



HAL
open science

Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides

Athanasios Beopoulos

► **To cite this version:**

Athanasios Beopoulos. Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides. Biotechnologies. INAPG (AgroParisTech), 2009. Français. NNT: . pastel-00005952

HAL Id: pastel-00005952

<https://pastel.hal.science/pastel-00005952>

Submitted on 8 Apr 2010

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.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Biotechnologie

Présentée par

Athanasios BEOPOULOS

INGENIERIE GENETIQUE DE LA LEVURE OLEAGINEUSE *YARROWIA LIPOLYTICA* POUR LA PRODUCTION DE LIPIDES

Codirecteur de thèse : Dr. Thierry CHARDOT

Codirecteur de thèse : Dr. Jean-Marc NICAUD

*Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585 et
Laboratoire de Chimie Biologique, INRA, UMR206, F-78850 Thiverval-Grignon*

Devant le jury :

M. Claude GAILLARDIN, Professeur, AgroParisTech
M. Thierry BERGES, Professeur, Université de Poitiers
M. Alain MARTY, Professeur, INSA de Toulouse
Mme Carole MOLINA- JOUVE, Professeur, INSA Toulouse
M. Jean-François ROUS, Directeur Adjoint R&D, Sofiprotéol
M. Jean-Marc NICAUD, DR2, CNRS
M. Thierry Chardot, DR2, INRA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Biotechnologie

Présentée par

Athanasios BEOPOULOS

Le 10 Novembre 2009

INGENIERIE GENETIQUE DE LA LEVURE OLEAGINEUSE *YARROWIA LIPOLYTICA* POUR LA PRODUCTION DE LIPIDES

Codirecteur de thèse : Dr. Thierry CHARDOT

Codirecteur de thèse : Dr. Jean-Marc NICAUD

*Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585 et
Laboratoire de Chimie Biologique, INRA, UMR206, F-78850 Thiverval-Grignon*

Devant le jury :

M. Claude GAILLARDIN, Professeur, AgroParisTech
M. Thierry BERGES, Professeur, Université de Poitiers
M. Alain MARTY, Professeur, INSA de Toulouse
Mme Carole MOLINA- JOUVE, Professeur, INSA Toulouse
M. Jean-François ROUS, Directeur Adjoint R&D, Sofiprotéol
M. Jean-Marc NICAUD, DR2, CNRS
M. Thierry Chardot, DR2, INRA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Biologique (INRA, UMR206, AgroParisTech) dirigé successivement par Catherine Lapierre et Thierry Chardot ainsi qu'au sein du laboratoire Microbiologie et Génétique Moléculaire (INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585, AgroParisTech) dirigé par Jean-Marie Beckerich à Thiverval-Grignon. La thèse a été en partie financé par l'ANR Lipicaero (No 0701C0089).

Au terme de ces trois années et demie, il me tient à cœur de remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin !

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Marc Nicaud et Thierry Chardot, mes deux directeurs de thèse qui ont su être omniprésents au cours de cette thèse. Je vous remercie au fond du cœur de m'avoir guidé tout au long de ces années.

Thierry, je te remercie de m'avoir persuadé de continuer mes études en thèse, je ne le regretterai jamais. Je te remercie également de ton enthousiasme pour trouver un sujet aussi intéressant, taillé à mes intérêts, et de m'avoir suivi tout au long de ces travaux prêt à discuter et à trouver des nouvelles directions.

Jean Marc, je te remercie de m'avoir si gentiment accueilli au sein de ton équipe. Mais je te remercie avant tout de m'avoir transféré ta passion pour la génétique moléculaire et les systèmes biologiques, un monde aussi passionnant. Ton enthousiasme pour tous éléments novateurs de la recherche a été une grande source de motivation. Je te remercie également de m'avoir laissé la liberté d'essayer de mettre en place chaque nouvelle idée, de gérer indépendamment plusieurs projets et de suivre des expérimentations parfois peu probables...

Mais surtout je vous remercie tous les deux de votre confiance et la liberté que vous m'avez donnée, qui m'a fait sentir comme un vrai chercheur et pas seulement un étudiant en thèse.

Je remercie également l'équipe de l'INSA de Toulouse et spécialement Carole Molina-Jouve, non seulement d'avoir accepté de juger cette thèse, mais surtout pour ses conseils, son expérience, son soutien et son enthousiasme pendant les travaux de cette étude. Je tiens aussi à remercier Jean-Louis Uribelarrea d'avoir partagé son expertise en fermentation, indispensable pour l'avancement de ces travaux.

Mes remerciements vont également au Professeur Alain Marty, non seulement d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse mais aussi de m'avoir accueilli et de m'avoir fait connaître Toulouse. Je remercie également le Professeur Thierry Berges d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et Monsieur Jean-François Rous pour son intérêt pour ce travail.

Je remercie vivement le Professeur Claude Gaillardin pour son accueil au sein du laboratoire et surtout de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier également l'équipe grecque, de m'avoir accueilli chaleureusement au laboratoire de microbiologie de l'université d'agriculture d'Athènes. Merci à Seraphim

Papanikolaou pour son aide et ses conseils tout au long de cette thèse. Je remercie aussi les Professeurs Maria Galliotou-Panayiotou et Michalis Komaitis pour leur soutien.

Je remercie chaleureusement Sabine D'Andréa qui a montré une disponibilité sans égal afin de répondre à toutes mes questions, pour ses conseils et son aide immense aux cours de ces années.

Mes remerciements vont également à Cécile Neuvéglise pour ses conseils scientifiques et le superbe BBQ !

Je remercie également Jean-Marie Beckerich pour son accueil et son aide pendant ces années.

Merci aussi à Marine et Brigitte pour tous leur conseils et surtout pour tous le temps qu'on a passé à pratiquer l'exorcisme devant une CPG possédée...

Merci également à toute l'équipe du 'couloir' : Bernard, Frank, Laurent et Michel (merci pour toutes Michel !)

Merci à Guy non seulement pour son aide 'logistique', mais surtout pour les petites conversations et ses conseils 'routiers'...

Je tiens aussi à remercier P.H. Benetti pour les conseils scientifiques- *et non-* et pour toutes les conversations et soirées parisiennes...

Je remercie également Thomas, pour son aide scientifique, ses idées et pour toutes les conversations effectuées au cours de congrès.

Il m'est agréable de remercier Ramdane d'une part pour avoir réalisé une partie des expériences présentés dans ce travail, mais surtout pour avoir partagé le même bureau et d'être un vrai 'pote'... (Eh, oui, mec...). Merci également à Malika-Myriam-Mariam qui non seulement complémente mais apporte la personnalité unique de l'équipe terrible du sous-sol !

Un grand merci à Philomène pour son bonne humeur et nos conversations infinies...

Je tiens aussi à remercier tout la compagnie de Grignon : Amandine, Jamila, Ali, Francine, Renne...l'effet Grignon... Merci à l'ensemble de membres du laboratoire de Grignon, pour m'avoir accueilli à bras ouverts (les citer serait trop long et j'aurais peur d'en oublier) !

Je tiens aussi à remercier ma famille de m'avoir soutenu et toute mon équipe parisienne : Nat, Stor, Soff, Zura, Nad merci pour tous !!

Une pensée particulière et un grand merci à Brigitte pour avoir eu l'immense gentillesse de relire mon manuscrit et d'y avoir apporter la justesse grammaticale qui me faisait défaut.

Enfin à tout ceux que j'aurais oublié (et je m'excuse mille fois), je dis merci !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	10
I. AVANT PROPOS.....	11
II. INTRODUCTION	15
A. LIPIDES	16
A.1 Classification et fonction des lipides	17
A.1.1 Les acides gras.....	17
A.1.2 Les phospholipides	20
A.1.3 Les sphingolipides	22
A.1.4 Les glycérides : MAG, DAG, TAG.....	23
A.1.5 Les stérols et leurs esters	24
A.1.6 Les cérides	25
A.2 Les lipides neutres comme éléments de réserve.....	25
B. Accumulation des lipides chez les microorganismes/ levures.....	26
B.1 Les corps lipidiques	26
B.2 Les microorganismes oléagineux	27
B.3 Déclenchement de l'accumulation de lipides chez les microorganismes.....	28
B.4 L'intérêt des lipides de levures et de <i>Y. lipolytica</i>	29
B.4.1 Les souches de <i>Y. lipolytica</i>	30
B.4.2 Physiologie, taxonomie et intérêt de la levure <i>Y. lipolytica</i>	30
B.5. PUBLICATION I	32
The Hydrocarbon- Degrading Oleaginous Yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	32
C.1 Biosynthèse des acides gras : accumulation <i>de novo</i>	35
C.1.1 Activation des acides gras et de leurs précurseurs.....	36
C.1.2 Régulation de la biosynthèse des acides gras par les acyl-CoA synthases.....	38
C.2 Provenance du carbone utilisé pour la biosynthèse des acides gras	39
C.2.1 Production d'acétyl-CoA à partir du citrate par l'ACC.....	39
C.2.2 L'ATP citrate lyase et le déclenchement de l'accumulation	40
C.2.3 Le malonyl-CoA	41
C.2.4 L'acétyl-CoA carboxylase (ACC)	41

C.2.5 L'acide gras synthase (FAS).....	43
C.2.6 L'apport du NADPH est régulé par l'enzyme malique	45
C.2.7 Régulation de l'ACC et de la FAS	47
C.3 Réactions de modification	48
C.3.1 Elongation.....	48
C.3.2 Régulation de l'élongation.....	50
C.3.3 Désaturation des acides gras	50
C.3.4 Régulation des désaturases	54
D. La synthèse <i>ex novo</i>	56
D.1 Assimilation du substrat	56
D.2 Transport des AGL	58
D.3 PUBLICATION II.....	61
Uptake and Assimilation of Hydrophobic Substrates by the Oleaginous Yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	61
E. Accumulation de lipides de réserve	64
E.1 La voie de synthèse des TAG	64
E.2 La synthèse des esters de stérols.....	69
E.2.1 Régulation de la synthèse des esters de stérols.....	70
E.3 Stockage dans les corps lipidiques.....	70
E.4 Biosynthèse des corps lipidiques	71
F. Voie de dégradation des réserves lipidiques	74
F.1 Les TAG lipases.....	74
F.2 Voie de la β -oxydation.....	75
F.2.1 Les acyl-CoA oxydases.....	75
F.2.2 Les enzymes impliquées dans la voie de la β -oxydation	77
F.3 Le destin de l'acétyl-CoA issue de la β -oxydation	78
F.4 Interaction des voies du métabolisme	79
F.4.1 PUBLICATION III	80
<i>Yarrowia lipolytica</i> : A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation	80
G. Les outils génétiques existants pour la modification de <i>Y. lipolytica</i>	82

