



**HAL**  
open science

# Caractérisation de gènes de la famille des alcool deshydrogénases et alcool acyl transférases chez le melon cantaloup charentais

Daniel Manriquez

► **To cite this version:**

Daniel Manriquez. Caractérisation de gènes de la famille des alcool deshydrogénases et alcool acyl transférases chez le melon cantaloup charentais. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2006. Français. NNT : 2006INPT010A . tel-04580997

**HAL Id: tel-04580997**

**<https://ut3-toulouseinp.hal.science/tel-04580997>**

Submitted on 21 May 2024

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

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

N° d'ordre : 2351

## **THÈSE**

**Présentée pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**Ecole doctorale : S.E.V.A.B.**

**Filière : Qualité et Sécurité des Aliments**

### **TITRE**

**CARACTERISATION DE GENES DE LA FAMILLE DES ALCOOL  
DESHYDROGENASES ET ALCOOL ACYL TRANSFERASES CHEZ**

**LE MELON CANTALOUPE CHARENTAIS**

par

**Daniel MANRÍQUEZ**

Soutenu le 26 Juin 2006  
devant le jury composé de :

M. Mondher BOUZAYEN  
M. Michel PITRAT  
M. Pravendra NATH  
M. Jean-Claude PECH  
M. Alain LATCHE  
M. Julio RETAMALES

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Co-directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Membre

**Laboratoire Génomique et Biotechnologie des Fruits, UMR INRA/INP-ENSAT N° 990  
Chemin de Borde Rouge - BP 62307 - 31326 Castanet Tolosan Cedex**



## AVANT PROPOS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INP-ENSAT) dans l'UMR990 INRA/INP-ENSAT « Génomique et Biotechnologie des Fruits » dirigé par le Professeur Mondher Bouzayen.

Je voudrais bien remercier mes deux directeurs de thèse le Dr. Alain Latché et le Professeur Jean Claude Pech qui m'ont accueilli et confié ce travail. Je les remercie sincèrement pour leur contribution à ma formation. Leurs conseils, suggestions et critiques animés de débats et discussions ont été constructifs et ont permis une bonne progression de ce travail.

Je remercie vivement les Professeurs Christian. Ambid et le Dr. Gustavo De Billerbeck pour leurs conseils.

Mes vifs remerciements pour les Dr. M. Pitrat et P. Nath pour avoir bien voulu être rapporteurs de ce travail et le Prof. Retamales d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ma plus sincère reconnaissance à toutes les personnes du laboratoire qui ont fait que chacun de nos jours de travail ont été plus faciles et agréables.

Je n'oublie pas de remercier mes grands amis et collègues du laboratoire avec lesquels j'ai partagé cette grande expérience de vie qu'est le doctorat : Dr. Borja Flores y Dra. Fabiola Jaimes Miranda. J'ai une attention particulière pour Luciano Lucchetta pour sa grande efficacité dans la collaboration sur la caractérisation biochimique des AAT et Cesar Luis Girardi qui m'a aidé dans la préparation du manuscrit et les formalités administratives.

Mes sincères remerciements au Conseil National de Science et de la Technologie du Chili (CONICYT) par ma bourse de doctorado.

Merci beaucoup à ma famille pour son appui inconditionnel et son amour. À Cynthia par son grand amour et pour marcher ensemble avec moi pendant ces belles années. Je te remercierai éternellement.

## SOMMAIRE

<b>ABRÉVIATIONS UTILISÉES</b> .....	7
<b>RESUME EN FRANÇAIS</b> .....	9
<b>RESUME EN ANGLAIS</b> .....	10
<b>RESUME EN ESPAGNOL</b> .....	11
<b>PRESENTATION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	13
<b>INTRODUCCION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	17
1. Importance économique du melon .....	17
2. Classification botanique des différents types de melons .....	17
3. Mécanismes de maturation des fruits .....	19
3.1 Fruits climactériques et non climactériques .....	19
3.2 Modèles d'étude de la maturation des fruits climactériques. Avantages et inconvénients du modèle melon.....	21
3.3 Apport croisé des différents modèles végétaux à la compréhension de la maturation des fruits y compris non climactériques. ....	23
3.4 Rôle de l'éthylène dans la maturation des fruits climactériques .....	24
4. Les arômes du melon nature, voies de biosynthèses et gènes impliqués .....	26
4.1 Les constituants aromatiques de melon .....	26
4.2 Voies de biosynthèse d'arômes.....	29
4.2.1 Biogenèse d'esters et d'alcools volatils à partir d'acides gras.....	29
4.2.2 Métabolisme des acides aminés .....	33
4.2.3 La formation des esters volatils .....	35
5. Régulation de la biosynthèse d'esters.....	37
5.1 Disponibilité du substrat .....	38
5.2 Régulation enzymatique.....	39
5.2.1 Facteurs génétiques.....	39
5.2.2 Facteurs hormonaux.....	39
5.2.3 Facteurs environnementaux .....	40
6. Transport et conjugaison des composés volatils .....	41
<b>CHAPITRE I</b> .....	43
<b>CARACTERISATION MOLECULAIRE ET BIOCHIMIQUE DE DEUX ALCOOL DESHYDROGENASES HAUTEMENT DIVERGENTES S'EXPRIMANT SPECIFIQUEMENT DANS LE FRUIT DE MELON</b>	43
Publication sous presse Plant Molecular Biology : Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening specific expression and distinct biochemical characteristics.	45
Abstract .....	46
Introduction .....	47
Material and methods .....	48
Plant material and postharvest treatments.....	48
RNA Isolation .....	48
Isolation and in silico analysis of Cm-ADH sequences .....	49
Real time quantitative RT-PCR .....	50
Expression of Cm-ADH.....	51
Purification of recombinant ADH and electrophoresis methods .....	51
ADH enzyme activity and kinetic parameters with recombinant proteins .....	52
ADH enzymes activity assay of melon fruit crude protein.....	52
Results and discussion.....	53

Sequence analysis of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 and predicted proteins .....	53
Expression of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 genes .....	59
Alcohol dehydrogenase activity of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 recombinant proteins towards various substrates in vitro .....	62
Kinetic parameters of recombinant Cm-ADHs proteins .....	64
ADH activity in fruit .....	65
Acknowledgements .....	68
<b>CHAPITRE II</b> .....	69
<b>CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'UNE FAMILLE D'ALCOHOL ACYLTRANSFERASES DE MELON. MISE EN EVIDENCE DU ROLE CRUCIAL D'UN RESIDU THREONINE POUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE</b> .....	69
Publication parue dans Plant Molecular Biology: Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. Plant Mol. Biol. 59: 343-360.	71
Abstract .....	71
Introduction .....	71
Materials and methods .....	72
Plant material and post harvest treatments .....	72
RNA isolation .....	72
Isolation and in silico analysis of Cm-AAT sequences .....	73
Real time quantitative RT-PCR .....	73
Expression of Cm-AAT and site-directed mutagenesis .....	74
Purification of recombinant AAT .....	74
AAT enzyme activity assay with recombinant proteins .....	74
AAT activity assay of melon fruit crude proteins .....	75
Results and discussion .....	75
The AAT gene family of melon and predicted proteins .....	75
Expression of Cm-AAT genes .....	77
Alcohol acyl-transferase activity of Cm-AAT recombinant proteins towards various substrates in vitro .....	80
Estimation of AAT activity during melon ripening with preferred substrates of each AAT protein .....	82
Search for the failure of Cm-AAT2 to produce volatile esters .....	84
Conclusion .....	86
Acknowledgements .....	86
<b>CHAPITRE III</b> .....	89
<b>CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE DIFFERENTES ALCOHOL ACYLTRANSFERASES IMPLIQUÉES DANS LA BIOSYNTHESES D'AROMES CHEZ LE MELON</b> .....	89
1. Introduction .....	91
2. Matériel et méthodes .....	93
2.1 Expression de Cm-AAT et mutagenèses dirigées .....	93
2.2 Purification des protéines recombinantes .....	93
2.3 Activité des enzymes recombinantes AAT .....	96
2.4 Détermination du pH de la température optimum .....	95
2.5 Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes et des protéines du fruit .....	95
2.6 Dissociation des multimères .....	96
2.7 Paramètres cinétiques .....	96
2.8 Etude des effets du CoA-SH .....	96

2.9 Elimination de l'interférence du CoA-SH formé par recyclage en l'acétyl CoA par la phosphotransacétylase.....	97
3. Resultats .....	98
3.1 Conditions optimales d'activité, pH et température.....	98
3.2 Masse moléculaire, structure polymérique et activité des protéines recombinantes .....	98
3.3 Masse moléculaire de l'AAT du fruit .....	102
3.4 Caractéristiques cinétiques des protéines recombinantes AAT1, AAT3, AAT4 et AAT2 mutée.....	105
3.5 Mise en évidence du rôle régulateur du CoASH (stimulateur ou inhibiteur) .....	105
3.6 Effets de l'élimination du CoASH sur les paramètres cinétiques au cours de la réaction.....	106
4. Discussion et conclusion	112
Discussion générale et perspectives	115
Références bibliographiques	119

## Abréviations utilisées

Aa	: Acide aminé
AAT	: alcool acyl-transférase
ACO	: Acide aminocyclopropane carboxylique oxydase
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADH	: alcool déshydrogénase
AS	: melon transgénique exprimant l'ACO antisens
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN(m)	: acide ribonucléique (messagers)
BCKDH	: «branched $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase»
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
DD	: Differential display
DTT	: Dithiothréitol
DO	: Densité optique
NAD(P)(H)	: Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (réduit)
FPLC	: Fast proteins liquid chromatography
JAP	: Jour après pollinisation
MCP	: 1-méthylcyclopropène
PM	: Poids moléculaire
pI	: Point isoélectrique
RT-PCR	: Reverse transcription-polymerase chain reaction
SAHH	: S-adénosyl homocystéine hydrolase
SAM	: S-adénosyl méthionine
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
SSC	: Sodium chloride citrate sodium
Tris	: Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
TPP	: Thiamine pyrophosphate
WT	: Melon non transformé (sauvage)



**CARACTERISATION DE GENES DE LA FAMILLE DES ALCOOL  
DESHYDROGENASES ET ALCOOL ACYL TRANSFERASES CHEZ LE MELON  
CANTALOUPE CHARENTAIS**

**RESUME**

L'arôme est un des attributs principaux de la qualité des fruits. Ces composés sont synthétisés au cours du processus de maturation. Leur synthèse est sous la dépendance de l'éthylène dans les fruits climactériques tels que le melon. Un pourcentage important des composés volatils contribuant à l'arôme de nombreux fruits est constitué par des esters. La voie de biosynthèse des esters à partir d'acides gras et des acides aminés est contrôlée par deux enzymes clés, l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'alcool acyl-transférase (AAT). L'ADH participe à l'interconversion des aldéhydes en alcools et fournit ainsi des substrats pour la formation des esters. Nous avons isolé dans cette thèse deux gènes fortement divergents codant pour des ADHs (15 % d'identité au niveau d'acide aminé) dans le melon cantaloupe Charentais (*Cucumis melo* variété *cantalupensis*). Cm-ADH1 appartient à une classe d'ADHs de moyenne longueur et Cm-ADH2 à une classe à courte chaîne. Les deux protéines exprimées dans la levure sont enzymatiquement actives. Cm-ADH1 a une forte préférence pour le NADPH comme cofacteur, tandis que Cm-ADH2 utilise préférentiellement le NADH. Les deux protéines sont plus efficaces comme réductases. Elles ont en effet des Kms 10 à 20 fois inférieurs pour la conversion des aldéhydes en alcools que pour la déshydrogénation des alcools en aldéhydes. Toutes les deux ont une forte préférence pour les aldéhydes aliphatiques. Cependant Cm-ADH1 est capable de réduire les aldéhydes ramifiés tels que le 3-méthylbutyraldéhyde alors que Cm-ADH2 en est incapable. Les deux gènes sont exprimés spécifiquement dans le fruit et leur expression augmente pendant la maturation. Les transcrits des deux gènes ainsi que l'activité ADH totale sont fortement réduites dans les melons AS-ACO (AS) et dans les melons non transformés (WT) traités avec 1-MCP, démontrant que l'éthylène exerce une régulation positive sur l'expression des deux gènes d'ADH.

L'AAT réalise l'acylation des alcools pour produire des esters. Nous démontrons dans cette thèse que le melon cantaloupe Charentais exprime au moins quatre gènes correspondant à l'AAT : *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3* et *Cm-AAT4*. Toutes les protéines codées par ces gènes, excepté Cm-AAT2, sont enzymatiquement actives et sont capables de produire des esters volatils lorsqu'elles sont exprimées dans la levure. Chacune de ces protéines montre des préférences spécifiques pour la formation d'esters. Cm-AAT1 est capable de produire des esters à courte et longue chaîne avec différents acyls-CoA, mais avec une préférence marquée pour la formation d'acétate d'E-2-hexenyl et d'hexanoate hexyle. Cm-AAT3 accepte également un grand nombre de substrats mais elle présente une préférence très forte pour la production d'acétate de benzylique. Quant à Cm-AAT4 elle produit presque exclusivement des acétates et a une forte préférence pour la formation d'acétate de cinnamoyl. Une mutagenèse dirigée a montré que l'absence d'activité de production d'esters volatils de Cm-AAT2 est liée à la présence d'un résidu 268 d'alanine à la place d'une thréonine alors que toutes les protéines actives étudiées jusque là possèdent cette thréonine. L'activité de chacune de ces trois protéines s'accroît fortement pendant la maturation du melon. Cependant, des melons antisens-ACC Oxydase (AS) qui ne produisent pas d'éthylène ont une très faible activité AAT. D'ailleurs, l'expression des 3 gènes *Cm-AAT* est fortement réduite dans le melon AS et après traitement de melons non transformés (WT) traités avec l'inhibiteur d'action de l'éthylène, 1-MCP. Ceci démontre que l'éthylène est le régulateur principal de l'expression de ces gènes.

Une étude biochimique des protéines recombinantes a été réalisée. Elle montre que les protéines ont une masse moléculaire de 200 kDa environ correspondant à des tétramères. Les protéines natives extraites de melon ont une masse moléculaire identique.

Les Km des trois protéines recombinantes (Cm-AAT1, Cm-AAT3 et Cm-AAT4) sont de 1,23, 1,9 et 0,15 mM vis-à-vis de l'acétyl CoA et 0,56, 0,67 et 0,32 mM vis-à-vis de l'alcool. Selon le niveau, le CoA-SH produit par la réaction peut être activateur ou inhibiteur. Des cinétiques réalisées en présence d'une enzyme capable d'éliminer l'interférence du CoA-SH (phosphotransacétylase) montrent en général un très forte diminution du Km vis-à-vis de l'acétyl CoA, sauf pour Cm-AAT3. Le Ki relatif à l'inhibition par le CoA-SH est voisin de -0,90 mM pour les trois enzymes.

Les données de cette thèse suggèrent que chacune des protéines AAT et ADH joue un rôle spécifique dans la biosynthèse d'esters volatils odorants chez le melon.

## **CHARACTERISATION OF GENES OF THE ALCOHOL DEHYDROGENASE AND ALCOHOL ACYLTRANSFERASE FAMILIES IN CANTALOUPE CHARENTAIS MELON**

### **ABSTRACT**

Aroma is one of the principal attributes of quality in fruits. Volatile compounds are synthesized during ripening. In climacteric fruit such as melon the synthesis of aroma volatiles is dependant upon ethylene. Esters represent a significant percentage of the volatile compounds participating in the flavor of many fruits. The esters biosynthesis pathway from fatty acids and amino acids is controlled by two key enzymes, alcohol dehydrogenase (ADH) and alcohol acyltransferase (AAT). ADHs perform the interconversion of aldehydes into alcohols thus providing substrates for the formation of esters. In this thesis, we have isolated two highly divergent ADH genes (15 % identity and the amino acid level) in cantaloupe Charentais melon (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). *Cm-ADH1* belongs to the class of medium-chain ADHs and *Cm-ADH2* to the class of short chain ADHs. The two proteins are enzymatically active when expressed in the yeast. *Cm-ADH1* has strong preference for NADPH as a cofactor, while *Cm-ADH2* employs preferentially NADH. Both of them exhibit better efficiency as reductases with Kms 10 to 20 times lower for the conversion of aldehydes into alcohols than for the dehydrogenation of alcohols into aldehydes. They show strong preference for aliphatic aldehydes but *Cm-ADH1* is able to reduce branched aldehydes such as 3-methylbutyraldehyde, while *Cm-ADH2* cannot. The two ADH genes are expressed specifically in fruit and the expression increases during ripening. Gene expression and total ADH activity are strongly reduced in antisense-ACO (AS) melon and in wild type (WT) melons treated with the ethylene inhibitor 1-MCP, indicating a positive regulation by ethylene.

AAT is involved in the acylation of alcohols to produce esters. We demonstrate in this thesis that cantaloupe Charentais melon express at least four members of the AAT gene family: *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3* and *Cm-AAT4*. All the encoded proteins, except *Cm-AAT2*, were active in the production of esters when expressed in the yeast. Each of them shows specific preferences for the formation of esters. *Cm-AAT1* is able to produce short and long-chain esters with different acyls-CoA, with a marked preference for the production of E-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate. *Cm-AAT3* also accepts a great number of substrates but has a very strong

preference for the production of benzyl acetate. Cm-AAT4 produces almost exclusively acetates, with a strong preference for cinnamoyl acetate. A site directed mutagenesis showed that the failure of Cm-AAT2 to produce esters is related to the presence of a 268-alanine residue instead of a threonine. Threonine is present in all other AATs so far characterized for being active in the formation of ester volatiles. The activity of each of the three proteins increases during ripening of untransformed wild type (WT) fruit. However, antisense-ACO (AS) melon in which ethylene production is inhibited show very low AAT activity. The expression of all three genes is strongly reduced in AS melon and in WT melon treated with 1-MCP, indicating a positive regulation by ethylene.

A biochemical study of the recombinant proteins has been performed. It shows that proteins have a molecular mass of around 200 kDa corresponding to tetramers. Native proteins extracted from the melon have the same molecular mass. The  $K_m$  of all three recombinant proteins (Cm-AAT1, Cm-AAT3 and Cm-AAT4) are of 1.23, 1.9 et 0.15 mM towards acetyl CoA and 0.56, 0.67 and 0.32 mM towards the alcohol. Depending on the level, CoA-SH resulting from the reaction can be either activator or inhibitor. Kinetic studies performed in the presence of an enzyme capable of removing the interference of the CoA-SH (phosphotransacetylase) show in general a very strong decrease of the  $K_m$  towards acetyl CoA, except for Cm-AAT3. The  $K_i$  related to the inhibition by CoA-SH is close to -0.90 mM for the three enzymes.

The data of this thesis suggest that the AAT and ADH protein plays a specific role in the biosynthesis of odorant ester volatiles in melon.

## **CARACTERIZACIÓN DE GENES DE LA FAMILIA ALCOHOL DESHIDROGENASA Y ALCOHOL ACYL TRANSFERASA EN MELON CANTALOUPE CHARENTAIS**

### **RESUMEN**

El aroma es una de los principales atributos de calidad en frutas. Los compuestos volátiles son sintetizados durante la maduración. En frutos climatéricos como el melón la síntesis de los compuestos volátiles del aroma es dependiente del etileno. Los ésteres representan un porcentaje significativo de los compuestos volátiles que son parte del sabor de muchos frutos. La ruta de biosíntesis de los ésteres a partir de ácidos grasos y de aminoácidos es controlada por dos enzimas, alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol acyl transferasa (AAT). Las ADHs realizan la interconversión de aldehídos en alcoholes proporcionando así los substratos para la formación de ésteres. En este trabajo de tesis, hemos aislado dos genes ADH altamente divergentes (15 % de la identidad a nivel de aminoácidos) de melón Cantaloupe Charentais (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Cm-ADH1 pertenece a la clase de ADHs de cadena-media y Cm-ADH2 a la clase de ADHs de cadena corto. Ambas proteínas son enzimáticamente activas cuando son expresadas en levadura. Cm-ADH1 tiene una preferencialmente fuerte por NADPH como cofactor, mientras que Cm-ADH2 emplea preferencial NADH. Las dos enzimas muestran una eficacia mayor como reductasas, con  $K_m$ s 10 a 20 veces más bajo para la conversión de aldehídos en los alcoholes que para el deshidrogenación de alcoholes en aldehídos. Las dos enzimas muestran una fuerte preferencia por aldehídos alifáticos pero Cm-ADH1 es capaz de reducir aldehídos ramificados tales como 3-metilbutiraldehído, mientras Cm-ADH2 no puede reducir este tipo de sustratos. Los dos genes ADH se expresan específicamente en fruto y la expresión de los mismos aumenta en el curso de la maduración. La expresión de los genes y la actividad total de las ADH se ve fuertemente reducida en el melón antisentido ACO (AS) y en el melón tipo silvestre (WT) tratado con el inhibidor de la acción del etileno 1-MCP, indicando una regulación positiva por el etileno.

AAT está implicada en la acilación de alcoholes para producir ésteres. En este trabajo de tesis hemos demostrado que en el melón Cantaloupe Cahrentais existen por lo menos cuatro miembros de la familia de genes AAT: *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3* y *Cm-AAT4*. Todas las proteínas codificadas por dichos genes, excepto *Cm-AAT2* son activas en la producción de ésteres cuando son expresadas en levadura. Cada uno de ellas muestra preferencias específicas en la formación de ésteres. *Cm-AAT1* puede producir ésteres de corta y larga cadena con diversos acils-CoAs, con una marcada preferencia por la producción del acetato de E-2-hexenilo y de hexanoato hexilo. *Cm-AAT3* también acepta una gran cantidad de sustratos pero tiene una preferencia muy fuerte por la producción del acetato benzilo. *Cm-AAT4* produce casi exclusivamente acetatos, con una preferencia fuerte por acetato del cinamilo. Una mutagénesis dirigida demostró que la falta de actividad en la formación de ésteres de *Cm-AAT2* está relacionada con la presencia de un residuo alanina en posición 268 en vez de un treonina. Esta treonina está presente en el resto del AATs caracterizadas hasta ahora como activas en la formación de ésteres volátiles. La actividad de cada uno de las tres proteínas aumentó el curso de la maduración del fruto de melón salvaje no transformado (WT). Sin embargo, en frutos de melón antisentido-ACO (AS) en el cual la producción del etileno es inhibida la actividad AAT fue muy baja. La expresión de los tres genes es reducida fuertemente tanto en el melón AS como en el melón WT tratado con 1-MCP, indicando una regulación positiva por el etileno.

Se realizó un estudio bioquímico de las proteínas AAT recombinantes fue realizado, demostrando que las proteínas tienen poseen una masa molecular de alrededor de 200 kDa que corresponde a un tetrámero. Las proteínas nativas extraídas de melón tienen la misma masa molecular. Los  $K_m$  de las tres proteínas recombinantes (*Cm-AAT1*, *Cm-AAT3* y *Cm-AAT4*) son de 1,23, 1,9 y 0,15 mM para acetyl-CoA y de 0,56, 0,67 y 0,32 mM para el alcohol. Dependiendo del nivel, el CoA-SH producto de la reacción puede actuar tanto como activador o inhibidor de la misma.

Estudios de cinética realizados en la presencia de una enzima capaz de remover la interferencia demostrada del CoA-SH (fosfotransetilasa) mostraron en general una disminución muy fuerte del  $K_m$  para el acetyl-CoA, excepto para *AAT3*. El  $K_i$  relativo a la inhibición por CoA-SH es alrededor de -0.90 mM para las tres enzimas.

Los datos de esta tesis sugieren que las proteínas ADH y AAT desempeñan un papel específico en la biosíntesis de los ésteres volátiles del aroma de melón.

## PRESENTATION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

La qualité sensorielle des fruits englobe un ensemble de propriétés telles que le goût sucré, l'acidité, l'arôme, la fermeté et la couleur qui sont associées à des voies métaboliques spécifiques et qui sont généralement coordonnées pendant le processus de maturation. Le développement des caractères de qualité dépend de nombreux facteurs tels que la variété, les conditions de culture, le stade de la récolte, et les conditions de stockage. Chez les fruits climactériques, l'hormone l'éthylène contrôle la plupart des événements de maturation et donc la plupart des voies métaboliques responsables de la qualité sensorielle (Lelièvre *et al.*, 1997; Giovannoni, 2004). De plus, l'éthylène contrôle la vitesse de maturation et la durée de conservation post-récolte.

L'augmentation de la durée de conservation a été un des buts principaux des sélectionneurs dans les dernières décennies et ceci a été généralement accompagné d'une perte de saveur. Dans le cas des melons Cantaloup Charentais par exemple, les génotypes traditionnels à maturation rapide et présentant une phase climatérique intense et de courte durée ont été remplacés sur le marché par les variétés de moyenne ou longue conservation qui sont considérées comme étant de qualité sensorielle inférieure par les consommateurs. Parmi les caractères de maturation, les arômes sont particulièrement affectés dans les génotypes de longue conservation. Chez le melon, comme chez d'autres fruits climactériques, une relation inverse existe entre l'intensité de production d'éthylène et la durée de conservation (Gussman *et al.*, 1993; Zheng et Wolff, 2000). Les melons ayant un pic d'éthylène très prononcé tels que le Cantaloup Charentais (groupe *cantalupensis*) ont une durée de conservation plus courte et produisent plus d'arômes que les cantaloups ou rockmelons américains (groupe *reticulatus*) qui produisent beaucoup moins d'éthylène. Les melons non-climactériques tels que les cassabas et les «piel de sapo» (groupe *inodorus*) ont une longue durée de conservation et une production d'arôme faible ou nulle. Le caractère climactérique et son intensité constituent donc des éléments déterminants de la vitesse

de maturation, de la durée de conservation et de la qualité sensorielle chez le melon. Il en est de même chez de nombreux fruits.

Afin d'évaluer les effets de l'éthylène sur la maturation du fruit, des melons Cantaloup Charentais ont été transformés avec une construction d'un ADN antisens codant pour l'ACO2 oxydase (ACO) sous le contrôle du promoteur 35S (Ayub *et al.*, 1996). L'ACO est l'enzyme responsable de la dernière étape de biosynthèse de l'éthylène. Une lignée de melon antisens ACO a présenté une réduction de la production d'éthylène de plus de 99,5%, ce qui a eu pour conséquence d'inhiber un certain nombre de phénomènes de la maturation y compris une forte inhibition de la production de composés volatils. Bauchot *et al.* (1998) ont démontré, en utilisant des hybrides de melons Charentais issus d'un croisement d'une lignée sauvage avec une lignée antisens ACO, que l'inhibition de la synthèse d'éthylène due aux antisens ACO se traduisait par une réduction de la synthèse des composés odorants totaux de 60 à 80% par rapport aux témoins ne possédant pas l'antisens ACO. Les composés les plus importants dans l'arôme du melon Charentais sont des esters. Ceux-ci sont issus soit de la réduction des acides gras pour les esters aliphatiques, soit de la décarboxylation des acides aminés pour les esters ramifiés (Paillard, 1979; Schreier, 1984; Heath et Reineccius, 1986; Walter et Steffens, 1990; Wyllie et Leach, 1990; Sanz *et al.*, 1997; Fujiki *et al.*, 2000; Wyllie et Fellman, 2000). L'inhibition de la synthèse d'éthylène affecte les esters au premier chef. Les étapes métaboliques auxquelles leur biosynthèse est contrôlée par l'éthylène ont été déterminées en utilisant des disques de fruits témoins ou antisens ACO mis en présence de divers précurseurs de la voie de biosynthèse des esters (Flores *et al.* 2002). Il en ressort que l'étape de réduction des acides gras en aldéhydes était essentiellement un processus éthylène-dépendant, alors que la dernière étape de la formation d'ester n'était que partiellement régulée par l'éthylène.

Les recherches sur les arômes ont surtout porté jusque là sur le recensement des composés volatils émis au moyen de méthodes de plus en plus sophistiquées faisant appel en particulier à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). On a pu ainsi

déterminer que les composés aromatiques volatils émis par des melons Charentais correspondent principalement à un mélange complexe d'esters, d'aldéhydes et d'alcools saturés et insaturés ainsi que de composés soufrés (Homatidou *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1995; Beaulieu et Grimm, 2001). Les esters aliphatiques et ramifiés représentent la plus grande partie des composés volatils odorants et contribuent pour l'essentiel à l'arôme du melon. Par des méthodes de traceurs radioactifs, il a été montré que la chaîne de biosynthèse des esters comprend deux étapes de réduction des acides gras en aldéhydes et des aldéhydes en alcools. Des études de biochimie enzymatique ont permis de caractériser des alcool deshydrogénases (ADH) qui interviennent dans la voie de biosynthèse des esters en réalisant l'interconversion des aldéhydes en alcools et en fournissant ainsi des substrats pour la formation des esters (Speirs *et al.*, 1998; Wyllie et Fellman, 2000 ; Speirs *et al.*, 2002). La dernière étape de formation des esters est catalysée par des acyl-transférases (AAT) qui transfèrent un résidu acyl fixé sur un acyl-CoA sur un alcool (Harada *et al.*, 1985). Ces enzymes sont capables de combiner différents alcools et résidus acyl, ce qui engendre un grand nombre d'esters différents et contribue à la grande diversité des esters émis par le fruit.

Au début de ce travail on disposait de peu de données sur les gènes impliqués dans la biosynthèse d'esters chez les fruits. Chez la tomate un gène d'ADH a été isolé (Longhurst *et al.*, 1994). Sa sur-expression dans la tomate a conduit à une amélioration de la qualité aromatique démontrant ainsi le rôle important de ce gène dans la production d'arômes dans le fruit (Speirs *et al.*, 1998). En ce qui concerne les AAT, un gène a été caractérisé et identifié fonctionnellement chez la fraise (Aharoni *et al.*, 2000). Chez le melon Charentais, un gène nommé *Mel2*, codant putativement pour une protéine AAT a été isolé (Aggelis *et al.*, 1997). La fonction de ce gène, nommé Cm-AAT1, a été identifiée ultérieurement par expression hétérologue dans la levure (El-Yahyaoui *et al.*, 2002).

Le travail présenté dans cette thèse a consisté en la poursuite des recherches initiées par El-Yahyaoui au laboratoire afin d'approfondir les connaissances sur les gènes de biosynthèse

d'esters chez le melon. Il a consisté en la caractérisation moléculaire de gènes de la famille des alcool acyl transférases et alcool deshydrogénases et en l'étude biochimique des propriétés enzymatiques des protéines recombinantes correspondantes.

Ce manuscrit de thèse comportera tout d'abord une **étude bibliographique** sur les mécanismes de la maturation du melon et les problèmes liés à la qualité sensorielle de ce fruit, en particulier des arômes. Cette introduction bibliographique insistera particulièrement sur les connaissances acquises en matière de composés aromatiques du melon, les voies de biosynthèse, les mécanismes de régulation ainsi que sur les enzymes et les gènes caractérisés jusque là.

**Le premier chapitre** portera sur la caractérisation de deux alcool deshydrogénases hautement divergentes présentant une expression maturation-spécifique et ayant des caractéristiques enzymatiques spécifiques.

**Le deuxième chapitre** portera sur la caractérisation fonctionnelle d'une famille de gènes codant pour des alcool acyl transférases. On démontrera leur expression spécifique pendant la maturation, la spécificité de substrats de chacune des protéines ainsi que le rôle crucial d'un résidu thréonine dans l'activité enzymatique.

**Le troisième chapitre** consistera en une caractérisation approfondie des propriétés enzymatiques des AATs de melon. En particulier on montrera que les protéines recombinantes et natives sont des tétramères et que leur activité peut être stimulée ou inhibée par le produit de la réaction, le CoA-SH.

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Importance économique du melon

Les melons comestibles (*Cucumis melo* L) constituent des cultures importantes dans les régions tropicales et sub-tropicales, mais ils sont également cultivés de façon intense dans les régions tempérées. Selon la FAO ([www.FAO.org](http://www.FAO.org)), la production mondiale de Cantaloups et d'autres melons a été d'environ 27 million de tonnes en 2004 dont près de 70% cultivés en Asie (Tableau 1). En raison de la grande diversité de la famille des Cucurbitacées, les melons représentent seulement environ 15% de la production totale de cucurbitacées (179 millions de tonnes), dont approximativement 80% (145 millions de tonnes) sont cultivés en Asie. Lorsqu'on compare avec la production d'autres fruits charnus tropicaux, les melons arrivent au 4<sup>ème</sup> rang après les agrumes (plus de 100 million de tonnes), la pastèque (plus de 90 million de tonnes) et les bananes (près de 70 million de tonnes), avant les mangues, les ananas et les papayes (Tableau 2).

### 2. Classification botanique des différents types de melons

Trente deux espèces de *Cucumis* ont été recensées (Kirkbride 1993). Le genre peut être divisé en un sous-genre *Cucumis* avec seulement deux espèces, le concombre (*Cucumis sativus* L.) et *C. hystrix* Chakravarty, toutes les deux originaires d'Asie, et un sous-genre *Melo* avec 30 espèces incluant le melon cultivé (*C. melo* L.) d'origine africaine. Au sein du sous-genre *Melo*, *C. anguria* L. and *C. metuliferus* Meyer (ex Naudin) sont également cultivés, mais à plus petite échelle que le melon ou le concombre. *C. sativus* a un nombre haploïde de chromosomes (n) de 7, alors que toutes les autres espèces ont n = 12, certaines étant tetraploïdes ou hexaploïdes. Des melons à petits fruits ronds ou ovales de 20 à 50 g sont rencontrés communément en Afrique. Probablement le melon a été d'abord domestiqué pour ses graines, comme d'ailleurs d'autres cucurbitacées telles que la pastèque (*Citrullus*) et la courge (*Cucurbita*), en raison de l'amertume de la chair. Au Soudan, le type «seinat» est encore cultivé pour ses graines. Selon leur utilisation, les cultivars de melon peuvent être divisés en trois groupes principaux: (i) ceux dont les fruits ne

sont pas sucrés à maturité, qui sont récoltés à un stade immature et qui sont consommés crus, au vinaigre ou cuits, (ii) ceux qui sont sucrés et récoltés à maturité et (iii) ceux qui ne sont pas consommables et qui sont utilisés pour leur parfum. Parmi les groupes mineurs rencontrés aujourd'hui, certains melons sont cultivés pour leurs feuilles en Afrique du Sud (Vorster et Jansen van Rensburg 2004). Jeffrey (1980) a proposé de diviser *C. melo* en deux sous-espèces selon la pilosité de l'ovaire, la sous-espèce *agrestis* avec des poils courts que l'on rencontre de l'Inde à l'Extrême Orient et la sous-espèce *melo* avec de longs poils que l'on rencontre de l'Inde à l'Asie centrale au proche Orient, en Europe et en Amérique (Tableau 3). Les deux sous-espèces pourraient correspondre à deux domestications indépendantes. Les melons sauvages peuvent avoir, selon les cas, des poils ovariens longs ou courts. Au sein de ces deux sous-espèces, différents groupes botaniques ou *varietas* ont été définis selon les caractères des fruits. La classification de Naudin (1859) en 10 *varietas* a constitué une base utilisée dans des travaux ultérieurs. Une meilleure connaissance des melons d'Asie centrale et d'Extrême Orient a conduit à définir un plus grand nombre de *varietas*. Par exemple, *momordica* se caractérise par une structure farineuse non sucrée à maturité, un épiderme très mince, et l'éclatement du fruit à maturité. On le rencontre seulement en Inde. *Flexuosus* présente des fruits longs à très longs (jusqu'à 2 m) et sont connus sous le nom de melon serpent, melon concombre, fakouss, adjour et kakri. Ils sont consommés crus en salade et sont cultivés du Maroc à l'Égypte, Turquie, Irak et Inde. *Conomon* ressemble à, et est consommé comme un concombre et est cultivé en Chine, Corée et Japon. Le groupe *cantalupensis* est défini par ses fruits ronds côtelés à chair orange et à l'arôme typique. Les fruits du groupe *reticulatus* sont caractérisés par une broderie de l'épiderme. Ces deux sous-groupes sont parfois combinés par certains auteurs en un seul groupe *cantalupensis*. Le groupe *inodorus* est caractérisé par des fruits non climactériques émettant peu d'arôme. Les fruits peuvent être très sucrés et certains ont une longue conservation. Les culti-groupes Cassaba, Tendral, Amarillo, Honeydew, Piel de sapo et Kirkagac, appartiennent au groupe *inodorus*. *Dudaim* constitue un groupe botanique original avec des fruits de la taille d'une orange; les fruits ne sont

pas sucrés, mais ils ont un arôme très puissant et typique. Ce type de fruit est cultivé en Asie, depuis la Turquie jusqu'en Afghanistan.

De nombreuses tentatives ont été faites pour générer des croisements interspécifiques en utilisant la pollinisation conventionnelle entre *C. melo* et d'autres espèces de *Cucumis*, principalement *C. metuliferus* et *C. sativus*. Malgré certains résultats publiés (Norton and Granberry 1980; Fanourakis 1988; Lebeda *et al.*, 1997), aucun caractère horticole n'a pu être transféré du melon à une autre espèce ou *vice versa*.

Tableau 1. Production de melons Cantaloups et d'autres melons par comparaison avec le total des cucurbitacées dans différentes régions du monde en 2005 (<http://www.FAO.org/>)

		Afrique	Asie	Europe	Amérique Nord + Centrale	Amérique Sud	Monde
Cantaloups + autres melons	Million tonnes	1.5	20.5	3.2	2.5	0.6	28.3
	Million Ha	0.07	0.9	0.14	0.13	0.05	1.3
Cucurbitacées	Million tonnes	8.1	149.4	14.5	9.8	3.5	184.7
	Million Ha	0.66	6.47	0.76	0.57	0.25	8.7

Tableau 2. Production mondiale de Cantaloups et autres melons par comparaison avec les principaux fruits tropicaux frais en 2005 (<http://www.FAO.org/>)

Rang pour la production	Type de fruit	Production Million tonnes	Surface Million Ha
1	Agrumes	105.43	7.6
2	Pastèque	95.13	3.41
3	Banane	72.62	4.45
4	Cantaloups + autres melons	28.33	1.30
5	Mangue	27.96	3.87
6	Ananas	15.88	.85
7	Papaye	6.75	.38

### 3. Mécanismes de maturation des fruits

#### 3.1 Fruits climactériques et non-climactériques

La maturation des fruits correspond à un ensemble de modifications biochimiques, physiologiques et structurales qui confèrent au fruit ses qualités organoleptiques et le rendent

consommable. Bien que ces processus varient d'un type de fruit à un autre, on classe les fruits en deux catégories, climactériques et non climactériques (Biale, 1964). Le classement dans l'une ou l'autre de ces deux catégories dépend de la présence ou non d'une crise respiratoire et d'un pic de synthèse d'éthylène au moment de la maturation (McMurchie *et al.*, 1972). L'augmentation brutale de synthèse d'éthylène observée chez les fruits climactériques est considérée comme responsable des modifications de couleur, d'arômes, de texture, de saveur et d'autres paramètres biochimiques et physiologiques. A l'inverse, chez les fruits non-climactériques, on considère que les modifications survenant au cours de la maturation ne sont pas dépendantes de l'éthylène et on ignore les facteurs de régulation impliqués.

Tableau 3. *Varietas* de melons au sein des sous-espèces (Jeffrey, 1980) et utilisations du fruit.

Caractéristiques	Subsp. <i>agrestis</i>	Subsp. <i>melo</i>
“légume” (non sucré) habituellement récolté immature	<i>conomon</i> <i>momordica</i> <i>acidulus</i>	<i>chate</i> <i>flexuosus</i> <i>tibish et seinat</i>
“fruit” (sucré) habituellement récolté à maturité	<i>makuwa</i> <i>chinensis</i>	<i>cantalupensis</i> <i>reticulatus</i> <i>inodorus</i> <i>adana</i> <i>chandalak</i> <i>ameri</i>
“parfum”, non comestibles récolté à maturité		<i>dudaim</i>

Le melon Cantaloup Charentais qui a fait l'objet de cette thèse est un fruit typiquement climactérique (Hadfield *et al.*, 1995). D'autres types de melon tels que les melons Cantaloups américains ou les melons Galia sont également dans ce cas même si l'intensité du phénomène climactérique est plus réduite (Miccolis et Salveit, 1991). Par contre certains autres melons comme les Cassaba, Tendral, Amarillo, Honeydew, Piel de sapo et Kirkagac qui appartiennent au groupe *inodorus* sont non climactériques.