G.1 Les marqueurs de sélection	82
G.2 Les promoteurs	82
G.3 Les systèmes d'amplification	83
G.4 Le système Cre lox recombinaise	83
H. Applications Biotechnologiques de <i>Y. lipolytica</i>	85
H.1 PUBLICATION IV	86
<i>Yarrowia Lipolytica</i> as a Cell Factory for Oleochemical Biotechnology	86
I. Conclusion	88
I.1 PUBLICATION V	90
<i>Yarrowia lipolytica</i> as a model for bio-oil production	90
III. MATERIEL ET METHODES	93
A. Matériels	94
A.1. Souches	94
A.2 Vecteurs	95
A.2.1 Plasmides	95
A.2.2 Vecteurs d'expression	95
A.3. Milieux de culture	98
A.3.1. Milieu de culture complet pour <i>E.coli</i> : LB	98
A.3.3. Milieux de culture pour <i>Y. lipolytica</i>	98
A.3.4. Milieux de sélection des transformants de <i>Y. lipolytica</i>	99
A.3.5. Milieux de synthèse des acides gras	99
A.3.6. Milieux d'accumulation des acides gras	100
B. Méthodes Génétiques	101
B.1 Analyse <i>in silico</i> des séquences d'intérêt.	101
B.2. Méthodes de préparation/ extraction de l'ADN	101
B.2.1 Préparation de l'ADN plasmidique bactérien	101
B.2.2 Préparation de l'ADN génomique de levure	102
B.3. Amplification des séquences par PCR	102
B.4. Techniques de préparation et d'analyse de l'ADN	104
B.4.1. Purification de fragments d'ADN	104
B.4.2. Analyse des fragments d'ADN par séparation électrophorétique	104

B.4.3. Dosage de l'ADN	104
B.4.4. Hydrolyse par des endonucléases de restriction	104
B.4.5. Déphosphorylation de l'ADN.....	105
B.4.6. Ligature de l'ADN.....	105
B.5. Techniques de transformation.....	105
B.5.1. Transformation d' <i>E. coli</i>	105
B.5.2. Transformation de <i>Y. lipolytica</i>	106
B.6. Construction de vecteurs de disruption/ surexpression	107
B.6.1. Construction des cassettes de disruption	107
B.6.2. Construction de vecteurs de surexpression.....	110
B.6.3. Excision du marqueur de sélection - expression de la recombinaise Cre	111
B.6.4. Vérification de la transformation et de l'excision	111
B.7. Conditions de culture et de croissance de souches	111
B.7.1. Conditions de culture.....	111
B.7.2. Estimation de la croissance /biomasse.....	112
B.8. Techniques analytiques.....	112
B.8.1. Microscopie optique	112
B.8.2. Coloration de cellules au rouge Nil / Microscopie de fluorescence	112
B.8.3. Extraction des lipides.....	113
B.8.4. Séparation des lipides	113
B.8.5. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	114
B.8.6. Transméthylation des acides gras	114
B.8.7. Chromatographie Phase Gazeuse (CPG).....	114
B.8.8. Quantification et analyse des corps lipidiques (CLs).....	115
IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	117
A. Physiologie de l'accumulation des lipides chez <i>Y. lipolytica</i>	118
A.1 Modes de culture affectant la production de lipides.....	118
A.2 La modification génétique.....	119
B. Etude de l'accumulation de lipides chez la souche sauvage de <i>Y. lipolytica</i>	120
B.1 Souches de référence	120
B.2 Milieux de référence	121

B.3 Etude de la croissance des souches ‘sauvages’	121
B.4 Etude de l’accumulation des lipides des souches ‘sauvages’	122
B.5 Etude du profil lipidique des souches sauvages	124
B.6 Répartition des lipides des souches sauvages par classes.....	125
C. Étude comparative de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides	127
C.1 Définition des approches mises en œuvre pour l’ingénierie métabolique	129
C.2 Effet de la modification des flux sur l’accumulation de lipides	131
C.3 Publication VI	133
Control of Lipid Accumulation in the Yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	133
C.4 Valorisation de résultats	135
D. Le rôle des acyltransférases dans l’accumulation de lipides chez <i>Y. lipolytica</i>	136
D.1 Analyse fonctionnelle des acyltransférases	137
D.2 Effet de l’invalidation des gènes codant les différentes acyltransférases.....	138
D.3 Publication VII	139
Role of storage lipid proteins in lipid accumulation and lipid profile in the oleaginous yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	139
D.4 La surexpression des acyltransférases	141
D.4.1 Construction des vecteurs d’expression et des mutants	141
D.4.2 Test d’accumulation par des souches surexprimant les acyltransférases	142
D.4.3 Discussion sur la surexpression des acyltransférases	145
E. Modification du profil lipidique de <i>Y. lipolytica</i>	147
E.1 Construction des vecteurs d’expression et des mutants $\Delta 12$	147
E.2 Test d’accumulation de lipides chez les souches modifiées pour la $\Delta 12$ désaturase....	148
E.3 Profil lipidique des souches modifiées pour la $\Delta 12$ désaturase	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
Liste des Publications	179
Résumé	183
Abstract	184

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : Cassette de liaison à l'ATP
ACP : Acyl-carrier protein
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGL : Acides gras libres
Aox: Acyl-CoA oxydase
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
CCM : Chromatographie en couche mince
CMC : Concentration minimum critique
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
Cx : Acide gras dont la longueur de chaîne comporte x atomes de carbone
DAG : Diacylglycérol
DCA : Acide dicarboxylique
CL : corps lipidique
DHAP : Di-hydroxy-acetone phosphate
DO : Densité optique
ES : Esters de stérol
FADH : Alcool déshydrogénase
FAE : formic-acid-extractable protein
G-3-P : Glycérol-3-phosphate
G3PDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
LCFA : Acides gras à longue chaîne carbonée (14-16-18 unités carbone)
MAG : Monoacylglycérol
MCFA : Acides gras à longueur de chaîne carbonée moyenne (12-14 unités carbone)
ORE : Elément de réponse à l'oléate
PUFA : Acides gras polyinsaturés (*polyunsaturated fatty acid*)
pb : Paire de bases
RE: Réticulum endoplasmique
SPE : extraction en phase solide
TAG : Triacylglycérols
TMS : Segments transmembranaires
VLCFA : Acides gras à très longue chaîne carbonée (plus que 18 unités carbone)

I. AVANT PROPOS

Cette revue bibliographique permettra de tracer le bilan des connaissances sur la production de lipides par les microorganismes, et notamment les levures. *Y. lipolytica* est une levure oléagineuse, capable à produire de grandes quantités de lipides d'intérêt industriel, qui a fait l'objet de nombreux travaux sur le métabolisme des substrats hydrophobes. La variabilité des rendements de production de lipides mentionnée dans la littérature révèle différentes évolutions possibles du devenir du carbone. Par contre, il n'existe que peu d'études explorant les capacités de *Y. lipolytica* sur la production de lipides d'intérêt industriel, biotechnologique ou économique.

Le but de cette introduction est de faire le point sur les voies de production des lipides chez cette levure, de connaître sa composition lipidique et sa capacité de production. Les lipides produits par cette levure, les voies métaboliques et les gènes associés (synthèse, dégradation) ainsi que les mécanismes de régulation et du routage du carbone font partie de cette étude, même si plusieurs éléments entre eux restent encore un champ important d'investigation.

L'intérêt initial de cette étude était d'améliorer la capacité de bioremédiation des déchets lipidiques industriels issus du secteur agroalimentaire ou de l'industrie pétrochimique, qui restent des polluants qui sont inexploités. Nous avons mis l'accent sur la production des résidus lipidiques ayant un intérêt biotechnologique. Des collaborations avec des entreprises ou dans le cadre d'ANR et des projets internationaux nous ont conduits à travailler, dans un premier temps sur la production de molécules pouvant remplacer les carburants actuels, et qui représentent la nouvelle génération de biocarburants.

L'enjeu des biocarburants n'est pas de remplacer la totalité des carburants fossiles mais de réduire l'impact humain sur l'environnement. Les biocarburants sont complémentaires du développement et de l'amélioration du secteur de transports et il faut qu'ils puissent améliorer les performances énergétiques de ce secteur. Il est essentiel donc d'avoir des molécules d'une composition qui puissent répondre aux exigences de chaque secteur du transport. Par exemple pour l'aéronautique les caractéristiques requises du kérosène limitent l'utilisation des biocarburants routiers. Le remplacement du carburant des avions par les biocarburants reste une illusion. Il existe par contre des molécules candidats à des usages énergétiques pour l'aéronautique, utilisables comme additifs qui doivent d'un côté répondre aux spécifications très strictes, mais peuvent d'un autre côté améliorer le rapport énergétique et diminuer la consommation de kérosène. Les biocarburants en sont un exemple. L'industrie pétrochimique

impliquée dans la production des polymères, des adhésifs et des plastiques à beaucoup à gagner par la production de molécules spécifiques par les microorganismes. C'est le cas des usines biologiques issues des cellules auxquelles la chimie verte ou blanche s'intéresse. Par contre, un tel processus, afin d'être rentable, nécessite des substrats bon marché (ou de déchets et des produits secondaires des autres processus), des processus efficaces et peu onéreux, un taux de bioconversion efficace et surtout de grandes capacités de production.

La première partie de l'étude bibliographique portera sur les molécules lipidiques des systèmes biologiques et de leurs propriétés physiques et chimiques. En suite on se focalisera sur le métabolisme de la levure *Y. lipolytica* en mettant l'accent sur la capacité d'accumulation et de dégradation des lipides, la régulation et les interactions des différentes voies métaboliques. L'étude et l'implication des différents gènes pour la production de lipides seront aussi des éléments forts tout au long de ce travail. Cette introduction marque la voie pour combiner les connaissances physiologiques de cette levure avec les outils génétiques existants afin d'utiliser cette levure comme usine cellulaire pour la production des grandes quantités de lipides ayant un intérêt industriel. L'amélioration de la teneur en lipides de *Y. lipolytica*, les mécanismes de production des lipides neutres et la modification de la composition lipidique de cette levure sont les éléments centraux cette étude.

II. INTRODUCTION

A. LIPIDES

Les lipides constituent une classe chimiquement hétérogène composée de substances hydrocarbonées portant des fonctionnalités très différentes, et ayant pour propriétés communes d'être insolubles dans l'eau et d'être solubles dans des solvants organiques comme le chloroforme, les hydrocarbures et les alcools. Ces molécules amphiphiles, constituent en solution dans l'eau, des structures dans lesquelles le pôle hydrophobe est enfoui tandis que l'extrémité polaire s'expose en surface au contact de l'eau (micelles, vésicules, etc.). Cela leur permet de constituer des structures bidimensionnelles, telles que des membranes fluides tout en étant totalement imperméables à l'eau et aux molécules polaires, à la base de toutes les membranes biologiques. Ainsi, bien que non polymérisable, cette classe de molécule joue un rôle structurel important chez les êtres vivants (membrane cellulaire). Ces molécules constituent également des éléments énergétiques car leur état d'oxydation est très bas (en particulier s'il s'agit de graisses ou de triacylglycérols).

Répartis dans tout le monde vivant, les lipides sont trouvés dans tous les types de cellules, et ces molécules peuvent être impliquées de la régulation de la transcription de gènes à la régulation de voies métaboliques vitales. Néanmoins, on peut diviser les lipides en deux grandes catégories : ceux constitués à partir des acides gras et ceux constitués à partir de stérols. Les acides gras sont les lipides les plus simples, que l'on retrouve comme constituants de nombreux types de lipides plus complexes. Leur structure étant extrêmement polymorphe, on connaît plus de 300 types d'acides gras différents chez les végétaux (Voelker et Kinney, 2001), il est difficile de les définir d'un point de vue structural. En forme libre les acides gras sont assez rares dans la cellule, car ils sont susceptibles d'avoir des effets toxiques sur les membranes. Habituellement les acides gras entrant dans la cellule sont activés en acyl-CoA. On les trouve ainsi estérifiés dans les phospholipides, les sphingolipides et les triglycérides. Les lipides constitués des stérols sont les hormones stéroïdes, des vitamines et autres terpènes. Suivant les règnes, la complexité et le rôle des stérols va grandement varier, notamment chez les végétaux qui composent des stéroïdes particuliers. Les brassinostéroïdes chez les brassicacées sont impliqués dans la signalisation et dans la rigidité des membranes. Chez les microorganismes la

diversité des lipides constitués des stérols est moins important car ils contiennent essentiellement de l'ergostérol et ses précurseurs. Chez les animaux cette classe de lipides comporte les hormones stéroïdes. Sous forme estérifiée, les stérols peuvent représenter une quantité assez importante des acides gras. C'est le cas de la levure *S. cerevisiae* où plus que 50% des lipides de stockage se trouvent sous forme d'esters des stérols (Daum *et al.*, 1998).

A.1 Classification et fonction des lipides

Du fait de la grande diversité des lipides et de la difficulté à adopter une définition universelle, il n'existe pas de classification unique des lipides. Dans cette partie les lipides sont distingués en fonction de leur polarité afin de discuter leurs propriétés physiques.

Les lipides polaires constituent une classe à part dans les matières grasses puisque comme leur nom l'indique, ces lipides possèdent une partie hydrophile qui leur permet de jouer un rôle prépondérant au niveau des interfaces que ce soit dans les organismes vivants ou dans les systèmes dispersés.

A.1.1 Les acides gras

Les acides gras sont les constituants de nombreux types de lipides. Ils sont constitués d'un squelette alcane (R) portant une fonction acide carboxylique terminale (-COOH). Ils se distinguent par la longueur de la chaîne hydrocarbonée, son degré d'insaturation, la localisation et la conformation (*cis*, *trans*) des doubles liaisons, la présence et la position de modifications éventuelles (hydroxylation, époxydation, etc.). Leurs diagrammes de phases peuvent être très complexes et leurs propriétés physiques sont affectées par les modifications qu'ils peuvent porter. Les acides gras sont désignés par le nombre de carbone de la chaîne aliphatique, le nombre de double liaisons (Δ), leurs positions et leurs configurations (*cis* ou *trans*). La position des modifications est faite en prenant comme référence la fonction acide carboxylique (Δ) de la molécule. Certains auteurs se réfèrent au méthyle terminal (numérotation ω ou *n*) (Figure II-1).

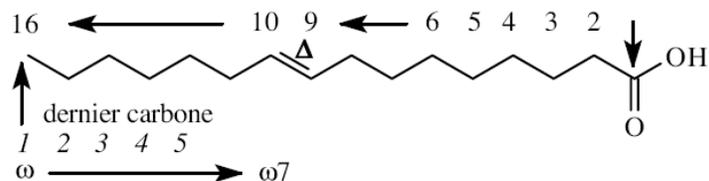


Figure II-1 : Exemple de numérotation des carbones et de doubles liaisons de l'acide palmitique. Il peut s'écrire comme C16:1 $\Delta 9$, $\omega 7$ ou n-7.

Les acides gras insaturés trouvés dans la nature ont une longueur de chaîne comprise entre 2 et 30 carbones, et entre 12 et 22 atomes de carbone pour les plus communs. La configuration d'une chaîne saturée est représentée dans la figure II-2. Du fait de l'agitation thermique et de la libre rotation des liaisons carbone-carbone des groupements méthylènes les acides gras sont capables d'adopter un très grand nombre de configurations possibles. Les interactions stériques et les interactions avec les autres molécules de la nature restreint la motion des acides gras non-estérifiés et des chaînes acylés des lipides complexes.

La configuration des doubles liaisons des acides gras insaturés est en général de type *cis* (ou *Z*). Dans la plupart des cas l'insaturation commence avec une insertion d'une double liaison en position $\Delta 9$. La présence d'une ou de plusieurs insaturations sur la chaîne carbonée d'un acide gras introduit une cassure de la chaîne par rapport à un acide gras saturé (Figure II-2b).

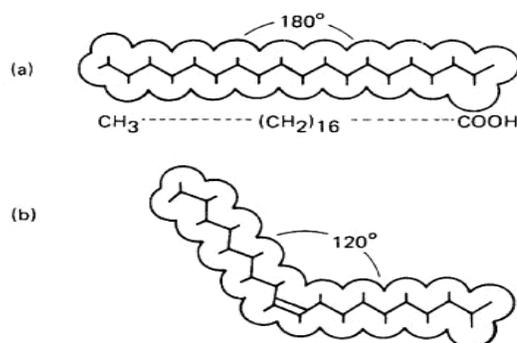


Figure II.2 : Conformation préféré (a) d'une acide gras saturé (acide stéarique) et (b) d'un acide gras mono-insaturé (acide oléique, conformation *cis*)

Du fait d'une stabilité thermodynamique moins importante de la configuration *cis*, les acides gras insaturés ont des points de fusion plus bas que leurs formes saturées. Ainsi la différence de température de fusion entre les C18:0 et C18:1 *cis* est de l'ordre de 50°C. Les isomères *trans*, dépourvus de brisure ont des propriétés thermodynamiques très proches de celles des acides gras insaturés. On les trouve dans la nature comme constituants rares chez des organismes photosynthétiques. De manière générale, la longueur de la chaîne des acides gras saturés diminue la CMC et augmente la température de fusion. La méthylation et l'insaturation diminuent la température de fusion de la chaîne carbonée (**Tableau II-1**).

Tableau II-1 : Température du point de fusion selon la longueur de chaîne, les insaturations et la conformation des doubles liaisons de différents acides gras

Nom	Saturés	Insaturés	T de fusion (°C)
Acide butyrique	C4 :0		-6,5
Acide caproïque	C6 :0		-3
Acide caprilique	C8 :0		16,5
Acide caprique	C10 :0		31,5
Acide laurique	C12 :0		44,3
Acide myristique	C14 :0		53,9
Acide palmitique	C16 :0		63,1
Acide stéarique	C18 :0		70
Acide oléique		C18 :1 (n-9) <i>cis</i>	16,3
Acide élaidique		C18 :1 (n-9) <i>trans</i>	45
Acide linoléique		C18 :2 (n-6, 9)	-5
Acide iso-linoléique		C18 :2 (n-7,9)	56,5
Acide α -linoléique		C18 :3 (n-3,6,9)	-11
Acide arachidique	C20 :0		76,5
Acide érucique		C22 :1 (n-9) <i>cis</i>	33,5
Acide trans-érucidique		C22 :1 (n-9) <i>trans</i>	61,5
Acide lignocérique	C24 :0		86
Acide tétracosatétraénoïque		C24 :4 (n-10,13,16,19) <i>cis</i>	-49,5

Les membranes biologiques sont constituées principalement de phospholipides, et ce sont les acides gras estérifiés qui imposent leur état à la majorité des lipides (les stérols jouant aussi sur la rigidité des membranes), ce qui impliquera des variations dans la nature de ces derniers selon leur fonction dans les organismes vivants. L'existence des cellules est conditionnée par la qualité de la fluidité de leur membrane pour réaliser les fonctions de barrière et d'échange. Chez les organismes poïkilothermes (organismes qui peuvent s'adapter à des températures différentes), on observe des modifications de la composition en acides gras lorsque la température change ce qui permet de conserver une fluidité adéquate aux membranes plasmiques. Pareillement, chez les espèces thermophiles, la présence d'acides gras méthylés permet de conserver une stabilité des membranes jusqu'à des températures de 85°C.