Il est possible que la crise climactérique soit le résultat du stress de la récolte. Des études avec des melons Charentais (Shellie and Saltveit, 1993), des tomates (Saltveit, 1993), des fruits de saskatoons (*Amelanchier alnifolia*) (Rogiers and Knowles, 1999) et des fruits de la passion

pourpres (Shiomi *et al.*, 1996) ont montré que le pic d'éthylène climactérique n'était pas accompagné par une crise respiratoire quand le fruit reste attaché à la plante pendant la maturation. Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence que l'accroissement d'éthylène et la crise climactérique respiratoire sont présents et simultanés chez les melons Charentais (Hadfield *et al.*, 1995) et les tomates (Andrews, 1995) lors de la maturation sur pied, même si ces processus peuvent être retardés par comparaison aux fruits détachés au même âge physiologique. Dans un travail ultérieur, Bower *et al.*, (2002) ont suivi la production d'éthylène et la consommation d'oxygène pendant la maturation de melons Charentais cultivés en France et en Australie. Tous les fruits qui ont mûri après détachement de la plante ont présenté à la fois une crise d'éthylène et de respiration. Chez les fruits mûris sur pied, l'accroissement de la production d'éthylène a toujours eu lieu, mais, la crise respiratoire était soit absente, soit réduite en intensité. La présence ou l'absence de crise respiratoire dans les fruits restés sur pied est donc affectée par des facteurs environnementaux influençant le développement des plantes. Ces résultats appuient l'hypothèse que la crise climactérique respiratoire ne constitue peut être pas un élément essentiel de la maturation, mais plutôt un artéfact causé par le stress de la récolte.

### **3.2 Modèles d'étude de la maturation des fruits climactériques. Avantages et inconvénients du modèle melon**

La tomate est le modèle d'étude de la maturation des fruits climactériques le plus utilisé pour plusieurs raisons: son importance économique, sa diploïdie, sa bonne production de graine et de fruits, la micropropagation, croisement entre lignées aisé, un cycle de développement court (45-100 jours), culture toute l'année sous serre. En plus de ces aspects, la tomate présente d'autres avantages comme un génome assez petit ( $n = 12$ ,  $C = 0,96 \cdot 10^6$  kb, 5 à 6 X chez *Arabidopsis thaliana*) pour lequel plus de 1000 marqueurs moléculaires ont été identifiés avec un espacement moyen de moins de 2 cM (Tanksley *et al.*, 1992). Les cartes génétiques ont été très utiles pour l'identification et la localisation de QTLs (Quantitative Trait loci) qui influencent de nombreux loci du développement, de la maturation et de la qualité du fruit (Bucheli *et al.*, 1999). Des

banques génomiques sont disponibles et un programme de séquençage systématique du génome à partir de plus de 20 banques d'ADNc de différents tissus a été initié. La base de donnée <http://www.tigr.org/tdb/lgi/index.html> contient environ 30000 ESTs. De plus, des microarrays d'ADNc et d'oligonucléotides sont disponibles.

Dans ce contexte, quelles sont les caractéristiques particulières du melon et les raisons de s'intéresser à ce fruit pour des études de maturation. L'importance économique de ce fruit est loin d'être négligeable comme on l'a montré plus haut. Le melon cultivé est diploïde avec  $2n = 2x = 24$  chromosomes. *C. melo* a un petit génome, estimé à 450-500 Mbp (1C) (Arumanagathan et Earle, 1991), similaire à celui du riz, 3,5 fois celui d'*Arabidopsis thaliana* et presque la moitié de celui de la tomate. Par ailleurs, le melon est une espèce très polymorphe quant aux caractéristiques des fruits et à la résistance aux maladies. L'héritabilité de certains de ces caractères a été étudiée et de nombreux gènes et QTLs ont été décrits. Certains ont même été localisés sur des cartes génétiques. Les cartes génétiques les plus récentes ont été publiées par Baudracco-Arnas et Pitrat (1996), Wang *et al.* (1997), Oliver *et al.* (2001), Danin-Poleg *et al.* (2002) et Périn *et al.* (2002b). La construction d'une carte consensus par combinaison de ces cartes complémentaires est en cours au sein d'un consortium international impliquant des partenaires privés. Parmi les cucurbitacées, le melon est l'espèce pour laquelle la cartographie est la plus avancée.

La petite taille du génome de melon (450 Mb) et la disponibilité d'une carte génétique saturée avec un rapport moyen de distance physique/génétique de 280 kb cM<sup>-1</sup>, constituent des caractéristiques favorables pour le clonage positionnel de gènes cibles. Tirant avantage des méthodes à haut débit d'extraction d'ADN et de génotypage, une cartographie fine est actuellement en cours. Des outils moléculaires ont été développés chez le melon. Des banques BAC sont disponibles et ont été utilisées pour le clonage positionnel ou des études de synténie (Luo *et al.* 2001; van Leeuwen *et al.* 2003; Park *et al.*, 2004). La première étape pour le clonage positionnel consiste en une cartographie fine de la région renfermant le gène d'intérêt. Cette

stratégie a permis le clonage des gènes *Vat*, *Fom-2* et *nsv* (Pitrat 2002). Une banque d'ESTs avec 3731 séquences (2467 unigènes) peut être consultée en ligne (<http://melon.bti.cornell.edu/>). Une autre banque d'EST a été utilisée pour identifier du polymorphisme nucléotidique (Morales *et al.*, 2004). Le consortium international mentionné plus haut s'est donné également pour objectif d'enrichir la banque d'ESTs. Un grand avantage du melon pour l'étude de la maturation du fruit est que cette espèce, comme cela a été souligné plus haut comprend des génotypes climactériques et non climactériques. Ceci a permis d'étudier les bases génétiques du phénomène climactérique (Périn *et al.*, 2002 ). La génération de lignées recombinantes par croisement d'un melon typiquement climactérique (Cantaloup Charentais du group *cantalupensis*) avec un melon non climactérique (PI 161375 du groupe *agrestis chinensis*) a permis de démontrer que le caractère climactérique est conféré par deux loci dupliqués seulement, ce qui pourrait conduire par cartographie fine et clonage positionnel à l'isolement du (des) gène(s) responsable(s).

Il est un domaine dans lequel le melon présente un grand intérêt, c'est celui des arômes, particulièrement le Cantaloup Charentais. En effet, ce type de melon est caractérisé par une grande richesse et une grande intensité aromatique. Comme on le verra plus loin, l'arôme de melon comprend un ensemble de composés volatils parmi lesquels des esters aliphatiques et ramifiés et des composés soufrés (Homatidou *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1995; Beaulieu et Grimm, 2001).

Une des difficultés rencontrées avec le melon est sa durée de cycle relativement longue et la quasi impossibilité de culture toute l'année. On peut réaliser seulement deux cycles annuels. Par ailleurs la transformation génétique est plus difficile que chez la tomate. Cependant, l'efficacité des méthodes de transformation a été grandement améliorée et leur application à une vaste gamme de génotypes est maintenant possible (Akasaka-Kennedy *et al.*, 2004).

### **3.3 Apport croisé des différents modèles végétaux à la compréhension de la maturation des fruits y compris non climactériques**

Il est évident que l'étude de la maturation des fruits peut bénéficier des avancées obtenues sur d'autres espèces modèles ne produisant pas de fruits charnus tels qu'*Arabidopsis*. Par

exemple, des mutants d'*Arabidopsis* ont permis d'élucider une grande partie de la voie de perception et de transduction du signal éthylène (Stepanova et Ecker, 2000) dont les retombées ont été importantes pour la compréhension de la maturation des fruits climactériques. Les études de génétique mentionnées plus haut sur le déterminisme génétique du caractère climactérique chez le melon pourront avoir des retombées sur les autres fruits.

Pour les fruits non-climactériques, sans doute en raison du fait que l'éthylène ne joue pas de rôle régulateur de l'ensemble des processus, il n'existe pas de modèle prédominant. De plus, le développement des outils moléculaires et de génomique chez ce type de fruits a été plus lent. On notera cependant que des efforts ont été faits dans ce sens chez la fraise (Aharoni *et al.*, 2000) et que des initiatives de développement de la génomique sont en cours sur le raisin (Waters *et al.*, 2005). Les agrumes dont l'importance économique est considérable et qui ont fait l'objet de nombreuses études physiologiques et moléculaires, pourraient également être considérés comme modèle de maturation des fruits non-climactériques. Dans ce cas d'ailleurs, la dégradation des chlorophylles a fait l'objet d'études génétiques ayant conduit à l'isolement du gène codant pour une chlorophyllase (Trebitsh *et al.*, 1993) et à la découverte de sa régulation par l'éthylène (Jacob-Wilk *et al.*, 1999). Cette donnée montre bien que la maturation de type non climactérique comporte des événements régulés par l'éthylène. Inversement, nous verrons ci-après que la maturation des fruits climactériques présente des composantes indépendantes de l'éthylène. La découverte de facteurs de transcription de type MADS box intervenant dans le développement de la maturation chez la tomate (Vrebalov *et al.*, 2002) aura sans doute des retombées chez d'autres fruits, en particulier non climactériques. En effet ces gènes sont présents chez tous les types de fruits.

### **3.4 Rôle de l'éthylène dans la maturation des fruits climactériques**

Au cours des deux dernières décades, avec l'apparition des méthodes et concepts de la biologie moléculaire, la maturation est apparue comme un phénomène de développement génétiquement programmé et impliquant l'expression de gènes spécifiques (Grierson, 1986). Les

mécanismes de maturation des fruits climactériques ont de loin été les plus étudiés en raison du rôle majeur de l'éthylène et des progrès importants réalisés dans la connaissance de la biosynthèse (Sato et Theologis, 1989 ; Van der Straeten *et al.*, 1990 ; Hamilton *et al.*, 1991 ; Spanu *et al.*, 1991 ; Pech *et al.*, 2005) et de l'action de cette hormone (Ecker, 1995 ; Jonhson et Ecker, 1998, Stepanova et Ecker, 2000 ; Underwood *et al.*, 2005).

De nombreuses revues ont été consacrées aux mécanismes de maturation des fruits en termes biochimiques, physiologiques et moléculaires (Pech *et al.*, 2002 ; Giovannoni, 2001 ; Lelièvre *et al.*, 1997 ; Brady, 1987, Alexander et Grierson, 2002 ; Giovannoni, 2004). Dans ce paragraphe, nous résumerons brièvement les mécanismes généraux de la maturation des fruits climactériques et le rôle de l'éthylène.

La création de lignées transgéniques de tomate (Murray *et al.*, 1993 ; Picton *et al.*, 1993 ; Theologis *et al.*, 1993) et de melon (Ayub *et al.*, 1996) dont la synthèse d'éthylène a été inhibée à l'aide d'une construction *ACO* ou *ACS* en orientation anti-sens ont permis de distinguer les phénomènes du mûrissement qui dépendent de l'éthylène et ceux qui ne dépendent pas de l'éthylène. Le changement de couleur peut être dépendant ou indépendant de l'éthylène en fonction du pigment et du type de fruit. Par exemple, l'accumulation du lycopène dans les tomates ne produisant plus d'éthylène est fortement réduite (Oeller *et al.*, 1991 ; Murray *et al.*, 1993). Par contre, dans le melon, la synthèse de caroténoïdes est un phénomène indépendant de l'éthylène (Guis *et al.*, 1997). La dégradation des chlorophylles est totalement dépendante de l'éthylène, en accord avec l'observation que l'éthylène stimule l'expression d'un gène codant pour une chlorophyllase (Jacob-Wilk *et al.*, 1999). L'accumulation des sucres et des acides n'est pas affectée par la présence d'éthylène. Le ramollissement et la détérioration des membranes sont partiellement contrôlés par l'éthylène. Par exemple, dans la famille de gènes codant pour une polygalacturonase (enzyme de la dégradation des parois) de melon, certains membres sont régulés par l'éthylène et d'autres non (Guis *et al.*, 1999). La synthèse d'arômes volatils est dépendante de l'éthylène dans la tomate et le melon (Baldwin *et al.*, 2000 ; Bauchot *et al.*, 1998), même si

certaines voies de biosynthèse des arômes échappent au contrôle de l'éthylène (Flores *et al.*, 2002). Ainsi, le mûrissement des fruits climactériques est un processus complexe dans lequel l'éthylène joue un rôle important en association avec d'autres hormones et des facteurs du développement. Ce processus met en jeu des mécanismes dépendants de l'éthylène mais aussi indépendants de l'éthylène (Pech *et al.*, 2002).

#### **4. Les arômes du melon : nature, voies de biosynthèses et gènes impliqués.**

##### **4.1 Les constituants aromatiques du melon**

Les variétés de melon (*C. melo*) diffèrent par leurs caractéristiques physiques et biochimiques. La concentration en sucre et l'arôme sont les deux facteurs les plus importants de la qualité perçue par le consommateur (Shalit *et al.*, 2001). L'arôme du melon cantaloup est constitué par un mélange complexe d'une centaine de molécules volatiles représentées majoritairement par les esters. Il existe également des composés soufrés dont certains sont d'ailleurs des esters qui sont importants pour donner la typicité aromatique du melon. Il existe des différences importantes entre les variétés de melon ; par exemple, les acétates sont les composés volatils principaux des fruits mûrs de la variété Arava, un melon climactérique commercialement important. En revanche, les aldéhydes et les alcools volatils sont les composés volatils les plus abondants de la variété Rochet, un melon non-climactérique (Shalit *et al.*, 2001).

Les données les plus nombreuses relatives aux composés volatils aromatiques émis par le melon concernent les melons Cantaloups de type américains, cv *reticulatus*. Beaulieu et Grimm (2001) ont recensé, dans les travaux réalisés jusque là, environ 240 composés volatils obtenus généralement après extraction par solvants. La méthode de Solid Phase Microextraction (SPME) est souvent utilisée depuis quelques années. Cette méthode n'utilise pas de solvant organique et nécessite un très faible volume d'échantillon. L'extraction consiste en un équilibre de partage entre une phase solide et une phase gazeuse ou liquide. Cette phase solide est un film polymère enrobant une fibre en verre de silice. Les solutés se concentrent dans la phase solide polymère et sont désorbés ensuite thermiquement et transférés vers la colonne de chromatographie en phase

gazeuse (GC). Beaulieu et Grimm (2001) ont identifié de cette façon 53 composés nouveaux, ce qui donne donc un total d'environ 300 composés émis par le melon cantaloup américain. Le melon Cantaloup Charentais est connu pour sa puissance aromatique. Cependant le nombre de travaux réalisés sur l'identification et la quantification des arômes de ce type de melon sont beaucoup moins nombreux (Homatidou *et al.*, 1992 ; Horvat et Senter, 1987). Homatidou *et al.* (1992) ont identifié 109 composés parmi lesquels se trouvent des esters, des alcools et des aldéhydes aromatiques et aliphatiques, des cétones, des  $\delta$ -lactones, des phénols, des acides aliphatiques, des terpénoïdes et des composés soufrés.

Les composés qui donnent la note de melon ont été décrits pour le melon Honeydew. Il s'agit des composés suivants : (z)-6-nonenyl acetate, (z,z)-3-6-nonadienyl acetate, (z)-3-non-enyl acetate, 3-methyl-2-butenyl acetate et ethyl (methylthio) acetate (Buttery *et al.*, 1982). Selon Homatidou *et al.* (1992) d'autres composés contribuent à donner l'arôme du melon Charentais: methyl (methylthio) acetate, 3-(methylthio) propane-1-nitrile, 3-(methylthio) propan-1-ol, ethyl (methylthio) acetate, 2-(methylthio) ethyl acetate, methyl 3-(methylthio) propanoate, ethyl 3-(methylthio) propanoate et 3-(methylthio) propyl acetate. Les composés volatils émis par une variété commerciale (Cézanne) de melon Cantaloup Charentais connue pour ses qualités aromatiques sont donnés dans le tableau 5.

La seule quantité d'un composé n'est pas suffisante pour expliquer son importance olfactive. Pour connaître l'importance odorante d'un composé émis par le fruit, on utilise la valeur olfactive ou odorante (VO) selon la formule suivante : (Figure 1). Cette valeur correspond à la concentration minimale dans l'eau perçue par le nez d'un dégustateur averti. Les valeurs VO de quelques composés volatils sont données sur le tableau 4.

$$VO = \frac{\text{Concentration d'ester (ng/mL)}}{\text{Seuil de perception olfactive dans l'eau (ng/mL)}}$$

Figure 1. Calcul de la valeur odorante (VO) des composés volatils.

Tableau 4 : Seuil de perception olfactive de quelques esters volatils d'après Takeoda *et al.*, 1991, 1992).

Esters	Seuils (ng/mL)
Acétate d'éthyle	5
Acétate de 2-méthylpropyle	65
Acétate de butyle	66
Acétate de 2-méthylbutyle	11
Acétate d'hexyle	2
2-méthyl propanoate d'éthyle	0.1
butanoate d'éthyle	1
hexanoate d'éthyle	1

Tableau 5. Principaux composés présents chez le melon cantaloup Charentais variété Cézanne (Aubert et Bourger, 2004)

Composés volatils	Concentration (µg/Kg)	
Ethyl propanoate	497.2	± 58.7
Ethyl 2-methyl propanoate	165.7	± 26.9
Propyl acetate	2695	± 42.4
Methyl butanoate	183.9	± 48.6
Methyl-2-methyl butanoate	114.5	± 4.9
2-methyl propyl acetate	63.8	± 12.6
Ethyl butanoate	764.3	± 114.0
Ethyl-2-methyl butanoate	704.4	± 97.9
Butyl acetate	218.6	± 12.0
2-methyl butyl acetate	62.2	± 6.0
Ethyl propanoate	58.5	± 11.4
Methyl hexanoate	203.0	± 40.5
Ethyl hexanoate	67.6	± 5.8
Benzyl acetate	341.3	± 27.8
<b>Total d'esters</b>	<b>3714.5</b>	<b>± 262.7</b>
4-nonel-1-ol	133.0	± 11.2
Isobutanol	450.0	± 127.6
Butanol	414.0	± 10.4
Isomyl alcool	1419.9	± 82.2
3-phenyl propanol	215.4	± 45.0
Hexanol	408.9	± 48.8
Acool benzylique	1857.5	± 178.6
2-phenyl ethanol	359.4	± 55.7
Eugenol	80.9	± 19.7
<b>Total d'alcools</b>	<b>5339.1</b>	<b>± 444.2</b>
Ethyl-2- methythio acetate	250.8	± 26.5
2-methylthioethyl acetate	252.5	± 22.8
2-methioethanol	27.2	± 7.8
Ethyl-3-methylthiopropanoate	90.3	± 15.7
3-methiopropyl acetate	206.8	± 48.3
3-methylthio propanol	329.1	± 96.0
<b>Total des composés soufrés</b>	<b>1156.6</b>	<b>± 181.0</b>

Les cultivars de melons Charentais ayant une vitesse de maturation et une durée de conservation variable (courte, moyenne et longue) ont une intensité de production d'arômes et un profil aromatique différent. Par exemple, les variétés de longue conservation ont une émission de composés volatils réduite de 49 à 87% par rapport à des variétés de courte ou moyenne conservation (Aubert et Bourger, 2004). De même des melons transgéniques dans lesquels la production d'éthylène a été inhibée par expression d'un gène antisens d'une ACC oxydase ont une émission volatile beaucoup plus faible que des melons ne contenant pas ce gène (Bauchot *et al.*, 1998). De plus, ce sont les composés les plus odorants qui sont affectés par la suppression de l'émission d'éthylène.

#### **4.2 Voies de biosynthèse d'arômes**

Les composés volatils impliqués dans l'arôme du fruit correspondent à au moins cinq catégories chimiques qui semblent être communes à différents fruits (alcools, aldéhydes, cétones, esters et terpènes). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux voies de biosynthèse des aldéhydes, alcools et esters aliphatiques ou ramifiés (Figure 2). Ces composés sont importants pour l'arôme et la saveur des fruits et sont synthétisés à partir d'acides aminés et de lipides membranaires (Sanz *et al.*, 1997).

Les lieux de synthèse des esters dans la cellule ne sont pas connus. On sait toutefois que la lipoxigénase C, jouant un rôle dans la synthèse d'arômes chez la tomate est localisée en périphérie dans la membrane chromoplastique (Riley *et al.*, 1996).

##### **4.2.1 Biogenèse d'esters et d'alcools volatils à partir d'acides gras**

Les acides gras sont les précurseurs principaux des esters volatils impliqués dans l'arôme de la plupart des fruits (Sanz *et al.*, 1997). Les voies biosynthétiques impliquées incluent la  $\beta$ -oxydation, la scission en hydroxyacides et l'oxydation via la lipoxigénase pour former des aldéhydes, des cétones, des acides, des alcools, des lactones et des esters à partir des acides gras (Heath et Reineccius, 1986). La formation des composés volatils dans un fruit intact se fait par

l'intermédiaire de la voie de la  $\beta$ -oxydation, tandis que quand le tissu de fruit est blessé, les volatils sont formés par l'intermédiaire de la voie de lipoxygénase (Schreier 1984). Les taux de synthèse des lipide et de dégradation des membranes augmentent pendant la maturation de la pomme (Bartley 1985) de même que l'activité lipoxygénase (Wooltorton *et al.*, 1965).

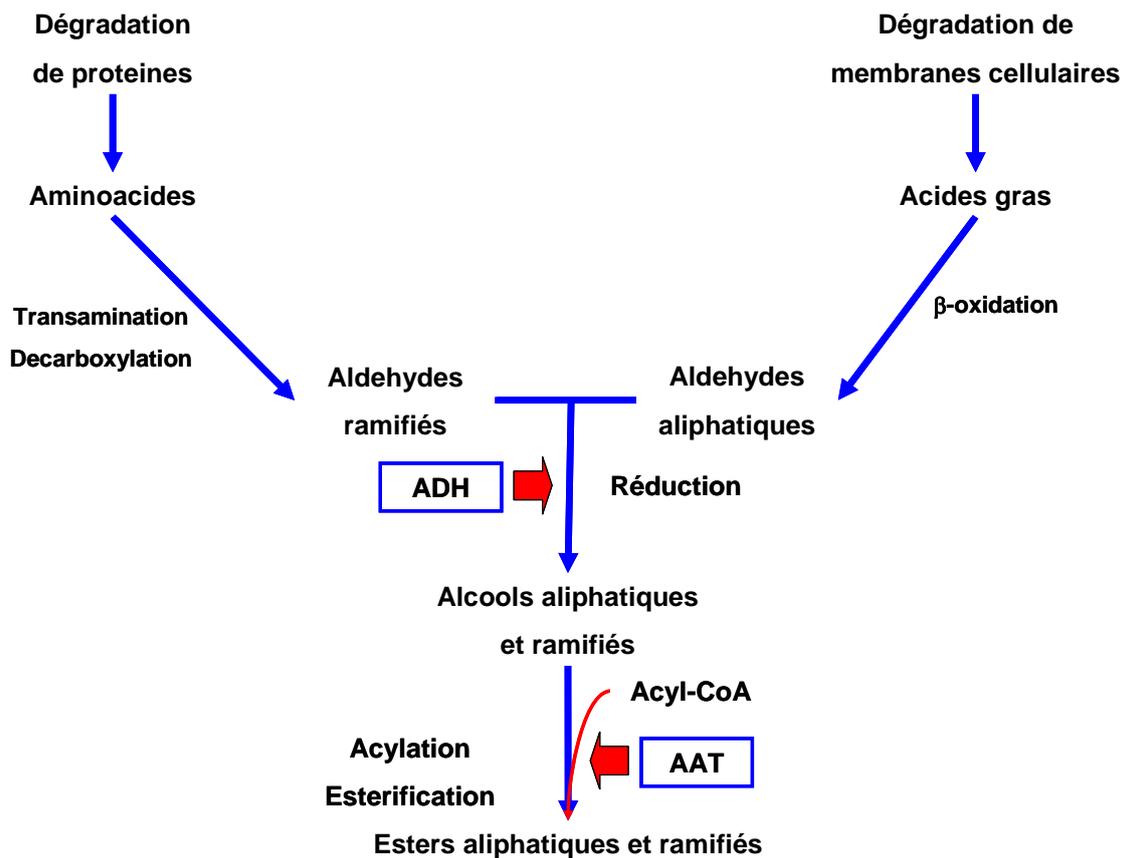


Figure 2. Voie de biosynthèse des esters volatils.

Des études utilisant des substrats et des précurseurs marqués par radioactivité ont été réalisées chez les poires (Jennings 1967), les bananes (Tressl et Drawert 1973) et les pommes (Paillard 1979; Bartley *et al.*, 1985). Ces études ont établi que la  $\beta$ -oxydation des acides gras est le processus biosynthétique primaire fournissant les alcools et l'acyl coenzyme A pour la formation d'esters (Sanz *et al.*, 1997).

Le catabolisme d'acides gras, via la voie de la lipoxygénase (LOX) et de la  $\beta$ -oxydation (Paillard, 1979 ; Schreier, 1984) est à l'origine de nombreux composés volatils (Salas *et al.*, 2000).

La  $\beta$ -oxydation est un processus dans lequel des dérivés d'acyl-CoA d'acide gras sont convertis en acyl-CoA à chaînes plus courtes en perdant deux carbones dans chaque cycle de  $\beta$ -oxydation. Ce processus exige la flavine adenine dinucléotide (FAD), le nicotinamide adenine dinucléotide (NAD), et libère du CoA. Les acyl CoAs sont réduits par la Acyl CoA réductase en aldéhydes qui sont ensuite réduits en alcools par l'alcool déshydrogénase (ADH). Les alcools servent de substrats pour l'alcool acyl transférase (AAT) pour produire des esters (Bartley *et al.*, 1985). Les acyls-CoA intermédiaires, dont la chaîne carbonée est souvent courte ou moyenne, peuvent être transférés sur un alcool par une alcool acyl-CoA transférase (AAT) ou ester synthase. Il se forme ainsi des alcanates d'ester (hexanoate et butanoate d'éthyle ou de méthyle par exemple). Les acyls-CoA peuvent également être hydrolysés en CoA-SH et en acide correspondant. Ce dernier est réduit en aldéhyde par une aldéhyde déshydrogénase (Ald-DH), puis en alcool par une alcool déshydrogénase (ADH).

Au cours de la maturation des fruits, les processus cataboliques seraient prédominants par rapport aux processus anaboliques (Tressl et Albrecht, 1986). Des incubations d'acides gras marqués au  $^{14}\text{C}$  ou non, avec des tissus de fruits de banane (Tressl et Drawert, 1973) et de pomme (Paillard, 1979) ont établi le rôle de la  $\beta$ -oxydation dans la génération des composés volatils. Quand les fruits sont déstructurés, l'acide linoléique et linoléinique sont oxydés en divers aldéhydes en C6 et C9 (Drawert, 1975; Galliard et Matthew, 1977; Lea, 1995). Les aldéhydes en C6 sont responsables des notes "vertes" de l'arôme (Hatanaka, 1993). Dans les fruits intacts, les enzymes de la voie de la lipoxygénase (LOX) et leurs substrats sont localisés dans des compartiments cellulaires différents, empêchant la formation des composés volatils (Sanz *et al.*, 1997). Pendant la maturation, les membranes cellulaires de fruits mûrs se dégradent, permettant à la voie de LOX de devenir active sans destruction physique des tissus (Sanz *et al.*, 1997). La voie de la lipoxygénase, déclenchée à la suite de la dégradation des membranes (blessure, surmaturation, sénescence), produit des composés en C6 (hexanal/-ol) responsables de la note verte, et des composés en C9 (nonenal/-ol). Les lipides membranaires sont déacylés par une acyl

hydrolase ou lipase qui libère les acides linoléique (AL) et linoléique (ALN). Ces acides gras sont hydroperoxydés par la LOX produisant des 13-hydroperoxydes (13-HP) ou des 9-hydroperoxydes (9-HP) qui sont ensuite transformés en aldéhydes et en oxo-acides par l'hydroperoxyde lyase (HPL). La LOX peut produire préférentiellement le 13-ou le 9-HP; elle est dite du type 13 ou du type 9. La HPL peut également avoir ou non une spécificité vis-à-vis de ses substrats (13- ou 9-HP). Chez l'olive par exemple, la LOX produit essentiellement les 9-HP, mais la HPL préfère le 13-HP, ce qui explique la quasi-absence de composés volatils C9 dans l'huile d'olive et sa richesse en constituants volatils en C6 (alcools, aldéhydes et esters) (Williams *et al.*, 1998). Chez les plantes, l'activité lipoxigénase est ubiquiste et donc détectée chez de nombreuses espèces. Si sa structure et ses propriétés biochimiques sont bien connues (Salas *et al.*, 2000), sa fonction et sa régulation commencent à peine à être élucidées. En effet, cette voie est aussi impliquée dans la croissance et le développement (Peterman *et al.*, 1985 ; Altschuler *et al.*, 1989 ; Park *et al.*, 1989 ; Peary *et al.*, 1990) via la synthèse de molécules régulatrices telles que le jasmonate (Ueda *et al.*, 1980 ; Koch *et al.*, 1999). La lipoxigénase est également impliquée dans la réponse à la blessure et à l'attaque par des pathogènes et insectes (Croft *et al.*, 1993; Bate *et al.*, 1998 ; Arimura *et al.*, 2000 ; Vancanneyt *et al.*, 2001).

Des études moléculaires sur des fruits ont apporté de nouveaux éléments sur la compréhension des mécanismes régulateurs de cette voie. En effet, chez le melon, l'activité LOX globale augmente au cours de la maturation du fruit, parallèlement à une baisse des teneurs en acides linoléique et linoléique libres (Lester, 1990). Riley *et al.* (1996) ont également montré que l'activité LOX de la fraction microsomale augmente de 50% au cours de la maturation des tomates, tandis que l'activité de la fraction soluble décroît. Ceci montre l'existence d'isoenzymes de la LOX ayant des localisations subcellulaires distinctes et des régulations différentielles. Par ailleurs, Griffiths *et al.* (1999a) ont étudié l'expression de trois gènes LOX différentiellement régulés au cours du développement du fruit de tomate et par l'éthylène. Le niveau des transcrits de *TomloxA*, décroît à partir du stade "mature green" (MG) chez les fruits sauvages (WT), alors que

chez la lignée ACO antisens, son expression n'est pas inhibée. *TomloxB* et *-C* sont exprimés à partir du stade "breaker". L'activité lipoxygénase dans la pomme cv. Schone van Boskoop est la plus élevée pendant la crise climactérique (Kim et Grosch, 1979). La voie biosynthétique de la LOX offre des possibilités intéressantes pour fournir des substrats pour la production d'ester (De Pooter *et al.*, 1983). La présence d'une voie biosynthétique de LOX active pendant la maturation constitue une alternative à la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

#### 4.2.2 Métabolisme des acides aminés

Des alcools à chaîne ramifiée, des aldéhydes et des esters sont produits par le métabolisme des acides aminés valine, leucine, isoleucine, alanine et acide aspartique (Heath et Reineccius 1986; Sanz *et al.*, 1997). Les acides aminés représentent une source importante de composés volatils ramifiés, soufrés et aromatiques chez les plantes (Walter et Steffens, 1990; Wyllie et Leach, 1990 ; Wyllie et Fellman, 2000 ; Fujiki *et al.*, 2000) et autres organismes tels que la levure (Yoshikawa *et al.*, 1995, Dickinson *et al.*, 1997 ; Casalone *et al.*, 1997), les bactéries (Yvon *et al.*, 1997, 2000) et les champignons (Denoya *et al.*, 1995). Chez les plantes supérieures, cette voie est primordiale dans la biogenèse d'esters ou d'acides gras ramifiés (Tressl et Drawert, 1973; Kroumova *et al.*, 1994). Elle commence par une désamination (aminotransférase/désaminase) dans laquelle l' $\alpha$ -cétoacide subit une décarboxylation oxydative selon un schéma semblable à celui du pyruvate, par un complexe enzymatique, Branched Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase, BCKDH nécessitant le TPP (thiamine pyrophosphate), l'acide lipoïque, le FAD (flavéine adénine dinucléotide), le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et le Coenzyme A. Deux intermédiaires sont produits: l'aldéhyde ou l'acyl-CoA. Le premier est réduit en alcool par une ADH, et l'alcool peut alors être acylé par une alcool acétyl/acyl-transférase (AAT). L'acyl-CoA sert de donneur du groupement acyle pour l'estérification. Le tableau 6 rassemble les principaux acides aminés précurseurs et les composés volatils correspondants.

Les concentrations variables d'acides aminés libres peuvent expliquer l'augmentation de la production d'esters volatils ramifiés dans le fruit. Par exemple, pendant la maturation du fruit

de la banane, la L-leucine et L-valine augmentent d'environ 3 fois par rapport à d'autres acides aminés dont la teneur reste constante (Tressl et Drawert, 1973). Ces acides aminés sont convertis en alcools et esters à chaînes ramifiées pendant la phase post-climactérique de la banane, ce qui implique l'action d'enzymes de trois voies biosynthétiques: aminotransférases, décarboxylases et ADH (Sanz *et al.*, 1997). L'isoleucine est considérée comme le précurseur biosynthétique de l'acide 2-méthyl butanoïque et de ses esters dans la pomme (Paillard 1990). Les taux de métabolisation de la leucine et de l'isoleucine en composés volatils sont variables selon la variété de pomme et la disponibilité du substrat détermine la concentration d'esters à chaînes branchées pour chaque cultivar (Rowan *et al.*, 1997).

Tableau 6 : Liste des principaux acides aminés précurseurs d'arômes chez les plantes

<b>acides aminés</b>	<b>Volatils formés</b>
Leucine	3-méthylbutyle esters et 3-méthylbutanoates esters (ex : acétate de 3-méthylbutyle et 3-méthylbutanoate d'éthyle)
Isoleucine	2-méthylbutyle esters et 2-méthylbutanoates esters
Valine	2-méthylpropyle esters et 2-méthylpropanoates esters
Alanine	propyle esters et propanoates esters
Phénylalanine	benzyle esters et benzoates esters (ex: acétate de benzyle et
Tryptophane	benzoate d'éthyle) 2-phényléthyle esters (ex : acétate de 2-phényléthyle)
Méthionine	3-méthylthiopropyle esters

Wyllie *et al.* (1995) ont montré, chez une variété de melon type Galia (cv. Makdimon), une très forte augmentation de la teneur en valine, méthionine et alanine au cours de la maturation du fruit et une faible augmentation de la leucine et de l'isoleucine. Des résultats similaires ont été obtenus par Wang *et al.* (1996) qui ont montré que la plupart des acides aminés libres augmente au cours de la maturation du melon en parallèle avec l'émission d'esters. Un phénomène similaire a été rapporté par Tressl et Drawert (1973) chez la banane. Ainsi, la variation en acides aminés libres pendant la maturation pourrait participer à la définition du profil aromatique de chaque fruit (Tressl et Drawert, 1973 ; Pérez *et al.*, 1992). Cependant, une telle relation entre la teneur en acides aminés et en composés volatils n'est pas systématiquement vérifiée. Par exemple, chez le melon de la variété Makdimon, l'isoleucine et la leucine sont présentes et augmentent d'une façon

similaire pendant la maturation (Wang *et al.*,1996), mais les esters formés proviennent majoritairement de l'isoleucine (acétate de 2-méthylbutyle) et non de la leucine (acétate de 3-méthylbutyle). Par ailleurs, le fait que deux variétés de melon, cv Alice (variété non odorante) et Makdimon (odorante), aient des teneurs en acides aminés libres assez proches (Wyllie *et al.*, 1995), signifie que la disponibilité des acides aminés est une condition nécessaire mais non suffisante. La régulation se ferait donc en aval, au niveau des enzymes de biosynthèse et/ou du transport des substrats. Tressl et Drawert (1973) ont démontré que la <sup>14</sup>C-leucine est transformée en 3-méthylbutanoate, 3-méthylbutanol et 3-méthylbutyle esters. La <sup>14</sup>C-isoleucine est transformée majoritairement en acétate de 2-méthylbutyle et en 2-méthylbutanoate d'éthyle par des tissus de fruits de melon cantaloup, et minoritairement en acétates de butyle et d'hexyle, ce qui laisse penser que le marquage au <sup>14</sup>C proviendrait de l'acétyl-CoA suite à un catabolisme poussé de la <sup>14</sup>C-leucine et la <sup>14</sup>C-isoleucine (Yabumoto *et al.*, 1977b). Le catabolisme des acides aminés ramifiés produit également des composés volatils chez la levure (Dickinson *et al.*, 1997, 2000). Certaines souches bactériennes d'*Erwinia carotovora* produisent plus d'esters que d'autres et l'addition d'acides aminés (leucine, isoleucine, valine, méthionine, phénylalanine) est suivie d'une augmentation significative d'esters et d'alcools correspondants. Les plantes de *Cichorium intybus* infectées par ce parasite prennent une note de fruit de banane mûre (Spinnler et Dijian, 1991).

#### **4.2.3 La formation des esters volatils**

Les esters forment le plus grand groupe de composés volatils produits par les fruits, mais leur voie biosynthétique n'est pas entièrement comprise. Nous avons vu précédemment que la formation d'esters a lieu à partir de substrats formés par la  $\beta$ -oxydation, la dégradation des acides gras par la voie de la LOX et aussi des acides aminés. La production d'esters dans le tissu de fruit est le résultat de l'estérification d'alcools, d'acides carboxyliques, et d'acyl CoAs dans une réaction dépendante de l'oxygène par une enzyme alcool acyl transferase (AAT) (Drawert et Berger 1983). La température optimale pour l'activité maximum est 30°C, pH 7-8,5 et les groupes sulfhydryl sont essentiels pour l'activité. Les AAT de levures sont localisées dans la membrane

cellulaire (Yoshioka et Hashimoto, 1981) tandis que dans la banane on pense que les AAT sont localisées dans le cytoplasme (Harada *et al.*, 1985). Le mélange des esters produits dans différents fruits dépend de l'activité et la spécificité des substrats des différentes AAT. La spécificité de substrat des AAT diffère d'un fruit à l'autre et l'estérification des alcools à chaîne linéaire est préférée à celle des alcools à chaînes ramifiées (Olias *et al.*, 1995; Rowan *et al.*, 1996). La biosynthèse d'esters est considérée comme pouvant être limitée par la concentration en alcool (Gilliver et Nursten 1976; Berger *et al.*, 1992). L'estérification, dernière étape de la biosynthèse d'esters, est catalysée par l'acétyl-CoA: alcool O-acétyltransférase (AAT, EC 2.3.1.84) ou ester synthase selon la réaction suivante : Alcool + acyl CoA = Ester + CoA-SH

Cette voie de biosynthèse a été bien étudiée chez les micro-organismes. Des travaux de purification et de caractérisation d'une AAT de levure ont été publiés par Yoshioka et Hashimoto (1981) chez *Saccharomyces uvarum*, et *S. cerevisiae* par Malcorps et Dufour (1992). Minetoki *et al.* (1993) ont identifié quelques séquences internes de l'AAT, et l'ADNc du gène *ATF1* a été cloné chez *S. cerevisiae* et (*ATF1*, *Lg-ATF1*) et chez *S. uvarum* (Fujii *et al.*, 1994). Un deuxième gène *ATF2* a été cloné chez *S. cerevisiae* (Nagasawa *et al.*, 1998). Des souches de levure surexprimant le gène *ATF1* ou *Lg-ATF1* manifestent une forte activité AAT. La régulation de ces gènes a fait l'objet de quelques travaux ayant montré que l'activité AAT ainsi que l'expression du gène *ATF1* sont inhibées par l'oxygène et par les acides gras insaturés ajoutés au milieu de culture des levures (Fujii *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998; Bardi *et al.*, 1999).

La capacité à synthétiser des esters a été évaluée chez différents fruits (fruits entiers ou disques) et dans différentes conditions de stockage ou de traitements: banane (Wyllie et Fellman, 2000), pomme (Knee *et al.*, 1981; Rowan *et al.*, 1996, 1999), fraise (Hamilton-Kemp *et al.*, 1996) et melon (Ueda *et al.*, 1997). Les premiers résultats relatifs à l'AAT des plantes (Harada *et al.*, 1985) montrent que cette enzyme est localisée dans la fraction soluble de la pulpe de banane. Des travaux similaires ont été réalisés sur l'AAT de la fraise (Pérez *et al.*, 1993) et du melon (Ueda *et al.*, 1997). Le premier gène codant une AAT chez les plantes, a été isolé et décrit en 1998. Il s'agit

de la Benzyl Alcool Acétyle Transférase (BEAT) de fleurs de *Clarkia breweri* (Dudareva *et al.*, 1998a). Les AAT décrites dans la bibliographie semblent assez différentes au niveau des substrats, des masses moléculaires (banane, 40 kDa ; fraise, 70 kDa; melon, 400 kDa). Cependant, les AATs ont certaines caractéristiques communes telles qu'une température optimale autour de 30°C et un pH optimum entre 7 et 8,5. Par ailleurs, il a été démontré qu'il y avait une corrélation entre la spécificité de l'AAT vis-à-vis des substrats (réaction *in vitro* ou bioconversion) et les esters présents dans les fruits. Ceci met en valeur le rôle de l'AAT dans la composition qualitative et quantitative des esters dans différents fruits. Il convient de noter également que la voie de l'AAT n'est probablement pas unique pour la biogenèse d'esters volatils. En effet, Dudareva *et al.* (2000) ont montré que la formation du benzoate de méthyle chez une fleur cultivée (*Antirrhinum majus*), résulte de la méthylation du benzoate (acide non activé) par une méthyl-transférase utilisant la SAM (S-adenosyl méthionine) comme donneur du groupement méthyle.

## **5. Régulation de la biosynthèse d'esters**

La régulation de la biosynthèse des esters s'exerce à plusieurs niveaux. Dans certains cas, c'est la disponibilité des substrats qui est décisive et qui peut déterminer la composition en esters. Dans d'autres situations, c'est la présence ou l'absence de l'enzyme qui est cruciale. Les deux situations peuvent coexister au sein d'une voie métabolique. Des études de la physiologie post-récolte des fruits (principalement chez la pomme), ont apporté des informations intéressantes dans ce domaine. Ces études visaient à améliorer et à optimiser les conditions de stockage afin de conserver le maximum de composés volatils et éventuellement de les restaurer en cas d'une baisse importante de la qualité sensorielle, notamment en cas d'un stockage prolongé. La quantité d'esters produits est fortement corrélée à la disponibilité des substrats (De Pooter *et al.*, 1983; Harb et Streif, 1994) mais aussi de l'activité AAT (Ueda *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 1999; Shalit *et al.*, 2001).

## 5.1 Disponibilité du substrat.

Le substrat présent dans la cellule est souvent non accessible à cause de la compartimentation cellulaire. Il devient accessible lors de la déstructuration des membranes consécutive à une blessure (note verte = hexanal, *cis/trans*-hexenal), ou à l'entrée en sénescence des fleurs et des fruits (Hong *et al.*, 2000; Rubinstein, 2000; Schade *et al.*, 2001).

Il existe des cas où la biosynthèse du substrat peut être également réduite. Ainsi, des pommes stockées à 12°C produisent 10 à 15 fois plus d'acétates d'esters que celles stockées en atmosphère réfrigérée (AR) à 3°C (Knee *et al.*, 1981). Cependant, après vaporisation d'alcool, la production d'esters devient identique dans les deux conditions de stockage. La production de composés volatils peut être ainsi augmentée après apport de substrats exogènes (acides organiques, aldéhydes, ou alcools) (De Pooter *et al.*, 1983; Berger et Drawert, 1984; Bartely *et al.*, 1985). La production d'esters est réduite chez les pommes récoltées précocément (Song et Bangerth, 1994; Bangerth *et al.*, 1998) et ceci est corrélé à de très faibles teneurs en acides gras libres. Le stockage en présence de 1% d'O<sub>2</sub> et 3% de CO<sub>2</sub> (ultra low oxygen, ULO) réduit également la quantité d'acides gras et d'esters linéaires, tandis que les acides et les esters ramifiés ne sont pas affectés (Harb et Streif, 1994). L'apport de précurseurs (acides, aldéhydes ou alcools) restaure un niveau normal d'esters. Cela signifie que la disponibilité des substrats est réduite (essentiellement celle des alcools pour l'AAT). Wyllie et Fellman (2000) ont montré que, malgré la faible abondance du 2-méthylbutyl ester chez la banane, les disques étaient capables d'estérifier le 2-méthylbutanol exogène. Ceci est un argument supplémentaire en faveur d'une régulation par limitation de substrat. Par ailleurs, il est important de souligner que le substrat peut être sujet à une compétition entre différentes voies métaboliques divergentes. Par exemple, au delà d'une certaine luminosité, la synthèse de pigments est favorisée et devient prioritaire au détriment d'esters ou d'autres voies utilisant l'acétyl-CoA (Poll *et al.*, 1996). Ceci pourrait être l'une des raisons pour lesquelles les fruits sélectionnés pour leur couleur (pour des raisons de marketing) sont généralement moins odorants.

## 5.2 Régulation enzymatique

Très peu de données sont disponibles à ce jour sur la régulation des enzymes de biosynthèse des arômes. Néanmoins, on peut penser que cette régulation est sous le contrôle de facteurs intrinsèques (espèce, variété, stade de maturation et facteurs hormonaux) et de facteurs extrinsèques (environnement, conditions de stockage, etc.).

### 5.2.1 Facteurs génétiques

Il est très courant de constater des différences plus ou moins grandes de la composition en esters en fonction des variétés. Certaines espèces voire variétés disposent de tous les gènes nécessaires à la production d'esters. Mais le processus d'évolution par le jeu des mutations successives, fait que certaine(s) enzyme(s) peuvent voir leurs propriétés biochimiques et leurs constantes cinétiques modifiées. Il s'en suit alors un changement du profil aromatique. Deux variétés de pomme "Red Delicious" et "Granny Smith" n'utilisent pas de la même façon les précurseurs apportés (Rowan *et al.*, 1996). La première, produit les 2-méthylbutyl esters (42%) et le 2-méthylbutanoate ester (58%) à partir de l'isoleucine deutéré, tandis que la seconde, ne produit que du 2-méthylbutyl esters. L'addition de 2-méthylbutanol, montre que le potentiel d'estérification est supérieur chez "Granny Smith". La régulation peut être exercée au niveau transcriptionnel ou postranscriptionnel. Ainsi, une lignée non odorante de *Clarkia* possède une très faible activité benzyl alcool acétyl-transférase, (BEAT) par rapport à la lignée odorante. Les deux lignées ont le même niveau d'ARNm-BEAT, mais chez la lignée non odorante, l'ARNm-BEAT contient un intron qui n'est pas épissé (Nam *et al.*, 1999).

### 5.2.2 Facteurs hormonaux

Certains gènes impliqués dans la biosynthèse d'arômes sont exprimés dans des tissus ou des organes particuliers et/ou à des stades bien définis. Il en est ainsi des fleurs (Wang *et al.*, 1997, Dudareva *et al.*, 1998b) et des fruits (Longhurst *et al.*, 1990; Aharoni *et al.*, 2000). Cette

régulation est essentiellement orchestrée par des facteurs développementaux et hormonaux tels que l'éthylène, l'acide jasmonique, le méthyle jasmonate, etc. (Song et Bangerth, 1994, 1996; Fan et Mattheis, 1999).

### 5.2.3 Facteurs environnementaux

Pour un organe ou un tissu donné et à un stade physiologique donné, l'expression de certains gènes impliqués dans la biogenèse des arômes est modulée par des facteurs externes ( $T^{\circ}$ , lumière, % $O_2$ , %  $CO_2$ , stress, etc.). Les résultats de Fellman *et al.* (1993) montrent que de très faibles pressions d' $O_2$  affectent l'activité AAT. Les pommes "Royal Gala" récoltées entre le stade vert et le stade jaune, et stockées au froid, accumulent les alcools (Mattheis *et al.*, 1998), indiquant soit que l'activité AAT est faible, soit que celle de l'ADH est élevée. Dans ce type de régulation, les effets de la lumière et des conditions de culture ne sont pas négligeables. A ce sujet, il est facile de remarquer que la qualité sensorielle des fruits hors saison est très médiocre. Kasperbauer *et al.* (2001) ont montré que chez la fraise la couverture du sol (mulch) avec du plastique rouge, entraîne une nette amélioration de l'arôme par comparaison avec la couverture avec du plastique noir.

Très peu de travaux ont été consacrés aux mécanismes intimes de régulation. Souvent, c'est l'effet global d'un traitement qui est mesuré ou décrit. Certains facteurs de régulation peuvent agir en même temps à des niveaux très différents. Par exemple, le stockage à faible % d' $O_2$  produit un effet global qui est une baisse de la production d'esters aliphatiques. Mais on ignore le mécanisme de cette baisse. On peut formuler quelques hypothèses et suppositions au sujet des effets putatifs ou avérés d'une privation en  $O_2$ , associée éventuellement à une augmentation en  $CO_2$ .

L' $O_2$  étant un cofacteur pour la LOX (Feussner *et al.*, 1995), l'abaissement du taux d' $O_2$  entraîne une baisse de l'activité LOX, et donc d'hydropéroxydes, précurseurs d'aldéhydes et d'alcools (C4, C6, C9), mais aussi précurseurs de molécules régulatrices telles que le jasmonate,

produit à partir du 12-oxodécanoate. La réduction de la production d'esters aliphatiques suite à une baisse de teneur en O<sub>2</sub>, est levée par l'addition de précurseurs en aval de l'hydropéroxyde .

L'O<sub>2</sub> est un cofacteur pour l'ACC oxydase (Yang et Hoffman, 1984). La réduction du niveau d'O<sub>2</sub> se traduit par une baisse de la production d'éthylène, et par conséquent, une baisse de l'activité des enzymes régulées par l'éthylène (Bauchot *et al.*, 1998; Abdi *et al.*, 1998; Fan et Mattheis, 1999) qui interviennent dans la biogenèse d'esters.

L'augmentation de CO<sub>2</sub> inhibe l'action de l'éthylène et sa biosynthèse (Mathooko *et al.*, 2001), et donc l'expression de certains gènes de biosynthèse d'arômes. L'O<sub>2</sub> est nécessaire à la respiration et à la production d'ATP et de NAD(P)H. Ces cofacteurs sont indispensables pour la synthèse de composés volatils et utilisés par l'aldéhyde déshydrogénase, ADH, acyl-CoA synthétase, etc. Il s'en suit alors une réduction de la production d'alcools et d'acyl-CoA. Enfin, la production d'arômes dépend aussi des pratiques culturales (fertilisation, Somogy *et al.*, 1964; lumière, Kasperbauer *et al.*, 2001).

La production d'esters est la résultante d'une activité de synthèse via l'AAT et de dégradation via les estérases (Fukuda *et al.*, 1998). Certains auteurs ont montré que l'activité estérase augmente avec la maturation (Goodenough et Riley, 1985) alors que d'autres montrent qu'elle reste constante (Knee *et al.*, 1989). Par ailleurs, il est important de souligner que de nombreux alcools sont stockés sous formes conjuguées avant d'être libérés par des glycosidases. Ce phénomène constitue probablement un autre mode de régulation qui mériterait d'être étudié.

## **6. Transport et conjugaison des composés volatils :**

Les composés volatils ont un caractère plutôt hydrophobe. Leur transport et leur mode d'émission restent inconnus. Les interactions avec d'autres composés ont été étudiées en terme de dynamique de diffusion ou de volatilité. Les polysaccharides et les polyphénols présents dans le vin influencent la volatilité des esters (Dufour et Bayonove, 1999a,b). Les protéines augmentent la rétention des composés volatils (Landy *et al.*, 1995). *In vivo*, on sait que les molécules volatiles sont également présentes sous formes glycoconjuguées, plus solubles dans l'eau, facilitant ainsi

leur transport et/ou leur stockage. La partie aglycane est généralement liée au glucose de la partie glycane. Leur libération a lieu lors de la maturation ou des traitements de transformation des aliments. Les glycanases ( $\beta$ -glucosidase) jouent un rôle primordial dans cette libération

A l'issue de cette étude bibliographique nous rappellerons l'organisation générale des résultats de cette thèse

**Le premier chapitre** portera sur la caractérisation de deux alcool deshydrogénases hautement divergentes présentant une expression maturation-spécifique et ayant des caractéristiques enzymatiques spécifiques. Ce chapitre correspond à une publication dans *Plant Molecular Biology* dont je suis premier co-auteur.

**Le deuxième chapitre** portera sur la caractérisation fonctionnelle d'une famille de gènes codant pour des alcool acyl transférases. Il correspond à une publication dans *Plant Molecular Biology* dont je suis 2<sup>ème</sup> co-auteur à travail égal au premier.

**Le troisième et dernier chapitre**, rédigé en français consistera en une caractérisation approfondie des propriétés enzymatiques des AAT de melon.

*Les références bibliographiques de cette partie figurent à la fin de ce manuscrit*

## **CHAPITRE I**

### **CARACTERISATION MOLECULAIRE ET BIOCHIMIQUE DE DEUX ALCOOL DESHYDROGENASES HAUTEMENT DIVERGENTES S'EXPRIMANT SPECIFIQUEMENT DANS LE FRUIT DE MELON**



**Publication sous presse dans Plant Molecular Biology**

**Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics**

Daniel Manríquez<sup>+</sup>, Islam El-Sharkawy<sup>+</sup>, Francisco B. Flores, Fikri El-Yahyaoui, Farid Regad, Mondher Bouzayen, Alain Latché and Jean-Claude Pech\*

UMR 990 INRA/INPT-ENSAT "Génomique et Biotechnologie des Fruits", Av. de l'Agrobiopole, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France.

*\*(author for correspondence; tel: +33 562 19 35 64; fax: +33 562 19 35 73; email: [pech@ensat.fr](mailto:pech@ensat.fr))*

<sup>+</sup> These authors contributed equally to the work

Footnote:      accession      numbers      Cm-ADH1      (ABC02081),      Cm-ADH2      (ABC02082)

## Abstract

Alcohol dehydrogenases (ADH) participate in the biosynthetic pathway of aroma volatiles in fruit by interconverting aldehydes to alcohols and providing substrates for the formation of esters. Two highly divergent *ADH* genes (15 % identity at the amino acid level) of Cantaloupe Charentais melon (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) have been isolated. *Cm-ADH1* belongs to the medium-chain zinc-binding type of ADHs and is highly similar to all *ADH* genes expressed in fruit isolated so far. *Cm-ADH2* belongs to the short-chain type of ADHs. The two encoded proteins are enzymatically active upon expression in yeast. *Cm-ADH1* has strong preference for NADPH as a co-factor, whereas *Cm-ADH2* preferentially uses NADH. Both *Cm-ADH* proteins are much more active as reductases with *K<sub>m</sub>*s 10 to 20 times lower for the conversion of aldehydes to alcohols than for the dehydrogenation of alcohols to aldehydes. They both show strong preference for aliphatic aldehydes but *Cm-ADH1* is capable of reducing branched aldehydes such as 3-methylbutyraldehyde, whereas *Cm-ADH2* cannot. Both *Cm-ADH* genes are expressed specifically in fruit and up-regulated during ripening. Gene expression as well as total ADH activity are strongly inhibited in antisense *ACC* oxidase melons and in melon fruit treated with the ethylene antagonist 1-methylcyclopropene (1-MCP), indicating a positive regulation by ethylene. These data suggest that each of the *Cm-ADH* protein plays a specific role in the regulation of aroma biosynthesis in melon fruit.

*Key words:* alcohol dehydrogenase/aldehyde reductase, aroma volatiles, ethylene, fruit ripening, medium- and short-chain ADH, melon.

## Introduction

Alcohol dehydrogenases (ADH, EC 1.1.1.1) catalyse the reversible conversion of aldehydes to the corresponding alcohols. They have been involved in the stress response of plants, mainly in anaerobiosis where they are responsible for the production of ethanol. ADHs have also been implicated in the response to a wide range of other stresses, elicitors and abscisic acid (Matton *et al.*, 1990; De Bruxelles *et al.*, 1996; Peters and Frenkel, 2004). However, *ADH* genes are also expressed in plant tissues in a developmentally-regulated manner, particularly during fruit ripening (Van der Straeten *et al.*, 1991; Speirs *et al.*, 1998; 2002; Echeverria *et al.*, 2004). In tomato fruit, one of the two *ADH* genes, *Le-ADH2*, participates in the formation of flavor volatiles during fruit ripening. Over-expression of *Le-ADH2* has led to improved flavor of the fruit by increasing the level of alcohols, particularly Z-3-hexenol (Speirs *et al.*, 1998). In grapes, three *ADH* genes are expressed during fruit development. *Vv-ADH1* and *Vv-ADH3* transcripts accumulate transiently in young developing berry, while *Vv-ADH2* transcripts strongly increase at the onset of ripening named véraison (Tesnière and Verriès, 2000). Fruit-specific dehydrogenases so far characterised belong to the medium-size zinc-containing class (Chase, 1999). Partial cDNA clones putatively encoding short-chain ADHs have been reported in tomato (Picton *et al.*, 1993) and in pear (Fonseca *et al.*, 2004). In melon, the step of conversion of aldehydes to alcohols is controlled by ethylene and is strongly inhibited by the ethylene antagonist 1-MCP and in fruit in which ethylene production has been suppressed by an antisense *ACC* oxidase gene (Flores *et al.*, 2002). In the present study, two fruit-specific *Cm-ADH* genes belonging to both the medium- and short-chain types have been isolated. After expression in yeast and purification, we have found that the two encoded enzymes preferentially work as aldehyde reductases and have specific substrates preferences.

## Material and methods

### *Plant material and post harvest treatments*

Wild-type (WT) and ACC oxidase antisense (AS) Charentais Cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*, Naud cv. *Védrantais*) were used (Ayub *et al.*, 1996; Guis *et al.*, 1997). They were grown on a trellis in a greenhouse under standard cultural practices for fertilization and pesticide treatments. Freshly opened female flowers were tagged on the day of hand-pollination to identify fruit of known age. Melons were harvested after 32, 35, 37, 39 and 42 days after pollination (DAP) and ethylene production measured immediately after harvest. Fruit were selected for homogenous ethylene production. Stages of ripening of WT fruit, and equivalent age for AS fruit, corresponded to mature green (32 DAP), onset of ripening (35 DAP), early climacteric (37 DAP), full climacteric (39 DAP) and late climacteric (42 DAP). Antisense fruits, harvested at 35 DAP, were exposed to 50  $\mu\text{l l}^{-1}$  ethylene for three days. The ethylene inhibitor 1-MCP was applied at 35 DAP to WT fruit on the vine at 1  $\mu\text{l l}^{-1}$  in 3-l jars for three days before harvesting with periodical flushing with air and re-injection of the inhibitor. Vegetative tissues (leaves, stems, seeds and roots) and flowers were collected from plants grown in a greenhouse. All plant material was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *RNA isolation*

Total RNA from fruit samples was extracted using the methods described by Boss *et al.* (1996). For leaf, stem, seed, root, and flower material, total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini Kit following the manufacturer's recommendations (Qiagen, Valencia, CA, USA). All RNA extracts were treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) and cleaned up by phenol-chloroform extraction.

### *Isolation and in silico analysis of Cm-ADH sequences*

*Cm-ADH1* and *Cm-ADH2* have been isolated by PCR from a cDNA library of ripe melon. The SK primer (in Bluescript: 5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATCCC-3') was combined with the degenerated primers, *Cm-ADH1* (F): 5'-TCTASTTTTAGCGWRTACACTGTT-3', *Cm-ADH1* (R): 5'-AAGTCCAAYAGMTCCAAGTCCAAA-3', *Cm-ADH2* (F): 5'-CAGCCTTCAWSAGAAACCATG-3', and *Cm-ADH2* (R): 5'-AAGAGACTGTGCTCCATCAAC-3' designed from a conserved region among plants alcohol dehydrogenase. The isolated fragments were cloned using Qiagen PCR Cloning <sup>plus</sup> Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), sequenced and compared with database sequences using the BLAST program (Altschul *et al.*, 1997). Extension of the partial cDNA clones was carried out using the 3'- and 5'- RACE kit (Invitrogen, Paisely, UK). First strand cDNA synthesis was carried out using 10 µg of total DNase-treated RNA in a 50 µl aliquot followed by PCR with specific *Cm-ADH* primers using 1 µl of cDNA. A high fidelity PCR system (BMB Indianapolis, IN, USA) was used with the following PCR parameters: 3 min template denaturation at 95°C for one cycle, followed by 5 cycles at 95°C (30 s), 58°C (1 min), and 72°C (1 min 30 s), then 25 cycles at 95°C (30 s), 58°C (1 min), and 72°C (2 min) with a final 10 min extension step at 72°C to isolate the full length *Cm-ADH* sequences.

Alignments of the predicted protein sequences were performed with ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) and GENEDOC (Nicholas and Nicholas, 1997). Phylogenetic analysis of ADH sequences was performed using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) of PHYLIP package (Felsenstein, 1992). Bootstrapping was performed by resampling from the data 1000 times. Finally, a cDNA clone was isolated with homology to a β-actin sequence (AY859055). It was checked by Northern analysis (data not shown) that the β-actin mRNA level was similar in all treatments. The gene was, thereafter, used as an internal control in gene expression studies.

**Table 1:** Real time quantitative PCR primers

Name	Oligonucleotide sequence
Cm-actin-344 (F)	5'-GTGATGGTGTGAGTCACACTGTTC-3'
Cm-actin-426 (R)	5'-ACGACCAGCAAGGTCCAAAC-3'
Cm-ADH1-518 (F)	5'-GTGTTCTTAGCTGCGGCATTT-3'
Cm-ADH1-588 (R)	5'-TTGACCCTTTTTAGGCTTTGCA-3'
Cm-ADH2-145 (F)	5'-GCGGAATCGTTAAAGGGTGTACT-3'
Cm-ADH2-216 (R)	5'-AGCCGCCTCTCTCTCTTCTTC-3'

#### *Real Time quantitative RT-PCR*

DNase-treated RNA (4 µg) was reverse transcribed in a total volume of 40-µL using Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Real-time quantitative PCR was performed using 100 ng of cDNA in a 20-µL reaction volume using SYBR GREEN PCR Master Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI PRISM 7900HT sequence-detection system. PRIMER EXPRESS software (PE-Applied Biosystems) was used to design gene-specific primers (Table 1). For all the genes studied here, optimal primer concentration was 300 nM. RT-PCR conditions were as follow: 50°C for 2 min, followed by 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All RT-PCR experiments were run in triplicate with different cDNAs synthesized from three biological replicates. Samples were run in triplicate on each 96-well plate and were repeated at least two plates for each experiment. For each sample, a Ct (threshold sample) value was calculated from the amplification curves by selecting the optimal  $\Delta R_n$  (emission of reporter dye over starting background fluorescence) in the exponential portion of the amplification plot. Relative fold differences were calculated based on the comparative Ct method using the  $\beta$ -actin as an internal standard. A cDNA clone was isolated with homology to a  $\beta$ -actin sequence (AY859055). It was checked by Northern analysis (data not shown) that the  $\beta$ -actin mRNA level was similar in all treatments. To demonstrate that the efficiencies of the different genes primers were approximately equal, the absolute value of the slope of log input amount versus  $\Delta C_t$  was calculated for both the *Cm-ADH* and  $\beta$ -actin genes and was determined to be  $< 0.1$ . To determine relative fold differences for each sample in each experiment, the Ct value for both *Cm-ADH* genes was normalized to the Ct value for  $\beta$ -actin and

was calculated relative to a calibrator (seeds for *Cm-ADH1*, Wild-type melon fruit treated three days with 1-MCP for *Cm-ADH2*) using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### *Expression of Cm-ADH*

The two *Cm-ADH* cDNAs were cloned in the pYES2.1 TOPO-TA vector for regulated protein expression in yeast following the instructions provided by the manufacturer (Invitrogen, Paisely, UK). Auto-ligated construct was used as negative control. All the constructs were transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* cell line INVSc1. The strain harboring the correct constructions were grown in selective medium (SC-U) with 2% galactose as inducer of the recombinant protein expression, at 30°C and 250 rpm, according to manufacturer's recommendations, until the OD<sub>600</sub> of the culture reached ~ 4 U.

### *Purification of recombinant ADH and electrophoresis methods*

Cells were collected by centrifugation (1800 g, 10 min at room temperature) from 150 mL of yeast cultures induced with galactose and resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate pH 7.5, 10% v/v glycerol, 0.3 M NaCl) containing 2 mM β-mercaptoethanol. The cells were mechanically ground in liquid nitrogen for 2 min and stored at -80°C until needed. To extract the ADH enzyme, the powder was thawed and centrifuged at 45 000 g for 20 min at 4°C. The crude extract obtained was concentrated by addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 80% saturation. The suspension centrifuged at 45000 g for 20 minutes at 4°C and the pellet suspended in 1 mL of tampon A and desalted in Sephadex G-25 columns equilibrated with buffer A (Amersham Biosciences, Chalfont Buckinghamshire, UK). The recombinant protein was purified by a metal affinity resin designed to purify polyhistidine-tagged proteins (BD Talon metal affinity resin, BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol. Briefly, the enzyme was fixed to the resin in the presence of buffer A, and after removing the unbound proteins with several washes with the same buffer the recombinant protein was eluted with buffer A containing 150 mM imidazole. The

extract was desalted in Sephadex G-25 equilibrated with buffer A. A second purification was performed with the metal affinity resin. The highly purified protein was quantified according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. Protein purity was verified by separation on SDS-PAGE (12% acrylamide gel) and staining with silver nitrate (Amersham Biosciences).

#### *ADH enzyme activity and kinetic parameters with recombinant proteins*

Reductase and dehydrogenase activities of ADH were evaluated by spectrophotometry according to Molina *et al.* (1987). Briefly, reductase activity was assayed in 1mL total volume containing 100  $\mu$ l of purified protein (1-2  $\mu$ g), 5 mM aldehyde, 0.25mM NADH or NADPH and adjusted to final volume with sodium phosphate 50 mM buffer (pH 5.8). Dehydrogenase activity was measured in the presence of 5 mM ethanol, 0.25mM NAD or NADP and adjusted to final volume with glycine-NAOH buffer (pH 9.4). Different concentrations of NADH/NAD or NADPH/NADP (from 0.015 to 1 mM) or acetaldehyde/ethanol (from 0.15 to 10 mM) were used for kinetic parameters determinations.

#### *ADH enzyme activity assay of melon fruit crude protein*

One gram of mesocarp tissue was ground mechanically in the presence of 1 mL of extraction buffer (250 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1% Triton X-100 and 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) in liquid nitrogen during 2 min and the protein crude extract was stored at -80°C until needed. The protein extract was thawed in ice and centrifuged at 45000 g for 20 min at 4°C. The supernatant phase was desalted using Sephadex G-25 columns (Amersham Biosciences) equilibrated with sodium phosphate 50 mM (pH 5.8). Total proteins were quantified according to Bradford (1976). ADH activity was measured as described above.

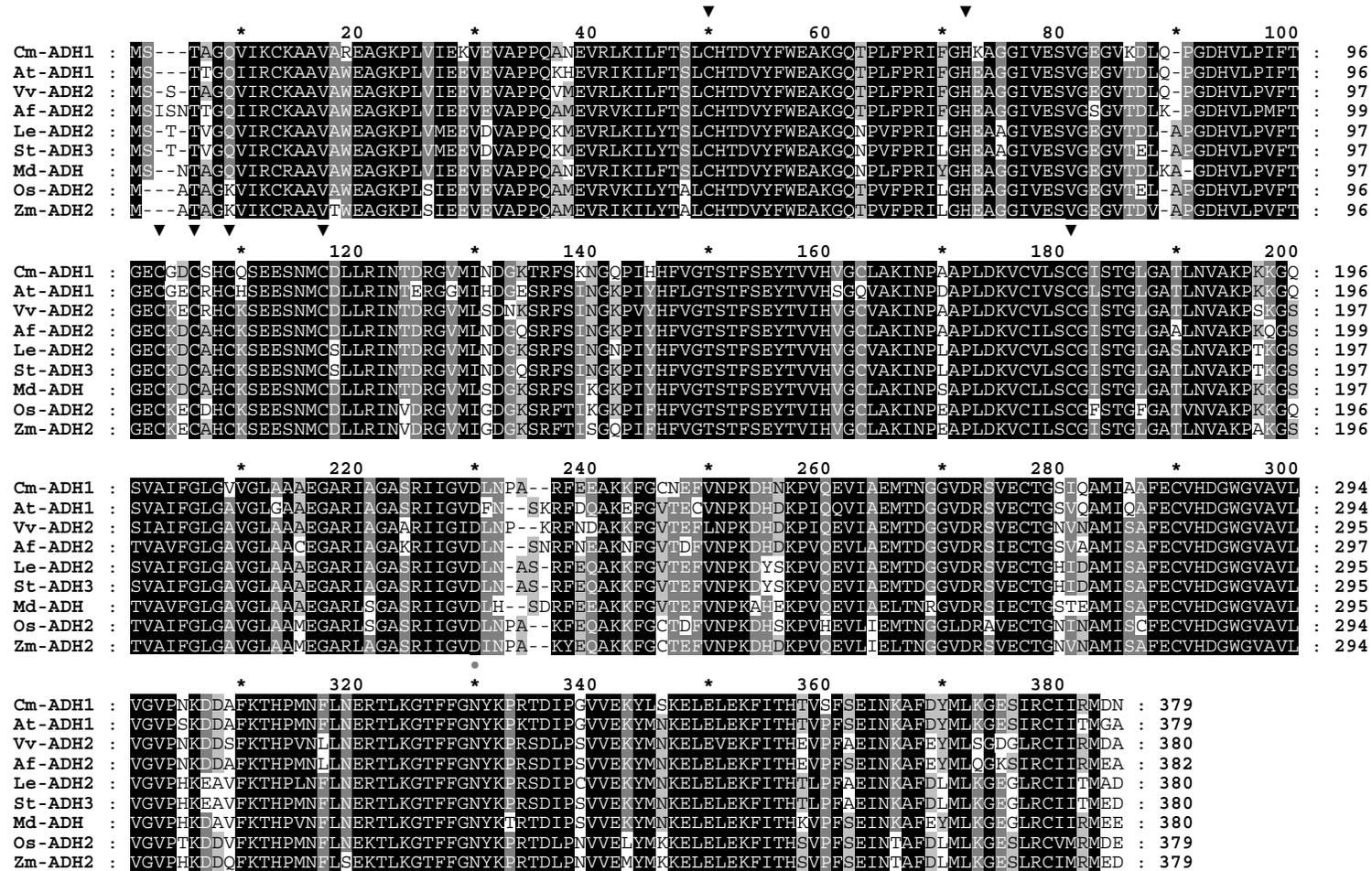
## Results and discussion

### *Sequence analysis of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 and predicted proteins*

*Cm-ADH1* and *Cm-ADH2* encode proteins of 379 and 266 residues, with the predicted molecular weight of 41.0 and 29.0 kDa, and isoelectric points of 6.3 and 8.2, respectively. The *Cm-ADH1* protein belongs to the highly conserved zinc-medium-chain ADHs sub-family (Chase, 1999; Table 2 and Fig. 1). Many genes encoding proteins of this sub-family have been characterized in plants. In tomato, *Le-ADH3a* and *Le-ADH3b* are expressed in anthers (Ingersoll *et al.*, 1994) and *Le-ADH2* in ripening fruit (Longhurst *et al.*, 1994) where it plays a role in the biosynthesis of aroma (Speirs *et al.*, 1998). In grape, *Vv-ADH2*, is a ripening regulated gene (Sarni-Manchado *et al.*, 1997, Tesnière and Verriès, 2000). The alignment of *Cm-ADH1* with sequences of different plant zinc-medium-chain ADH proteins shows the presence of a large number of conserved domains (Fig. 1), that are typical of this sub-family (Chase, 1999). The identity at the amino acid level between *Cm-ADH1* and other plants zinc-medium-chain ADHs sub-family is very high and ranges between 81 and 85 % (Table 2). Many very well conserved amino acids that have been implicated in the fixation of zinc are present in *Cm-ADH1*: Cys, His and Cys at the 50, 72 and 181 positions (Fig. 1) and four Cys at positions 102, 105, 108 and 116 (Eklund *et al.*, 1976; Yokoyama and Harry, 1993). The Asp in position 230, corresponding to *Cm-ADH1* sequence has been described as implicated in the preference of NAD as cofactor in the dehydrogenase reaction (Eklund *et al.*, 1976; Fan *et al.*, 1991).

*Cm-ADH2* protein is a member of the short-chain ADH sub-family. Contrary to medium-chain ADHs, the percentage of identity at the amino acid level is highly variable ranging from 21% to 67% (Table 2). The highest percentage of identity to *Cm-ADH2* is for *Cs-ADH* of *Citrus sinensis*. Strikingly, genes of this sub-family have a number of conserved amino acids (around 40) well distributed all over the sequence, but very few conserved domains (Fig. 2). Person *et al.* (1991) had highlighted few conserved elements of unknown function among plant short-chain

dehydrogenases that are underlined in figure 2: : **(I)** ALVTGG(S/T)RGIG, located at the N-terminal region, **(II)** ILVNNAG, **(III)** YxaxK and **(IV)** IRVNxVaP. However, alignment of figure 2 shows that none of these domains are well conserved except domains I and IV that show conservation of six amino acids out of eleven and five amino acids out of eight, respectively. Similarly, the three glycine residues at the N- terminal region that have been described by Jörnvall *et al.* (1995) as implicated in binding NAD in *Drosophila melanogaster* ADH are all present in the Ds-TRR2 protein at positions 27, 31 and 35 (Fig.2). However, only Gly 31 is conserved in all other plant ADH sequences shown in figure 2. The diversity in amino acid sequence of the short-chain ADHs sub-family can be related to a wide range of biological function of such proteins that can use a wide range of substrates (Jörnvall *et al.*, 1995) such as tropinone (Nakajima *et al.*, 1993) and 3-oxoacyl-acyl carrier protein (Klein *et al.*, 1992) in higher plants.



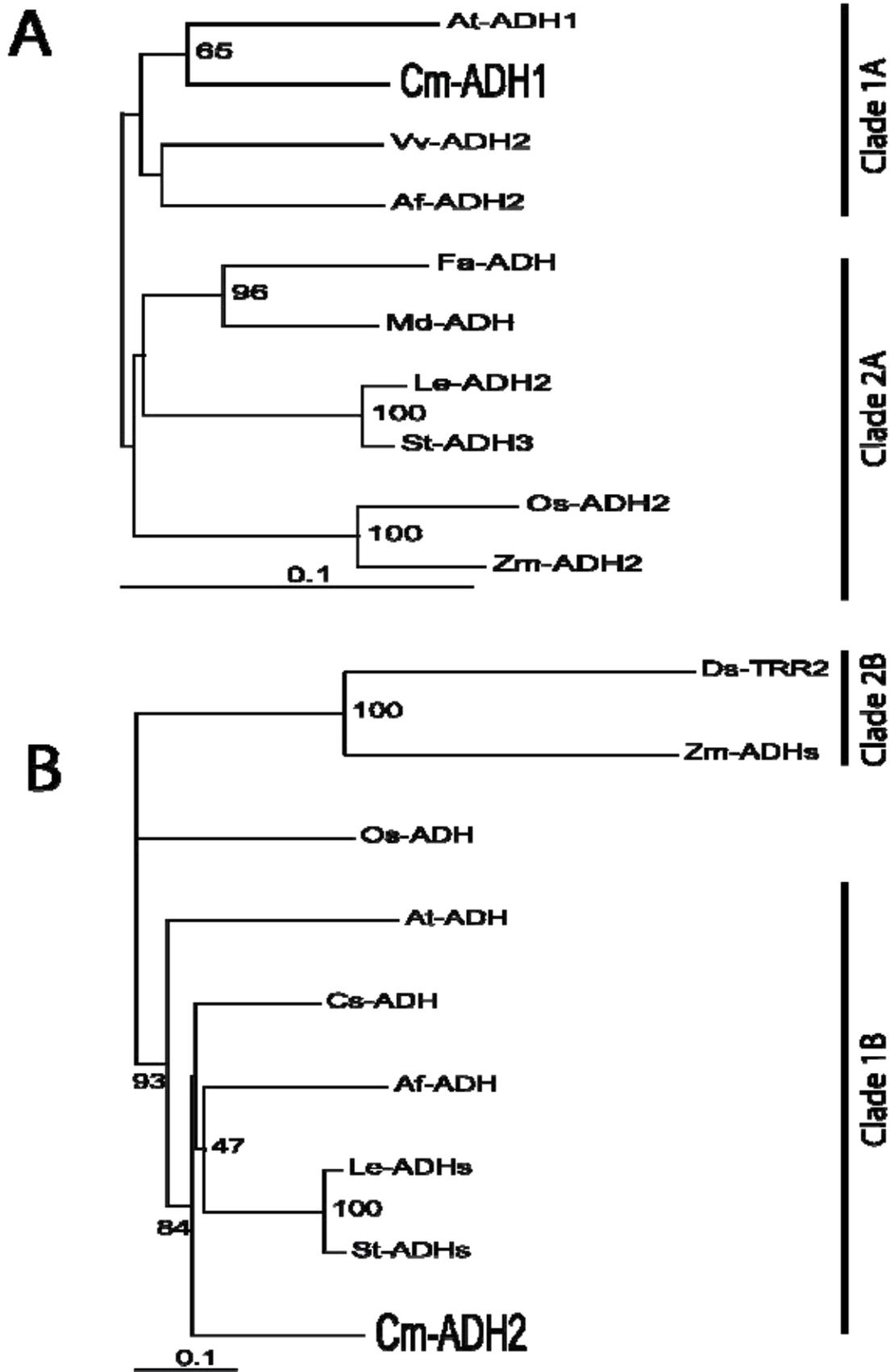
**Figure 1:** Amino acid sequence alignment of *Cucumis melo* Cm-ADH1 (ABC02081<sup>(a)</sup>) with closely related sequences *Malus domestica* Md-ADH (CAA88271<sup>(a)</sup>), *Vitis vinifera* Vv-ADH2 (AAL55726<sup>(a)</sup>), *Lycopersicon esculentum* Le-ADH2 (CAA54450<sup>(a)</sup>), *Arabidopsis thaliana* At-ADH1 (AAK73970<sup>(a)</sup>), *Solanum tuberosum* St-ADH3 (AAA33808<sup>(a)</sup>), *Oryza sativa* Os-ADH2 (AAF34412<sup>(a)</sup>), *Zea mays* Zm-ADH2 (CAA26001<sup>(a)</sup>) and *Ametastegia formosa* Af-ADH2 (TC9383<sup>(b)</sup>) using ClustalX program. Conserved residues are shaded in black. Dark grey shading indicates similar residues in seven out of nine of the sequences and clear grey shading indicates similar residues in five out of nine of the sequences. The black arrows represent the amino acids that have been implicated in the fixation of zinc (Eklund *et al.*, 1976; Yokoyama and Harry, 1993). The gray arrow represents the Asp that has been described as implicated in the preference of NAD as cofactor in the dehydrogenase reaction (Eklund *et al.*, 1976; Fan *et al.*, 1991). The letters following the accession numbers in the legend of the figure indicate the source database: <sup>(a)</sup> GeneBank and <sup>(b)</sup> TIGR



**Table 2:** Amino acid sequence comparison between the peptides full length *Cucumis melo* (Cm-ADH1), *Malus domestica* (Md-ADH), *Vitis vinifera* (Vv-ADH2), *Lycopersicon esculentum* (Le-ADH2), *Arabidopsis thaliana* (At-ADH1), *Solanum tuberosum* (St-ADH3), *Oryza sativa* (Os-ADH2), *Zea mays* (Zm-ADH2), and *Ametastegia formosa* (Af-ADH2) zinc-medium-chain and *Cucumis melo* (Cm-ADH2), *Lycopersicon esculentum* (Le-ADHs), *Solanum tuberosum* (St-ADHs), *Arabidopsis thaliana* (At-ADH), *Citrus sinensis* (Cs-ADH), *Ametastegia formosa* (Af-ADH), *Oryza sativa* (Os-ADH), *Zea mays* (Zm-ADHs) and *Datura stramonium* (D-TRR2) short chain alcohol dehydrogenases proteins. For accession numbers see legends of figures 1 and 2.

Protein Name	Size	Amino acid identity (%)	
		Cm-ADH1	Cm-ADH2
<b>Cm-ADH1</b>	379	-	15
<b>At-ADH1</b>	379	85	14
<b>Le-ADH2</b>	380	83	12
<b>Md-ADH</b>	380	83	14
<b>Vv-ADH2</b>	380	83	14
<b>St-ADH3</b>	380	83	11
<b>Os-ADH2</b>	379	81	12
<b>Zm-ADH2</b>	379	81	11
<b>Af-ADH2</b>	383	84	13
<b>Cm-ADH2</b>	266	15	-
<b>Le-ADHs</b>	266	16	64
<b>St-ADHs</b>	266	16	64
<b>At-ADH</b>	266	12	53
<b>Cs-ADH</b>	266	15	67
<b>Af-ADH</b>	266	14	59
<b>Os-ADH</b>	277	13	50
<b>Zm-ADHs</b>	253	10	24
<b>Ds-TRR2</b>	260	12	21

In order to determine the phylogenetic position of the melon *ADH* genes isolated in this study, a phylogenetic tree was constructed by employing a data set including some of the previously published medium- (Fig 3A) and short-chain ADHs (Fig 3B) from both monocots and dicots. The resulting ADH tree roughly consisted in two monophyletic groups (Clade 1" and "Clade 2") in both A and B sub-families (Fig. 3). Clade 1A and 1B contain *ADH* genes from dicots only including melon ADHs, while Clade 2A and 2B contain *ADH* genes from both dicots and monocots. In medium-chain ADHs (Fig 3A), proteins show a very low divergence in accordance with the sequence alignments comparisons of figure 1. The closest neighbour for Cm-ADH1 is *Arabidopsis thaliana* ADH1. In contrast, short-chain ADHs show a high level of divergence (Fig 3B).