Chez les organismes vivants les acides gras sont très rarement trouvés sous forme libre (RCOO-, acides gras libres : AGL). Le caractère chargé des AGL leur confère des activités détergentes et une grande affinité pour les protéines ayant pour conséquence la modification de la structure des membranes et l'inhibition de la fonction d'enzymes, démontrant une activité toxique pour la cellule. Cependant, chez plusieurs organismes la forte expression de lipases entraîne la libération d'acides gras sans pour autant que l'on observe de toxicité. C'est le cas par exemple pour les globules rouges sanguins dans lesquels les acides gras se trouvent complexés avec l'albumine (Gurr et al., 2002).

A.1.2 Les phospholipides

Les phospholipides (PL) et les triacylglycérides (TAG) sont les lipides les plus importants en biologie, les deux dérivent du diacylglycérol (DAG). Le glycérol est une molécule à trois atomes de carbone, chacun portant un groupement hydroxyle (triol). Ces groupements hydroxyyles peuvent réagir avec le groupement acide des acides gras pour former une liaison ester. A un glycérol, peuvent donc se fixer de 1 à 3 acides gras (chaîne acyle-R). Les molécules obtenues sont nommées en conséquence, monoacylglycérides (MAG), diacylglycérides (DAG) et triglycérides (TAG). Les phospholipides sont donc composés d'un squelette glycérol contenant des chaînes acyles liées par une liaison ester en positions *sn1* et *sn2*. Le troisième carbone est estérifié par une liaison phosphodiester d'un dérivé X de l'acide phosphorique (XPO₄) et constitue la tête polaire (Figure II-3). Les phospholipides sont donc des molécules amphiphiles dont les parties hydrophobes peuvent s'associer entre elles, en excluant l'eau du

milieu, les parties hydrophiles restant en interaction avec l'environnement aqueux, ce qui a pour conséquence la formation spontanée de bicouches, à l'origine des membranes. Ces membranes permettent aux cellules de séparer leurs constituants internes de l'environnement externe. C'est ce même principe que la cellule utilise afin de différencier ses organelles. La parcellisation permet la ségrégation des réactions chimiques, d'accroître leur efficacité biochimique et d'éviter la dispersion des produits réactionnels.

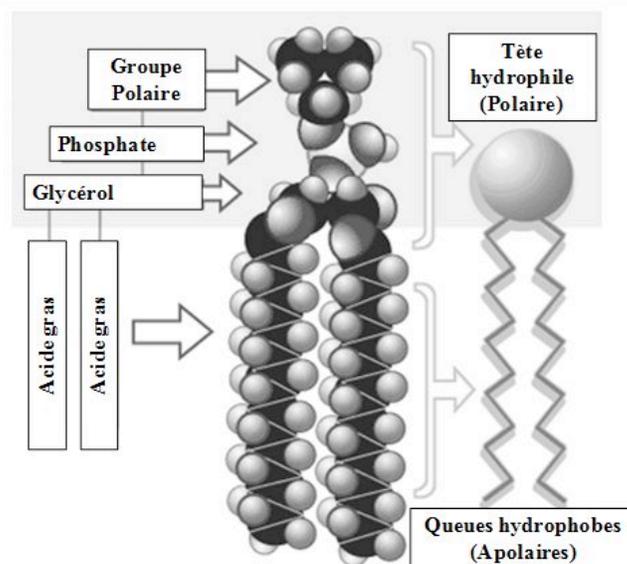


Figure II-3: Représentation de la structure d'un phospholipide

Les classes de phospholipides sont définies par la nature du composant X. Les phospholipides des membranes plasmiques les plus représentés de manière quantitative sont la phosphatidylcholine (PC) et les aminophospholipides, la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) qui sont des diacylglycérides estérifiés par un groupement azoté, et le phosphatidylinositol (PI) qui est un diacylglycéride estérifié par un polyalcool cyclique. A pH 7, le groupe phosphate porte une charge négative ; donc si le groupement X est neutre ou chargé négativement, comme pour le PI et la PS, le phospholipide est anionique ; si X porte une charge positive, le phospholipide est électriquement neutre ou zwitterionique, comme dans le cas de la PC et de la PE.

Les phospholipides sont, avec le cholestérol, les lipides les plus abondantes de la membrane, suivis par les sphingolipides. La plupart des biomembranes contiennent une grande

diversité d'espèces moléculaires de phospholipides. Cette diversité est générée par le grand nombre de combinaisons possibles des diverses têtes polaires (choline, éthanolamine, inositol et sérine) avec les différentes chaînes acyles. En général, la distribution des chaînes acyles est asymétrique (Hanahan, 1954). Les phospholipides de levure par exemple possèdent en effet plutôt des chaînes acyles saturées en position *sn-1* (comme le palmitate) et des acyles insaturées (comme l'oléate) en position *sn-2* (Wagner et Paltauf, 1994). La tête polaire ainsi que la composition en chaînes acyles des phospholipides déterminent les propriétés de la membrane. La charge du groupement polaire affecte le potentiel de surface de membranes (Carbon et Calderon, 1991). La composition lipidique, alors, fournit aux membranes le potentiel de bourgeonnement, de mise en forme, de fission et de fusion. Ce sont là des caractéristiques essentielles pour la division cellulaire, la reproduction biologique et la circulation intracellulaire. Les lipides affectent aussi l'activité des protéines membranaires permettant en plus l'agrégation et la dispersion de ces protéines (Chen et Wilson, 1984). La taille de la tête polaire détermine l'état physique des membranes qui est en générale sous forme liquide-cristallin dans la plupart des organismes (Zweytick *et al.*, 2000).

Enfin, les lipides peuvent agir comme des messagers dans la traduction du signal et dans les procédures de reconnaissance moléculaire. La dégradation des lipides amphiphiles permet le cheminement des signaux de transduction : dans les membranes par la portion hydrophobe et dans le cytosol par la portion polaire de la molécule. En plus, la composition lipidique de la membrane détermine les domaines membranaires spécifiques au recrutement de protéines (van Meer *et al.*, 2008). Un dérivé du phosphatidyl inositol constitue la structure de base de l'ancrage des protéines dans les membranes.

A.1.3 Les sphingolipides

Il s'agit du deuxième constituant des membranes, étant présent dans la membrane plasmique à des concentrations très faibles, à hauteur de 0,4% (glip/gbiomasse). Ils dérivent tous d'une même molécule la sphingosine (figure II-4). Elle peut fixer un phosphate sur son OH primaire et un AG sur sa fonction NH₂. Dès lors, la liaison sur un groupement phosphate donnera un sphingolipide. Il y a deux types de sphingoides chez la levure : la dihydrosphingosine et la

phytosphingosine. Les sphingolipides de la levure contiennent majoritairement la phytosphingosine. Sa similarité de structure avec la PC lui confère des propriétés analogues

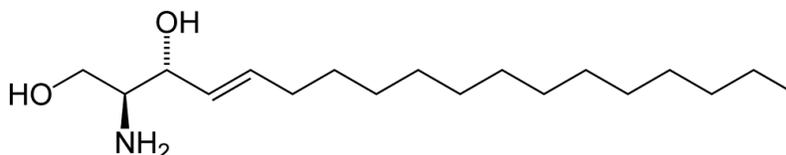


Figure II-4 : La molécule de sphingosine

A.1.4 Les glycérides : MAG, DAG, TAG

Les glycérides comprennent les mono-glycérides (MAG), les diglycérides (DAG) et les triglycérides (TAG) selon le degré de substitution du squelette du glycérol. Ils sont capables de former des membranes en solution dans l'eau, toutefois dans une cellule ils n'ont pas ce rôle, ils constituent plutôt une réserve de lipide pour une utilisation ultérieure. Il s'agit des graisses neutres. On distingue les TAG simples, où tous les carbones du glycérol sont estérifiés par le même acyl ($R_1 = R_2 = R_3$), comme la tristéarine (bougie) ou la trioléine (huile d'olives) ; des TAG mixtes avec au moins un R différent des deux autres comme chez le cacao (Figure II-5). Les molécules utilisées pour la constitution du TAG sont des diglycérides modifiés. Deux groupements hydroxyles sont impliqués dans une liaison avec les acides gras, au troisième se fixe un groupement de nature variée et fortement polaire. L'un des plus connus est l'ion phosphate - la molécule résultante étant un phospholipide - qui sert de point de fixation à diverses molécules telles que la choline.

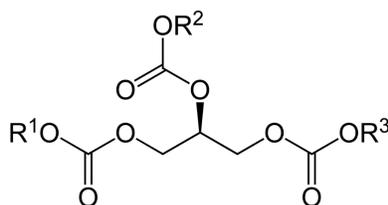


Figure II-5 : Représentation d'un triglycéride

La propriété physique dominante est le caractère complètement apolaire des acylglycérols naturels, essentiellement des triacylglycérols. Les groupes polaires (hydroxyle ou carboxyle) disparaissent dans les liaisons esters. Les TAG sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants les plus apolaires comme l'acétone. Agités dans l'eau, ils forment des émulsions très instables. Les tensioactifs eux dispersent et stabilisent ces émulsions où les TAG se mettent en suspension sous forme de micelles. Les MAG et DAG sont des émulsifiants.

A.1.5 Les stérols et leurs esters

Les stérols sont une famille de lipides dérivés du noyau cholestérol. Le chef de file est le cholestérol chez les animaux, la famille des terpènes chez les végétaux et l'ergostérol chez les champignons et les levures. Ils sont spécifiques des eucaryotes et sont bien représentés chez les animaux. Ils sont présents principalement dans la couche extérieure de la membrane plasmique. Les stérols constituent des tampons de fluidité : de même que certains acides faibles constituent des tampons de pH, ils permettent de conserver une fluidité à peu près constante dans une gamme de température plus large. Chez les animaux, les stérols sont à la base de toute une famille d'hormones, les hormones stéroïdes. Chez les levures, l'ergostérol (Figure II-6) qui représente environ 50% des stérols totaux est généralement trouvé sous forme libre et associé à la membrane plasmique. Les 50% restant sont en général des intermédiaires de biosynthèse qui sont estérifiés et localisés dans des particules lipidiques. L'ergostérol joue aussi un rôle dans la formation des radeaux ou rafts qui sont des micro-domaines de la membrane impliqués dans le trafic membranaire et la signalisation cellulaire (Bagnat *et al.*, 2000). Les stérols en général jouent en plus un rôle dans l'endocytose chez la levure (Munn et Riezman, 1994).