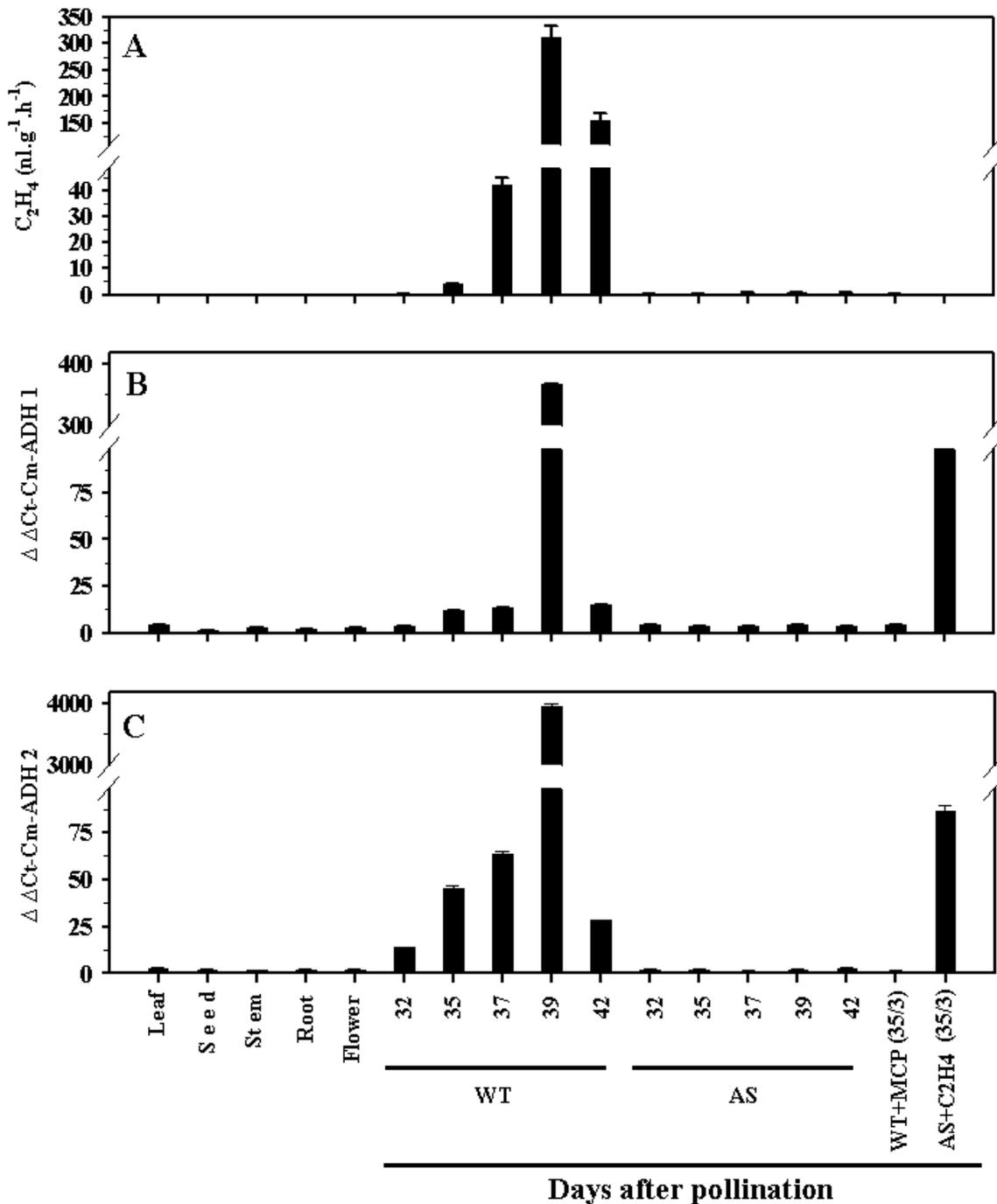
**Figure 3** : Neighbor-joining bootstrap phylogenetic tree of the two *Cm*-ADH with ADHs sequences belonging to the medium-chain zinc-binding type (*At*-ADH1, *Vv*-ADH2, *Af*-ADH2, *Le*-ADH2, *St*-ADH3, *Fa*-ADH, *Md*-ADH, *Os*-ADH2 and *Zm*-ADH2) and short-chain type of ADHs (*At*-ADH, *Cs*-ADH, *Af*-ADH, *Os*-ADH, *Ds*-TRR2, *Zm*-ADHs, *Le*-ADHs, and *St*-ADHs). The percent bootstrap support for 1000 replicates is shown below each node. Amino acid sequences were aligned using Clustal W. *Fragaria x ananassa* ADH (*Fa*-ADH) accession number is CAA33613 (GeneBank).

## Expression of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 genes

Real time PCR analysis indicated that the two *Cm-ADH* genes studied here are specifically expressed in fruit. Vegetative tissues (leaves, stems, seeds, roots) and flowers exhibited no or very low expression (Fig. 4) even when treated with ethylene. The pattern of changes in transcript levels during fruit ripening was similar for the two *Cm-ADH* genes with transient and sharp increase at 39 days when ethylene production was maximum (Fig. 4). Both genes exhibited very low expression before and after the peak. In AS melon fruit where ethylene was strongly suppressed by antisens *ACO* mRNA or in WT fruit treated with the ethylene antagonist 1-MCP (for three days before harvest at 35 DAP) the transcript levels of both genes were almost undetectable (Fig. 4). However, exposure of AS fruit to ethylene resulted in stimulation of gene expression although the levels of mRNA never reached the values of WT fruit at the peak (Fig. 4).

Our data indicate that ethylene is a major regulator of *Cm-ADH1* and *Cm-ADH2* transcript levels. Partial involvement of ethylene in hypoxic induction of *Arabidopsis thaliana ADH1* in seedlings has been reported (Peng *et al.*, 2001). In tomato, Van der Straeten *et al.* (1991) showed that the accumulation of tomato *ADH* mRNA was related to fruit ripening, with 50 times higher mRNA accumulation in ripe as compared to green fruit. Expression of *Le-ADH2* is strongly induced during fruit ripening (Chen and Chase, 1993). However, the induction of expression during ripening is not related to hypoxic conditions in the fruit. Exogenous ethylene stimulated expression, but this appeared as to be indirect because it requires more than 24 h after ethylene treatment (Chen and Chase, 1993). Ethylene was also concluded not to be involved in hypoxic induction of *ADH* in maize and rice (Morrell and Greenway, 1989). In tomato, a partial cDNA clone showing homology to short-chain ADHs is expressed during ripening and expression was greatly reduced in the *rin* mutant (Picton *et al.*, 1993). In pear, the expression of an EST putatively encoding a short-chain ADH increased during ripening in parallel to the expression of the *ACO* gene

encoding for a key enzyme of ethylene biosynthesis (Fonseca *et al.*, 2004). In grape, a non-climacteric fruit, ethylene stimulates the expression of *Vv-ADH2* a gene essentially expressed at véraison, the onset of ripening (Tesnière and Verriès, 2000). Application of 1-MCP an antagonist of ethylene in berries results in the reduction of the expression of *Vv-ADH2* mRNA (Tesnière *et al.*, 2004). In addition, cell cultures of *Vitis vinifera* treated with 2-chloro ethyl phosphonic acid (CEPA), an ethylene regenerating compound, showed a stimulation of the expression of *Vv-ADH2* m-RNA as compared to control cells (Tesnière *et al.*, 2004). Furthermore, the promoter of the *Vv-ADH2* gene contains putative ethylene responsive element (ERE) motifs that are probably involved in responsiveness to ethylene treatment (Verriès *et al.*, 2004).



**Figure 4:** Ethylene production and *Cm-ADH* genes expression during fruit ripening and various organs of melon. A: ethylene production, B and C: levels of *Cm-ADHs* transcripts assessed by real time quantitative PCR. The experiments were carried out in triplicate. The X-axis represents various organs of melon (leaf, seed, stem, root) and flower; wild-type (WT) and antisense (AS) melon fruit at different days after pollination; WT (35 DAP) fruit exposed to 1-MCP ( $1 \mu\text{l l}^{-1}$ ) for 3 days, and AS fruit treated with ethylene ( $50 \mu\text{l l}^{-1}$ ) for 3 days.  $\Delta\Delta Ct$  in the Y-axis of each figure refers to the fold difference in *Cm-ADH1* and *Cm-ADH2* expression relative to seeds and to wild-type melon fruit treated three days with 1-MCP, respectively.

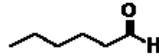
## **Alcohol dehydrogenase activity of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 recombinant proteins towards various substrates in vitro**

Because endogenous ADH activity was present in yeast, the biochemical characterization of the recombinant Cm-ADH proteins has been performed using a highly purified protein after two successive purifications steps by affinity column chromatography. As aldehyde reductases, the two recombinant enzymes showed a preference for aliphatic aldehydes, mainly acetaldehyde (Table 3). Using acetaldehyde as substrate, Cm-ADH1 shows 4.5 times more activity in the presence of NADPH than in the presence of NADH (Table 3). This was similar to the activity of Vv-ADH2 and Vv-ADH3 that have also strong preference for NADPH (Tesnière *et al.*, 2004). On the contrary, Cm-ADH2 had strong preference for NADH, with an activity of reduction of acetaldehyde that was about 6 times higher than with NADPH. Beside aliphatic aldehydes, Cm-ADH1 utilized also branched aldehydes as 2 and 3-methylbutyraldehyde, 2-methylpropionaldehyde and aromatic aldehydes such as benzaldehyde, but the activity for this type of substrates is approximately 4 to 70 times lower than with acetaldehyde both in the presence of NADPH or NADH (Table 3). Cm-ADH2 used almost exclusively aliphatic aldehydes. Activity with branched or aromatic aldehydes was between 20 to 40 times lower in the presence of NADH as a cofactor and not detectable or at trace levels in the presence of NADPH as a co-factor (Table 3).

The activity of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 towards the oxidation of ethanol was strictly NAD dependant with activities of 8865 and 441  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectively. No activity could be detected in the presence of NADP. These results are in agreement with the presence, in Cm-ADH1, of an Asp residue in position 230 (Figure 1) which is implicated in the fixation of NAD (Eklund *et al.*, 1976, Fan *et al.*, 1991). Information on the NAD binding site in short-chain ADHs is lacking. An Asp residue at the position 130 present in

all ADH sequences aligned in figure 2, except Ds-TRR2, could correspond to the Asp residue involved in NAD binding.

**Table 3:** Activities of purified recombinant Cm-ADH1 and Cm-ADH2 proteins towards different aldehydes (5 mM) and NADH or NADPH (0.25 mM). Activity is expressed in  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$  as the mean  $\pm$  SE of three replications.

Aldehydes	Cm-ADH1		Cm-ADH2	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
 Acetaldehyde	474 $\pm$ 96	2,216 $\pm$ 228	487 $\pm$ 38	80 $\pm$ 6
 Butyraldehyde	316 $\pm$ 41	980 $\pm$ 33	273 $\pm$ 41	60 $\pm$ 8
 Capronaldehyde	285 $\pm$ 56	978 $\pm$ 63	241 $\pm$ 36	57 $\pm$ 1
 2-methylbutyraldehyde	24 $\pm$ 13	41 $\pm$ 5	7 $\pm$ 1	ND
 3-methylbutyraldehyde	129 $\pm$ 30	483 $\pm$ 32	14 $\pm$ 3	TR
 2-methylpropionaldehyde	76 $\pm$ 6	88 $\pm$ 11	16 $\pm$ 2	TR
 Benzaldehyde	15 $\pm$ 2	30 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	ND

ND = Not detectable

TR = Traces

### **Kinetic parameters of recombinant Cm-ADHs proteins**

The kinetic parameters were determined using the preferential substrate and cofactor for the two enzymes operating as either reductases (acetaldehyde/NADPH for Cm-ADH1 or acetaldehyde/NADH for Cm-ADH2) or oxidases (ethanol/NAD for both enzymes). Table 4 shows that Cm-ADH1 had a  $K_m$  for acetaldehyde which was 10 times lower than the  $K_m$  for ethanol (0.25mM as compared with 2.5mM). The respective  $V_{max}$  were of 2500 and 5000  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . The  $K_m$  for NADPH was about 3.5 times lower than for NAD (0.07 and 0.25 mM, respectively). The Cm-ADH2 protein had a  $K_m$  for acetaldehyde which was about 18 times lower than for ethanol (0.24 and 4.52 mM). The corresponding  $V_{max}$  were 588.2 and 370.4  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$  respectively (Table 4). The  $K_m$  for NADH was lower (0.02 mM) than for NAD (0.37 mM). When compared with data obtained for other ADHs, it appeared that the  $K_m$  values for acetaldehyde of Cm-ADH1 and Cm-ADH2 (0.25 and 0.24 mM) were similar with the  $K_m$  for acetaldehyde of the grape Vv-ADH2 (0.45mM) reported by Tesnière *et al.* (2004). However, the  $V_{max}$  for acetaldehyde of Vv-ADH2 (300  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) was closer to Cm-ADH2 (588.2  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) than to Cm-ADH1 (2500  $\mu\text{mol.mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Low  $K_m$  values for the co-factors have also been observed by Tesnière *et al.* (2004) for the recombinant proteins of grape, Vv-ADH2 and Vv-ADH3, (0.02 and 0.04 mM, respectively). In addition, Salas and Sánchez (1998) have also described a very low  $K_m$  for NADPH of an ADH purified from olive fruit.

The lower  $K_m$  for the acetaldehyde substrate of the two melon ADHs as compared to ethanol suggest that these two enzymes operate preferentially as reductases of aldehydes into alcohols rather than oxidases of alcohols into aldehydes. This observation is confirmed by the catalytic efficiency (corresponding to the  $k_{cat}/K_m$  ratio) which is 5-fold (Cm-ADH1) to 30-fold (Cm-ADH2) higher for acetaldehyde as compared to ethanol (Table 4). Although these data have been obtained with recombinant proteins, it can be assumed however that the preferential production of alcohols also occurs in the fruit *in vivo*. Alcohols such as

ethanol, butanol, hexanol and 3-methylbutanol are indeed substrates for alcohol acyl-transferases (AAT) implicated in the aroma biosynthesis in melon fruit (Yahyaoui *et al.*, 2002; El-Sharkawy *et al.*, 2005). Therefore, the mode of action of the two ADHs of melon supports a role for the two enzymes in the biosynthesis of aroma in melon fruit. However, none of the melon recombinant ADHs were capable of converting different ketones such as acetone, 3-pentanone, 1-pentene-3-one,  $\beta$ -ionone and 6-methyl-5-heptene-2-one into the corresponding alcohols (data not shown) while some of these compounds are present in aroma volatiles of melon (Aubert and Bourger, 2004). Since some short-chain ADHs characterized in plants are capable of reducing ketones (Chase, 1999), it can be concluded that other ADH proteins may, therefore, be present and expressed in melon for the synthesis of such compounds.

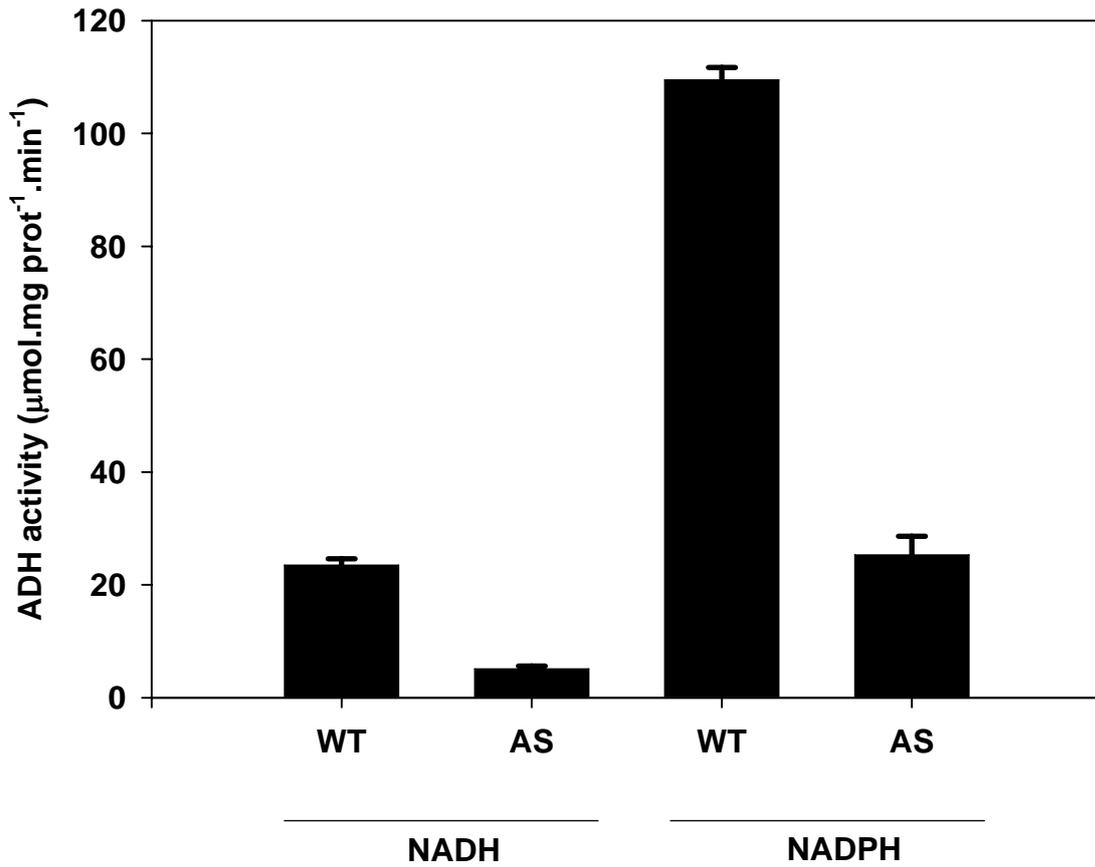
**Table 4:** Kinetic parameters of purified recombinant Cm-ADH1 and Cm-ADH2 proteins.

		<b>V<sub>max</sub></b> ( $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	<b>K<sub>m</sub></b> (mM)
<b>Cm-ADH1</b>			
<b>Acetaldehyde</b>	NADPH (0.25mM)	2500.0	0.25
<b>NADPH</b>	Acetaldehyde (1.25mM)	3333.3	0.07
<b>Ethanol</b>	NAD (0.25mM)	5000	2.5
<b>NAD</b>	Ethanol (20mM)	12500	0.25
<b>Cm-ADH2</b>			
<b>Acetaldehyde</b>	NADH (0.125mM)	588.2	0.24
<b>NADH</b>	Acetaldehyde (1.25mM)	555.6	0.02
<b>Ethanol</b>	NAD (0.125mM)	370.4	4.52
<b>NAD</b>	Ethanol (20mM)	526.3	0.37

### ADH activity in fruit

ADH activity was measured in fruit extracts of untransformed melon (WT) and antisense ACC oxidase melon (AS) with acetaldehyde as a substrate in the presence of NADH and NADPH (Fig. 5). ADH activity was always higher in WT than in AS fruit with both co-factors although activity in the presence of NADPH around 4 times higher. In considering that Cm-ADH1 has higher activity in the presence of NADPH, it is likely that this enzyme accounts for most of the ADH activity in fruit. However, *Cm-ADH1* gene

expression is much lower than *Cm-ADH2* which has preference for NADH. This suggests that other *Cm-ADH* genes may be expressed in ripening melon fruit. Nevertheless, figure 5 clearly shows that the suppression of ethylene production in AS fruit results in a strong reduction of ADH activity. This is in agreement with gene expression studies of figure 4 showing that both *Cm-ADH1* and *Cm-ADH2* gene expression was almost totally inhibited in ethylene suppressed AS fruit. Previous studies on *in vivo* bioconversion assays on fruit disks had also shown that ADH activity of fruit was strongly regulated by ethylene (Flores *et al.*, 2002). Residual activity in AS melon fruit suggests the presence of ethylene-independent ADH(s). In tomato, there is a strong increase in ADH activity during ripening (Speirs *et al.*, 2002) which is stimulated by ethylene treatment and correlated with the level of *Le-ADH2* gene expression (Chen and Chase, 1993). In non-climacteric fruit such as grape and strawberry where ethylene is not supposed to play an essential role, ADH activity also increases during ripening (Tesnière and Verriès, 2000; Moyano *et al.*, 2004). However, when the grape berries were treated with the ethylene action inhibitor 1-MCP, ADH activity was significantly reduced (Tesnière *et al.*, 2004). Altogether these data indicate that in both climacteric and non-climacteric fruit, some ADHs are regulated by ethylene, others are not.



**Figure 5:** ADH activity in WT and AS fruit (42 DAP). Enzyme activity was measured with 5 mM acetaldehyde as a substrate in the presence of 0.25 mM NADH or NADPH. Activity is expressed in  $\mu\text{mol mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$  as the mean  $\pm$  SE of three replications.

In conclusion, this paper shows that two highly divergent *ADH* genes are specifically expressed in ripening melon and are up-regulated by ethylene. They encode proteins that operate preferentially as aldehyde reductases. However, the two proteins have differential substrate and co-factors preference indicating that they probably play specific roles in providing substrates to the downstream alcohol acyl-transferases (Yahyaoui *et al.*, 2002; El-Sharkawy *et al.*, 2005).

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by the Midi Pyrénées Régional (grants N°01008920 and 03001146), the National Commission for Scientific and Technological Research (CONICYT) from Chile (Doctoral scholarship to D.M.), the CEPIA department of INRA (ANS 2002-2003 and postdoctoral scholarship to I. E.), and the Spanish Ministry of Education (Postdoctoral scholarship to F.B.F.). We thank B. Van der Rest and M. Zouine for their helpful advice on the biochemical characterization of ADH proteins and construction of the phylogenic tree.

## CHAPITRE II

### **CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'UNE FAMILLE D'ALCOOL ACYLTRANSFERASES DE MELON. MISE EN EVIDENCE DU ROLE CRUCIAL D'UN RESIDU THREONINE POUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

Ce chapitre correspond à la publication suivante:

El-Sharkawy I\*, Manríquez D\*, Flores FB, Regad F, Bouzayen M, Latché A and Pech JC (2005). Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology* 59 (2): 345-362.

\*Auteurs ayant contribué de façon égale.



## Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity<sup>★</sup>

Islam El-Sharkawy<sup>†</sup>, Daniel Manríquez<sup>†</sup>, Francisco B. Flores<sup>†</sup>, Farid Regad, Mondher Bouzayen, Alain Latché and Jean-Claude Pech<sup>\*</sup>

UMR 990 INRA/INPT-ENSAT "Génomique et Biotechnologie des Fruits", Av. de l'Agrobiopole, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France (\*author for correspondence; e-mail pech@ensat.fr);  
<sup>†</sup>These authors contributed equally to the work

Received 19 May 2005; accepted in revised form 16 June 2005

**Key words:** alcohol acyl-transferase, aromas, melon, site-directed mutagenesis, volatile esters

### Abstract

Volatile esters, a major class of compounds contributing to the aroma of many fruit, are synthesized by alcohol acyl-transferases (AAT). We demonstrate here that, in Charentais melon (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*), AAT are encoded by a gene family of at least four members with amino acid identity ranging from 84% (Cm-AAT1/Cm-AAT2) and 58% (Cm-AAT1/Cm-AAT3) to only 22% (Cm-AAT1/Cm-AAT4). All encoded proteins, except Cm-AAT2, were enzymatically active upon expression in yeast and show differential substrate preferences. Cm-AAT1 protein produces a wide range of short and long-chain acyl esters but has strong preference for the formation of *E*-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate. Cm-AAT3 also accepts a wide range of substrates but with very strong preference for producing benzyl acetate. Cm-AAT4 is almost exclusively devoted to the formation of acetates, with strong preference for cinnamoyl acetate. Site directed mutagenesis demonstrated that the failure of Cm-AAT2 to produce volatile esters is related to the presence of a 268-alanine residue instead of threonine as in all active AAT proteins. Mutating 268-A into 268-T of Cm-AAT2 restored enzyme activity, while mutating 268-T into 268-A abolished activity of Cm-AAT1. Activities of all three proteins measured with the preferred substrates sharply increase during fruit ripening. The expression of all Cm-AAT genes is up-regulated during ripening and inhibited in antisense ACC oxidase melons and in fruit treated with the ethylene antagonist 1-methylcyclopropene (1-MCP), indicating a positive regulation by ethylene. The data presented in this work suggest that the multiplicity of AAT genes accounts for the great diversity of esters formed in melon.

### Introduction

Aroma volatiles contribute to a large extent to the overall sensory quality of fruit. Research during

the last decades has been dedicated to the identification of volatile compounds present in fruit aromas, and to the elucidation of some of the biosynthetic routes by either bioconversion or by tracing of precursors (Sanz *et al.*, 1997; D'Auria *et al.*, 2002; Dudareva *et al.*, 2004). Recently, research efforts have been directed to the isolation of genes involved in the production of aroma

<sup>★</sup> Accession numbers Cm-AAT1 (CAA94432), Cm-AAT2 (AAL77060), Cm-AAT3 (AAW51125), and Cm-AAT4 (AAW51126).

volatiles of fruit (Aharoni *et al.*, 2000; Yahyaoui *et al.*, 2002; Beekwilder *et al.*, 2004) or scent of flowers (Dudareva and Pichersky, 2000; Shalit *et al.*, 2003). Although fruit aroma is generally a complex mixture of a wide range of compounds, volatile esters often represent the major contribution to the odour of fruit such as apple and pear (Paillard, 1990), banana (Shiota, 1993) pineapple (Elss *et al.*, 2005) and strawberry (Zabetakis and Holden, 1997). In cantaloupe melons esters represent the major group of aroma volatiles emitted and they are likely to be the key contributors to the unique aroma of ripe melon (Homatidou *et al.*, 1992; Beaulieu and Grimm, 2001). Among cantaloupe melons, the Charentais type is highly aromatic and the synthesis of aroma volatiles is regulated by the plant hormone ethylene (Flores *et al.*, 2002). Extension of shelf-life either by breeding or by genetic engineering has led to strong reduction in aroma volatiles production (Bauchot *et al.*, 1998; Aubert and Bourger, 2004).

The esterification step is catalysed by alcohol acyl-transferase enzymes (AAT) that transfer an acyl-CoA to an alcohol (Harada *et al.*, 1985). These enzymes are capable of combining different alcohols and acyl-CoAs resulting in the synthesis of a wide range of esters accounting for the diversity of esters emitted by the fruit. The alcohol moiety of the esters arises from either lipids or amino acids produced by the degradation of lipids and proteins respectively (Sanz *et al.*, 1997). The availability of the substrates and/or selectivity of the enzymes upstream of AATs may account, at least in banana, for the amount and type of ester formed (Wyllie and Fellman, 2000). However, it is possible the diversity of volatile esters arises from the multiplicity of genes encoding AAT enzymes with different specific substrate selectivity.

So far, in fruit and flowers only one or two AAT genes have been characterized (Dudareva *et al.*, 1998; Aharoni *et al.*, 2000; D'Auria *et al.*, 2002; Shalit *et al.*, 2003; Beekwilder *et al.*, 2004). In melon, two putative AAT genes have been isolated (*Cm-AAT1* and *Cm-AAT2*) with strong identity (84%), but only the *Cm-AAT1*-encoded protein showed AAT activity upon expression in yeast (Yahyaoui *et al.*, 2002). A large number of acyl-transferase genes are present in plants with around 70 members encountered in *Arabidopsis* (Pichersky and Gang, 2000). Although performing the same reaction, AAT proteins from different

fruit species may be highly divergent. For instance SAAT and *Cm-AAT1* have only 22% identity while they have similar preference for substrates (Aharoni *et al.*, 2000; Yahyaoui *et al.*, 2002). These considerations have led us to search for other AAT members in the melon and to characterize their substrate preferences. By comparing within-species and inter-species gene sequences we have also undertaken a site-directed mutagenesis approach to determine why *Cm-AAT2*, a gene closely related to *Cm-AAT1* was encoding a protein that was unable to produce volatile esters.

## Materials and methods

### Plant material and post harvest treatments

Wild-type (WT) and ACC oxidase antisense (AS) Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*, Naud cv. *Védrantais*) were used (Ayub *et al.*, 1996; Guis *et al.*, 1997). They were grown on a trellis in a greenhouse under standard cultural practices for fertilization and pesticide treatments. Freshly opened female flowers were tagged on the day of hand-pollination to identify fruit of known age. Melons were harvested after 32, 35, 37, 39 and 42 days after pollination (DAP) and ethylene production measured immediately after harvest. Fruit were selected for homogenous ethylene production. Stages of ripening of WT fruit, and equivalent age for AS fruit, corresponded to mature green (32 DAP), onset of ripening (35 DAP), early climacteric (37 DAP), full climacteric (39 DAP) and late climacteric (42 DAP). Antisense fruits, harvested 35 DAP, were exposed to 50  $\mu\text{l l}^{-1}$  ethylene for 1 and 3 days. The ethylene inhibitor, 1-methylcyclopropene (1-MCP) was also applied 35 DAP to WT fruit on the vine at 1  $\mu\text{l l}^{-1}$  in 3-l jars for one and three days before harvesting. Both treatments were performed with periodical flushing with air and re-injection of ethylene or 1-MCP. Vegetative tissues (leaves, stems, seeds and roots) and flowers were collected from plants grown in a greenhouse. All plant material was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### RNA isolation

Total RNA from fruit samples was extracted using the methods described by Boss *et al.* (1996). For

leaf, stem, seed, flower, and root material, total RNA was extracted according to the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). All RNA extracts were treated with DNase I (Promega, Madison, WI, USA) and cleaned up with a phenol-chloroform extraction.

#### *Isolation and in silico analysis of Cm-AAT sequences*

*Cm-AAT1* and *Cm-AAT2* had been isolated prior to this study (Aggelis *et al.*, 1997; Yahyaoui *et al.*, 2002). *Cm-AAT3* and *Cm-AAT4* have been isolated by PCR from a cDNA library of ripe melon. The SK primer (in Bluescript: 5'-CGCTCTAGAAGT-AGTGGATCCC-3') was combined with the degenerated primers, Cm-AAT (F): 5'-GTGG-ACITTTGGATGGGGAAARSCC-3' and Cm-AAT (R): 5'-GGSYTTTCCCATCCAAAGTC CAC-3', designed from a conserved region (VDFGWGK) among plants acyl-transferase (St Pierre *et al.*, 1998). The isolated fragments were cloned by using Qiagen PCR Cloning *plus* Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), sequenced and compared with database sequences using the BLAST program (Altschul *et al.*, 1997). Extension of the partial cDNA clones was carried out using the 3'- and 5'- RACE kit (Invitrogen, Paisely, UK). First strand cDNA synthesis was carried out using 10 µg of total DNase-treated RNA in a 50-µl aliquot followed by PCR with specific Cm-AAT primers using 1 µl of cDNA. A high fidelity PCR system (BMB Indianapolis, IN, USA) was used with the following PCR parameters: 3 min template denaturation at 95 °C for one cycle, followed by 5 cycles at 95 °C (30 s), 58 °C (1 min), and 72 °C (1 min 30 s), then 25 cycles at 95 °C (30 s),

58 °C (1 min), and 72 °C (2 min) with a final 10 min extension step at 72 °C to isolate the full length *Cm-AAT* sequences. Alignments of the predicted protein sequences were performed with ClustalX (Jeanmougin *et al.*, 1998) and GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997). The neighbour-joining tree was constructed with PAUP\* 4.0b3. The tree excluded regions of the alignment where poor matching occurred. Bootstrap values from 1000 replicates were obtained. The tree was visualised with the TreeView program (Page, 1996). Finally, a cDNA clone was isolated with homology to a β-actin sequence (AY859055). It was checked by Northern blot analysis (data not shown) that the β-actin mRNA level was similar in all treatments. The gene was, thereafter, used as an internal control in gene expression studies.

#### *Real time quantitative RT-PCR*

DNase-treated RNA (4 µg) was reverse transcribed in a total volume of 40 µl using Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Real-time quantitative PCR was performed using 100 ng of total RNA in a 20 µl reaction volume using SYBR GREEN PCR Master Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI PRISM 7900HT sequence-detection system. PRIMER EXPRESS software (PE-Applied Biosystems) was used to design gene-specific primers (Table 1). For all the genes studied here, optimal primer concentration was 300 nM. RT-PCR conditions were as follow: 50 °C for 2 min, followed by 95 °C for 10 min, then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. All RT-PCR experiments were run in triplicate with different cDNAs synthesized from

Table 1. Real-time quantitative PCR primers.

Name	Oligonucleotide sequence
Cm-actin-344 (F)	5'-GTGATGGTGTGAGTCACACTGTTC-3'
Cm-actin-426 (R)	5'-ACGACCAGCAAGGTCCAAAC-3'
Cm-AAT1-1181 (F)	5'-CCACAGGGGCCAGAATTACA-3'
Cm-AAT1-1284 (R)	5'-TGGAGGAGGCAAGCATAGACTT-3'
Cm-AAT2-1175 (F)	5'-CTATAATTGGAGGGTGTGGAATTATC-3'
Cm-AAT2-1311 (R)	5'-AACATTTGCCCTAAATCTTTCCAT-3'
Cm-AAT3-677 (F)	5'-CGCTTGATGACATGGCACAT-3'
Cm-AAT3-744 (R)	5'-GGCCTTACGGATAGCAGAGATC-3'
Cm-AAT4-659 (F)	5'-CAGTTGTACCCCGTCGAGTA-3'
Cm-AAT4-734 (R)	5'-AATATCGCTTCTGATCGGAACAC-3'

three biological replicates. Each sample was run in three technical replicates on 384-well plate. For each sample, a Ct (threshold constant given by the ABI PRISM 7900 Applied Biosystem 'sds' software) value was calculated from the amplification curves by selecting the optimal  $\Delta R_n$  (emission of reporter dye over starting background fluorescence) in the exponential portion of the amplification plot. Relative fold differences were calculated based on the comparative Ct method using the  $\beta$ -actin as an internal standard. To demonstrate that the efficiencies of the different gene primers were approximately equal, the absolute value of the slope of log input amount versus  $\Delta C_t$  was calculated for all the *Cm-AAT* and  $\beta$ -actin genes and was determined to be  $< 0.1$ . To determine relative fold differences for each sample in each experiment, the Ct value for *Cm-AAT* genes was normalized to the Ct value for  $\beta$ -actin and was calculated relative to a calibrator (flowers for *Cm-AAT1* and *Cm-AAT2*, seeds for *Cm-AAT3*, and antisense melon fruit, 39 DAP for *Cm-AAT4*) using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### *Expression of Cm-AAT and site-directed mutagenesis*

All *Cm-AAT* cDNAs were cloned in the pYES2.1 TOPO-TA cloning vector for regulated protein expression in yeast following the instructions provided by the manufacturer (Invitrogen, Paisley, UK). Auto-ligated construct was used as negative control. All the constructs were transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* cell line INVSc1. The strain harbouring the correct constructions were grown in selective medium (SC-U) with 2% galactose as inducer of the recombinant protein expression, at 30 °C and 250 rpm, according to Invitrogen recommendations, until the  $OD_{600}$  of the culture reached  $\sim 4$  U.

All *Cm-AAT* mutants were generated using the QuikChange (Stratagene, San Diego, CA, USA) PCR-based method with *Cm-AAT* genes cloned in the pYES2.1 TOPO-TA cloning vector. After that, all mutants were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* as described before.

#### *Purification of recombinant AAT*

Cells were collected by centrifugation (1800 g, 10 min at room temperature) from 50 ml of yeast

cultures induced with galactose and resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate pH 7.5, 10% v/v glycerol, 0.3 M NaCl) containing 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. The cells were mechanically ground in liquid nitrogen for 2 min and stored at  $-80$  °C until needed. To extract AAT enzyme, the powder was thawed and centrifuged at 45 000 g for 20 min at 4 °C. The crude extract obtained was purified by an affinity column designed to purify polyhistidine-tagged proteins (BD Talon Metal Affinity, BD Biosciences), according to the manufacturer protocol. Briefly, the enzyme was fixed to the resin in the presence of buffer A, and after removing the unbound proteins with several washes with the same buffer the recombinant protein was eluted with buffer A containing 150 mM imidazole. Proteins were quantified according to Bradford (1976).

#### *AAT enzyme activity assay with recombinant proteins*

AAT activity was assayed in 500  $\mu$ l total volume containing 70  $\mu$ l of purified protein (10–15  $\mu$ g), 2 mM alcohol, 250  $\mu$ M acyl-CoA and adjusted to final volume with buffer B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10% v/v glycerol, 1 mM DTT). The mixture was incubated at 30 °C for 20 min. Immediately after reaction 5  $\mu$ l the internal standard (methyl benzoate 0.5  $\mu$ l l<sup>-1</sup>) were added into the mixture. The volatile compounds were extracted with 250  $\mu$ l of pentane, vortexed for 1.5 min and the pentanolic phase was concentrated. The quantification of these compounds was done by gas chromatography (GC); 1  $\mu$ l of concentrated pentanolic phase was injected into the GC equipment with a flame ionisation detector (GC-FID). The GC-FID equipment was made up of a Hewlett-Packard gas chromatograph (model 5890) equipped with a HP-Innowax cross-linked polyethylene glycol column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m). Injector and detector temperatures were 250 °C. The oven temperature was programmed from 40 °C (1 min) to 60 °C (1 min) at a rate of 2 °C min<sup>-1</sup> and finally to 190 °C (5 min) at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup>. Nitrogen was used as a carrier gas at 100 kPa. Compounds were identified by comparison of retention times with those of authentic standards.

#### AAT activity assay of melon fruit crude proteins

Total protein from melon pulp was extracted using the method described by Harada *et al.* (1985) with modifications. One gram of mesocarp tissue with 1 ml of extraction buffer (250 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT) was ground mechanically in liquid nitrogen during 2 min and the protein crude extract was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until needed. The protein extract was thawed in ice and centrifuged at 45 000 *g* for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant phase was desalted using Sephadex G-25 columns (Amersham Biosciences) and eluted with buffer B. Total proteins were quantified according to Bradford (1976). The AAT assay was performed as described above, the volume of soluble fraction of protein extract was 300  $\mu\text{l}$  and the total incubation time was 30 min.

#### Results and discussion

##### *The AAT gene family of melon and predicted proteins*

In the present work, two additional full-length cDNAs have been isolated, *Cm-AAT3* and *Cm-AAT4*, putatively encoding alcohol acyl-transferases (AAT) that differed from the previously isolated *Cm-AAT1* and *Cm-AAT2* genes (Yahyaoui *et al.*, 2002). Multiple alignment of the four putative *Cm-AAT* and other characterized *AAT* genes from fruit or flowers (Figure 1) highlighted a number of conserved motifs that are common to the plant BAHD (benzylalcohol acetyl-, anthocyanin-O-hydroxy-cinnamoyl-, ant-

ranilate-N-hydroxy-cinnamoyl/benzoyl-, deacetyl-vindoline acetyltransferase, O-acyltransferases) family (St Pierre and De Luca, 2000). Among them, the HXXXD motif located in the middle of the sequence (168–172 residues in *Cm-AAT1*) is the only conserved motif between the higher plants *AATs* and yeast, thus suggesting that this element is involved in the catalytic activity of acyl-transfer from an acyl-CoA to an alcohol (Yoshimoto *et al.*, 1999). Another highly conserved motif, DFGWG, was present near the C terminus (380–385 residues in *Cm-AAT1*). The recent discovery of the crystal structure of a member of the BAHD family, vinorine synthase, allowed to show that the HXXXD motif region participating in catalysis was located in the centre of the reaction channel, while the DFGWG motif, which is necessary for the reaction, was located away from the active site and seems to play a structural role (Ma *et al.*, 2005). A third less conserved sequence, LXXyypXaGr, is present near the N terminus (Aharoni *et al.*, 2000; St-Pierre and De Luca, 2000), corresponding to residues 76–85 in *Cm-AAT1* (Figure 1).

The *Cucumis melo AAT1-4* encode proteins of 462, 461, 459, and 479 amino acids, respectively, which corresponds to approximately the average size of other plant *AATs* (Table 2). The deduced molecular mass was of 51.5, 51.8, 51.1, and 55.0 kDa and the theoretical pIs of 8.0, 8.5, 7.64, and 7.62, respectively. Amino acid sequence identities over the whole sequence of *AAT* genes from melon and other species are presented in Table 2. There is considerable divergence among *AATs* not only between species, but also within *Cucumis melo*. Among melon *Cm-AATs*, considerable

Table 2. Amino acid sequence comparison between the predicted full length *Cucumis melo*, *Clarkia breweri*, *Fragaria x ananassa*, *Fragaria vesca*, *Musa sapientum*, and *Rosa hybrida* alcohol acyl-transferase (AAT) proteins.