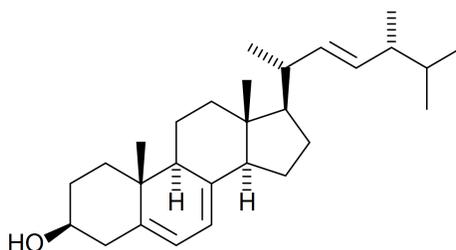


Figure II-6 : La molécule d'ergostérol

A.1.6 Les cérides

Ils doivent leur nom générique au fait qu'ils sont les principaux constituants des cires animales, végétales et bactériennes. Les cérides sont des monoesters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne qui sont en général des alcools primaires, à nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés. La composition des cires est relativement complexe, elles contiennent à côté de différents cérides, des alcools et acides gras libres et souvent des hydrocarbures saturés à longue chaîne. Chez les vertébrés, elles ont une fonction de protection, de lubrification et d'imperméabilisation des cheveux, laines, fourrures, plumes, etc. Chez les végétaux, elles limitent l'évaporation et forment des couches de protection au niveau de la partie vue par le soleil des feuilles. Elles constituent des réserves énergétiques chez le plancton et les microorganismes.

A.2 Les lipides neutres comme éléments de réserve

Les lipides, du fait de leur état relativement réduit, constituent une forme efficace d'accumulation de l'énergie. Ils ont une valeur énergétique élevée d'environ 39 kJ/g (9 kcal/g). Estérifiés sous forme de TAG et d'esters de stérols (ES), ils servent de dépôts énergétiques dans des organelles spécifiques de la cellule, qui sont des inclusions huileuses du cytosol : corps lipidiques de graines de plantes oléagineuses, tissu adipeux des mammifères, corps lipidiques des levures. Certaines plantes peuvent aussi stocker des acides gras hydroxylés comme des cires (i.e. Jojoba- une plante de la famille des euphorbes). Les lipides neutres étant très hydrophobes, leur stockage se fait ainsi sous une forme physique compacte et sans eau. Alors que le glycogène est une source rapide de glucose épuisable en une journée, les acylglycérols sont une réserve à long terme de quelques mois. Citons le rôle de réserve pour les oiseaux migrateurs, pour les animaux hibernants ou polaires. En plus de leur rôle de réserves caloriques / d'énergie, ces organelles sont aussi capables de fournir des acides gras et des stérols pour la biogenèse et le maintien des membranes cellulaires. Ce sont donc plus que des simples inclusions de graisses destinées à couvrir des besoins énergétiques.

B. Accumulation des lipides chez les microorganismes/ levures.

Le métabolisme lipidique est présent chez tous les microorganismes. Du fait de la toxicité des acides gras libres et du potentiel de stockage des triglycérides et des esters de stérols, c'est sous cette forme qu'ils sont principalement stockés chez les eucaryotes. Ces lipides de stockage sont accumulés dans des organelles spécifiques, à l'intérieur de la cellule, appelées corps lipidiques.

B.1 Les corps lipidiques

Selon les conditions environnementales, les organismes eucaryotes sont capables de mobiliser les acides gras libres ou de les stocker sous forme de triacylglycérol (TAG) et d'ester de stérol (ES) dans des corps lipidiques (Ratledge et Tan, 1990). Les corps lipidiques (CL) sont composés d'un noyau hydrophobe formé de lipides neutres qui sont entourés par une couche de phospholipides, dans laquelle sont incorporées des protéines (Figure II-7). A l'origine, les corps lipidiques étaient uniquement considérés comme des dépôts de lipides neutres qui pouvaient être mobilisés durant une phase de carence en nutriments. Cependant, cette image de compartiment de stockage a été révisée depuis que plusieurs protéines présentes dans les corps lipidiques ont été identifiées comme des protéines impliquées dans le métabolisme de lipides. Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, les protéines des corps lipidiques contribuent à l'activation des acides gras (Johnson *et al.*, 1994), à la synthèse des TAG ainsi qu'à leur dégradation (Leber *et al.*, 1998; Sorger et Daum, 2002), sont impliquées dans le métabolisme des stérols (Koffel *et al.*, 2005) et dans la synthèse des acides phosphatidiques (Athenstaedt et Daum, 1997; Athenstaedt *et al.*, 1999). En plus, elles participent au transport des lipides entre le cytosol et le CL (Ferreya *et al.*, 2006) et à une partie de la synthèse des lipides neutres (Athenstaedt *et al.*, 2006; Ferreya *et al.*, 2006). Ceci pourrait être aussi une indication que les CL sont capables d'accueillir des acides gras (Mlickova *et al.*, 2004; Beckman, 2006). D'autre part, la participation des corps lipidiques à la formation des composés lipophiliques tels que les hormones stéroïdiennes ou les prostaglandines, a été démontrée (Freeman et Ascoli, 1982; Gwynne et Strauss, 1982). Toutefois les classes d'acides gras constituant les triglycérides accumulés varient d'un organisme à l'autre.

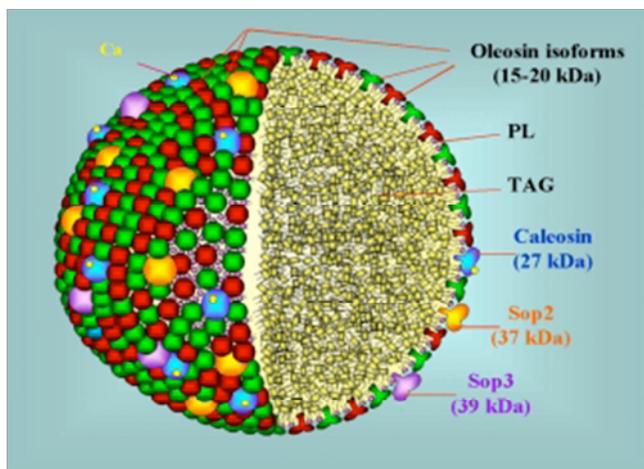


Figure II-7 : Représentation d'un corps lipidique végétal. Les corps lipidiques (CL) sont composés d'un noyau hydrophobe formé de lipides neutres qui sont entourés par une couche de phospholipides, dans laquelle sont incorporées des protéines. Figure adaptée d'après Tzen et collaborateurs (Tzen et Huang, 1992)

B.2 Les microorganismes oléagineux

Les organismes qui stockent plus que 20% de lipides sont considérés comme oléagineux. Ils peuvent appartenir aussi bien à des espèces bactériennes qu'à des eucaryotes : Les levures oléagineuses sont capables de synthétiser et d'accumuler des lipides jusqu'à hauteur de 72% de la masse sèche de la cellule. *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* et *Lipomyces* sont des genres auxquels appartiennent des espèces typiquement oléagineuses (Ratledge et Tan, 1990), qui stockent leurs réserves lipidiques dans les corps lipidiques (CL). Même si il existe des algues, des champignons et quelques bactéries oléagineuses, sur le plan biochimique et physiologique, l'accumulation lipidique est plutôt étudiée chez la levure. Ce sont les avantages que portent les levures au niveau culture, extraction et obtention des huiles qui ont conduit à cette discrimination entre les microorganismes. Parmi plus de 600 espèces de levures, seulement 25 entre elles sont connues pour être oléagineuses. Le tableau (Tableau II-2) qui suit présente les teneurs maximales en lipides et le profil des acides gras accumulés chez les principales levures oléagineuses.

Tableau II-2. Teneur en lipides totaux des levures oléagineuses

Espèces	% lipides		Acides gras majeurs (relatif % w/w)				
	* (g _{lip} ·g _{ps} ⁻¹)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	25	0	10	57	7	0
<i>Cryptococcus albidus</i>	65	12	1	3	73	12	0
<i>Candida sp 107</i>	42	44	5	8	31	9	1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	1	3	47	8	0
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	30	2	12	36	15	4
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	11	6	1	28	51	1

*. (g_{lip}·g_{ps}⁻¹) : (g) lipides / (g) poids sec. Source (Ratledge, 1994)

B.3 Déclenchement de l'accumulation de lipides chez les microorganismes

Chez les organismes oléagineux le déclenchement de l'accumulation de lipides est dû à la carence en un nutriment majeur du milieu de culture. Il s'agit le plus souvent de l'azote, normalement apporté sous forme de NH₄⁺. Pour mesurer le taux d'accumulation des lipides dans une levure, le milieu de culture doit être préparé de façon à être limitant en azote et en excès de carbone. Lorsque l'azote devient indisponible, les cellules ne peuvent plus proliférer, car l'azote est essentiel à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques. Pourtant, le carbone continue à être assimilé par les cellules. Ces dernières, convertissent le substrat incorporé en acide gras et en triglycérols, qui vont immédiatement être stockés dans les corps lipidiques. Outre l'azote, d'autres nutriments peuvent également être limitants pour la croissance. Il peut s'agir, par exemple, du phosphate, du magnésium, du sulfate ou du fer. Néanmoins, ces nutriments sont susceptibles d'affecter des processus métaboliques autres que la biosynthèse de protéines et la production des acides nucléiques. Cela conduit à un taux de croissance moins important.

Les organismes non – oléagineux n’accumulent pas autant de lipides. Lors d’une limitation en azote, certains de ces organismes cessent de croître et peuvent accumuler les hydrocarbures disponibles dans le milieu de culture et les convertir en divers polysaccharides (glycogène, glucanes, mannanes). Dans ce dernier cas l’accumulation de lipides peut atteindre 15% de la biomasse (Ratledge, 1994).

B.4. L’intérêt des lipides de levures et de *Y. lipolytica*

Les levures sont des mycètes unicellulaires possédant un seul noyau vrai et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement transversal soit de façon sexuée par formation de spores. Les levures sont entourées d’une paroi rigide étroitement liée à la membrane plasmique sous-jacente, leur longueur ne dépassant pas une dizaine de micromètres.

Le grand avantage des levures par rapport aux autres microorganismes pour l’obtention d’huiles est la facilité de les cultiver, la température de culture, un temps de doublement rapide, l’espace requis pour la culture et des méthodes d’extraction de lipides existantes. Chez les levures, la teneur en lipides totaux et la composition des lipides accumulés sont très variables. Par exemple, dans le Tableau II-2 on observe que même si *C. curvatus* et *C. albidus* accumulent un niveau de lipides équivalent, (58% et 65%, respectivement) leur profil en acide gras est significativement différent. Quand *C. curvatus* accumule de grandes quantités d’acide palmitique, *C. albidus* a comme composant majeur l’acide oléique. D’une autre côté, la teneur lipidique entre les espèces de *Rhodotorula* est très variable (*R. glutinis* et *R. Graminis* accumulent des lipides jusqu’à 72 % et 36 % de leur biomasse, respectivement), mais la composition en acides gras reste relativement similaire. Chez *Y. lipolytica* l’accumulation de lipides est plus faible que pour les autres microorganismes oléagineux, mais c’est la seule levure connue capable d’accumuler de l’acide linoléique en grands proportions (plus de 50% des acides gras). Cette particularité de *Y. lipolytica* a attiré notre attention, car les acides gras longs et insaturés, présentent un grand intérêt alimentaire et biotechnologique. Ils constituent des lipides essentiels de l’alimentation, comme les oméga-3 et les acides gras polyinsaturés (PUFA), ainsi que de bons candidats pour une utilisation comme biocarburants ou comme précurseurs de la synthèse des plusieurs produits de la pétrochimie (plastiques, peintures, adhésifs, etc). De plus, *Y. lipolytica* possède le potentiel remarquable de croître et d’accumuler des lipides sur des milieux hydrophobes. Sa présence dans une vaste variété d’environnements pollués par le pétrole

témoigne de sa capacité à dégrader des composés organiques. Elle est déjà considérée comme un modèle pour la production de protéines, des enzymes et de bioconversion de dérivés de lipides à partir de substrats hydrophobes. *Y. lipolytica* est également présente dans des environnements marins, hyper-salins, ce qui en fait un modèle pour des études du stress osmotique. Ces dernières années son génome a été séquencé et de nombreux outils génétiques ont été développés pour l'analyse fonctionnelle et l'ingénierie génétique de cette levure.

B.4.1 Les souches de *Y. lipolytica*

De nombreuses souches ont été développées au laboratoire. La souche la plus utilisée est la souche Po1d. Elle dérive de la souche sauvage W29 (ATCC 20460, *MatA*) isolée d'eaux usées et possède des propriétés favorables pour la production de protéines recombinantes : (i) croissance à haute densité, (ii) taux élevé de sécrétion, (iii) absence de la protéase alcaline AEP et (iv) production de l'invertase de *S. cerevisiae* qui permet l'utilisation du saccharose comme source de carbone (Nicaud *et al.*, 1989). Cette dernière propriété est particulièrement intéressante dans le cas de production industrielle, car cette souche peut croître efficacement sur des substrats bon marché telles que les mélasses. La description des différentes souches de *Y. lipolytica* est présentée dans la publication I.

B.4.2 Physiologie, taxonomie et intérêt de la levure *Y. lipolytica*

Dans cette étude nous avons utilisé *Y. lipolytica* comme modèle pour l'accumulation et la dégradation des lipides en ayant toujours deux objectifs : D'un point de vue cognitif, on essaye de comprendre le métabolisme d'une levure oléagineuse, et d'identifier et localiser les enzymes et les mécanismes impliqués dans la dégradation des substrats hydrophobes et dans l'accumulation des lipides. D'un point de vue plus appliqué on utilise les connaissances acquises sur ce métabolisme afin d'augmenter la teneur en lipides de cette levure et de produire des lipides de composition prédéfinie d'une valeur ajoutée et d'un intérêt biotechnologique. Cette dernière démarche peut se faire soit par sélection du milieu et des conditions de culture, soit par modification génétique, ou en combinant les deux approches.

La revue suivante (publication I) présente de plus des informations sur l'habitat et la phylogénie de *Y. lipolytica*, ainsi que sur les conditions de culture et les outils génétiques existants.

B.5. PUBLICATION I**The Hydrocarbon- Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica***

A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, S. Zinjarde, C. Neuveglise, J-M. Nicaud

Titre en français: La levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* et sa capacité de dégradation des substrats hydrocarbonés

Résumé : La levure *Y. lipolytica* est une des plus importantes levures non-conventionnelles. Cette revue fait le point sur les progrès dans sa taxonomie, sa physiologie, ses besoins nutritionnels et sa distribution environnementale. De plus, l'étude fournit un sommaire extensif des aspects génomiques de *Y. lipolytica*. A cause de ses potentialités remarquables d'accumulation et de modification des lipides et de ses capacités de croissance sur divers substrats hydrophobes, *Y. lipolytica* est considérée comme un modèle de bioconversion pour la production des protéines, des enzymes et de dérivés des lipides. Sa présence dans des environnements pollués de pétrole et notamment dans les fractions lourdes, témoigne de son potentiel de dégradation des substrats organiques. Cette levure a été déjà testée pour sa capacité de dégradation des substrats organiques comme le naphthalène, le dibenzofurane et le trinitrotoluène avec succès. De plus, car *Y. lipolytica* est présente dans une grande variété d'environnements salins et hyper-salins, son utilisation comme modèle d'études du stress osmotique est envisageable. Le développement de nouveaux outils génétiques et le séquençage de son génome permettront une exploration complète d'utilisation de cette levure en biocatalyse, en bioconversion et en bioremédiation.

Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology Galleys

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009

210 The Hydrocarbon-Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*

A. Beopoulos¹ · T. Desfougeres¹ · J. Sabirova² · S. Zinjarde³ ·
C. Neugebuse¹ · J.-M. Nicaud^{1,*}

¹Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, Thiverval-Grignon, France

*jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr

²Laboratory of Industrial Microbiology and Biocatalysis, Department of Biochemical and Microbial Technology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

³Institute of Bioinformatics and Biotechnology, University of Pune, Pune, India

1	<i>Introduction</i>	2
2	<i>Fungi and Yeasts Degrading HS</i>	2
3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	4
3.1	Taxonomic History and Species Properties	4
3.2	Physiology and Habitat	4
3.3	Diversity and Applications of Different Strains of <i>Y. lipolytica</i>	5
3.4	Media and Culture Conditions	5
3.5	Genetics, Genomics and Post-Genomics	6
4	<i>Research Needs</i>	7

Abstract: *Yarrowia lipolytica* is one of the most important non-conventional oleaginous yeasts. This review summarizes the recent advances in the taxonomy, physiology, growth requirements and environmental distribution of this particular yeast. It provides as well an extensive summary of its genomic features. Due to the remarkable potential to accumulate and modify lipids and the ability to grow on various hydrophobic substrates, *Y. lipolytica* has been now seriously considered as a bioconversion model for production of single-cell proteins, enzymes and lipid-derived compounds. Its presence in a variety of environments polluted with petroleum and in particular with its heavy fractions, witnesses its pivotal role in degradation of recalcitrant organic compounds. Some of them (naphthalene, dibenzofuran, and trinitrotoluene) have been already successfully tested and the process has proved to be functional. *Y. lipolytica* is also found in a variety of marine and hypersaline environments, thus the use of this yeast as a model system for salt-stress studies could be envisaged. Newly developed genetic tools and available genome sequence data will allow more complete exploration of this yeast in the areas of biocatalysis, bioconversion, and bioremediation.

1 Introduction

The ability of diverse microbial populations to grow on hydrocarbons as sole source of carbon has been known since the nineteenth century, mostly including bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Atlas, 1992). Microorganisms that oxidize various hydrocarbons are widely distributed in soil, water, and on aerial surfaces. There are numerous examples of microbial utilization of petroleum during oil spillages (King et al., 1992) which could significantly reduce the disastrous ecological effects of water pollution by oil (i.e., Exxon Valdez spill in Alaska, 1989). Furthermore, hydrocarbon-degrading microorganisms have been used as emulsifying agents, i.e., for the conversion of jet-fuels to stable emulsions in order to reduce flammability during transportation and storage (Harris and Steinmetz, 1967). Another potential application of hydrophobic substrate (HS) degrading microorganisms is the possibility to serve as a source of nutrients for human or animal alimentation. This process implies the use of petrol as a source of food, but today's petrol prices make such an application rather unrealistic. At the moment, with the eventual progress of biotechnology, the commercial target of HS-utilizing microorganisms is the bioconversion of cheap substrates (such as short-chain alkanes) to added-value materials: secondary metabolites, aromas, specific catalysts, proteins, etc. They are also used to produce fats and oils, known as single cell oils, SCO (Ratledge, 2005). Chemical methods for converting raw glycerol (petrol derivative) to bioplastics, organic soil treatments, and lab reagents have been established, but the most environmentally-friendly approach would be to regenerate biofuels through fermentation reactions. Using alternative substrates and energy sources, white biotechnology is already bringing many innovations to the chemical, textile, food, packaging and health care industries.