Protein		Amino acid identity (%)			
Name	Size	<i>Cm-AAT1</i>	<i>Cm-AAT2</i>	<i>Cm-AAT3</i>	<i>Cm-AAT4</i>
<i>Cm-AAT1</i>	462	–			
<i>Cm-AAT2</i>	461	84	–		
<i>Cm-AAT3</i>	459	58	60	–	
<i>Cm-AAT4</i>	479	22	23	21	–
<i>Cb-BEBT</i>	456	52	52	70	22
SAAT	452	22	22	23	34
VAAT	455	23	23	23	35
<i>Rh-AAT</i>	457	24	24	24	32
<i>Cb-BEAT</i>	433	26	25	24	28
<i>Ban-AAT</i>	419	31	31	34	22

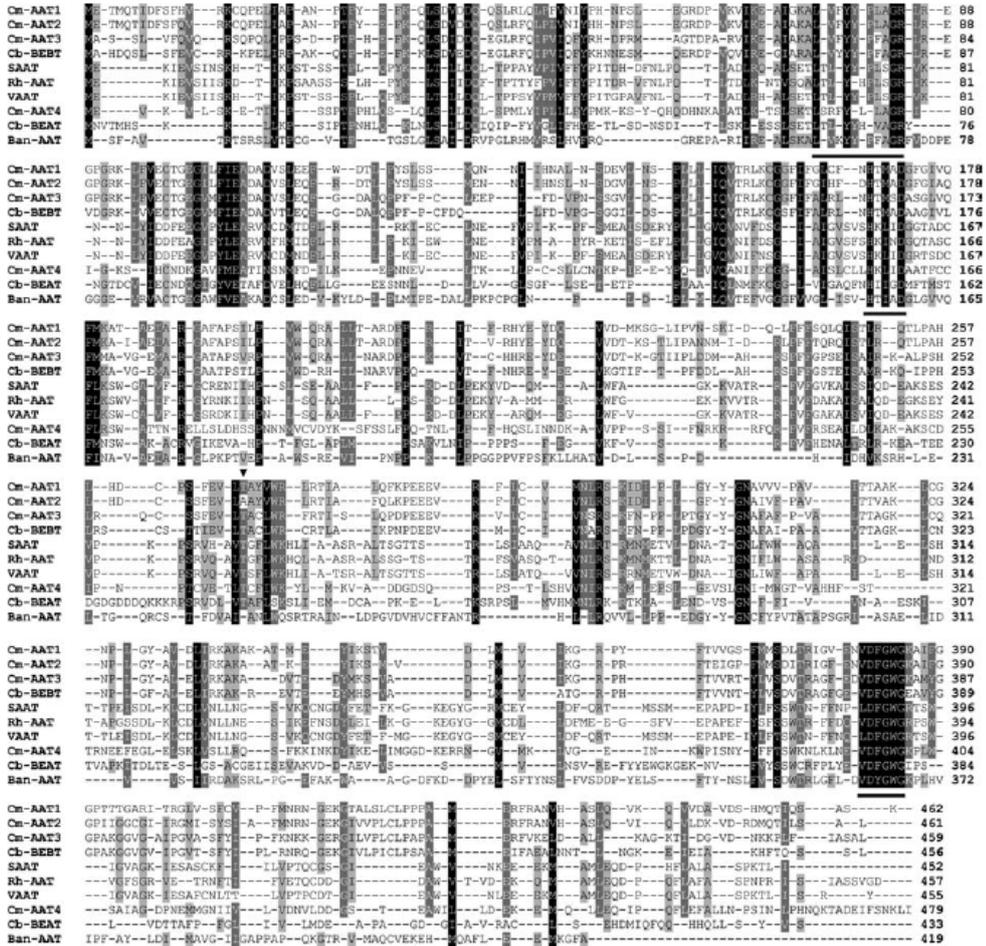


Figure 1. Amino acid sequence alignment of the *Cucumis melo* enzymes, Cm-AAT1 (CAA94432), Cm-AAT2 (AAL77060), Cm-AAT3 (AAW51125), and Cm-AAT4 (AAW51126) with closely related sequences *Clarkia breweri* Cb-BEBT (AAN09796), Cb-BEBT (AAF04787), *Musa sapientum* Ban-AAT (CAC09063), *Fragaria x ananassa* SAAT (AAG13130), *Fragaria vesca* VAAT (CAC09062), and *Rosa hybrida* Rh-AAT (AAW31948) using Clustal X program. Conserved residues are shaded in black. Dark grey shading indicates similar residues in eight out of ten of the sequences and clear grey shading indicates similar residues in six out of ten of the sequences. The underlined amino acids represent the conserved regions of plant acyl-transferase considered as playing role in the activity. The arrow represents the residue which has been studied by site-directed mutagenesis.

divergence exist between Cm-AAT1 and Cm-AAT4 with 22% identity only, although Cm-AAT1, Cm-AAT2 and Cm-AAT3 are more closely identical (84–58%). Melon Cm-AAT1-3, but not Cm-AAT4, have high identity to Cb-BEBT with 52%, 52%, and 70% identity,

respectively. Within the fruit AAT characterized so far, the VAAT gene from wild strawberry, showed the highest identity (35%) with the melon Cm-AAT4 (Table 2).

A phylogenetic tree comprising ten AAT sequences from six species, *Cucumis melo*, *Fragaria*

*x ananassa*, *Fragaria vesca*, *Musa sapientum*, *Clarkia breweri*, and *Rosa hybrida* has been generated (Figure 2) showing three main subfamilies (I, II, and III) based on sequence conservation. Establishing a correlation between phylogenesis and functional properties of the encoded proteins is hampered by the diversity of potential substrates and by the fact that authors have not always tested the same range of precursors (combinations of alcohols and acyl-CoAs). However, published data and Table 3 allow outlining a number of functional characteristics. Cm-AAT4, which is so far the only member of subfamily I, has almost exclusive preference for producing acetate esters. However, although Cm-AAT4 is quite divergent from the other AATs, the encoded enzyme has the same strong preference for producing cinnamoyl acetate, Z-2-hexenyl acetate and geranyl acetate. Similarly, a member of subfamily III, Ban-AAT of banana, has also strong preference for the formation of cinnamoyl and geranyl acetate (Beekwilder

*et al.*, 2004). Subfamily II comprises three members with only two of them (Rh-AAT and SAAT) having the same preference for generating geranyl acetate (Shalit *et al.*, 2003; Beekwilder *et al.*, 2004). Despite strong sequence identity, the SAAT and VAAT proteins differed in their substrate preference (Beekwilder *et al.*, 2004). Subfamily III comprises a large number of sub-branches in which very few functional similarities exist. However, the melon Cm-AAT3 and the *Clarkia* Cb-BEBT have in common a strong preference for synthesizing benzyl acetate (D'Auria *et al.*, 2002). Interestingly, this preference is also seen in Cb-BEAT which is quite divergent (Dudareva *et al.*, 1998). Another functional divergence within this subfamily that has been reported previously (Yahyaoui *et al.*, 2002) is the inability of Cm-AAT2 to generate volatile esters contrary to its closest neighbour, Cm-AAT1. A re-evaluation of the functional similarities or divergences will become possible when a wider range of acyl donors will be tested. The activity of many of the proteins mentioned in the phylogenetic tree has been tested with acetyl-CoA only as acyl donor (Cb-BEAT, Rh-AAT, VAAT, Ban-AAT).

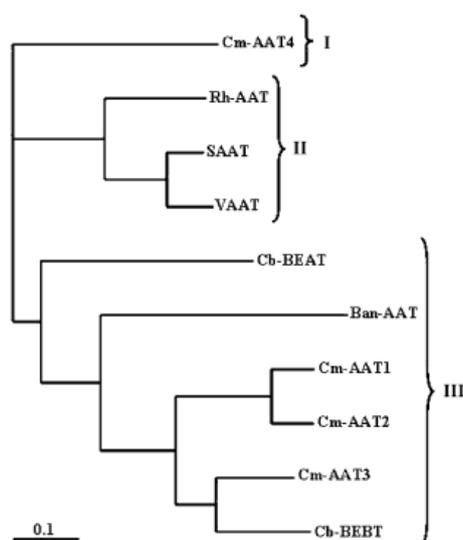


Figure 2. Phylogenetic relationships between *Cucumis melo* (Cm-AAT1, Cm-AAT2, Cm-AAT3, Cm-AAT4); *Clarkia breweri* (Cb-BEBT, Cb-BEAT); *Musa sapientum* (Ban-AAT); *Fragaria x ananassa* (SAAT); *Fragaria vesca* (VAAT); and *Rosa hybrida* (Rh-AAT) based on full-length amino acid sequence. Bootstrap confidence values from 1000 replicates are indicated I, II, and III correspond to the alcohol acyl-transferase (AAT) protein subfamilies.

#### Expression of Cm-AAT genes

Real time PCR analysis indicated that all *Cm-AAT* genes studied here are specifically expressed in fruit. Vegetative tissues (leaves, stems, seeds and roots) and flowers exhibited no or very low expression (Figure 3) even when treated with ethylene (data not shown). Transcript levels for all four *Cm-AAT* genes were by far highest in the fruit at the peak of ethylene production (Figure 3), although transcription levels of *Cm-AAT3* was 35, 28, and 27 times lower than *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, and *Cm-AAT4*, respectively. Small differences were observed in the pattern of expression before and after the peak. *Cm-AAT2* and *Cm-AAT4* expression was already detectable at 32 DAP while no expression was detected for *Cm-AAT1* and *Cm-AAT3*. In addition, transcript levels were present at significant levels before and after the peak of ethylene production for *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, and *Cm-AAT4* (35, 37 and 42 DAP) while transcripts for *Cm-AAT3* were very low at the same stages (Figure 3). In AS melon fruit where ethylene was strongly suppressed by antisense *ACC oxidase* (*ACO*) mRNA

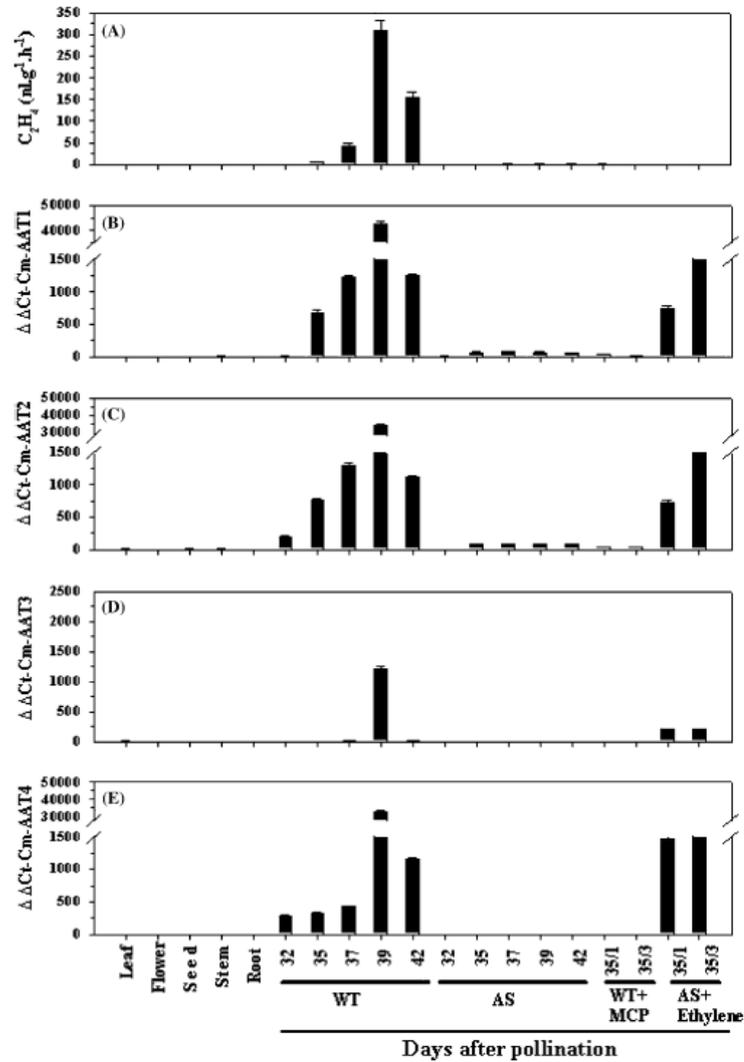


Figure 3. Ethylene production and *Cm-AATs* gene expression from ripening stages and various organs of melon. A: ethylene production; B–E: levels of *Cm-AAT1-4* transcripts assessed by real-time quantitative PCR. The experiments were carried out in triplicate. The x-axis represents various organs of melon (leaf, flower, seed, stem, and root); wild-type (WT) and antisense (AS) melon fruit at different days after pollination; WT (35 DAP) fruit exposed to  $1 \mu\text{l l}^{-1}$  MCP for 1 and 3 days; and AS (35 DAP) fruit treated with ethylene ( $50 \mu\text{l l}^{-1}$ ) for 1 and 3 days.  $\Delta\Delta C_t$  in the y-axis of each figure refers to the fold difference in *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3*, and *Cm-AAT4* expression relative to flowers, seeds, and antisense melon fruit (39 DAP), respectively.

Table 3. Activity of the recombinant Cm-AAT purified enzymes towards different types of alcohols and acyl-CoAs.

	Alcohol	Carbon No.	Acyl-CoA	Carbon No.	Esters produced	Ester reported in melon	Cm-AAT1	Cm-AAT3	Cm-AAT4
1	Ethanol	C2:0	Acetyl-CoA	C2:0	Ethyl acetate	+	ND	ND	ND
2	1-Butanol	C4:0	Acetyl-CoA		1-Butyl acetate	+	1 007 ± 139	542 ± 72	ND
3	1-Hexanol	C6:0	Acetyl-CoA		1-Hexyl acetate	+	1 479 ± 94	89 ± 17	117 ± 3
4	1-Heptanol	C7:0	Acetyl-CoA		1-Heptyl acetate	+	637 ± 29	ND	352 ± 20
5	1-Octanol	C8:0	Acetyl-CoA		1-Octyl acetate	+	150 ± 1	ND	345 ± 7
6	Z-2-hexen-1-ol	C6:1	Acetyl-CoA		Z-2-Hexenyl acetate	+	799 ± 33	482 ± 12	1863 ± 59
7	E-2-hexen-1-ol	C6:1	Acetyl-CoA		E-2-Hexenyl acetate	NR	2 941 ± 42	131 ± 1	392 ± 2
8	Z-3-hexen-1-ol	C6:1	Acetyl-CoA		Z-3-Hexenyl acetate	+	1 243 ± 12	77 ± 0	TR
9	E-3-hexen-1-ol	C6:1	Acetyl-CoA		E-3-Hexenyl acetate	+	483 ± 48	26 ± 4	122 ± 26
10	2-Methylpropanol	C4:0	Acetyl-CoA		2-Methylpropyl acetate	+	81 ± 30 <sup>a</sup>	ND	ND
11	2-Methyl-1-butanol	C5:0	Acetyl-CoA		2-Methyl-1-butyl acetate	+	377 ± 25	104 ± 13	ND
12	3-Methyl-1-butanol	C5:0	Acetyl-CoA		3-Methyl-1-butyl acetate	+	341 ± 23	352 ± 31	ND
13	Geraniol	C10:2	Acetyl-CoA		Geranyl acetate	NR	TR	TR	1013 ± 118
14	Benzyl alcohol	C7:3	Acetyl-CoA		Benzyl acetate	+	1 544 ± 31	16 285 ± 1231	547 ± 48
15	2-Phenylethyl alcohol	C6:3	Acetyl-CoA		2-Phenylethyl acetate	+	961 ± 75	163 ± 4	ND
16	Cinnamyl alcohol	C9:4	Acetyl-CoA		Cinnamoyl acetate	NR	124 ± 7	TR	3 961 ± 219
17	Ethanol	C2:0	Propanoyl-CoA	C3: 0	Ethyl propanoate	+	ND	ND	ND
18	1-Butanol	C4:0	Propanoyl-CoA		1-Butyl propanoate	+	ND	67 ± 5 <sup>a</sup>	ND
19	3-Methyl-1-butanol	C5:0	Propanoyl-CoA		3-Methyl-1-butyl propanoate	NR	80 ± 2	552 ± 3	ND
20	Hexanol	C6:0	Propanoyl-CoA		Hexyl propanoate	NR	576 ± 15	83 ± 4	ND
21	2-Phenylethyl alcohol	C6: 3	Propanoyl-CoA		2-Phenylethyl propanoate	+	728 ± 27	212 ± 24	ND
22	Ethanol	C2:0	Butanoyl-CoA	C4:0	Ethyl butanoate	+	96 ± 6	205 ± 10	469 ± 42
23	Ethanol	C2:0	2-methylpropanoyl-CoA		Ethyl 2-methylpropanoate	+	ND	ND	ND
24	3-Methyl-1-butanol	C5:0	2-methylbutanoyl-CoA		3-Methyl-1-butyl-2-methylbutanoate	NR	46 ± 4	1837 ± 110	38 ± 5
25	Ethanol	C2:0	Hexanoyl-CoA	C6: 0	Ethyl hexanoate	+	28 ± 3	40 ± 5	ND
26	1-Butanol	C4:0	Hexanoyl-CoA		1-Butyl hexanoate	+	190 ± 10	298 ± 8	ND
27	3-Methyl-1-butanol	C5:0	Hexanoyl-CoA		3-Methyl-1-butyl hexanoate	+	275 ± 6	950 ± 14	ND
28	Hexanol	C6:0	Hexanoyl-CoA		Hexyl hexanoate	NR	2 635 ± 91	189 ± 20	ND
29	2-Phenylethyl alcohol	C6:3	Hexanoyl-CoA		2-Phenylethyl hexanoate	+	868 ± 103	683 ± 36	ND

Activity is expressed in  $\mu\text{kat mg}^{-1}$  protein as the mean  $\pm$  SE of three replicates. NR, not reported in the literature; ND, non detectable; TR, traces, bold indicates maximum activity for the protein.

or where ethylene action was suppressed by treating WT fruit with the ethylene antagonist 1-MCP for one and 3 days before harvest at 35 DAP the transcript levels were strongly (*Cm-AAT1/2*) or totally (*Cm-AAT3/4*) inhibited (Figure 3). Interestingly, exposing AS fruit to ethylene for one and 3 days before harvest at 35 DAP resulted in strong stimulation in the mRNA levels of all *Cm-AAT* (Figure 3).

The fruit-specific expression of *Cm-AATs* is in agreement with previous results reported for *Cm-AAT1* and *Cm-AAT2* (Aggelis *et al.*, 1997; Yahyaoui *et al.*, 2002). The expression of the *VAAT* and *SAAT* genes from wild and cultivated strawberry respectively, and banana *Ban-AAT* gene were also fruit specific and strongly induced during ripening (Medina-Suarez *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 1999; Aharoni *et al.*, 2000). Other *O*-acetyltransferases also show organ-specific expression as *Cb-BEBT* that expressed specifically in the stigma (D'Auria *et al.*, 2002), *DAT* in the leaves (St-Pierre *et al.*, 1998), *Cb-BEAT* and *Rh-AAT* in the flowers (Dudareva *et al.*, 1998; Shalit *et al.*, 2003).

Our data indicate that ethylene is a major regulator of all *Cm-AAT* transcript levels. Similarly, ethylene initiates *Ban-AAT* gene expression in banana (Medina-Suarez *et al.*, 1997). The role of ethylene on the expression of the strawberry *SAAT* and *VAAT* has not been addressed but both genes are strongly induced during fruit ripening (Nam *et al.*, 1999; Aharoni *et al.*, 2000).

*Alcohol acyl-transferase activity of Cm-AAT recombinant proteins towards various substrates in vitro*

As demonstrated previously for *Cm-AAT1* (Yahyaoui *et al.*, 2002), recombinant yeasts expressing *Cm-AAT3* or *Cm-AAT4* genes were capable of producing high amounts of esters upon addition of the acyl-CoA and alcohol residues, contrary to control yeast transformed with the vector only for which the amount of esters emitted was at trace levels.

The capacity of the highly purified recombinant proteins (*Cm-AAT1*, *Cm-AAT3* and *Cm-AAT4*) to produce esters was tested in the presence of 29 combinations of substrates, each combination being tested individually. Table 3 shows that *Cm-AAT1* and *Cm-AAT3* could accept a wide range of combinations of acyl and alcohol

substrates, while *Cm-AAT4* was almost specific to the transfer of acetate. However, each protein showed marked preferences for the formation of some compounds. *Cm-AAT1* was highly active in the formation of *E*-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate (almost 3000 pkat mg<sup>-1</sup> protein) and to a lesser extent (between 1000 and 1500 pkat mg<sup>-1</sup> protein) in the formation of four other compounds, butyl, hexyl, *Z*-3-hexenyl and benzyl acetates. These findings are in general agreement with the data reported earlier by Yahyaoui *et al.* (2002) for crude extracts of the same recombinant enzyme. *Cm-AAT3* also accepted a wide range of substrates but the activity for producing benzyl acetate was very high (over 16000 pkat mg<sup>-1</sup> protein) as compared to the two next preferred activities (less than 2000 pkat mg<sup>-1</sup> protein) for the formation of 3-methylbutyl-2-ethylbutanoate). As for *Cm-AAT4*, it could convert a narrowest range of substrates as compared to *Cm-AAT1* and *Cm-AAT3* with almost exclusive preference for the transfer of the acetyl moiety. *Cm-AAT4* had highest activity for the formation of cinnamoyl acetate (almost 4000 pkat mg<sup>-1</sup> protein). The next two preferred activities were for *Z*-2-hexenyl acetate (ca. 1800 pkat mg<sup>-1</sup> protein) and geranyl acetate (ca. 1000 pkat mg<sup>-1</sup> protein). Interestingly, the highest activity of *Cm-AAT4* for the synthesis of cinnamoyl acetate is also the case for the *Ban-AAT* protein of banana (Beekwilder *et al.*, 2004). A scheme clearly showing the range of substrates accepted and the preference of each of the three proteins is given in Figure 4.

The large majority of esters made by the three *Cm-AAT* enzymes (Table 3) have been reported in the aromatic volatiles produced by cantaloupe melons (Beaulieu and Grimm, 2001). However, some of the esters produced by the recombinant proteins have not been reported to be evolved by melons. This is the case for compounds which are produced at a high rate such as *E*-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate by *Cm-AAT1*, 3-methylbutyl 2-ethylbutanoate by *Cm-AAT3* and cinnamoyl acetate and geranyl acetate by *Cm-AAT4* (Table 3). Similarly, the *SAAT* and *Ban-AAT* enzymes have strong preference for generating geranyl acetate and cinnamoyl acetate, respectively, whereas these volatile esters have not been reported among volatiles strawberry and banana fruit (Shiota, 1993; Perez *et al.*, 1996). This

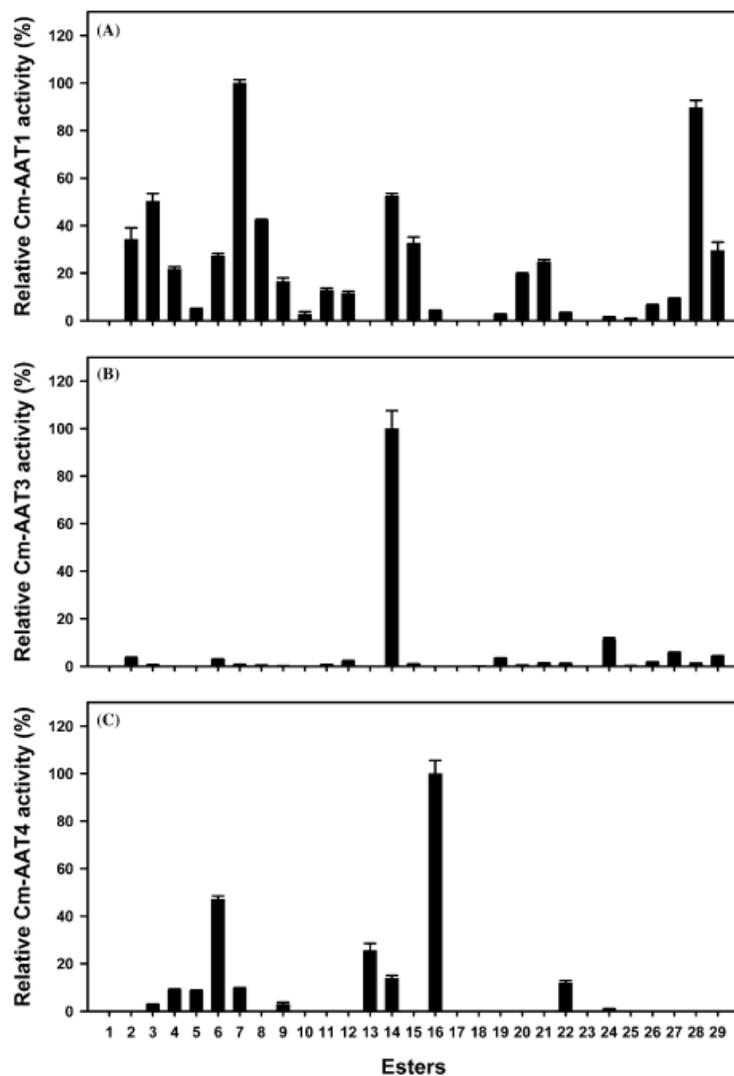


Figure 4. Substrate specificity of the recombinant Cm-AAT enzymes towards different types of alcohols and acyl-CoAs. A: Cm-AAT1; B: Cm-AAT3; C: Cm-AAT4. Activity was measured after purification of the proteins as described in Materials and methods. The number at the x-axis correspond to the esters listed in Tables 3 and 4. Activity is expressed as % of the most active substrate: a: 2490 pkat  $\text{mg}^{-1}$  protein; b: 16285 pkat  $\text{mg}^{-1}$  protein; c: 3961 pkat  $\text{mg}^{-1}$  protein.

indicates that, *in fructo*, the availability of the corresponding substrates may control the formation of esters. The availability of the precursors or

the selectivity of enzymes upstream in the pathway has been already reported as limiting the synthesis of some esters in banana (Wyllie and Fellman,

2000). Inversely, the three recombinant Cm-AATs have low or no capacity to form ethyl esters (ethyl acetate, ethyl propanoate, and ethyl 2-methylpropanoate, Table 3) that are abundant in the volatiles evolved by melon fruit (Beaulieu and Grimm, 2001) suggesting that there are likely yet unidentified *AAT* genes within the melon genome. It has already been reported that several recombinant AATs lack capacity to form ethyl acetate, such as Cb-BEBT and Cb-BEAT (Dudareva *et al.*, 1998; D'Auria *et al.*, 2002), whereas, VAAT, Rh-AAT, SAAT, and Ban-AAT can produce only trace amounts of such esters (Shalit *et al.*, 2003; Beekwilder *et al.*, 2004).

*Estimation of AAT activity during melon ripening with preferred substrates of each AAT protein*

The strong preference of each Cm-AAT protein for some substrates allowed the evaluation of the corresponding activity in melon fruit. Figure 5 shows that Cm-AAT activity of all proteins was very high at 42 DAP, i.e. after the peak of ethylene when fruit was already at an advanced stage of ripening. Such a high activity occurred few days after the sharp peak of gene expression that occurred at 39 DAP (Figure 3). In all cases, activity was low at 32 DAP. It increased steadily from 35 to 42 DAP for Cm-AAT1 while a strong increase occurred later around 39 DAP for Cm-AAT3 and Cm-AAT4. Ethylene-suppressed fruit (AS) showed low or strongly reduced activity for the preferred substrates of Cm-AAT1, Cm-AAT3 and Cm-AAT4, indicating strong ethylene dependence for the expression of the three proteins. This is in agreement with data on gene expression (Figure 3). Residual activity present in AS fruit may result from other yet non-identified proteins using the same substrates and showing ethylene-independent expression. This would be in agreement with previous data showing that the overall AAT activity of melon fruit was partly ethylene-independent (Flores *et al.*, 2002). However, the preferred substrates used here for determining activities are not fully specific for a given Cm-AAT, so that these data taken alone are not sufficient to conclude in the presence of other proteins.

The Charentais melon used in this study belongs to the traditional genotype, 'Védrantais' known for its fast ripening rate and their production of potent aromas. However, aroma

production is very transient and limited to fully mature fruit so that consumers are often disappointed when consumption is not made at the right stage. The very sharp AAT activity just after the peak of ethylene production accounts for such a behaviour. In modern mid or long shelf-life Charentais genotypes as in American cantaloupes of the *reticulatus* type, the ripening rate is slower. Beaulieu and Grimm (2001) showed that in melons of the latter group (Sol Real genotype) there was a progressive increase of aroma production during ripening with a maximum in fully ripe fruit and a decrease in over-ripe fruit. In another genotype of cantaloupe, 'Arava', Shalit *et al.* (2001) have demonstrated that AAT activity reached its higher level in fully ripe fruit. Cell free extracts of 'Arava' were capable of acetylating a number of alcohols (1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, isoamyl alcohol, 1-octen-3-ol, benzyl alcohol, phenyl ethyl alcohol, and 3-methylthio-1-propanol), but it is probable that several AAT isoforms were present in the extract. On the other hand, Wang *et al.* (1996) had shown that in another American cantaloupe genotype (Makdimon) the highest production of esters occurred during the latest stages of ripening.

In strawberries, a non-climacteric fruit, AAT activity increased during ripening and reached its maximum at the red-dark stage with some decrease in over-ripe fruit (Perez *et al.*, 1996).

In the apple the maximum production of esters occurs at the climacteric peak, suggesting that the activity of alcohol acyl-transferases was maximum at this stage (Song and Bangerth, 1996). Ethylene plays a major role in the regulation of volatiles production in climacteric fruit. In melon and apple the production of ester volatiles is strongly depressed by ethylene suppression in transgenic lines (Bauchot *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2002; Defilippi *et al.*, 2004). Apples continuously require ethylene for the synthesis of volatiles (Fan *et al.*, 1998) and treatment with 1-MCP results in strong reduction in ester volatiles emission (Lurie *et al.*, 2002; Defilippi *et al.*, 2004). In the apple ethylene suppression had no effect on the production of aldehyde and alcohol precursors while it strongly reduced ester formation (Dandekar *et al.*, 2004), AAT activity and gene expression (Defilippi *et al.*, 2005). In apples treated with aminoethoxyvinylglycine (AVG), an inhibitor of ethylene biosynthesis, the production

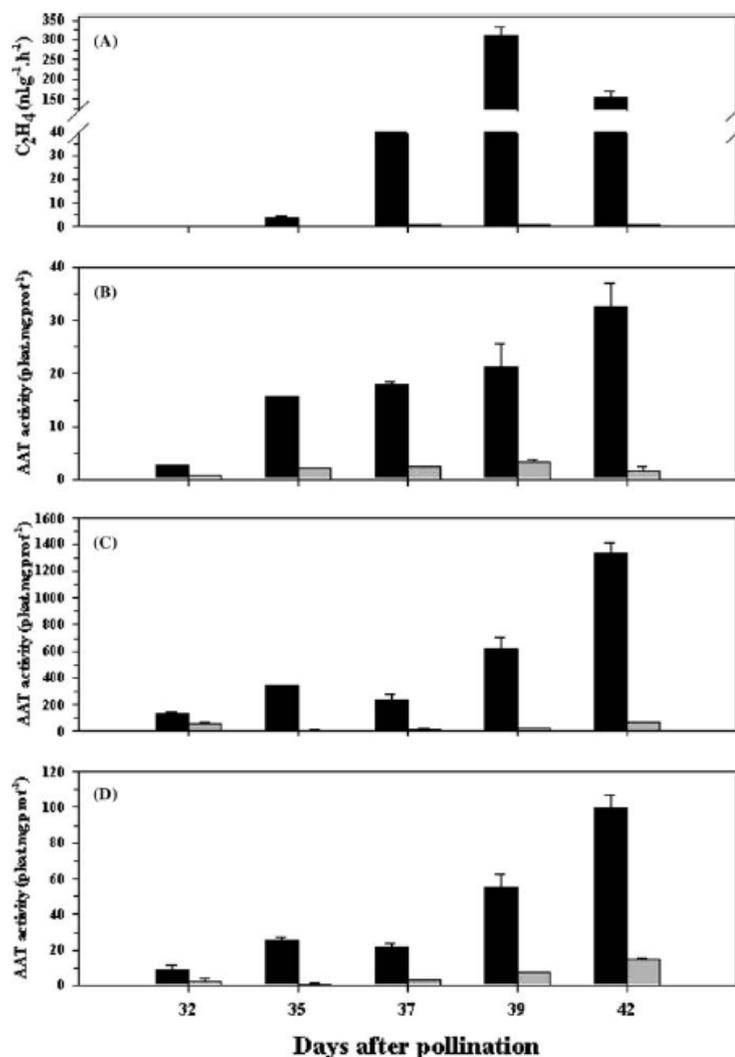


Figure 5. Ethylene production and alcohol acyl-transferases activity of crude protein extracts of WT (black bars) and AS (grey bars) melon fruit at different days after pollination (DAP). A: ethylene production. B: activity for Cm-AAT1 (measured with *E*-2-hexene-ol and acetyl-CoA), C: activity for Cm-AAT3 (measured with benzyl alcohol and acetyl-CoA) and for D: activity for Cm-AAT4 (measured with cinnamyl alcohol and acetyl-CoA). Activities were expressed in  $\text{pkat mg}^{-1}$  protein as the mean  $\pm$  SE of three replicates.

of esters was reduced by 21% as compared to untreated fruit (Mir *et al.*, 1999). In ethylene suppressed melon, there was an inhibition of ester formation, but it was related to both a strong

inhibition of the reduction of aldehydes into alcohols by alcohol dehydrogenase and to a 50% reduction in AAT activity (Flores *et al.*, 2002). In this paper, some ethylene independent

production of esters has been reported in melon fruit extracts although the three genes identified appear to be regulated by ethylene (data not shown). This suggests that other genes remain to be isolated that show ethylene-independent regulation.

*Search for the failure of Cm-AAT2 to produce volatile esters*

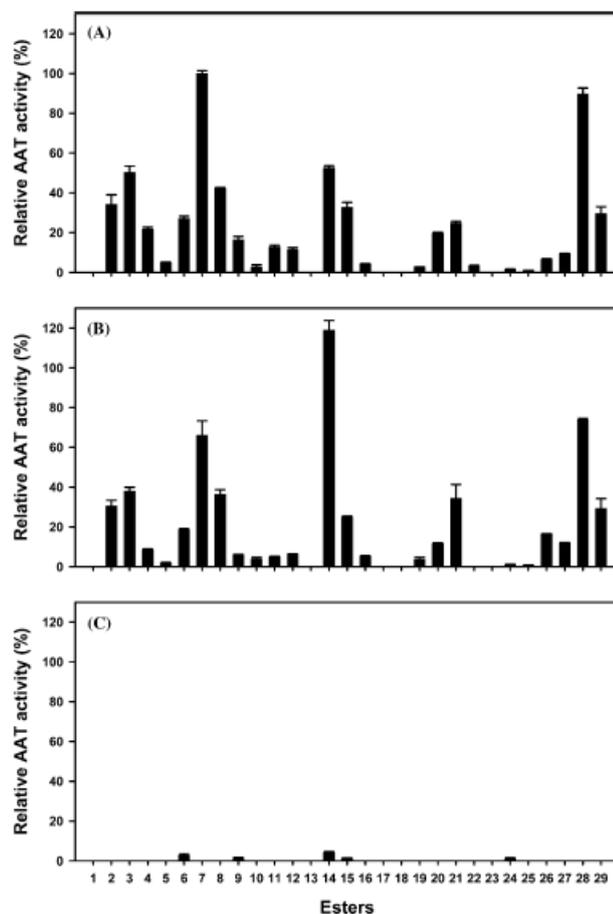
Yahyaoui *et al.* (2002) isolated a *Cm-AAT2* gene whose encoded protein was unable to produce volatile esters upon expression in yeast despite its strong sequence identity to Cm-AAT1 (84%, Table 2). By comparing the amino acid sequence of all active AATs isolated so far in the area between amino acids 244/263 and 255/273 (Figure 1), it appeared that alanine 268 was unique to Cm-AAT2 while other AATs had a threonine.

Due to the strong difference between these two amino acids in terms of hydrophobicity, it was decided to mutate A268 into T in Cm-AAT2 and T268 into A in Cm-AAT1. After expression in yeast of the wild type and mutated versions of the two genes, it appeared that the mutated Cm-AAT2/A268T became capable of producing a wide range of volatile esters (Table 4). The six preferred products of native Cm-AAT1 were also produced at a high rate by Cm-AAT2/A268T: *E*-2-hexenyl acetate and hexyl hexanoate as well as butyl, hexyl, *Z*-3 hexenyl and benzyl acetates. There were only some differences in the activity. For instance, the capacity for benzyl acetate formation was higher in the mutant, while it was lower for *E*-2-hexenyl acetate. However, the general profile of activity and substrates preference was overall similar to Cm-AAT1 (Figure 6). Conversely mutation of T into A at amino acid 268 of

Table 4. Activities of the recombinant Cm-AAT1, Cm-AAT2 and mutated Cm-AAT1/T268A, Cm-AAT2/A268T enzymes towards different types of alcohols and acyl-CoAs.

No	Esters	Cm-AAT2	Cm-AAT2-A268T	Cm-AAT1	Cm-AAT1-T268A
1	Ethyl acetate	ND	ND	ND	ND
2	1-Butyl acetate	ND	898 ± 85	1 007 ± 139	ND
3	1-Hexyl acetate	ND	1 116 ± 60	1 479 ± 94	ND
4	1-Heptyl acetate	ND	254 ± 7	637 ± 29	ND
5	1-Octyl acetate	ND	60 ± 2	150 ± 1	ND
6	<i>Z</i> -2-Hexenyl acetate	ND	548 ± 15	799 ± 33	83 ± 21
7	<i>E</i> -2-Hexenyl acetate	ND	1 942 ± 215	2 941 ± 42	ND
8	<i>Z</i> -3-Hexenyl acetate	ND	1 072 ± 65	1 243 ± 12	TR
9	<i>E</i> -3-Hexenyl acetate	ND	177 ± 5	483 ± 48	40 ± 9
10	2-Methylpropyl acetate	ND	118 ± 24	81 ± 30	ND
11	2-Methyl-1-butyl acetate	ND	146 ± 8	377 ± 25	ND
12	3-Methyl-1-butyl acetate	ND	181 ± 9	341 ± 23	ND
13	Geranyl acetate	ND	TR	TR	ND
14	Benzyl acetate	ND	3 497 ± 140	1 544 ± 31	126 ± 12
15	2-Phenylethyl acetate	ND	733 ± 15	961 ± 75	43 ± 0
16	Cinnamoyl acetate	ND	154 ± 10	124 ± 7	TR
17	Ethyl propanoate	ND	ND	ND	ND
18	1-Butyl propanoate	ND	ND	ND	ND
19	3-Methyl-1-butyl propanoate	ND	109 ± 31	80 ± 2	ND
20	Hexyl propanoate	ND	341 ± 13	576 ± 15	ND
21	2-Phenylethyl propanoate	ND	1 009 ± 207	728 ± 27	TR
22	Ethyl butanoate	ND	ND	96 ± 6	ND
23	Ethyl 2-methylpropanoate	ND	ND	ND	ND
24	3-Methylbutyl 2-ethylbutanoate	ND	39 ± 0	46 ± 4	40 ± 6
25	Ethyl hexanoate	ND	25 ± 2	28 ± 3	ND
26	1-Butyl hexanoate	ND	485 ± 3	190 ± 10	ND
27	3-Methyl-1-butyl hexanoate	ND	349 ± 9	275 ± 6	ND
28	Hexyl hexanoate	ND	2 171 ± 21	2 635 ± 91	ND
29	2-Phenylethyl hexanoate	ND	861 ± 145	868 ± 103	ND

The location of the mutated amino acid is indicated by an arrow in Figure 1. Activity was measured with purified recombinant proteins. Activity is expressed in  $\mu\text{kat mg}^{-1}$  protein as the mean ± SE of three replicates.



**Figure 6.** Effect of the Cm-AAT2/A268T and Cm-AAT1/T268A mutations on activity towards different types of alcohols and acyl-CoAs. A: wild type Cm-AAT1; B: Cm-AAT2/A268T; C: Cm-AAT1/T268A. Activity was measured after purification of the proteins as described in Materials and methods. The number at the x-axis correspond to the esters listed in Tables 3 and 4. Activity is expressed as % of the most active substrate of wild type Cm-AAT1: 2940 pkat  $\text{mg}^{-1}$  protein.