2 Fungi and Yeasts Degrading HS

Hydrocarbon-degrading microorganisms have developed different adaptations for utilizing poorly soluble substrates. Most of them produce biosurfactants which are amphiphilic molecules of diverse chemical nature and molecular size with diverse biological properties (Desai and Banat, 1997; Rosenberg and Ron, 1999). Their physical ability is to disperse the hydrocarbons

C. METABOLISME DES LIPIDES

L'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica* peut se produire par deux voies distinctes : La première est la biosynthèse *de novo* des acides gras qui correspond à la production dans des conditions définies des précurseurs des acides gras comme l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA et leur intégration dans la voie de biosynthèse de lipides (voie de Kennedy). La deuxième, appelé la voie d'accumulation *ex novo* correspond à l'incorporation des acides gras, des huiles et des triglycérides du milieu de culture et leur accumulation dans un état inchangé ou modifié à l'intérieur de la cellule. Cette voie demande l'hydrolyse des substrats hydrophobes, le transport et l'incorporation des acides gras libérés à l'intérieur de la cellule et le réassemblage de ces acides gras en TAG et ES pour leur stockage dans les corps lipidiques. Néanmoins, les voies d'accumulation *de novo* et *ex novo* sont plutôt antagonistes que complémentaires, car les enzymes de biosynthèse de lipides sont régulées par la composition des lipides extracellulaires. Si le milieu apporte aux organismes la source de lipide nécessaire, la synthèse et les modifications, tels que l'élongation et la désaturation, sont réprimées. Les levures sont capables d'accumuler directement des acides gras du milieu et de les stocker en forme de TAG ou d'ES dans les corps lipidiques. Cependant, la composition lipidique d'un microorganisme peut varier considérablement par rapport au milieu de culture.

C.1 Biosynthèse des acides gras : accumulation *de novo*

Les voies principales de la synthèse *de novo* des lipides chez *S. cerevisiae* (levure non oléagineuse) ou *Y. lipolytica* (levure oléagineuse) sont bien conservées. Donc, au cours de cette étude on fera souvent une comparaison fonctionnelle entre ces deux microorganismes. Toutefois, certaines voies métaboliques ne sont pas identiques et on décrira en détails ces voies qui confèrent le caractère oléagineux.

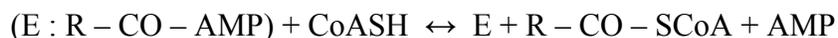
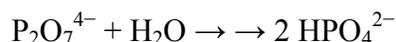
Les levures sont capables de synthétiser *de novo* tous les acides gras dont elles ont besoin à partir d'une source de carbone (Ratledge, 1994; Daum *et al.*, 1998). La biosynthèse des acides gras se fait à partir de précurseurs constitués d'unités acétate (2C). C'est pourquoi la plupart des acides gras du vivant possèdent un nombre de carbone pair. Dans la plupart des systèmes biologiques la longueur des acides gras synthétisés se situe entre 16 et 18 carbones. Par

la suite, plusieurs modifications des acides gras peuvent prendre place, les plus importantes étant les réactions d'élongation et de désaturation.

La quantité d'énergie nécessaire à la synthèse *de novo* est très supérieure à celle nécessaire à l'accumulation directe des lipides du milieu de culture. Les microorganismes capables d'accumuler directement les lipides du milieu ne dépensent pas autant d'énergie pour des modifications, et sont alors capables d'accumuler des lipides plus rapidement et en plus grande quantité (Ratledge et Wynn, 2002; Beopoulos *et al.*, 2008b). La biosynthèse des lipides est catalysée par un complexe enzymatique, l'acyl-CoA synthase I localisée dans le cytoplasme, les mitochondries et les peroxysomes. Cette enzyme catalyse aussi l'incorporation des acides gras exogènes dans la cellule. Cependant, la présence des acides gras exogènes peut réprimer la biosynthèse des acides gras. Les enzymes inhibées seraient l'acide gras synthase et l'ATP citrate lyase (Ratledge et Wynn, 2002).

C.1.1 Activation des acides gras et de leurs précurseurs

Pour que les acides gras ou leurs précurseurs participent à une réaction métabolique, leur activation est nécessaire. Le thioester (forme activée d'un acide gras), résulte d'une réaction d'estérification avec un nucléotide complexe, le coenzyme A (CoA). L'acide gras activé devient alors soluble dans l'eau. La formation des acyl-CoAs est catalysée par plusieurs Acyl-CoA synthases. Celles-ci appartiennent à une famille de protéines trouvée chez la plupart des organismes, la famille des protéines d'accrochage d'adénosine monophosphate-AMP (il y a formation d'AMP au cours de la réaction). La réaction de formation des acyl-CoAs comporte deux étapes :



Les deux réactions sont réversibles, mais la cinétique favorise la production d'acyl-CoA, car le pyrophosphate est rapidement hydrolysé. Les acyl-CoA synthases se différencient par leur affinité vis-à-vis de la longueur de chaîne de l'acide gras. L'analyse de l'ADNc de *Mycobacterium tuberculosis* a révélé 36 gènes différents codants pour des acyl-CoA synthases.

On différencie généralement les acyl-CoA synthases par leur spécificité pour des chaînes courtes (2 - 7C), moyennes (4 - 12C) et longues. Les acyl-CoA synthases peuvent aussi être spécifiques d'un acide gras particulier. Les acyl-CoA synthases à chaînes courtes et moyennes sont solubles et plutôt localisées dans la mitochondrie et le cytosol. Les acyl-CoA synthases à longue chaîne sont des enzymes d'accrochage aux membranes et peuvent être solubilisées uniquement en présence de détergents. L'activité acyl-CoA synthase est détectée dans le réticulum endoplasmique (RE), à l'extérieur de la membrane mitochondriale et aussi un peu dans les peroxysomes. Etant donné que l'activation des acides gras à longue chaîne est indispensable pour la synthèse (acylation) et pour la dégradation (β -oxydation), on peut considérer que les acyl-CoA synthases de la mitochondrie (β -oxydation) et celles du RE (synthèse des acides gras) permettent la formation de pools d'acyl-CoA distincts. Cette parcellisation joue un rôle de régulation dans le métabolisme des lipides (Figure II-8).

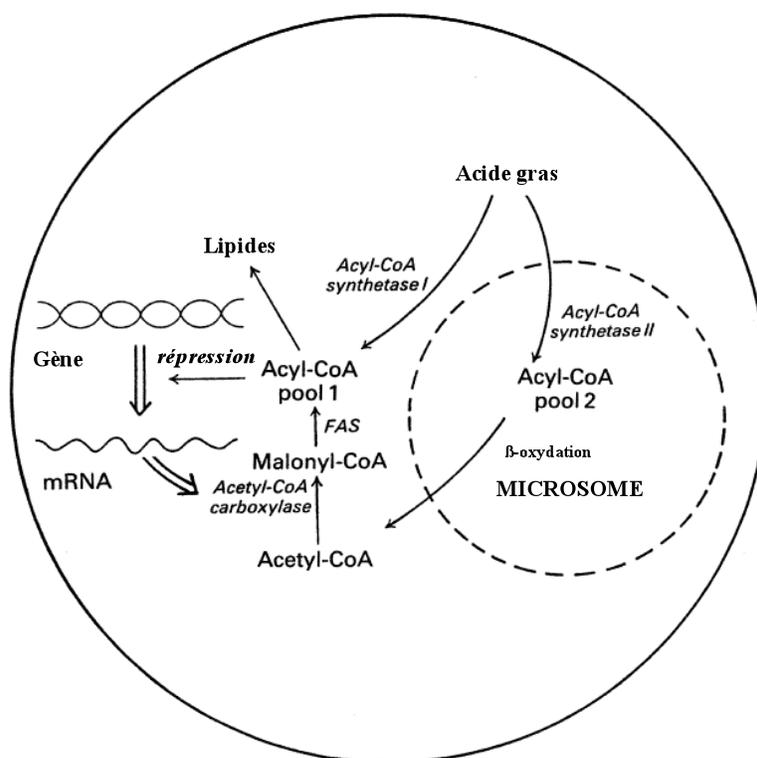


Figure II-8 : Les réactions de synthèse et de dégradation forment des pools d'acyl-CoA différents.

C.1.2 Régulation de la biosynthèse des acides gras par les acyl-CoA synthases

Les acyl-CoA synthases coopèrent avec les transporteurs des acides gras et forment ainsi des systèmes de régulation du métabolisme. Ainsi, chez *Escherichia coli*, l'importation des acides gras dépend de deux protéines : le transporteur associé à la membrane externe, FadL, et la synthase cytosolique des acyl-CoA, FadD. Dans ce modèle, importation et activation pourraient être intimement liées. De plus, elles sont directement soumises à un contrôle au niveau transcriptionnel: En l'absence d'acides gras exogènes, le facteur de transcription de l'acyl-CoA, FadR, est activé et se lie à l'ADN. Les gènes de dégradation des acides gras (*fad* : fatty acid degrading) sont réprimés, et par contre, les gènes de biosynthèse des acides gras (*fab*, fatty acid biosynthesis) sont fortement exprimés. La conformation de FadR est modifiée par la formation des acyl-CoAs qui permettent le décrochage de la protéine de l'ADN. Il en résulte la répression des gènes *fab* et l'induction des gènes *fad* (Figure II-9).

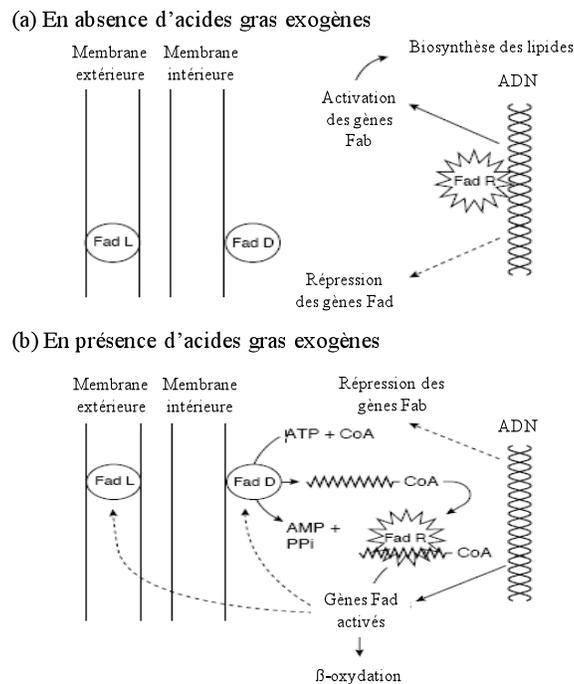


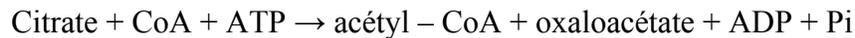
Figure II-9 : La régulation de la synthèse des lipides par les acides gras extracellulaires chez les microorganismes. La biosynthèse lipidique est contrôlée par la présence des acides gras exogènes. Schéma adaptée de (DiRusso *et al.*, 1999).