Cm-AAT1 resulted in a very strong reduction of activity. Only low residual and trace activity could be detected for few compounds. One single amino acid can, therefore, play a crucial role in AAT activity. It was checked that this was not due to a cloning or sequencing error by sequencing several clones from three independent PCRs and using a high fidelity DNA polymerase (Vent). Two melon sequences from oriental melon fruit (cv Gemsung) putatively encoding AAT have been deposited in

data banks, GeAAT-1 (BAB78588) and GeAAT-2 (BAC58010), that also differed from all other AATs by an alanine residue at the 268 position instead of a threonine. No information is available on the activity of the encoded proteins, but the isolation of these two genes gives further arguments for the absence of sequencing errors in our Cm-AAT2 gene. It remains, however, to determine which is the substrate preference of Cm-AAT2. Speculations on putative functions of AAT2 are

difficult due the potential wide range of substrates concerned by the very large BAHD superfamily (D'Auria *et al.*, 2002). In addition the enzymatic function has been determined in only few cases. However, this protein is probably involved in fruit ripening since the *Cm-AAT2* gene has the same pattern of expression as *Cm-AAT1*, 3 and 4. Its expression is fruit ripening-specific and ethylene-dependent.

### Conclusion

In conclusion, we demonstrate here that at least three genes encoding alcohol acyl-transferases are expressed specifically in melon fruit during ripening. Each of the encoded proteins has specific substrate preferences. Because some esters present in the melon are not produced by these three proteins, it is probable that other *Cm-AAT* genes remain to be isolated. In climacteric fruit, suppression or reduction of ethylene synthesis and action through genetics, biotechnology or inhibitors resulted in a loss or reduction of synthesis of aroma volatiles (Bauchot *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 1998; Lurie *et al.*, 2002; Defilippi *et al.*, 2004). So far all *Cm-AAT* genes described in climacteric fruit are ethylene dependent, but the presence of ethylene independent genes is suspected that could be good markers for improving aroma production in a context where ethylene production or action has been slowed-down in order to extend shelf-life. The expression of a gene family of *AATs* specifically in the fruit as described in this work accounts for the wide range of volatiles evolved during ripening. It also probably accounts for the influence of environmental factors and storage conditions on the production and composition of aroma volatiles of fruit (Beaudry, 1999; Mattheis and Fellman, 1999).

### Acknowledgements

This work was supported in part by the Midi Pyrénées Régional (Grants No. 01008920 and 03001146), the CEPIA department of INRA (ANS 2002–2003 and postdoctoral scholarship to I. E.), the National Commission for Scientific and Technological Research (CONICYT) from

Chile (Doctoral scholarship to D.M.) and the Spanish Ministry of Education (Postdoctoral scholarship to F.B.F.).

### References

- Aggelis, A., John, I., Karvouny, Z. and Grierson, D. 1997. Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 33: 313–322.
- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blass, J., Van Houwelingen, A.M.M.L., De Vos, R.C.H., Van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., Van Tunen, A.J. and O'Connell, A.P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647–661.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Aubert, C. and Bourger, N. 2004. Investigation of volatiles in Charentais Cantaloupe melons (*Cucumis melo* var *Cantalupensis*) Characterization of aroma constituents in some cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4522–4528.
- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot, L., Roustan, J.P., Latché, A., Bouzayen, M. and Pech, J.C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotech.* 14: 862–866.
- Bauchot, A.-D., Mottram, D.S., Dodson, A.T. and John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in Cantaloupe Charentais melon (cv. Védraçais). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787–4792.
- Beaudry, R.M. 1999. Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharv. Biol. Technol.* 15: 293–303.
- Beaulieu, J.C. and Grimm, C. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1345–1352.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J. and Aharoni, A. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* 135: 1865–1878.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059–1066.
- Dandekar, A.M., Teo, G., Defilippi, B.G., Uratsu, S., Passey, A.J., Kader, A.A., Stow, J.R., Colgan, R.J. and Jazmes, D.J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Res.* 13: 373–384.
- D'Auria, J., Chen, F. and Pichersky, E. 2002. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate

- and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* 130: 466–476.
- Defilippi, B.G., Dandekar, A.M. and Kader, A.A. 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *J. Agr. Food Chem.* 52: 5694–5701.
- Defilippi, B.G., Kader, A.A. and Dandekar, A.M. 2005. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Sci.* 168: 1199–1210.
- Dudareva, N., D'Auria, J.C., Nam, K.H., Raguso, R.A. and Pichersky, E. 1998. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase—an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.* 14: 297–304.
- Dudareva, N. and Pichersky, E. 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol.* 122: 627–633.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135: 1893–1902.
- Elss, S., Preston, C., Hertzog, C., Heckel, F., Richling, E. and Schreier, P. 2005. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* L., Merr.) and pineapple products. *Lebensm-Wissu-Technol.* 38: 263–274.
- Fan, X., Mattheis, J. and Buchanan, D. 1998. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1959–1963.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojo, F., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. and Ambid, C. 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.* 53: 201–206.
- Guis, M., Botondi, R., Ben Amor, M., Ayub, R., Bouzayen, M., Pech, J.C. and Latché, A. 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 748–751.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403–405.
- Harada, M., Ueda, Y. and Iwata, T. 1985. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol.* 26: 1067–1074.
- Homatidou, V., Karvouni, S., Dourtooglou, V. and Poulos, C. 1992. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. Variety Cantaloupensis. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1385–1388.
- Lurie, S., Pre-Aymard, C., Ravid, U., Larkov, O. and Fallick, E. 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv Anna apples. *J. Agr. Food Chem.* 50: 4251–4256.
- Ma, X., Koepke, J., Panjkar, S., Fritsch, G. and Stöckigt, J. 2005. Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.* 280: 13576–13583.
- Mattheis, J.P. and Fellman, J.K. 1999. Pre-harvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.* 15: 227–232.
- Medina-Suarez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R. and Seymour, G. 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of *in vitro* translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115: 453–461.
- Mir, N.A., Perez, R., Schwallier, P. and Beaudry, R. 1999. Relationship between ethylene response manipulation and volatile production in Jonagold variety apples. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2653–2659.
- Nam, Y.W., Tichit, L., Leperlier, M., Cuerq, B., Marty, I. and Lelièvre, J.M. 1999. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 39: 629–636.
- Nicholas, K.B. and Nicholas H.B.J. 1997. GENEDOC: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, distributed by the authors.
- Page, R.D.M. 1996. TREE VIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357–358.
- Paillard, N.M.M. 1990. The flavour of apples, pears and quinces. In: I.D. Morton and A.J. McLeod (Eds.), *Food Flavours, Part C. The Flavour of Fruit*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1–41.
- Perez, A.G., Sanz, C., Olias, R., Rios, J.J. and Olias, J.M. 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3286–3290.
- Pichersky, E. and Gang, D.R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5: 439–445.
- St Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M. and De Luca, V. 1998. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for co-enzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* 14: 703–713.
- St Pierre B. and De Luca, V. 2000. Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In: R.I. John, R. Romeo, L. Varin and V. De Luca (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry. Evolution of Metabolic Pathways*, vol. 34. Elsevier Science Publishing, Oxford, pp. 285–315.
- Sanz, C., Olias, J.M. and Perez, A.G. 1997. Aroma biochemistry of fruit and vegetables. In: F.A. Tomas-Barberan and R.J. Robins (Eds.), *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Oxford Science Pub, Oxford, UK, pp. 313–329.
- Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Schalechet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z. and Lewinsohn, E. 2001. Acetyl-CoA: alcohol acetyl transferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 794–799.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. and Lewinsohn, E. 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyl transferase in developing rose petals. *Plant Physiol.* 131: 1868–1876.
- Shiota, H. 1993. New ester components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 41: 2056–2062.
- Song, J. and Bangerth, F. 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharv. Biol. Technol.* 8: 259–269.
- Wang, Y., Wyllie, S.G. and Leach, D.N. 1996. Chemical changes during the development and ripening of the fruit of *Cucumis melo* (cv Makkimmon). *J. Agric. Food Chem.* 44: 210–216l.

- Wyllie, S.G. and Fellmann, J.K. 2000. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 3493–3496.
- Yahyaoui, F., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D. and Pech, J.C. 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.* 269: 2359–2366.
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Tanaka, K., Sone, H., Nagasawa, N. and Tamai, Y. 1999. Isolation and characterization of the ATP2 gene encoding alcohol acyl-transferase II in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorius*. *Yeast* 15: 409–417.
- Zabetakis, I. and Holden, M.A. 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* 74: 421–434.

## **CHAPITRE III**

### **CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE DIFFERENTES ALCOOL ACYL TRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE D'AROMES CHEZ LE MELON**



## 1. Introduction

L'acylation enzymatique représente une réaction de substitution impliquée dans la diversification des substances naturelles dérivées du métabolisme secondaire chez les plantes. Un grand nombre de petites molécules, couvrant la plupart des catégories de métabolites secondaires sont sujettes à des O-, N- C- ou S- acylations. Par ailleurs, les acylations peuvent également concerner les protéines et les polysaccharides.

Les acyl transférases (EC 2.3.1.x) catalysent le transfert de groupes acyl d'un donneur vers les groupements hydroxyle, aminé ou thiol de molécules acceptrices pour donner des esters. Différentes classes d'acyl transférases ont été identifiées qui utilisent des 1-O-acylglucosides, des acyl Coenzyme A, des protéines transporteuses des groupements acylés ou d'esters de l'acide quinique (St-Pierre et De Luca, 2000). Les acyltransférases concernées par notre travail utilisent les acyl CoA. Cette catégorie d'enzymes est impliquée entr'autres dans la biosynthèse d'acétyl CoA, de la cystéine, de l'arginine, des phospholipides, des acides gras et des polyamines. Chez les animaux, des O- et des N-acylations jouent un rôle important dans la synthèse des neurotransmetteurs à acétylcholine, des esters de cholestérol, dans la détoxification/bioactivation des arylamines carcinogènes et dans la régulation de la transcription des gènes via l'acétylation des histones (St-Pierre et De Luca, 2000). Chez les procaryotes, des O- et N-acétyltransférases sont impliquées dans la détoxification des antibiotiques. Chez les plantes, ces enzymes jouent également un rôle important. Nous citerons par exemple la formation des esters hydroxycinnamiques d'anthocyanes et de flavonoïdes, la synthèse des terpènes et celle des esters volatils odorants qui font l'objet de cette thèse. Chez les plantes, les acyltransférases CoA-dépendantes ont été classées dans une superfamille d'acyltransférases appelée par St-Pierre et De Luca (2000) la superfamille BAHD dont le sigle correspond à la première lettre des quatre premiers gènes isolés chez les plantes: Benzyl alcool O-acétyltransférase (BEAT),

Anthocyane O-hydroxycinnamoyltransférase (AHCT), Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (HCBT) et Déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase (DAT).

Les acyltransférases CoA-dépendantes de plantes de la superfamille des BAHD sont extrêmement diversifiées quand à leurs propriétés biochimiques, leur masse moléculaire, leur structure et leur séquence d'acides aminés. La masse moléculaire des unités monomériques varie de 15 kD à 71 kD mais ces protéines peuvent se trouver sous forme monomérique, dimérique, ou trimérique. La structure cristalline d'une seule protéine de la superfamille BAHD a été réalisée à ce jour. Il s'agit de la Vinorine synthase qui joue un rôle dans la formation des alcaloïdes indoliques monoterpéniques dans les plantes du genre *Rauvolfia* (Ma et al., 2005). Il s'agit d'une protéine monomérique constituée de deux domaines dont le premier renferme le motif conservé de toutes les protéines de cette famille, HXXXD, dans le voisinage du site actif. Il est localisé dans le centre du canal réactionnel à l'interface des deux domaines et accessible des deux côtés. Le canal s'étend sur l'ensemble de la molécule permettant au substrat et au co-substrat de se lier indépendamment. De façon surprenante, le motif DFGWG, caractéristique des membres de la superfamille BAHD qui est considéré comme indispensable pour la réaction catalytique ou pour la fixation du CoA se trouve en dehors du site enzymatique et semble jouer seulement un rôle structural.

Les propriétés cinétiques de certaines AAT capable de former des esters volatils ont été étudiées. Les valeurs de  $K_m$  obtenues sont très variables et vont par exemple de 1mM environ à 46 mM pour le co-substrat alcool (Wang et de Luca, 2005). Les données sur la dépendance du pH et de la température sont très fragmentaires. De plus, l'influence du produit de la réaction, CoA-SH, sur la réaction enzymatique de formation des esters n'a jamais été étudiée. Le présent chapitre a pour objectifs de réaliser une étude détaillée et comparative des paramètres cinétiques des différentes AAT de melon.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Expression de Cm-AAT et mutagenèse dirigée**

Tous les cDNAs *Cm-AAT* (*Cm-AAT1*, *Cm-AAT3* et *Cm-AAT4*) ont été clonés dans le vecteur de clonage pYES2.1 TOPO-TA afin d'exprimer les protéines dans la levure selon les instructions fournies par le fabricant (Invitrogen, Paisely, UK). Toutes les constructions ont été transférées dans la lignée cellulaire INVSc1All de *Saccharomyces cerevisiae*. Les souches renfermant les constructions correctes ont été cultivées sur milieu sélectif (SC-U) en présence de 2% de galactose comme inducteur de l'expression de la protéine recombinante, à 30°C en agitation (250 rpm), selon les recommandations de Invitrogen, jusqu'à ce que la DO<sub>600</sub> de la culture atteigne environ 4 U.

Les deux mutants de *Cm-AAT* ont été générés en utilisant la méthode QuikChange (Stratagene, San Diego, CA, USA) basée sur la PCR à partir des gènes *Cm-AAT* insérés dans le vecteur de clonage pYES2.1 TOPO-TA. Ensuite, les mutants ont été transférés dans *Saccharomyces cerevisiae* comme décrit précédemment. Les deux mutants (*Cm-AAT1/T268A* et *Cm-AAT2/A268T*) ont été décrits dans le chapitre précédent dans la publication de El-Sharkawy *et al.* (2005).

### **2.2 Purification des protéines recombinantes**

Les cellules de levure ont été récupérées par centrifugation (1800 g, 10 min à température ambiante) à partir de 50 mL de culture de levure induite avec du galactose et re-suspendues dans un tampon A (50 mM phosphate de sodium pH 7.5, 10% v/v de glycérol, 0.3 M NaCl) contenant 2 mM de β-mercapto-éthanol. Les cellules ont été broyées mécaniquement dans de l'azote liquide pendant 2 min et conservées à -80°C jusqu'à l'utilisation. Afin d'extraire les enzymes AAT, la poudre a été décongelée et centrifugée à 45 000 g pendant 20 min à 4°C. L'extrait brut ainsi obtenu a été purifié par passage sur une colonne d'affinité conditionnée pour purifier les protéines ayant une étiquette poly-histidine

(BD Talon Metal Affinity, BD Biosciences), selon le protocole du fournisseur. Brièvement, l'enzyme a été fixée sur la résine en présence du tampon A, et, après avoir éliminé les protéines non retenues par plusieurs lavages avec le même tampon A, les protéines recombinantes retenues sur la colonne étaient éluées avec du tampon A contenant 150 mM d'imidazole. Les protéines étaient quantifiées selon le protocole de Bradford (1976).

### **2.3 Activité des enzymes recombinantes AAT.**

L'activité AAT a été évaluée dans un volume total de 500  $\mu\text{L}$  contenant 70  $\mu\text{L}$  de protéine purifiée (10-15  $\mu\text{g}$ ), 2 mM éthanol, 250  $\mu\text{M}$  d'acyl-CoA et ajusté au volume final avec du tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10% v/v glycérol, 1 mM DTT). Le mélange était incubé à 30°C pendant 20 min. Immédiatement après la réaction, 5  $\mu\text{L}$  du standard interne (méthyl benzoate 0.5  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) a été ajouté au mélange. Les composés volatils ont été extraits avec 250  $\mu\text{L}$  de pentane, agitation par Vortex pendant 1.5 min et la phase pentanolique a été concentrée. La quantification des composés volatils a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC); 1  $\mu\text{L}$  de la phase pentanolique concentrée était injectée dans le GC équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). L'équipement GC-FID consistait en un appareil Hewlett-Packard (modèle 5890) équipé avec une colonne de verre «HP-Innowax cross-linked polyéthylène glycol» (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). La température de l'injecteur et du détecteur était de 250°C. La température du four était programmée de 40°C (1 min) à 60°C (1 min) à une vitesse de 2°C  $\text{min}^{-1}$  et finalement à 190°C (5 min) à une vitesse de 10°C  $\text{min}^{-1}$ . L'azote était utilisé comme gaz transporteur à 100 kPa. Les composés ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec celui de composés standards authentiques.

## **2.4 Détermination du pH et de la température optimum**

Pour l'ensemble des protéines recombinantes la dépendance du pH et la température optimum de la réaction enzymatique ont été évaluées en présence de d'acétyl Co-A et d'E-2-hexanol, d'alcool benzylique et d'alcool cinnamique pour Cm-AAT1, Cm-AAT3 et Cm-AAT4 respectivement. Les évaluations enzymatiques ont été réalisées dans des conditions identiques à celles décrites plus haut.

## **2.5 Détermination de la masse moléculaire des protéines recombinantes et des protéines du fruit.**

La masse moléculaire des protéines recombinantes a été déterminée en utilisant un appareil FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) par filtration sur une colonne contenant du Sephacryl S-200 HR (Amersham Bioscience). L'étalonnage de la colonne a été fait avec un kit fourni par le producteur (Amersham Bioscience). La colonne a été pré-équilibrée et lavée avec du tampon B à un débit de 1ml/min. L'activité AAT a été mesurée dans chaque fraction dans les mêmes conditions que précédemment excepté que 150 µL d'extrait était utilisé au lieu de 500µL.

Les protéines totales de melon et de banane ont été extraites en utilisant la méthode décrite par Harada *et al.* (1985) avec quelques modifications. Cinq grammes de tissu de mésocarpe ont été broyés mécaniquement pendant 2 minutes dans de l'azote liquide en présence de 5 mL de tampon d'extraction (250 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT). L'extrait protéique ainsi obtenu était stocké -80°C jusqu'à utilisation. L'extrait était ensuite décongelé et centrifugé à 45 000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu était concentré par addition de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 80% de saturation. La suspension était centrifugée à 45000 g pendant 20 minutes à 4°C et le culot suspendu dans 1 mL de tampon B et désalé sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée avec du tampon B (Amersham Biosciences, Chalfont Buckinghamshire, UK). La filtration sur colonne et le dosage de l'activité AAT

ont été réalisés comme décrit précédemment. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976).

## **2.6 Dissociation des multimères.**

Immédiatement après purification, la protéine était placée en haut d'une colonne NAP-10 pré-équilibrée avec un tampon C (tampon B + 0.3 M de  $MgCl_2$ ). Après élution, la fraction renfermant la protéine était divisée en deux échantillons qui étaient conservés une nuit à 4°C. Le premier échantillon a été utilisé pour la détermination de la masse moléculaire dans les conditions décrites plus haut excepté que le pré-équilibrage et l'élution étaient réalisés avec du tampon C riche en  $MgCl_2$ . Le deuxième échantillon était désalé deux fois dans la colonne NAP-10 pré-équilibrée avec du tampon. La détermination de la masse moléculaire est ensuite réalisée dans les conditions décrites plus haut.

## **2.7 Paramètres cinétiques**

Les paramètres cinétiques de la réaction ont été déterminés pour les deux substrats : l'acétyl CoA et l'alcool dans les mêmes conditions que celles mentionnées précédemment. Les concentrations d'acétyl CoA et d'alcool ont varié de 0.01mM à 8 mM. Dans tous les cas, la concentration de l'un des substrats a été fixée à saturation et les second à des concentrations variables et vice-versa. Les conditions de l'essai enzymatique étaient identiques à celles décrites antérieurement excepté que le volume final était de 250 $\mu$ L en présence de 35  $\mu$ L de protéine purifiée (5 - 7.5  $\mu$ g).

## **2.8 Etude des effets du CoA-SH**

Les effets du CoA-SH sur l'activité enzymatique AAT ont été étudiés dans les mêmes conditions de réaction que précédemment dans un volume final de 500 $\mu$ L en présence d'acétyl CoA et des alcools préférentiels de chaque enzyme. Des concentrations

variables de CoA-SH ont été ajoutées au mélange et, après 5 min d'incubation dans de la glace, la réaction a été initiée à 30°C.

## **2.9 Elimination de l'interférence du CoA-SH formé par recyclage en l'acétylCoA par la phosphotransacétylase**

Afin de minimiser l'interférence du CoA-SH, une phosphotransacétylase a été ajoutée au mélange réactionnel qui a pour effet de recycler le CoA SH en Acyl CoA. Les conditions de la réaction étaient les mêmes que celles indiquées précédemment avec un volume final de réaction de 250  $\mu$ L. La phosphotransacétylase a été ajoutée au milieu réactionnel à raison de 4 unités (40  $\mu$ L d'une solution contenant 100 unités/mL) et 4 mM d'acétyl phosphate (10  $\mu$ L d'une solution mère de 100 mM faite préparée peu de temps avant utilisation).

### **3. Résultats**

#### **3.1 Conditions optimales d'activité, pH et température**

Le pH optimum des trois ATT se situe autour de pH 7,5 (Figure III-1). La dépendance du pH est relativement peu marquée pour AAT3 dans la zone de pH 6 à 7,5. Pour AAT1, l'optimum se situe clairement à pH 7,5, mais l'activité varie peu pour les pH situés de part et d'autre. En ce qui concerne AAT4, le pic d'activité est sensiblement plus marqué.

La température optimum présente des variations importantes d'une protéine à l'autre (Figure III-2). AAT1 par exemple est peu sensible aux variations de température bien que l'optimum se situe aux alentours de 30 à 40°C. AAT3 a un optimum bien marqué à 40°C alors que AAT4 a une activité similaire à 30 et à 40°C.

#### **3.2 Masse moléculaire, structure polymérique et activité des protéines recombinantes.**

La masse moléculaire des protéines recombinantes natives a été évaluée par tamisage moléculaire après purification par chromatographie d'affinité. Les figures 3 A et 3 B montrent que l'ensemble des AAT de melon étudiées (AAT1, AAT2, AAT3 et AAT4) ainsi que les protéines mutées (MT1 et MT2) ont une masse moléculaire se situant autour de 200 kDa. La taille prédite par la séquence codante ainsi que les électrophorèses dénaturantes en SDS-PAGE (Fig. III-4) indique une masse autour de 50 kDa (chapitre 2). Ces données démontrent donc que les protéines natives sont des tétramères.

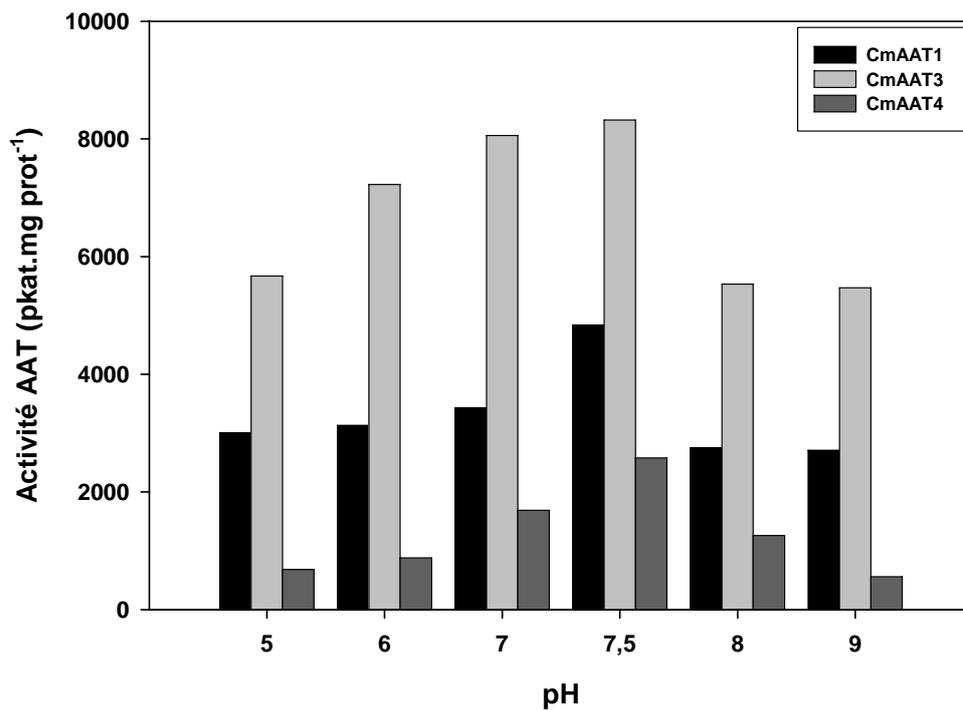


Figure III-1: Effets du pH sur l'activité enzymatique des protéines recombinantes AAT1, AAT3 et AAT4

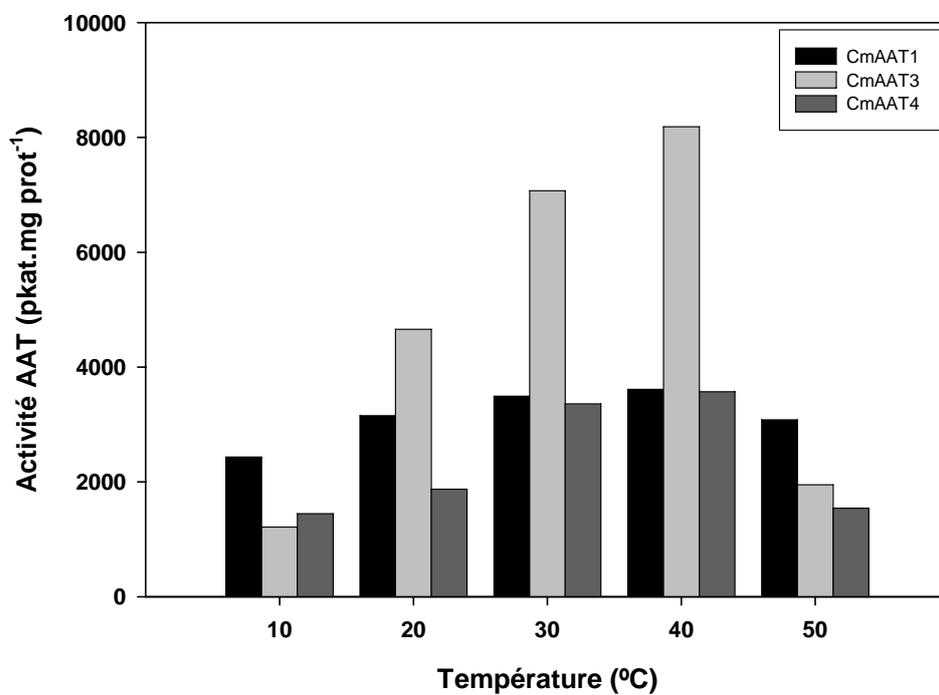


Figure III-2: Effets de la température sur l'activité enzymatique des protéines recombinantes AAT1, AAT3 et AAT4

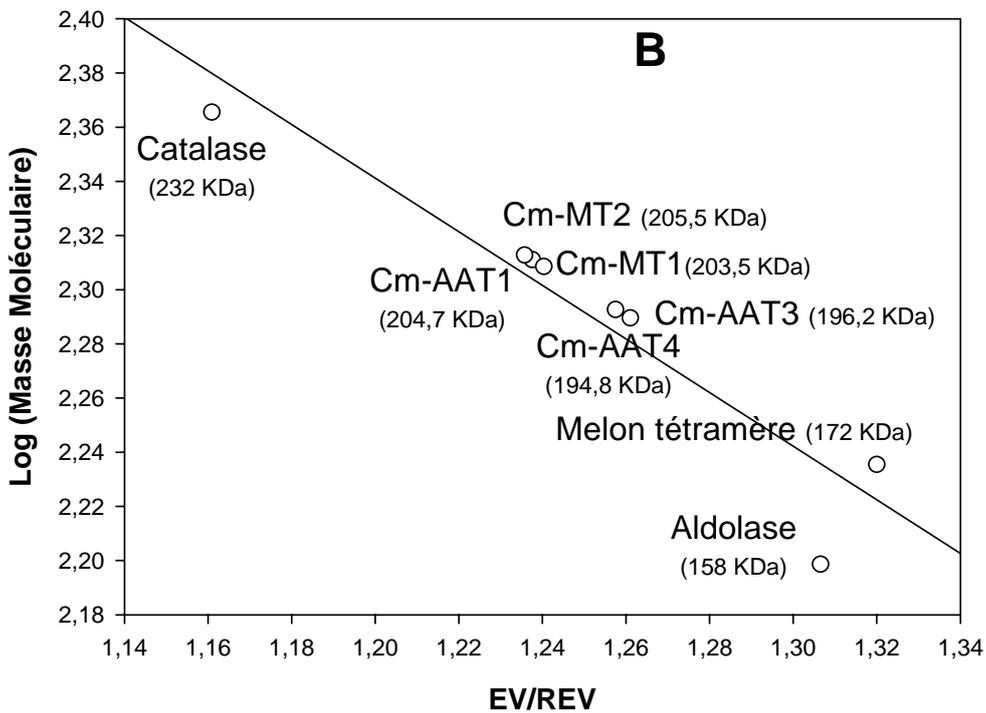
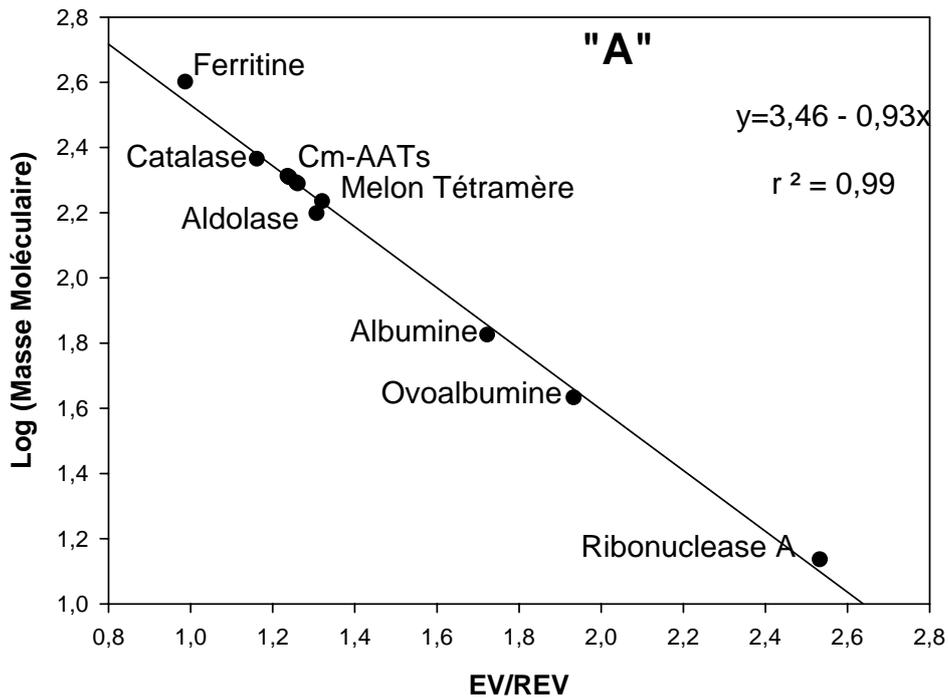


Figure III-3. Détermination de la masse moléculaire des AAT de fruit et recombinantes par tamisage moléculaire sur Séphacryl S-200. Ferritine 400 KDa, Catalase 232 KDa, Aldolase 158 KDa, Albumine 67 KDa, Ovoalbumine 43 KDa, Ribonuclease A 13.7 KDa, CmAAT1 204.7 KDa, CmAAT3 196.2 KDa, CmAAT4 194.8 KDa, CmMT1 203.5 KDa, CmMT2 205.5 KDa, Melon tétramère 172 KDa, La figure A représente une gamme moléculaire entre 13,7 kDa (ribonuclease) et 400 kDa (ferritine). La figure B représente une gamme plus restreinte entre 158 kDa (aldolase) et 232 kDa (catalase).

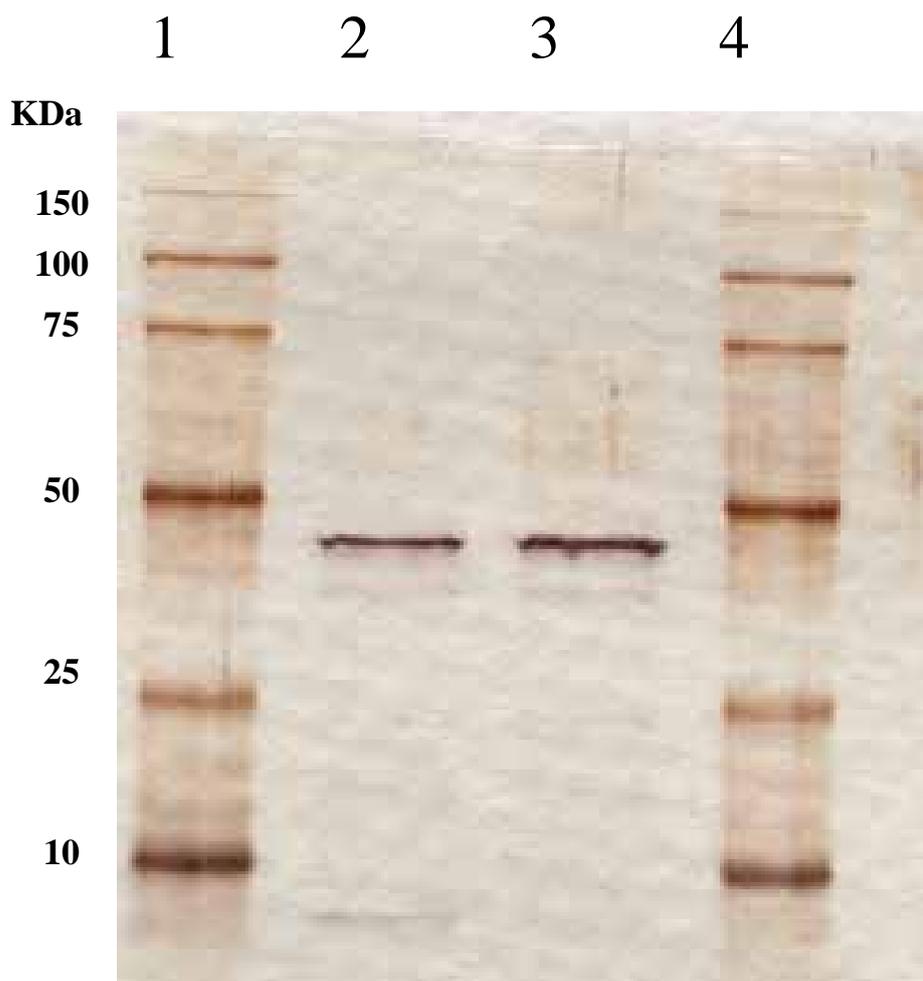


Figure III-4: Electrophorèse en gel SDS-PAGE de protéines AAT recombinantes: 1 et 4= marqueurs moléculaires de taille; 2= protéine recombinante purifiée AAT1 et 3: protéine recombinante purifiée AAT3.

Des essais de dissociation des tétramères de AAT1 ont eu lieu par des doses élevées de  $MgCl_2$ . Le tamisage moléculaire montre qu'une dissociation a lieu essentiellement en dimère (Fig. III-5A) avec une perte totale d'activité. Lorsque l'on réalise un désalage, la structure quaternaire en tétramère est recouverte (Fig. III-5B) ainsi qu'une grande partie de l'activité. Ces données démontrent donc que les protéines recombinantes AAT de melon ne sont actives que sous forme de tétramère.

### **3.3 Masse moléculaire de l'AAT du fruit**

L'AAT extraite de fruit de melon présente un seul pic d'activité lors du tamisage moléculaire (Fig. III-6) et une masse de 178 kDa (Fig. III-7). Afin de s'assurer que la masse moléculaire ainsi déterminée n'était pas artéfactuelle, nous avons extrait dans les mêmes conditions une AAT de banane déjà caractérisée par ailleurs (Harada et al, 1985). Les figures 6 et 7 indiquent que cette protéine est essentiellement sous forme de dimère comme indiqué par la littérature. On en conclue donc que la forme active des AAT de melon est bien tétramérique.

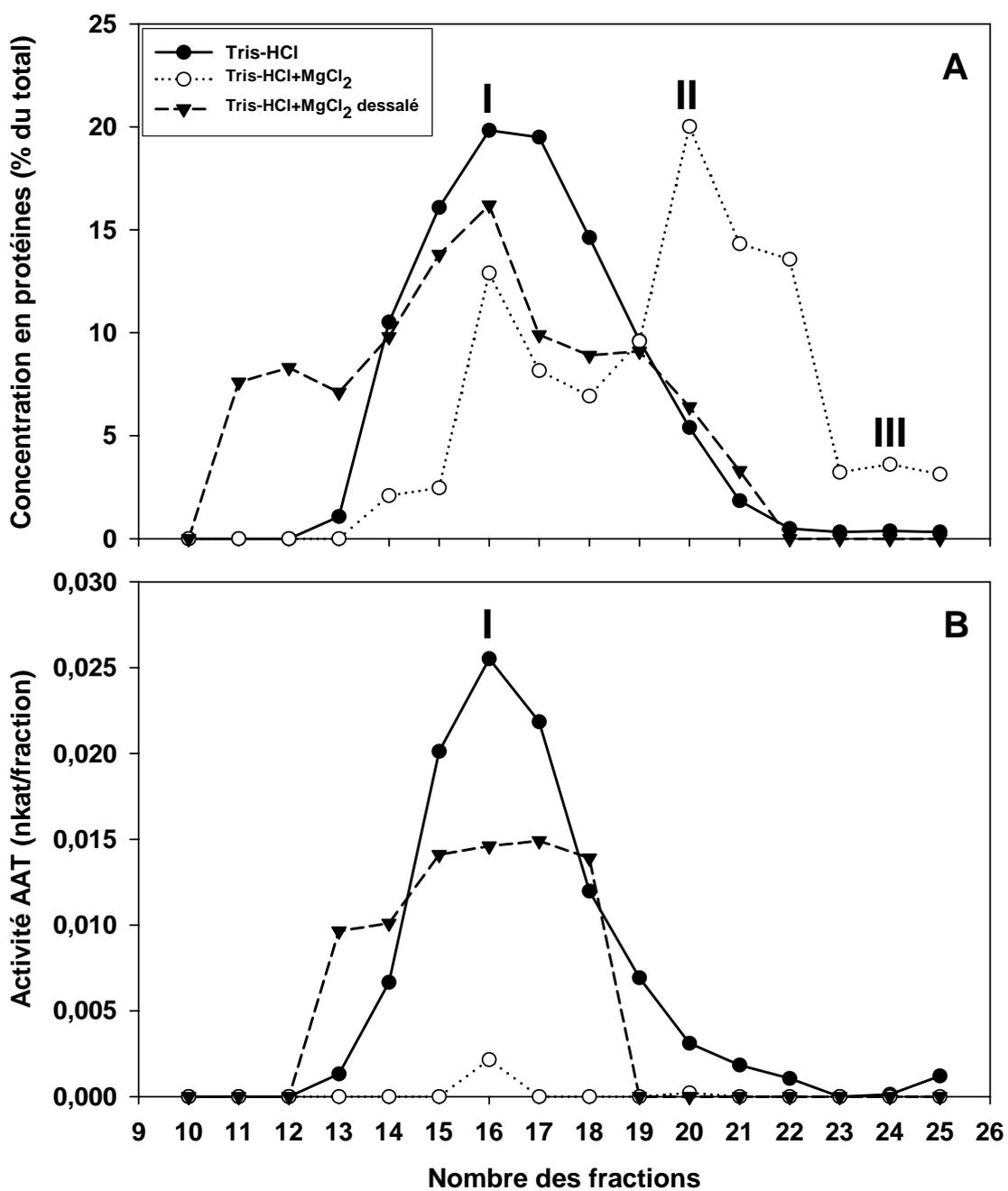


Figure III-5: Tamisage moléculaire sur Sephacryl S-200 de la protéine recombinante AAT1. A: Profil d'élution B: Activité enzymatique de la protéine non dénaturée (—), dénaturée par MgCl<sub>2</sub> (.....) et re-naturée (-----).

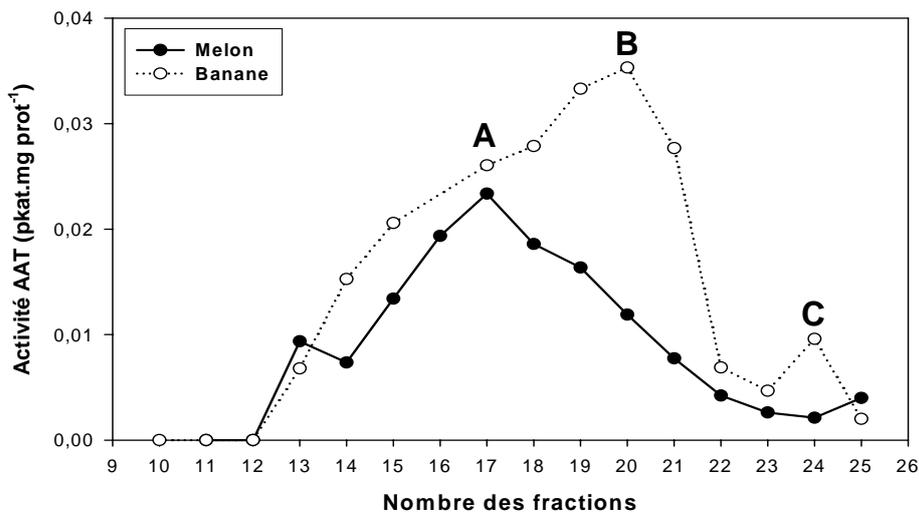


Figure III-6: Activité enzymatique après tamisage moléculaire sur Sephacryl S-200 de protéines natives de fruits de melon (—) et de banane (.....)

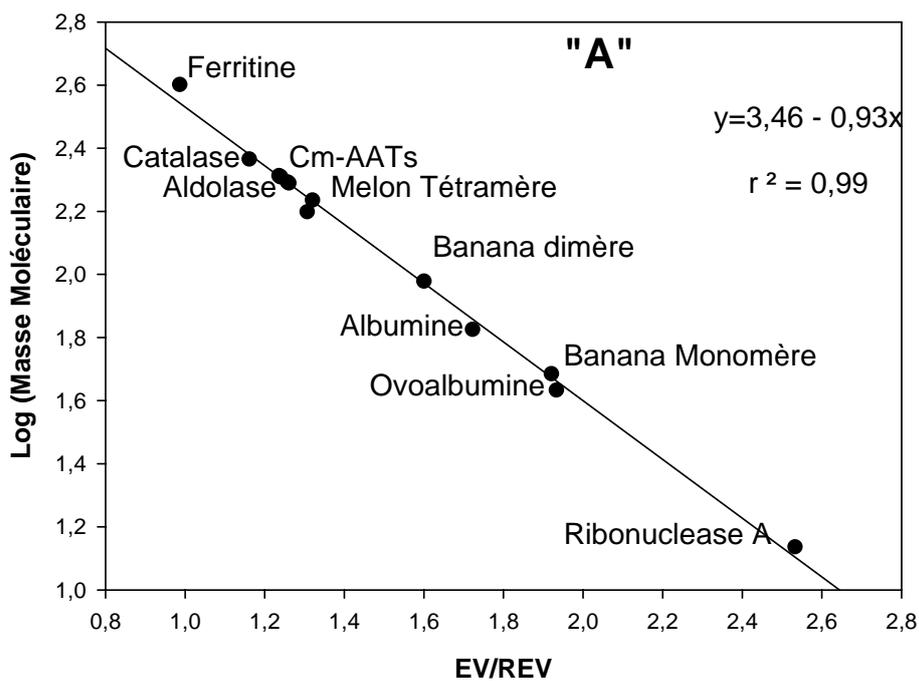


Figure III-7. Détermination de la masse moléculaire des AAT de fruit et recombinantes par tamisage moléculaire sur Séphacryl S-200. Ferritine 400 KDa, Catalase 232 KDa, Aldolase 158 KDa, Albumine 67 KDa, Ovoalbumine 43 KDa, Ribonuclease A 13.7 KDa, CmAAT1 204.7 KDa, CmAAT3 196.2 KDa, CmAAT4 194.8 KDa, CmMT1 203.5 KDa, CmMT2 205.5 KDa, Melon tétramère 172 KDa, Banane dimère 95.2 KDa and Banane monomère 48.4 KDa La figure représente une gamme moléculaire entre 13,7 kDa (ribonuclease) et 400 kDa (ferritine).

### **3.4 Caractéristiques cinétiques des protéines recombinantes AAT1, AAT3, AAT4 et AAT2 mutée**

Des études cinétiques ont été réalisées avec les substrats préférentiels des protéines recombinantes définis dans le chapitre 2. Il s'agit des couples suivants : acétyl CoA et trans-2-héxénol pour AAT1 ; acétyl CoA et alcool benzylique pour AAT3 et MT2 (=AAT2 mutée); acétyl CoA et alcool cinnamique pour AAT4. Les activités de toutes les protéines vis-à-vis de l'acétyl CoA et de l'alcool présentent une cinétique de type Michaélien (Fig. III-8A-H). Le tableau III-I rassemble les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) pour les deux co-substrats et pour l'ensemble des 4 protéines. Ces données montrent que les  $K_m$  vis-à-vis de l'acétyl CoA sont assez élevés pour AAT1, AAT3 et MT2 (entre 920 et 1900  $\mu\text{M}$ ) alors que le  $K_m$  pour AAT4 n'est que de 150  $\mu\text{M}$ . Les  $K_m$  vis-à-vis des alcools sont inférieurs à 670  $\mu\text{M}$  excepté pour MT2 dont le  $K_m$  est de près de 1900  $\mu\text{M}$ .

### **3.5 Mise en évidence du rôle régulateur du CoASH (stimulateur ou inhibiteur)**

Une étude de l'effet de doses variables de CoA-SH, produit de la réaction, a été effectuée sur la protéine recombinante la plus active, c'est-à-dire AAT4. De façon surprenante, l'activité est fortement stimulée ( $\times 4$ ) par de faibles concentrations en CoA-SH avec un maximum vers 2,5  $\mu\text{M}$  et très nettement inhibée pour des doses supérieures à 0,5 mM (Fig. III-9).

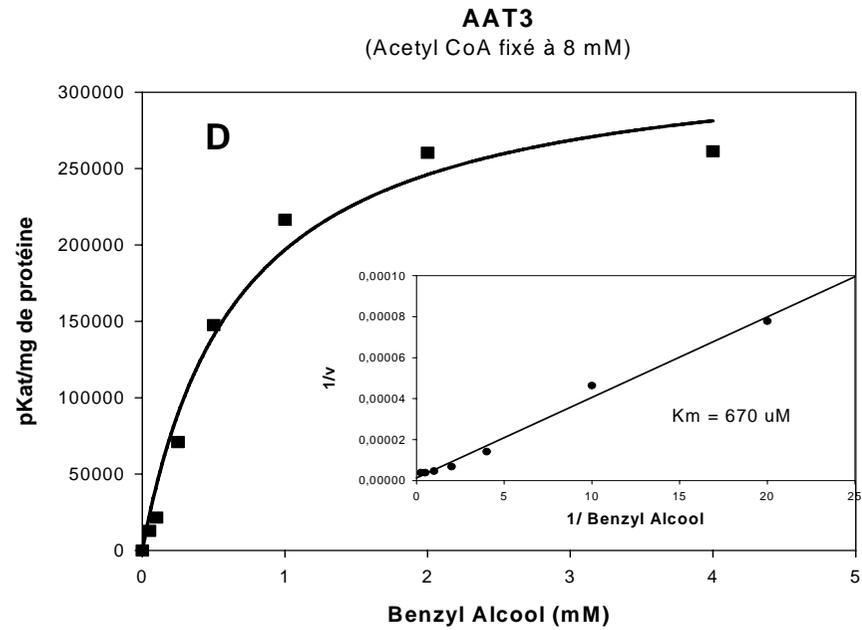
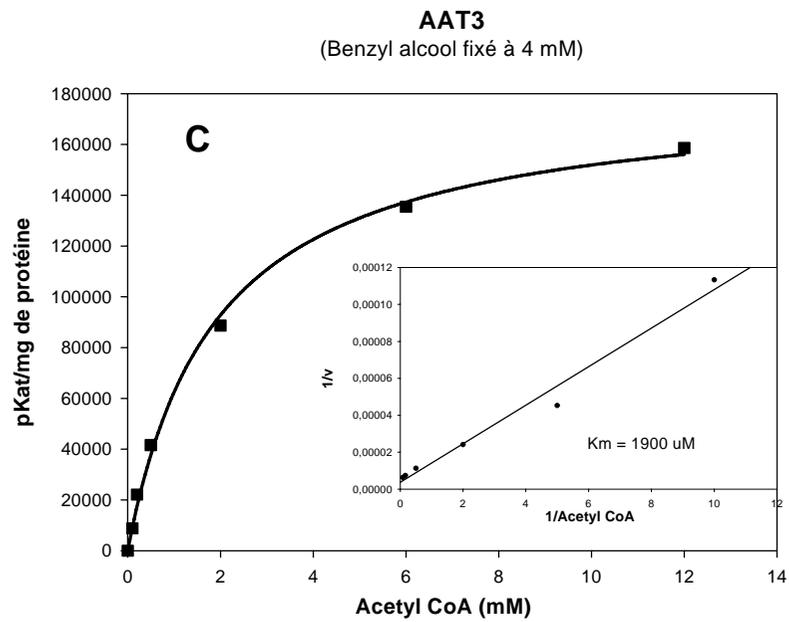
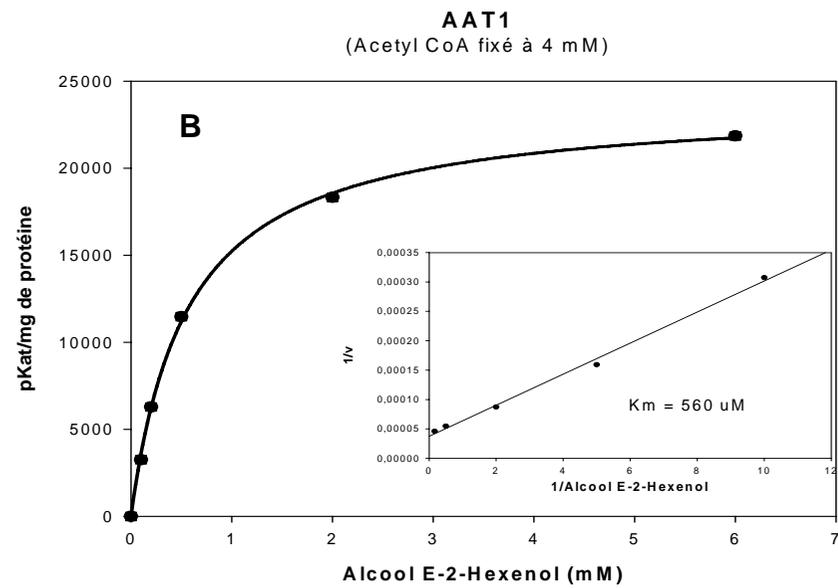
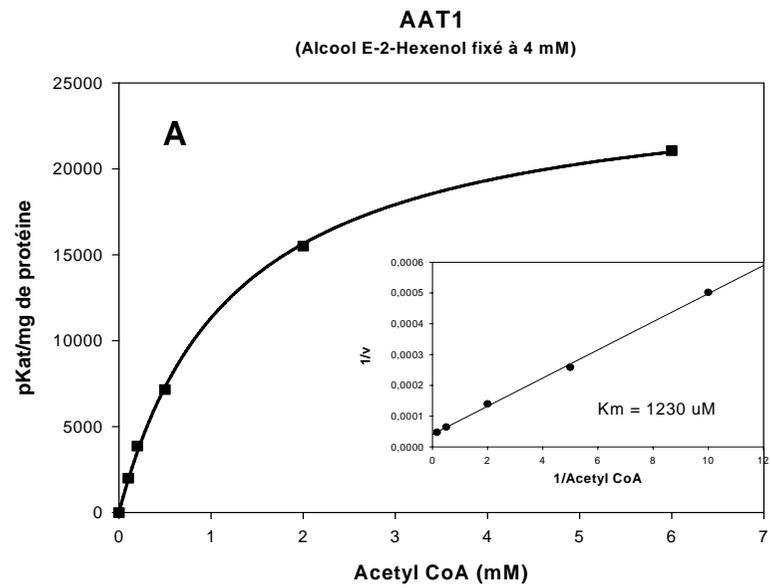
Une analyse détaillée de l'effet activateur du CoA-SH a été réalisée dans la gamme de 1 à 50  $\mu\text{M}$  (Fig. III-10A) pour AAT4. Il apparaît que l'activation est forte pour 1  $\mu\text{M}$  et plus faible pour 5 et 50  $\mu\text{M}$ .

Pour ce qui concerne l'effet inhibiteur des fortes doses (1 et 2,5 mM), la figure III-11 permet de déterminer un  $K_i$  de -0,96 mM de CoA-SH pour AAT4. Une étude identique sur les protéines AAT1 et AAT3 conduisent aux mêmes valeurs de  $K_i$  (Non montré).

### 3.6 Effets de l'élimination du CoASH sur les paramètres cinétiques au cours de la réaction

Les données précédentes indiquent donc que l'activité des AAT in vitro est dépendante du niveau de CoA-SH présent dans le milieu réactionnel. Ceci influence donc la détermination des paramètres cinétiques intrinsèques des protéines. Afin d'éliminer l'interférence du CoA-SH, nous avons couplé la réaction de formation d'esters avec la prise en charge du CoA-SH par une phospho-transacétylase (PTA) capable de régénérer de l'acylCoA en présence de phospho acétate selon la réaction suivante:  $\text{CoA-SH} + \text{Phospho-acétate} = \text{Acétyl CoA} + \text{Pi}$ .

Les figures 12 A-F rendent compte de l'effet de l'enlèvement du CoA-SH sur la cinétique enzymatique des 3 AAT en présence de concentrations variables d'acétyl CoA (Fig. III-12 A,C et E) ou d'alcools (Fig. B, D et F). L'activité en présence de doses croissantes d'acétyl CoA est toujours fortement stimulée par la présence de la PTA. L'exemple le plus remarquable concerne AAT4 dont l'activité, à saturation est augmentée de près de 3 fois (Fig. III-12E). En présence de doses croissantes d'alcools, le phénomène est nettement moins marqué et même aucun effet n'est visible sur AAT3 (Fig. III-12D). Le tableau I résume l'ensemble des valeurs cinétiques. Il en ressort que l'enlèvement du CoA-SH rend la protéine plus affine pour l'acyl CoA avec une forte diminution du Km. Par contre l'affinité pour les alcools reste globalement inchangée.



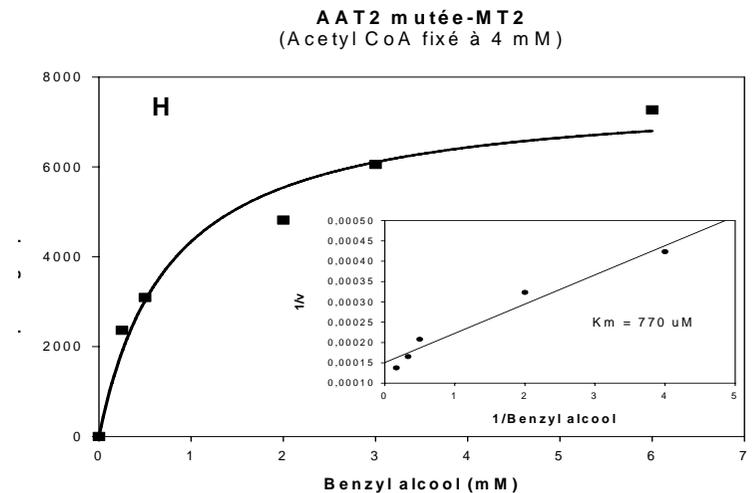
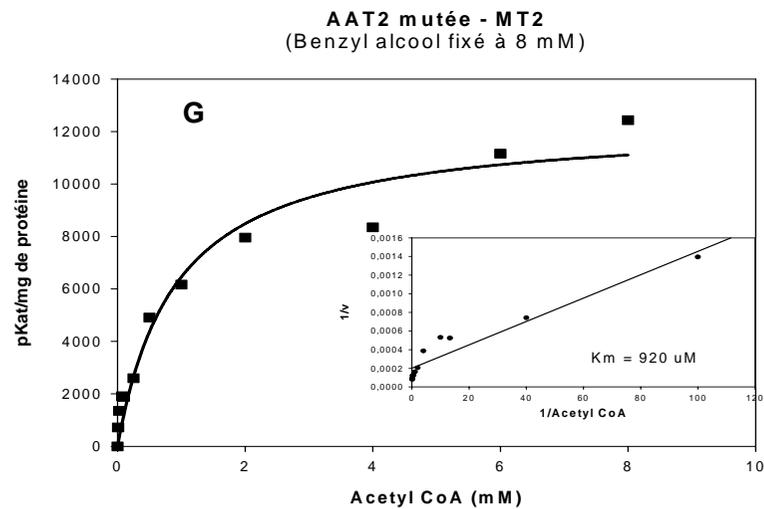
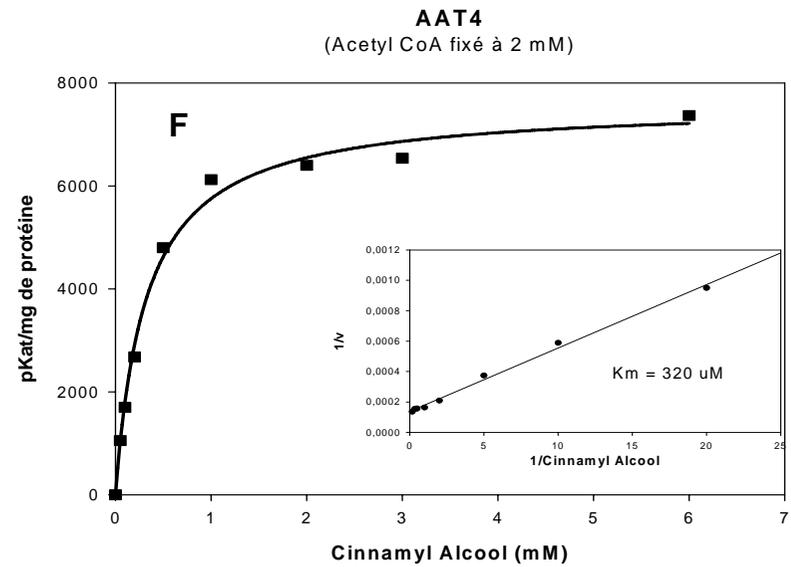
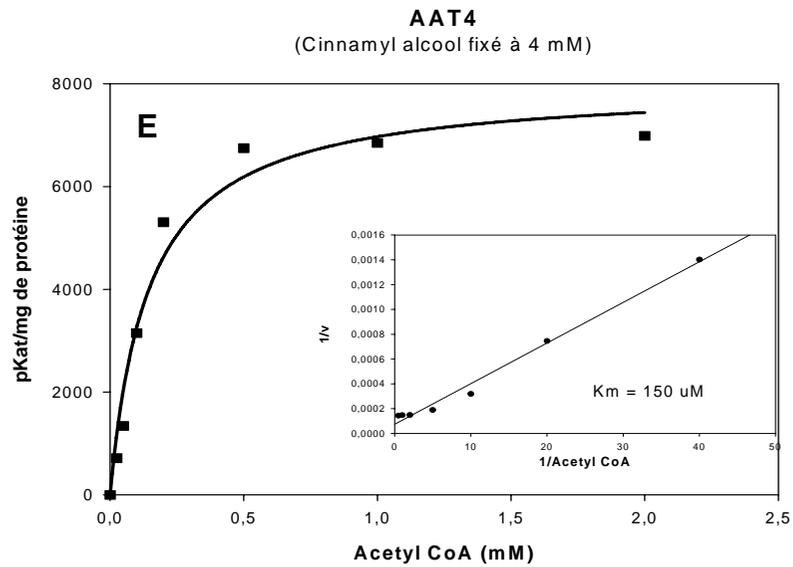


Figure III-8: Cinétique enzymatique des protéine recombinantes AAT1, AAT3, AAT4 et AAT2 mutée en fonction du co-substrat : acétyl CoA, (A, C, E et G) et alcool préférentiel (B,D,F et H). En insert est présentée la cinétique en mode Lineweaver-Burk.

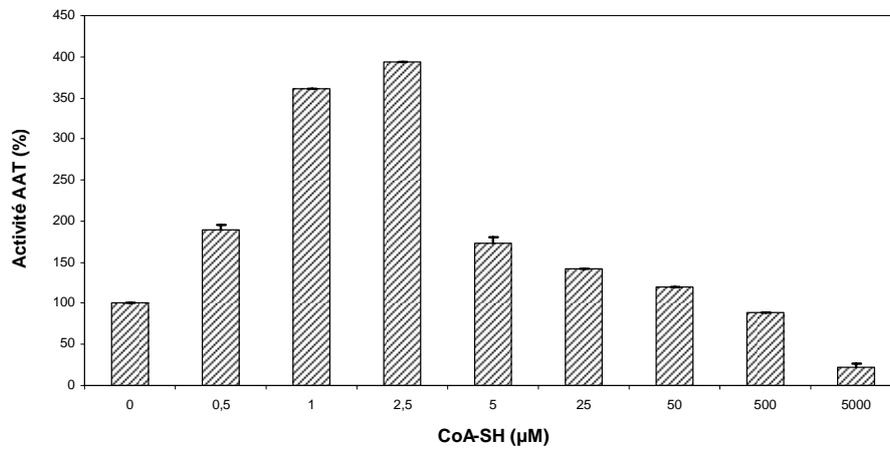


Figure III-9: Effets de doses variable de CoA-SH sur l'activité de la protéine AAT4

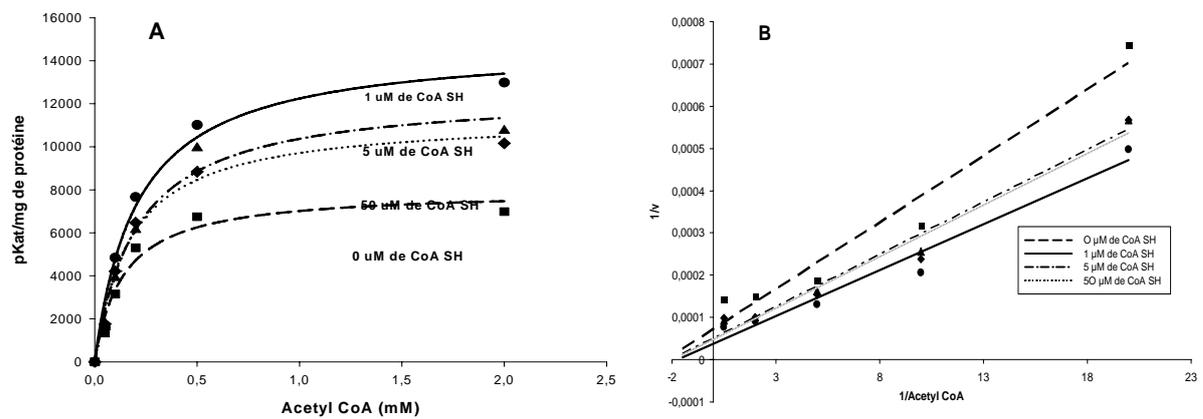


Figure III-10 : Effet de faibles doses de CoA-SH sur l'activité de la protéine recombinante AAT4. A : Cinétique en fonction de la dose d'acétyl CoA en présence de doses variables de CoA-SH. B : Courbe en double inverse selon

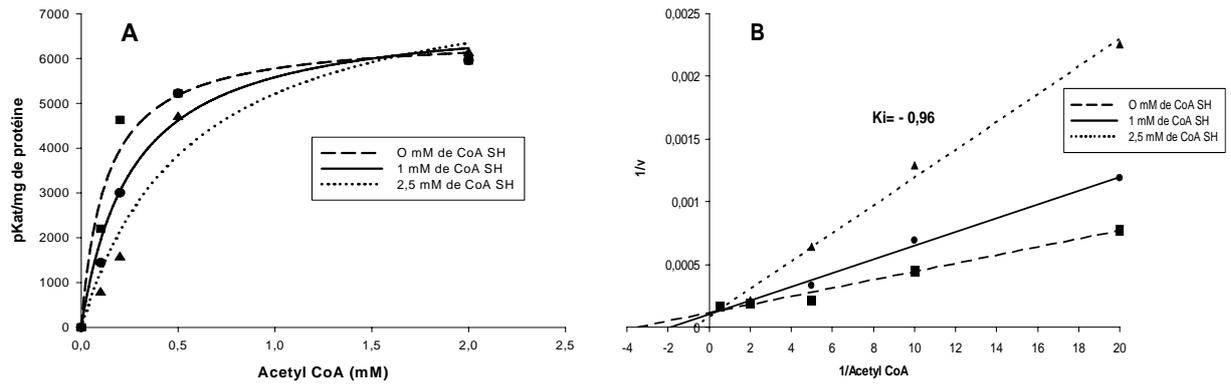


Figure III-11 : Effet de fortes doses de CoA-SH sur l'activité de la protéine recombinante AAT4. A : Cinétique en fonction de la dose d'acétyl CoA en présence de doses variables de CoA-SH. B : Courbe en double inverse montrant la constante d'inhibition ( $K_i$ ).

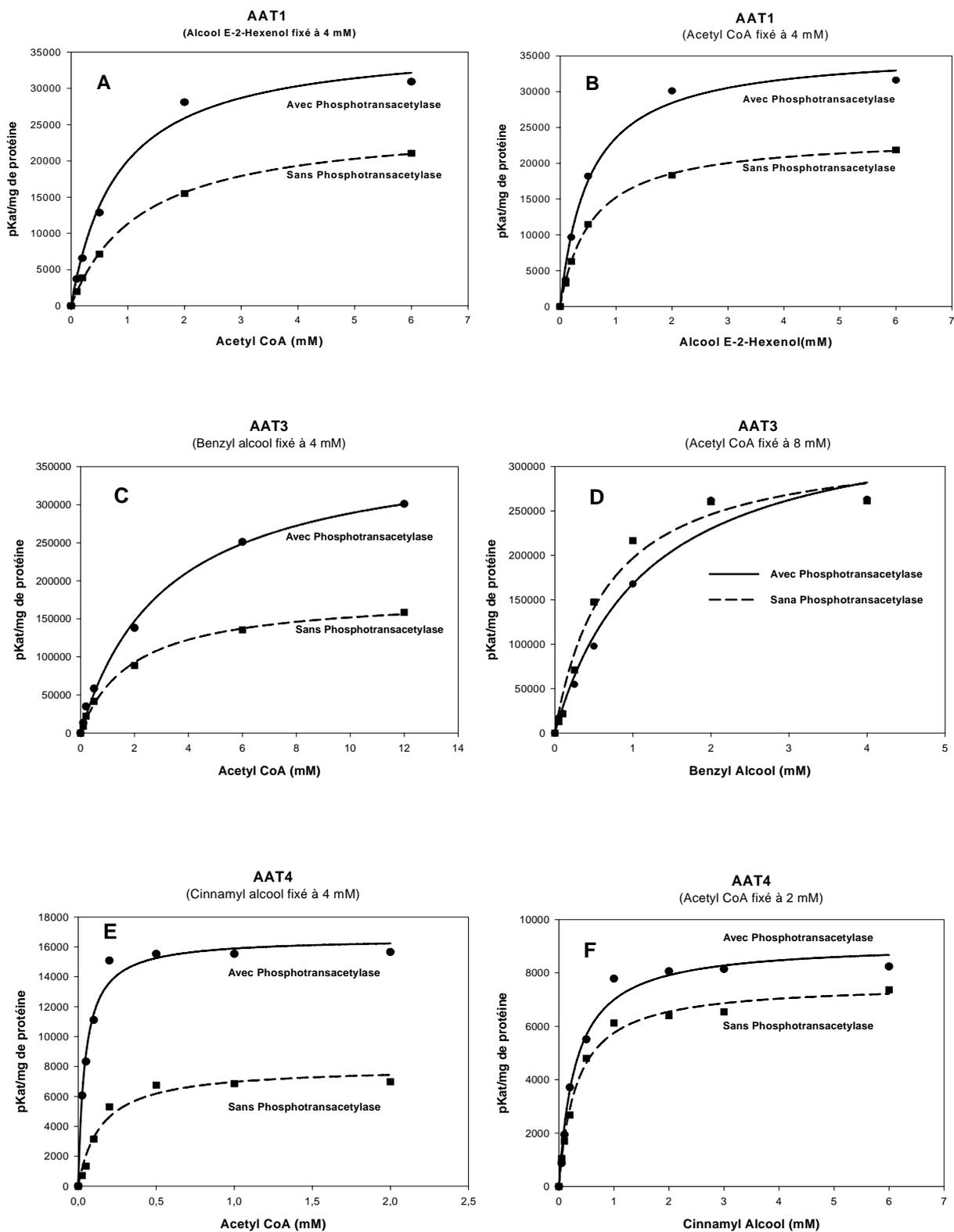


Figure III-12: Effets de la présence de phosphotransacétylase sur la cinétique enzymatique des protéine recombinantes AAT1, AAT3 et AAT4 en fonction du co-substrat: acétyl CoA, (A, C, E) et alcool préférentiel (B,D,F).

Tableau III-I: Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques des protéines recombinantes AAT1, AAT3, AAT4 et AAT2 mutée en fonction du co-substrat et de la présence de phosphotransacétylase dans le milieu réactionnel.

Protéine	Acetyl CoA				Alcool			
	Km (μM)		Vmax (pkat.mg.prot <sup>-1</sup> )		Km (μM)		Vmax (pkat.mg.prot <sup>-1</sup> )	
	Phosphotransacétylase		Phosphotransacétylase		Phosphotransacétylase		Phosphotransacétylase	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Cm-AAT1</b>	1230	830	25300 ± 365	36580 ± 1926	560	520	23780 ± 297	35810 ± 1726
<b>Cm-AAT3</b>	1900	3180	180740 ± 5260	380520 ± 15930	670	1170	328223 ± 25396	364960 ± 34915
<b>Cm-AAT4</b>	150	45	7980 ± 493	16580 ± 477	320	300	7600 ± 185	9110 ± 314
<b>Cm-MT2</b>	920	-	12380 ± 878	-	770	-	7670 ± 614	-

#### 4. Discussion et conclusion

Une des données majeures de ce chapitre est relative à la masse moléculaire des protéines recombinantes et de l'AAT de melon. Il s'agit de formes tétramériques qui sont d'ailleurs les seules ayant une activité. Jusqu'à maintenant les AAT recombinantes formant des esters volatils chez les fruits et les fleurs ont été décrites comme actives sous forme monomérique (Duradeva et al., 1998; Aharoni et al., 2000 ; D'auria et al., 2002 ; Wang et De Luca, 2005). Cependant la masse moléculaire d'une AAT native extraite de melon a été établie à 400 kDa, ce qui correspond à une forme multimérique complexe de 8 unités monomériques (Ueda et al. 1997). Parmi les AAT de la super famille de BAHD différentes structures quaternaires ont été trouvées comme actives, allant de monomères à des dimères et trimères (St Pierre et De Luca, 2000). Aucune forme tétramérique n'a été signalée, de sorte que la structure des AAT de melon est originale par rapport aux autres AAT.

Les Km vis-à-vis de l'acétyl CoA des AAT recombinantes de melon varient de 0,15 mM à 1,9 mM et vis-à-vis de l'alcool préférentiel de 0,32 mM à 0,67 mM. Dans le cas de l'AAT de raisin concord qui catalyse la formation de methyl anthranilate, le Km vis-à-vis de l'antraniloyl CoA est de 2, 51μM pour la protéine native et de 4,78μM pour la protéine recombinante (Wang et De Luca, 2005). Le Km pour le méthanol est beaucoup plus élevé: 14,97mM pour la protéine native et 31,8 pour la protéine recombinante. La SAAT recombinante de fraise a un Km variable

selon les alcools considérés : 46,1 mM pour le 1-butanol, 8,9 mM pour le 1-hexanol et 5,7 pour le 1-octanol (Aharoni et al., 2000). Par rapport à ces valeurs, les  $K_m$  que nous avons trouvés pour les AAT de melon sont en général supérieurs pour les acyl CoA et inférieurs pour les alcools.

Notre travail a mis en évidence l'influence d'un produit libéré au cours de la réaction, le Co-SH. Ce produit, à faible dose est activateur et à forte dose inhibiteur de l'activité AAT. Il est probable que le CoA-SH interfère avec les groupements de SH de la protéine ou bien comme inhibiteur compétitif. Des données antérieures sur l'importance des groupements SH pour l'activité des enzymes de la famille des BAHD ont été décrites (St-Pierre et De Luca, 2000). L'idée est donc venue de tester la possibilité de recycler le CoA-SH produit par la réaction en acétyl CoA par ajout d'une phosphotransacétylase (Iyer et Ferry, 2001). Cette étude a montré qu'en présence de cette enzyme l'activité AAT est fortement stimulée et les  $K_m$  réduits. Le CoA-SH modifie donc l'affinité de l'enzyme pour les co-substrats, surtout les acyls CoA.

En conclusion, ce chapitre sur l'étude biochimique des protéines recombinantes montre que les protéines ont une masse moléculaire de 200 kD environ correspondant à des tétramères. Les protéines natives extraites de melon ont une masse moléculaire identique. Les  $K_m$  des trois protéines recombinantes (AAT1, AAT3 et AAT4) sont de 1,23, 1,9 et 0,15 mM vis-à-vis de l'acétyl CoA et 0,56, 0,67 et 0,32 mM vis-à-vis de l'alcool. Selon le niveau, le CoA SH produit par la réaction peut être activateur ou inhibiteur. Des cinétiques réalisées en présence d'une enzyme capable d'éliminer l'interférence du CoA-SH (phosphotransacétylase) montrent en général un très forte diminution du  $K_m$  vis-à-vis de l'acétyl CoA, sauf pour AAT3. Le  $K_i$  relatif à l'inhibition par le Co-SH est voisin de -0,90 mM pour les trois enzymes.



## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette thèse est consacrée à l'étude de gènes impliqués dans la biosynthèse d'arômes chez le melon. Elle a pris en compte seulement la voie des composés dérivés des lipides et des acides aminés pour former des aldéhydes, alcools et esters volatils. Ce type de composés participe de façon importante à l'arôme de différents types de melons (Horvat et Senter, 1987, Homatidou *et al.*, 1992, Beaulieu et Grimm, 2001, Shalit *et al.*, 2001, Aubert et Bourger, 2004).

Cependant le melon produit d'autres constituants odorants comme des cétones, des  $\gamma$  et  $\delta$  lactones, des phénols, des acides aliphatiques, des terpénoïdes et des composés soufrés (Homatidou *et al.*, 1992). Comme dans le cas de la tomate, les terpénoïdes, malgré leur faible concentration jouent un rôle très important dans l'arôme. La voie de biosynthèse de nombreux composés volatils de cette famille tels que la  $\beta$ -ionone, la  $\beta$ -damascénone, le 2-isobutylthiazole et le géranylacétone, consiste en une oxygénation des terpénoïdes, notamment *via* l'action de carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) qui ont été caractérisées chez la tomate (Simkin *et al.*, 2004).

Il existe toute une série d'autres composés volatils qui font partie des profils aromatiques des végétaux. Certains, parfois abondants (méthyl-butanol, méthyl-butanal, phényléthanol, phénylacétaldéhyde) proviennent vraisemblablement de la dégradation de la leucine ou de la phénylalanine, mais les voies métaboliques mises en jeu restent méconnues. Il faut aussi souligner également l'importance des phénomènes de glycosylation dans la mesure où de nombreux précurseurs des composés volatiles issus des voies métaboliques citées ci-dessus s'accumulent, au cours de la maturation, sous la forme de glycosides et sont ensuite libérés, lors de la rupture des tissus par des glycosidases (Gunata *et al.*, 1985, Marlatt *et al.*, 1992).

Une autre série de composés aromatiques ont été décrits comme ayant une grande importance dans l'arôme et la typicité des melons Cantaloups. Il s'agit des composés soufrés dont les plus abondants correspondent à des esters soufrés comme le 2-(methylthio)ethyl acétate et le 3-

(methylthio)propylacétate (Aubert et Bourger, 2004). La synthèse de ce type d'esters par les AATs de melon n'a pas été étudiée dans ce travail de thèse.

Le travail présenté a donc porté sur deux étapes de la biosynthèse des esters catalysées par les alcool deshydrogénases (ADH) et les alcool acyltransférases (AAT). Les résultats sur les gènes correspondants et sur la caractérisation biochimique des AAT ont déjà été discutés dans les différents chapitres. Nous évoquerons ici les nombreuses possibilités qui existent pour la continuation de ce travail.

Une des plus immédiate serait l'analyse de la capacité des protéines codées par les divers gènes d'AAT isolés (*AAT1*, *AAT3* et *AAT4*) à produire des esters soufrés. Certains thio-alcools sont disponibles commercialement et il serait aisé de les utiliser dans des mesures enzymatiques comportant une détection des esters par chromatographie en phase gazeuse (El Yahyaoui *et al.*, 2002 ; El-Sharkawy *et al.*, 2005) à condition de disposer d'un détecteur à photométrie de flamme (DPF) capable de détecter les composés soufrés (Fang et Qian, 2005) ou bien d'une méthodologie de GC-MS comme celle décrite pour identifier et quantifier ce type de composés dans des espèces d'*Allium* (Pino *et al.*, 2001, Abu-Lafi *et al.*, 2004). Alternativement on pourrait mettre en oeuvre la méthode par marquage radioactif utilisant des acylCoA marqués au <sup>14</sup>C (Aharoni *et al.*, 2000). On pourrait, dans ce cadre rechercher si la protéine Cm-AAT2 qui est incapable de produire des esters volatils non soufrés, serait capable de produire ce type de composés.

Il est probable que la famille de gènes que nous avons isolés n'est pas complète. En effet d'autres gènes ayant une régulation différente, en particulier vis-à-vis de l'éthylène, sont sans doute présents. D'ailleurs les études de bioconversion (Flores *et al.*, 2002) avaient montré qu'une partie de la capacité de disques de melon à former des esters était éthylène-indépendante. Ces résultats ont été confirmés par la démonstration que des extraits protéiques de melons AS possèdent une activité résiduelle AAT importante. Par ailleurs, il existe des AAT que l'on suppose non régulées par l'éthylène dans des fruits non climactériques comme la fraise (Aharoni *et al.*,

2000). En ce qui concerne les ADH, de nombreux gènes sont sans doute exprimés dans le fruit, et qui, dans une certaine mesure, prennent part à la formation de composés volatils (Speirs *et al.*, 1998). Cependant, on ignore ceux qui sont spécifiquement responsables de la formation des alcools et aldéhydes.

Les étapes en amont des gènes que nous avons étudiés ne sont pas très connues chez le melon et même chez d'autres fruits. On pourrait isoler et caractériser les gènes codant pour la lipoxigénase et les hydroperoxy-lyases (HPL). Les voies métaboliques dérivant des acides aminés pourraient être explorées en se concentrant sur une des premières étapes du catabolisme des acides aminés: la décarboxylation. En effet, chez différentes fleurs dont la rose et le pétunia (Boatright *et al.*, 2004), la décarboxylation non-oxydative de la phénylalanine semble participer à la libération de composés volatils. Or cette décarboxylation est effectuée par les membres d'une famille multigénique (Facchini *et al.*, 2000) dont certains membres possèdent des EST exclusivement recensées dans le fruit et se retrouvent effectivement dans les bases de données d'expression du fruit de tomate.

Une autre perspective importante consisterait à rechercher le rôle *in vivo* de chacun des gènes isolés par génétique inverse. Compte tenu du grand nombre de gènes et de leur homologie de séquence, la technique des antisens exigerait de faire des constructions gène-spécifiques. La technique de RNAi pourrait sans doute être préférable. On peut également envisager la sur-expression en tandem d'une lipoxigénase et d'une hydroperoxy-lyase (HPL), deux enzymes clés de la formation d'aldéhyde et d'alcool volatils à partir des acides gras pour augmenter la disponibilité des précurseurs. On peut également envisager la sur-expression en tandem de gènes ADH et AAT isolés dans ce travail de thèse. Le facteur limitant est certainement la faible aptitude du melon à la transformation génétique. Il serait intéressant toutefois de mettre en oeuvre le protocole de Akasaka-Kennedy *et al.* (2004) qui prétend procurer des rendements de transformation élevés.

Sur un plan biotechnologique, la sur-expression des gènes AAT et ADH dans des micro-organismes comme des bactéries ou des levures pourrait être mise à profit pour la biosynthèse d'additifs alimentaires ou pour apporter des arômes à des produits fermentés (Janssens *et al.*, 1992, Horton *et al.*, 2003).

Finalement sur un plan plus fondamental il serait intéressant, avec l'aide de spécialistes, de comprendre le rôle du résidu thréonine dans l'activité des protéines AAT sauvages et mutées par une approche de modélisation théorique de structure tertiaire et quaternaire en s'appuyant sur les données de cristallographie disponible sur une protéine de la même famille (Ma *et al.*, 2005).

En conclusion, ce travail consacré à la caractérisation de gènes impliqués dans la synthèse d'esters volatils, composés importants de l'arôme de melon cantaloup Charentais apporte les informations nouvelles suivantes :

- La biosynthèse des esters est contrôlée par deux enzymes clés, l'alcool déshydrogénase (ADH) qui participe à l'interconversion des aldéhydes en alcools et l'alcool acyl-transférase (AAT) qui transfère un résidu acyl sur des alcools pour former des esters. Nous avons isolé et caractérisé deux gènes fortement divergents codant pour une ADH à moyenne et courte chaîne.

- Le melon exprime au moins quatre gènes correspondant à l'AAT: *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3* et *Cm-AAT4*. Toutes les protéines codées par ces gènes, excepté *Cm-AAT2*, sont enzymatiquement actives lorsqu'elles sont exprimées dans la levure.

- Des melons antisens-ACC Oxydase (AS) ne produisant pas d'éthylène ont une très faible activité ADH et AAT et ont une expression très réduite des gènes *Cm-ADH* et *Cm-AAT*.

- L'étude biochimique montre que les protéines AAT ont une masse moléculaire de 200 kDa environ correspondant à des tétramères. Les protéines natives extraites de melon ont une masse moléculaire identique. Selon le niveau, le CoA SH produit par la réaction peut être activateur ou inhibiteur.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdi, N., McGlasson, W., Holford, P., Williams, M., and Mizrahi, Y. 1998. Responses of climacteric and suppressed-climacteric plums to treatment with propylene and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 14: 29-39.

Abu-Lafi, S., Dembicki, J., Goldshlag, P., Hanus, L. and Dembitsky, V. 2004. The use of the 'Cryogenic' GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the *Allium sativum*. *Journal of Food Composition and Analysis* 17: 235–245.

Aggelis, A., John, I., Karvouni, Z., and Grierson, D. 1997a. Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 33: 313-322.

Aggelis, A., John, I., and Grierson, D. 1997b. Analysis of physiological and molecular changes in melon (*Cucumis melo* L.) varieties with different rates of ripening. *Journal of Experimental Botany* 48: 769-778.

Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z, Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blass, J., Van Houwelingen, A.M.M.L., De Vos, R.C.H., Vand der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., Van Tunen, A.J. and O'Connell, A.P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12:647-661.

Akasaka-Kennedy, Y., Tomita, K. and Ezura, H. 2004. Efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Sci.* 166:763-769.

Alexander, L. and Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Altschuler, M., Collins, G. B., and Hildebrand, D.F. 1989. Developmental expression of lipoxygenases in soybeans. *Plant Sci.* 63: 151-158.

Andrews, J., 1995. The climacteric respiration rise in attached and detached tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 6: 287–292.

Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., and Takabayashi, J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512-515.

Arumanagathan, K. and Earle, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:208-218.

Aubert, C. and Bourger, N. 2004. Investigation of volatiles in Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* Var. cantalupensis). Characterization of aroma constituents in some cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4522 – 4528.

- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot, L., Roustan, J. P., Latché, A., Bouzayen, M., and Pech, J. C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14: 862-866.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K. and Schuch, W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: Biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35:1013-1022.
- Bangerth, F., Streif, J., Song, J., and Brackmann, A. 1998. Investigations into the physiology of volatile aroma production of apple fruits. *Postharvest Biology and Technology* 96: 189-194.
- Bardi, L., Cocito, C., and Marzona, M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *International Journal of Food Microbiology* 47: 133-140.
- Bartely, I. M., Stoker, P.G., Martin, A.D.E., Hatfield, S.G.S., and Knee, M. 1985. Synthesis of aroma compounds by apples supplied with alcohols and methyl esters of fatty acids. *J. Sci. Food Agric.* 36: 567-574.
- Bate, N.J., Sivasankar, M.C., Moxon, C., Riley, J.M.C., Thompson, J. E., and Rothstein, S.J. 1998. Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology* 117: 1393-1400.
- Bauchot, A.D., Mottram, D.S., Dodson, A.T. and John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in Cantaloupe Charentais melon (cv Védraçais). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787-4792.
- Baudracco-Arnas, S. and Pitrat, M. 1996 A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.* 93:57-64.
- Beaudry, R.M. 1999. Effect of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharv. Biol. Technol.* 15: 293-303.
- Beaulieu, J.C. and Grimm, C.C. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 49:1345-1352.
- Beekwilder, J., Alavarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J. and Aharoni, A. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.* 135: 1865-1878.
- Berger, R. G., and Drawert, F. 1984. Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to Red Delicious apples. *J. Sci. Food* 35: 1318-1325.
- Berger, R. G., Dettweiler, G. R., Krempler, M. R. and Drawert, F. 1992. Precursor atmosphere technology. Efficient aroma enrichment in fruit cells. In: Teranishi, R., Takeoka, G. R. and Guntert, M. ed. *Flavour precursors. Thermal and enzymatic conversions.* ACS Symposium Series 490. Pp. 59-71.

- Biale, J.B. and Young, R.E. 1981. Respiration and ripening in fruits-retrospective and prospect. In: Friend, J., Rhodes, M.J.C. (Eds.), Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Academic Press, New York, pp.1–39.
- Bower, J., Holford, P., Latché, A. and Pech, J.C. 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of melon. *Postharvest Biology and Technology* 26: 135-146.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C.M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D. and Dudareva, N. 2004. Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.* 135: 1993-2011.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059-1066.
- Buttery, R., Seifer, R., Ling, L., Soderstrom, E., Ogawa, J., and Turnbaugh, J. 1982. Additional aroma components of honeydew melon. *J. Agric. food Chem.* 30: 1208-1211.
- Bucheli, P., Voirol, E., Torre, R., López, J., Rytz, A., Tanksley, S.D. and Pétiard, V. 1999. Definition of nonvolatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *J. Agric. Food Chem.* 47: 659 – 664.
- Casalone, E., Fia, G., Barberio, C., Cavalieri, D., turbanti, L., and Polsinelli, M. 1997. Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoro-leucine. *Res. Microbiol.* 148: 613-623.
- Chase Jr, T. 1999. Alcohol dehydrogenases: identification and names for gene families. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 333-350.
- Chen, A-R.S. and Chase Jr, T. 1993. Alcohol dehydrogenase 2 and pyruvate decarboxylase induction in ripening and hypoxia tomato fruit. *Plant Physiol.* 31: 875-885.
- Croft, K. P. C., Jüttner, F., and Slusarenko, A. J. 1993. Volatiles Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol.* 101: 13-24.
- Dandekar, A., Teo, G., Defilippi, B., Uratsu, S., Passey, A., Kader, A., Stow, J., Colgan, R. and Jazmes, D. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Res.* 13: 373-384.
- Danin-Poleg, Y., Tadmor, Y., Tzuri, G., Reis, N., Hirschberg, J. and Katzir, N. 2002. Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. *Euphytica* 125:373-384.
- D’Auria, J., Chen, F. and Pichersky, E. 2002. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* 130: 466–476.

- De Bruxelles, G., Peacock, W., Dennis, E. and Dolferus, R. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 111: 381-91.
- Defilippi, B., Dandekar, A. and Kader, A. 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *J. Agr. Food Chem.* 52: 5694-5701.
- Defilippi, B., Kader, A. and Dandekar, A. 2005. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Sci.* 168:1199-1210.
- De Pooter, H., Montens, J., Guido, A., Dirinck, P., and Schamp, N. 1983. Treatment of Golden Delicious apples with aldehydes and carboxylic acids: effect on the headspace composition. *J. Agric. Food Chem.* 31: 813-818.
- Dickinson, J., Lanterman, M., Danner, D., Pearson, B., Sanz, P., Harrison, S. and Hewlins, M. J. 1997. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 26871-26878.
- Dickinson, J., Harrison, S., Dickinson, J., and Hewlins, M. 2000. An Investigation of the Metabolism of Isoleucine to Active Amyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 10937-10942.
- Drawert, F. 1975. Biochemical formation of aroma components. In: Maarse, H.; Groenen P. J. ed. *Proceedings of the International Symposium on Aroma Research*. Pp. 13-39.
- Drawert, F. and Berger, R. G. 1983: Über die biogenese von aromastoffen bei pflanzen undfruchten. XX. Mitt.: Abhangigkeit der aromabiosynthese in erdbeerfriichten von exogenen parameters. *Lebensmittel-wissenschaft und technologie* 16: 209-214.
- Dudareva, N., D'Auria, J. C., and Nam, K. H. 1998a. Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *The Plant Journal* 14: 297-304.
- Dudareva, N., Raguso, R. A., Wang, J., Ross, J. R., and Pichersky, E. 1998b. Floral scent production in *Clarkia breweri*. III Enzymatic synthesis and emission of benzoid esters. *Plant Physiol.* 116: 599-604.
- Dudareva, N., Murfitt, L. M., Mann, C. J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C. M., Bonham, C., and Wood, K. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emmission in snapdragon flowers. *The Plant Cell* 12: 949-961.
- Dudareva, N. and Pichersky, E. 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol.* 122: 627-633.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135: 1893-1902.
- Dufour, C., and Bayonove, C. L. 1999a. Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *J. Agric. Food Chem.* 47: 678-684.
- Dufour, C., and Bayonove, C. L. 1999b. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 47: 671-677.

- Echeverria, G., Graell, J., Lopez, M.L. and Lara, I. 2004. Volatile production, quality, and aroma-related enzyme activities during maturation of "Fuji" apples. *Postharvest Biology Technology* 31: 217-227.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-75.
- Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Söderberg, B.O., Tapia, O., Brändén, C.I. and Akeson, A. 1976. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4Å resolution. *J. Mol. Biol.* 102: 27-59.
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A. and Pech, J.C. 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* 39: 345-362.
- Els, S., Preston, C., Hertzog, C., Heckel, F., Richling, E. and Schreier, P. 2005. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* L., Merr.) and pineapple products. *Lebensm-Wissu-Technol.* 38: 263-274.
- Facchini, Huber-Allanach, K.L. and Tari, L.W. 2000. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochem.* 34: 121-138.
- Fan, F., Lorenzen, J.A. and Plapp, B.V. 1991. An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry.* 30: 6397-6401.
- Fan, X., Mattheis, J. and Buchanan, D. 1998. Continuous requirement of ethylene for apple fruit volatile synthesis. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1959-1963.
- Fan, X., and Mattheis, J. 1999. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2847-2853.
- Fellman, J. K., Mattinson, D. S., Bostick, B. C., Mattheis, J. P., and Petterson, M. E. 1993. Ester biosynthesis in "Rome" apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* 3: 201-214.
- Felsenstein, J. 1992. PHYLIP (Univ. of Washington, Seattle), Version 3.5
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H., and Kuhn, H. 1995. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 18849-18853.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojaro, F., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Ambid, C. 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.* 53: 201-206.
- Fonseca, S., Hackler Jr, L., Zvara, A., Ferreira, S., Baldé, A., Dudits, D., Pais, M.S. and Puskas, L.G. 2004. Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. *Plant Sci.* 167: 457-469.
- Fuji, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., and Tamai, Y. 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environ Microbiology* 63: 910-915.

- Fujiki, Y., Sato, T., Ito, M., and Watanabe, A. 2000. Isolation and characterization of cDNA clones for the E1 $\beta$  and E2 subunits of the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 6007-6013.
- Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harshima, S., and Tamai, Y. 1998. Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, ATF1 and  $\Delta$ -9 fatty acid desaturase gene, OLE1 by unsaturated fatty acids. *Yeast* 14: 711-721.
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., and Kimura, A. 1998. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4076-4078.
- Galliard, T. and Matthew, J. A. 1977. Lipoxygenase-mediated cleavage of fatty acids to carbonyl fragments in tomato fruits. *Phytochemistry* 16: 339-343.
- Gilliver, P. J. and Nursten, H. E. 1976. The source of the acyl moiety in the biosynthesis of volatile banana esters. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27: 152-158.
- Giovannoni, J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 725-49.
- Giovannoni, J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell Supplement* 16: 170-180.
- Goodenough, P. W., and Riley, T. E. W. 1985. Increase in esterase activity during maturation of *Malus pumila* fruit. *Ann. Appl. Biol.* 107: 347-351.
- Grierson, D., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, J., Bird, C.R. and Schuch, W. 1986. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucleic Acids Research* 14:8595-8603.
- Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Soli, G. A., and Grierson, D. 1999a. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 50: 793-798.
- Guis, M., Botondi, R., Ben Amor, M., Ayub, R., Bouzayen, M., Pech, J. C., and Latché, A. 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 748-751.
- Gussman, C., Goffredz, J. and Gianfagna, T. 1993. Ethylene production and fruit-softening rates in several apple fruit ripening variants. *HortScience* 28:135-137.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. and Cordonnier, R. 1985. The aroma of grapes, I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 331:83-90.
- Hadfield, K., Rose, J.K. and Bennett, A., 1995. The respiratory climacteric is present in Charentais (*Cucumis melo* cv. *Reticulatus* F1 Alpha) melons ripened on or off the plant. *Journal of Experimental Botany* 46: 1923-1925.

- Hamilton, A.J., Lycett, G.W. and Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.
- Hamilton, A.J., Bouzayen, M. and Grierson, D. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7434-7437.
- Hamilton-Kemp, T. R., Archbold, D. D., Loughrin, J. H., Collins, R. W., and Byers, M. 1996. Metabolism of natural volatile compounds by strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2802-2805.
- Harada, T., Sunako, T., Wakasa, Y., Soejima, J., Satoh, T. and Niizeki, M. 1985. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101:742-746.
- Harada, M., Ueda, Y. and Iwata, T. 1985. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol.* 26: 1067-1074.
- Harb, J., and Streif, J. 1994. Synthesis of aroma compounds by controlled atmosphere (CA) stored apples supplied with aroma precursors: alcohols, acids and esters. *Postharvest Biology and technology* 93: 142-149.
- Hatanaka, A. 1993. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* 34: 1201-1218.
- Heath, H. B. and Reineccius, G. 1986. *Flavour chemistry and technology*. Westport, Connecticut, AVI Publishing. 442 p.
- Holt, R.U. 2001. Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chrom.* 937: 107-114.
- Homatidou, V., Karvouni, S., Dourtoglou, V. and Poulos, C. 1992. Determination of total volatile components of *Cucumis melo* L. variety *cantalupensis*. *J. Agric. Food Chem.* 40:1385-1388.
- Hong, Y., Wang, T. W., Hudak, K. A., Schade, F., Froese, C. D., and Thompson, J. E. 2000. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8717-22.
- Horton, C., Huang, K. Bennett, G. and Rudolph, F. 2003. Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acyltransferase genes in *Clostridium acetobutylicum* and *Escherichia coli* for the production of isoamyl acetate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 427-32.
- Horvat, R. J., and Senter, S. D. 1987. Identification of additional volatile compounds from cantaloupe. *J. Food Sci.* 52: 1097-1098.
- Ingersoll, J.C., Rothenberg, M., Liedl, B.E., Folkerts, K., Garvin, D., Hanson, M.R., Doyle, J.J. and Mutschler, M.A. 1994. A novel anther-expressed adh-homologous gene in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol.Biol.* 26: 1875-1891.
- Iyer P.P. and Ferry, J.,G. 2001. Role of arginines in coenzyme A binding and catalysis by the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol.* 183: 4244-4250.

- Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J. and Eyal, Y. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase I gene from ethylene-treated Citrus fruits and its regulation during development. *Plant J.* 20: 6543-661.
- Janssens, L., De Pooter, H., Schamp, N. and Vandamme, E. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* 27: 195-215.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403-405.
- Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. *Bot. J. Linn Soc.* 81:233-247.
- Jennings, W. G. 1967. In: Schultz, H. W.; Day, E. A.; Libbey, L. M. ed. *Chemistry and physiology of flavours*. AVI Publishing. Westport, Connecticut, AVI Publishing. Pp. 419.
- Johnson, P.R. and Ecker, J.R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32:227-54.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry.* 34: 6033-6013.
- Kasperbauer, M.J., Loughrin, J., and Wang, S.Y. 2001. Light reflected from red mulch to ripening strawberries affects aroma, sugar and organic acid concentrations. *Photochem. Photobiol* 74: 103-107.
- Kim, I. and Grosch, W. 1979. Partial purification of a lipoxygenase from apples. *J. of Agric. Food Chem.* 27: 243-246.
- Kirkbride, J.H. 1993. *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae)*. Parkway Publishers, North Carolina, USA.
- Klein, B., Pawlowski, K., Hoericke-Grandpierre, C., Schell, J. and Toepfer, R. 1992. Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a beta-ketoacyl-ACP reductase. *Mol. Gen. Genet.* 233: 122-128.
- Knee, M., and Hatfield, S. G. S. 1981. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *J. Sci. Food Agric.* 32: 593-600.
- Knee, M., Hatfield, S. G. S. and Smith, S. 1989. Evaluation of various indicators of maturity for harvest of apple fruit intended for long-term storage. *J. Food Sci.* 64: 413-419.
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., and Boland, W. 1999. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* 121: 153-162.
- Kroumova, A. B., Xie, Z. and Wagner, G. J. 1994. A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11437-11441.
- Landy, P., Druaux, C. and Voilley, A. 1995. Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chem.* 54: 387-392.

- Lea, A. G. H. 1995. Apple juice. In: Ashurts, P. R. ed. Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. 2nd edition. Glasgow, Blackie Academic and Professional. Pp. 153-196.
- Lebeda, A., Kubalaková, M., Kristkova, E., Navrátilová, B., Dolezal, K., Dolezal, J. and Lysák, M. 1997. Morphological and physiological characteristics of plants issued from an interspecific hybridization of *Cucumis sativus* x *Cucumis melo*. In: Abak K, Büyükalaca S (eds) First International Symposium on Cucurbits, Adana, Turkey, pp 149-155.
- Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. and Pech, J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 101:727-739.
- Lester, G. 1990. Lipoxygenase Activity of hypodermal- and middle-mesocarp tissues from netted muskmelon fruit during maturation and storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 612-615.
- Longhurst, T., Tung, H., and Brady, C. 1990. Developmental regulation of the expression of alcohol dehydrogenase in ripening tomato fruits. *Journal of Food Biochemistry* 14: 421-433.
- Longhurst, T., Lee, E., Hinde, R., Brady, C. and Speirs, J. 1994. Structure of the tomato Adh2 gene and Adh2 pseudogenes, and a study of Adh2 gene expression in fruit. *Plant Mol Biol.* 26:1073-84.
- Lurie, S., Pre-Aymard, C., Ravid, U., Larkov, O. and Fallik, E. 2002. Effect of 1-methylcyclopropene on volatile emission and aroma in cv Anna apples. *J. Agr. Food Chem.* 50: 4251-4256.
- Luo, M., Wang, Y.H., Frisch, D., Joobeur, T., Wing, R. and Dean, R.A. 2001. Melon BAC library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom-2). *Genome* 44:154-162.
- Ma, X., Koepke, J., Panjekar, S., Fritzch, G. and Stöckigt, J. 2005. Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.* 280: 13576–13583.
- Malcorps, P., and Dufour, J. P. 1992. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 210: 1015-1022.
- Marlatt, C., Ho, C.T. and Chien, M. 1992. Studies of aroma constituents bound as glycosides in tomato. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 249-252.
- Mathooko, F. M., Tsunashima, Y., Owino, W. Z. O., Kubo, Y., and Inaba, A. 2001. Regulation of genes encoding ethylene biosynthetic enzymes in peach (*Prunus persica* L.) fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 21: 265-81.
- Mattheis, J., Buchanan, D., and Fellman, J. 1998. Volatiles emitted by "Royal Gala" apples following sequential atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* 96: 201-205.
- Mattheis, J.P. and Fellman, J.K. 1999. Pre-harvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 15: 227-232.
- Matton, D.P., Constable, P. and Brisson, N. 1990. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Mol. Biol.* 14: 775-83.

- McMurchie, E., McGlasson, W. and Eaks, I. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237: 235–236.
- Medina-Suarez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aked, J., Bird, C.R. and Seymour, G. 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 different ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* 115: 453-461.
- Miccolis, V. and Saltveit, M. 1995. Influence of storage period and temperature on the postharvest characteristics of six melon (*Cucumis melo* L., Inodorus Group) cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 5: 211-219.
- Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., and Hamachi, M. (1993). The Purification, properties and internal peptide sequences of alcohol acetyltransferase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci. biotech. Biochem.* 57: 2094-2098.
- Mir, N.A., Perez, R., Schwallier, P. and Beaudry, R. 1999. Relationship between ethylene response manipulation and volatile production in Jonagold variety apples. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2653-2659.
- Molina, I., Salles, C., Nicolas, M. and Cruzet, J. 1987. Grape alcohol dehydrogenase. II Kinetics studies: mechanism, substrate and coenzyme specificity. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 60-64.
- Morales, M., Roig, E., Monforte, A.J., Arús, P. and Garcia-Mas, J. 2004. Single-nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.). *Genome* 47:352-360.
- Morrell, S. and Greenway, H. 1989. Evidence does not support ethylene as a cue for synthesis of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase during exposure to hypoxia. *Austr. J. Plant Physiol.* 16: 469-475.
- Moyano, E., Encinas-Villarejo, S., Lopez-Raez, J.A., Redondo-Nevado, J., Blanco-Portales, R., Betillo, M.L., Sanz, C., Caballero, J.L. and Munoz-Blanco, J. 2004. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Sci.* 166: 835-845.
- Murray, A.J., Hobson, G.E., Schuch, W. and Bird, C.R. 1993. Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes. *Postharvest Biology and Technology* 2:301-313.
- Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamach, M., and Kumagai, C. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:1852-1857.
- Nakajima, K., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1993. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9591-9595.
- Nam, K. H., Dudareva, N., and Pichersky, E. 1999. Characterization of benzylalcohol acetyltransferases in scented and non-scented *Clarkia* species. *Plant Cell Physiol.* 40: 916-923.

- Nam, Y.W., Tichit, L., Leperlier, M., Cuerq, B., Marty, I. and Lelièvre, J.M. 1999. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 39: 629-636.
- Naudin, C.V. 1859. Essai d'une monographie des espèces et des variétés du genre *Cucumis melo*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 11: 5-87.
- Nicholas, K. and Nicholas, H.B. 1997. GENEDOC: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments, distributed by the authors.
- Norton, J.D. and Granberry, D.M. 1980. Characteristics of progeny from interspecific cross of *Cucumis melo* L. with *C. metuliferus* E. Mey. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105:174-180.
- Oeller, P. W., Min-Wong, L., Taylor, L. P., Pike, D. A., and Theologis, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.
- Oliver, J.L., Garcia-Mas, J., Cardús, M., Pueyo, N., López-Sesé, A.I., Arroyo, M., Gómez-Paniagua, H., Arús, P. and De Vicente, C.M. 2001. Construction of a reference linkage map of melon. *Genome* 44:836-845.
- Page, R.D.M. 1996. TREE VIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Paillard, N.M. 1979. Biosynthèse des produits volatils de la pomme: formation des alcools et des esters à partir des acides gras. *Phytochem.* 18: 1165-1171.
- Paillard, N.M. 1990. The flavour of apples, pears and quinces. In: I.D. Morton, and A.J. McLeod (eds), *Food Flavours, PartC. The flavour of fruit*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp.1-41.
- Park, T. K., and Polacco, J. C. 1989. Distinct lipoxygenase species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean. *Plant physiology* 90: 285-290.
- Park, Y., Katzir, N., Brotman, Y., King, J., Bertrand, F. and Havey, M. 2004. Comparative mapping of ZYMV resistances in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109:707-712.
- Peary, J. S., and Prince, T. A. 1990. Floral lipoxygenase: activity during senescence and inhibition by phenidone. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 455-457.
- Peng, H., Chan, C., Shih, M. and Yang, S. 2001. Signalling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*126: 742-749.
- Pérez, A. G., Ríos, J. J., Sanz, L. C., and Olías, J. M. 1992. Aroma components and free amino acids in Strawberry var.chandler during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2232-2235.
- Pérez, A. G., Sanz, C., and Olías, J. M. 1993. Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from Strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1462-1466.
- Pérez, A.G., Sanz, C., Olías, R., Ríos, J.J., Olías, J.M. 1996. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3286-3290.

- Périn, C., Gomez-Jimenez, M.C., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J. C., Latché, A., Pitrat, M. and Lelièvre. 2002a. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiol.* 129: 300-309.
- Périn, C., Hagen, L.S., De Conto, V., Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Portnoy, V., Baudracco-Arnas, S., Chadoeuf, J., Dogimont, C. and Pitrat, M. 2002b. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theor. Appl. Genet.* 104:1017-1034.
- Persson, B., Krook, M. and Jörnvall, H. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* 200: 537-543.
- Peterman, T. K., and Siedow, J. N. 1985. Behavior of lipoxygenase during establishment, senescence, and rejuvenation of soybean cotyledons. *Plant Physiology* 78: 690-695.
- Peters, J.S. and Frenkel, C. 2004. Relationship between alcohol dehydrogenase activity and low-temperature in two maize genotypes, Silverado F1 and Adh1-Adh2- doubly null. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 841-846.
- Pichersky, E. and Gang, D.R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5: 439-445.
- Picton, S., Gray, J., Barton, S., AbuBakar, U., Lowe, A., and Grierson, D. 1993. cDNA cloning and characterisation of novel ripening-related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor rin tomato ripening mutant. *Plant Molecular Biology* 23: 193-207.
- Pino, J., Fuentes, V. and Correa M. 2001. Volatile constituents of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprengel) and rakkyo (*Allium chinense* G. Don). *J. Agric. Food Chem.* 49:1328-30.
- Pitrat, M. 2002. Gene list for melon. *Cucurbit Gene Coop. Rep.* 25:76-93.
- Poll, L., Rindom, A., Toldam-Andersen, T. B., and Hansen, P. 1996. Availability of assimilates and formation of aroma compounds in apples as affected by the fruit/leaf ratio. *Physiol. Plant.* 97: 223-227.
- Riley, J. C. M., Willemot, C., and Hompson, J. E. 1996. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 7: 97-107.
- Rogiers, S.Y. and Knowles, N.R., 1999. A comparison of preharvest and postharvest ethylene production and respiration rates of saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruit during development. *Can. J. Bot.* 77, 323–332.
- Rowan, D. D., Lane, H. P., Allen, J. H., Fielder, S., and Hunt, M. B. 1996. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3276-3285.
- Rowan, D. D., Allen, J. M., Fielder, S., and Hunt, M. B. 1999. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in red delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2553-2562.
- Rubinstein, B. (2000). Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol. Biol.* 44: 303-318.

- Salas, J.J. and Sanchez, J. 1998. Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry*. 48: 35-40.
- Salas, J. J., Sanchez, J., Ramli, U. S., Manaf, A. M., Williams, M., and Harwood, J. L. 2000. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid Research* 39: 151-180.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saltveit, M. Jr., 1993. Internal carbon dioxide and ethylene levels in ripening tomato fruit attached to or detached from the plant. *Physiol. Plant* 89: 204–210.
- Sanz, C., Olias, J.M. and Pérez, A.G. 1997. Aroma biochemistry of fruit and vegetables. In: F.A. Tomas-Barberan and R.J. Robins (eds), *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford Science Pub., Oxford, UK, pp. 313-329.
- Sarni-Manchado, P., Verriès, C. and Tesnière, C. 1997. Molecular characterization and structural analysis of one alcohol dehydrogenase gene (GV-Adh1) expressed during ripening of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry. *Plant Sci.* 125: 177-187.
- Sato, T. and Theologis, A. 1989. Cloning the mRNA Encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase, the Key Enzyme for Ethylene Biosynthesis in Plants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6621-6625.
- Schade, F., Legge, R. L., and Thompson, J. E. 2001. Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers. *Phytochemistry* 56: 703-10.
- Schreier, P. 1984. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. In: Alfred Hiithig Verlag GmbH. Heidelberg, Basel, New York.
- Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Shalekhet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z., and Lewinsohn, E. 2001. Acetyl-CoA : alcohol acyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 794-799.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. and Lewinsohn, E. 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyl transferase in developing rose petals. *Plant Physiol.* 131: 1868-1876.
- Shellie, K.C. and Saltveit, M.E. Jr., 1993. The lack of a respiratory rise in muskmelon fruit ripening on the plant challenges the definition of climacteric behavior. *J. Exp. Bot.* 44: 1403–1406.
- Shiomi, S., Wamocho, L.S. and Agong, S.G., 1996. Ripening characteristics of purple passion fruit on and off the vine. *Postharvest Biology and Technology* 7: 161–170.
- Shiota, H. 1993. New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *J. Agric Food Chem* 41: 2056-2062.

- Simkin, A.J., Underwood, B.A., Aldridge, M., Loucas, H.M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. and Harry J. Klee 2004. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -Ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* 136: 3504-3514.
- Simkin, A., Schwartz, S., Aldridge, M., Taylor, M. and Klee, H. 2004. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant Journal* 40: 882–892.
- Somogy, L., Childers, N. F., and Chang, S. S. 1964. Volatile constituents of apple fruits as influenced by fertilizer treatments. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. USA* 84: 51-58.
- Song, J., and Bangerth, F. 1994. Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity. *Postharvest Biology and Technology* 93: 150-159.
- Song, J. and Bangerth, F. 1996. The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology* 8: 259-269.
- Spanu, P., Grosskopf, D.G., Felix, G. and Boller, T. 1994. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol.* 106: 529-535.
- Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yonk-Duk, K., Steele Scott, N., Loveys, B. and Schuch, W. 1998. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. *Plant Physiol.* 117:1047-1058.
- Speirs, J., Correll, R. and Cain, P. 2002. Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. *Scientia Hort.* 93: 137-142.
- Spinnler, H. E., and Dijan, A. 1991. Bioconversion of amino acids into flavouring alcohols and esters by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 264-269.
- Stepanova, A.N. and Ecker, J.R. 2000. Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3: 341-435.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M., De Luca, V. 1998. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for co-enzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* 14: 703-713.
- St Pierre, B. and De Luca, V. 2000. Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In: R.I. John, R. Romeo, L. Varin and V. De Luca (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry. Evolution of Metabolic Pathways*, vol. 34. Elsevier Science Publishing, Oxford, pp. 285–315.
- Takeota, G., Buttery, R. G., Teranishi, R., and Flath, R. A. 1991. Identification of additional peanapple volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1848-1851.
- Takeota, R. G., Buttery, R. G., and Flath, R. A. 1992. Volatiles constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *J. Agric. Food Chem.* 40: 1925-1929.

Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., De-Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W. and Young, N.D. 1992. High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato Genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.

Tanksley, S. and McCouch, S.R. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.

Tesnière, C., Pradal, M., El-Kereamy, A., Torregrosa, L., Chatelet, P., Roustan, J.P. and Chervin, C. 2004. Involvement of ethylene signalling in a non-climacteric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. *J. Exp. Bot.* 55: 2235-2240.

Tesnière, C. and Verriès, C. 2000. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Sc.* 157: 77-88.

Theologis, A., Oeller, P. W., Wong, L. M., Rottmann, W. H., and Gantz, D. 1993. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study ripening, a complex developmental process. *Devel. Genet.* 14, 282-295.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.

Trebitsh, T., Goldschmidt, E.E. and Riov, J. 1993. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in Citrus fruit peel. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. USA* 90: 9441-9445.

Tressl, R., and Albrecht, W. 1986. In biogenesis of aroma. Parliment, T.H Croteau, R. ACS Symposium Series, Washinton, DC, 114-133.

Tressl, R., and Drawert, F. 1973. Biogenesis of banana volatiles. *J. Agr. Food Chem.* 21: 560-565.

Ueda, J. K. 1980. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from worm wood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* 66: 246-49.

Ueda, Y., Fujishita, N., and Chachin, K. (1997). Presence of alcohol acetyltransferase in melons (*Cucumis melo* L.). *Postharvest Biology and Technology* 10: 121-126.

Underwood, B., Tieman, D., Shibuya, K., Dexter, R., Loucas, H., Simkin, A., Sims, C., Schmelz, E., Klee, H., Clark, D. 2005. Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas. *Plant Physiology* 138: 255-266.

Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., and Castanera, P. 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Sci. USA* 98: 8139-8144.

Van Leeuwen, H., Monfort, A., Zhang, H.B. and Puigdomenech, P. 2003. Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51:703-718.

- Van Der Straeten, D., Rodrigues Poussada, R. A., Gielen, J., and Van Montagu, M. 1991. Tomato alcohol dehydrogenase. Expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 295: 39-42.
- Verriès, C., Pradal, M., Chatelet, P., Torregrosa, L. and Tesnière, C. 2004. Isolation and analysis of the promoter of VvAdh2, a grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening-related gene. *Plant Sci.* 167: 1067-1074.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R. Schuch, W. and Giovannoni, J. 2002. A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. *Science* 296: 343 – 346.
- Vorster, I. and Jansen van Rensburg, W. 2004. The rediscovery of leafy vegetable boosts appreciation for diversity. *GeneFlow '04*, ISBN 92-9043-644-1, Raymond RD (ed) International Plant Genetic Resources Institute Publisher, Rome, Italy, p. 41.
- Walters, D. S., and Steffens, J. C. 1990. Branched chain amino acid metabolism in the biosynthesis of *Lycopersicon penellii* glucose esters. *Plant Physiology* 93: 1544-1551.
- Wang, Y., Wyllie, S. G., and Leach, D. N. 1996. Chemical Changes during the Development and Ripening of the Fruit of *Cucumis melo* (Cv. Makdimon). *J. Agric. Food Chem.* 44: 210-216.
- Wang, Y, Thomas, C. and Dean, R. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:791-797.
- Wang, J., and De Luca V. 2005. The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylantranilate. *Plant J.* 44: 606-619.
- Waters, D., Holton, T., Ablett, E., Lee, L. and Henry, R. 2005. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Funct Integr Genomics* 5: 40-58.
- Williams, M., Morales, M. T., Aparicio, R., and Harwood, J. L. 1998. Analysis of volatiles from callus cultures of olive *Olea europaea*. *Phytochemistry* 47: 1253-1259.
- Wooltorton, L. S. C., Jones, J. D. and Hulme, A. C. 1965: Genesis of ethylene in apples. *Nature* 207: 999.
- Wyllie, S. G. and Leach, D. N. (1990). Aroma volatiles of *Cucumis melo* cv. golden crispy. *J. Agric. Food Chem.* 38: 2042-2044.
- Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y. and Shewfelt, R.L. 1995. Key aroma compounds in melons. p. 248-257. In: R.L. Rousef and M.M. Leahy (eds), *Fruit flavors*. ACS Symposium series 596. American Chemical Society, Washington D.C.
- Wyllie, S. G., and Fellman, J. K. 2000. Formation of volatiles branched chain esters in banana (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 3493-3496.
- Yabumoto, K., Yamaguchi, M., and Jennings, W. G. 1977b. Biosynthesis of some volatiles constituents of musk melon *Cucumis melo*. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm* 5: 53-56.

- Yang, S. F., and Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35: 155-189.
- Yahyaoui, F., Wongs-Aree, C., Latché A., Hackett, R., Grierson, D. and Pech, J.C. 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.* 269: 2359-2366.
- Yokoyama, S. and Harry, D.E. 1993. Molecular phylogeny and evolutionary rates of alcohol dehydrogenases in vertebrates and plants. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1215-1226.
- Yoshikawa, S., Oguri, I., Kondo, K., Fukuzawa, M., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1995. Enhanced formation of isoamyl alcohol in *Zygosaccharomyces rouxii* due to elimination of feedback inhibition of alpha-isopropylmalate synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 139-43.
- Yoshioka, K., and Hashimoto, N. 1981. Ester Formation by alcohol acetyltransferase from Brewers's Yeast. *Agri. Biol. Chem.* 45: 2183-2190.
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Tanaka, K., Sone, H., Nagasawa, N. and Tamai, Y. 1999. Isolation and characterization of the ATF2 gene encoding alcohol acyltransferase II in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorius*. *Yeast* 15: 409-417.
- Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., and Gripon, J.C. 1997. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 414-419.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., and Roudot-Algaron, F. 2000. Characterization and role of the branched chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 571-577.
- Zabetakis, I. and Holden, M.A. 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* 74: 421-434.
- Zheng, X.Y. and Wolff, D.W. 2000. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 613-624.

## RESUME

L'arôme est un des attributs principaux de la qualité des fruits. Ces composés sont synthétisés au cours du processus de maturation. Leur synthèse est sous la dépendance de l'éthylène dans les fruits climactériques tels que le melon. Un pourcentage important des composés volatils contribuant à l'arôme de nombreux fruits est constitué par des esters. La voie de biosynthèse des esters à partir d'acides gras et des acides aminés est contrôlée par deux enzymes clés, l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'alcool acyl-transférase (AAT). L'ADH participe à l'interconversion des aldéhydes en alcools et fournit ainsi des substrats pour la formation des esters. Nous avons isolé dans cette thèse deux gènes fortement divergents codant pour des ADHs (15 % d'identité au niveau d'acide aminé) dans le melon cantaloup Charentais (*Cucumis melo* variété *cantalupensis*). Cm-ADH1 appartient à une classe d'ADHs de moyenne longueur et Cm-ADH2 à une classe à courte chaîne. Les deux protéines exprimées dans la levure sont enzymatiquement actives. Cm-ADH1 a une forte préférence pour le NADPH comme cofacteur, tandis que Cm-ADH2 utilise préférentiellement le NADH. Les deux protéines sont plus efficaces comme réductases. Elles ont en effet des Kms 10 à 20 fois inférieurs pour la conversion des aldéhydes en alcools que pour la déshydrogénation des alcools en aldéhydes. Toutes les deux ont une forte préférence pour les aldéhydes aliphatiques. Cependant Cm-ADH1 est capable de réduire les aldéhydes ramifiés tels que le 3-méthylbutyraldéhyde alors que Cm-ADH2 en est incapable. Les deux gènes sont exprimés spécifiquement dans le fruit et leur expression augmente pendant la maturation. Les transcrits des deux gènes ainsi que l'activité ADH totale sont fortement réduites dans les melons AS-ACO (AS) et dans les melons non transformés (WT) traités avec 1-MCP, démontrant que l'éthylène exerce une régulation positive sur l'expression des deux gènes d'ADH.

L'AAT réalise l'acylation des alcools pour produire des esters. Nous démontrons dans cette thèse que le melon cantaloup Charentais exprime au moins quatre gènes correspondant à l'AAT : *Cm-AAT1*, *Cm-AAT2*, *Cm-AAT3* et *Cm-AAT4*. Toutes les protéines codées par ces gènes, excepté Cm-AAT2, sont enzymatiquement actives et sont capables de produire des esters volatils lorsqu'elles sont exprimées dans la levure. Chacune de ces protéines montre des préférences spécifiques pour la formation d'esters. Cm-AAT1 est capable de produire des esters à courte et longue chaîne avec différents acyls-CoA, mais avec une préférence marquée pour la formation d'acétate d'E-2-hexenyl et d'hexanoate hexyle. Cm-AAT3 accepte également un grand nombre de substrats mais elle présente une préférence très forte pour la production d'acétate de benzylique. Quant à Cm-AAT4 elle produit presque exclusivement des acétates et a une forte préférence pour la formation d'acétate de cinnamoyle. Une mutagenèse dirigée a montré que l'absence d'activité de production d'esters volatils de Cm-AAT2 est liée à la présence d'un résidu 268 d'alanine à la place d'une thréonine alors que toutes les protéines actives étudiées jusque là possèdent cette thréonine. L'activité de chacune de ces trois protéines s'accroît fortement pendant la maturation du melon. Cependant, des melons antisens-ACC Oxydase (AS) qui ne produisent pas d'éthylène ont une très faible activité AAT. D'ailleurs, l'expression des 3 gènes *Cm-AAT* est fortement réduite dans le melon AS et après traitement de melons non transformés (WT) traités avec l'inhibiteur d'action de l'éthylène, 1-MCP. Ceci démontre que l'éthylène est le régulateur principal de l'expression de ces gènes.

Une étude biochimique des protéines recombinantes a été réalisée. Elle montre que les protéines ont une masse moléculaire de 200 kDa environ correspondant à des tétramères. Les protéines natives extraites de melon ont une masse moléculaire identique.

Les Km des trois protéines recombinantes (Cm-AAT1, Cm-AAT3 et Cm-AAT4) sont de 1,23, 1,9 et 0,15 mM vis-à-vis de l'acétyl CoA et 0,56, 0,67 et 0,32 mM vis-à-vis de l'alcool. Selon le niveau, le CoA-SH produit par la réaction peut être activateur ou inhibiteur. Des cinétiques réalisées en présence d'une enzyme capable d'éliminer l'interférence du CoA-SH (phosphotransacétylase) montrent en général un très forte diminution du Km vis-à-vis de l'acétyl CoA, sauf pour Cm-AAT3. Le Ki relatif à l'inhibition par le CoA-SH est voisin de -0,90 mM pour les trois enzymes.

Les données de cette thèse suggèrent que chacune des protéines AAT et ADH joue un rôle spécifique dans la biosynthèse d'esters volatils odorants chez le melon.