C.2 Provenance du carbone utilisé pour la biosynthèse des acides gras

La transition de la phase de production de biomasse vers la phase de synthèse de lipides est finement induite par la limitation d'azote. A partir de ce moment il faut que les précurseurs requis pour la synthèse de lipides soient produits à un niveau élevé. Les plus importants sont l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA et le NADPH comme cofacteur.

C.2.1 Production d'acétyl-CoA à partir du citrate par l'ACC

La majeure partie du carbone utilisé pour la synthèse *de novo* des lipides vient du pool du pyruvate ($\text{CH}_3\text{COCOO}^-$), produit final de la glycolyse cytosolique. Dans les conditions où la biosynthèse est favorisée, le pyruvate est transporté par le cytosol dans la mitochondrie. Après déshydrogénation par la pyruvate déshydrogénase, l'acétyl-CoA ($\text{CH}_3\text{CO-CoA}$) formé est condensé avec l'oxaloacétate ($\text{HO}_2\text{CC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2^-$) afin de produire du citrate ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^{3-}$). Ces réactions se produisent au cours du cycle des acides tricarboxyliques (TCA, cycle de Krebs, Figure II-10) dans la mitochondrie. Le citrate est alors transporté par le *tricarboxylate anion carrier* de nouveau vers le cytosol où l'acétyl-CoA est libéré par l'ATP citrate lyase (ACL).



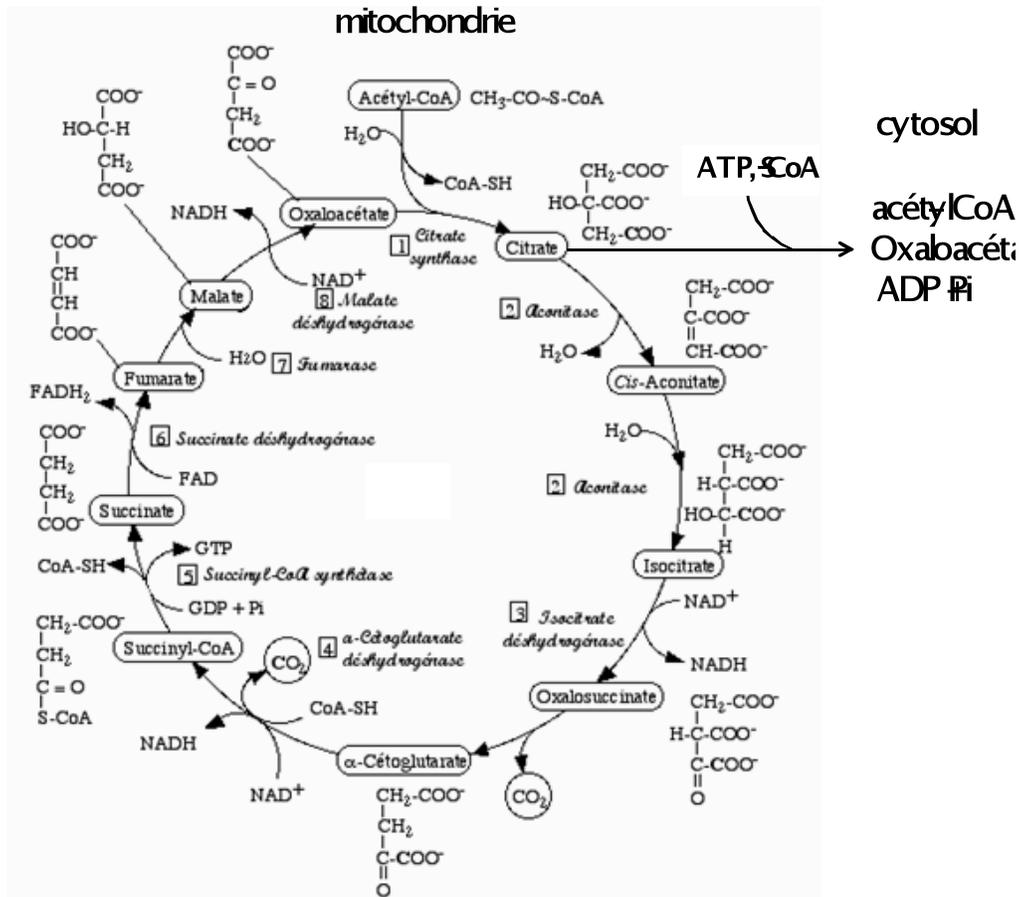


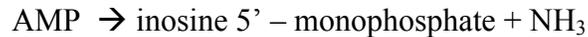
Figure II-10: Le cycle mitochondrial TCA (cycle de Krebs).

C.2.2 L'ATP citrate lyase et le déclenchement de l'accumulation

L'ATP citrate lyase est une enzyme fortement exprimée chez les organismes oléagineux (Ratledge et Wynn, 2002). Elle est également absente de la plupart des levures non-oléagineuses, comme *S. cerevisiae*. Chez les mammifères et notamment chez l'homme, l'ACL est codée par un seul gène, contrairement à *Y. lipolytica* où l'ACL comporte deux sous-unités, Aclap et Aclpb encodés par *ACL1* (YALI0E34793g) et *ACL2* (YALI0D24431g). Le cofacteur, NADPH, nécessaire pour les étapes de réduction prises en charge par la synthase des acides gras (FAS, Fatty Acid Synthase), est produit par la voie du pentose phosphate (cytosolique).

Néanmoins, les organismes oléagineux présentent une autre particularité concernant la régulation de la production du citrate. L'activité de l'isocitrate déshydrogénase, enzyme du cycle

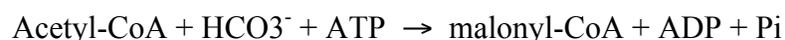
de Krebs responsable de l'isomérisation du citrate en α -cétoglutarate, dépend de la présence d'AMP (adénosine monophosphate). La concentration de l'AMP est entre autres régulée par l'activité AMP désaminase :



L'activité de cette dernière enzyme en partie responsable du déclenchement de l'accumulation de lipides est régulée par la concentration en azote extracellulaire. Au moment de la limitation en azote, on observe une augmentation de l'activité AMP désaminase d'un facteur 5, en vue de production d'ions d'ammonium (Ratledge et Wynn, 2002), ce qui entraîne une diminution du taux d'AMP intracellulaire. L'AMP mitochondrial étant le cofacteur de l'isocitrate déshydrogénase, l'isocitrate ne peut alors plus être métabolisé en α -cétoglutarate. L'isocitrate est alors isomérisé en citrate via l'aconitase. Cet excès de citrate dans la mitochondrie est pris en charge par un mécanisme transmembranaire qui couple l'export du citrate avec l'entrée du malate. Le citrate exporté dans le cytoplasme est clivé par l'ACL pour donner de l'acétyl-CoA, précurseur de synthèse des lipides. L'oxaloacétate également produit par cette réaction est lui-même converti par la malate déshydrogénase en malate, qui équilibre le système de transport membranaire.

C.2.3 Le malonyl-CoA

L'apport du malonyl-CoA est dépendant de l'acétyl-CoA et de l'ATP. Il est le produit de la première réaction de la synthèse de lipides, catalysé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC).



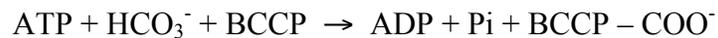
L'ACC1 est capable de catalyser plusieurs réactions, et avec l'acide gras synthase (FAS) se sont deux des enzymes les plus importantes à la synthèse *de novo* des acides gras.

C.2.4 L'acétyl-CoA carboxylase (ACC)

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC1) est une enzyme contenant de la biotine (vitamine B8, coenzyme qui participe à la synthèse des acides gras), localisé dans le cytoplasme. La séquence d'acides aminés déduite de cette protéine chez *S. cerevisiae* présente une identité avec l'enzyme du rat de l'ordre de 34 %. Elle contient des domaines typiques de fixation à la biotine mais de

plus possède une activité carboxyl- transférase. Un mutant haploïde invalidé du gène *ACC1* chez *S. cerevisiae* est incapable de se développer même en présence d'acides gras exogènes, ce qui signifie que le gène est nécessaire à d'autres fonctions que la biosynthèse d'acides gras. Chez les levures, l'Acc1p est une protéine de 190-230 kDa, activée par des acides carboxyliques comme le citrate ceci par l'agrégation des monomères en un complexe multifonctionnel (Goodridge *et al.*, 1991; Al-Feel *et al.*, 1992; Hasslacher *et al.*, 1993). Les acyl-CoA tels que le palmitoyl-CoA favorisent la conformation inactive de l'acétyl-CoA carboxylase. Le citrate active de façon allostérique cette enzyme (Gill et Ratledge, 1972). La réaction de l'Acc1p pour la formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA est catalysée par le magnésium et peut se diviser en deux réactions partielles :

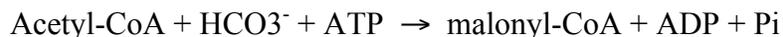
Dans un premier temps le groupe carboxylique est attaché à l'azote de la biotine, par le site catalytique de la biotine carboxylase, facilitant le transport vers l'acétyl-CoA. (BCCP, biotine ACC1)



Dans un deuxième temps l'activité carboxyl- transférase catalyse la réaction :



Afin d'arriver à la réaction complète:



Le malonyl-CoA généré par l'ACC est le précurseur de la plupart des carbones de la chaîne des acides gras. En effet, les deux premiers carbones dérivent directement de l'acétyl-CoA et tous les autres du malonyl-CoA. Toutes les réactions de synthèse à partir de ce moment sont catalysées par l'acide gras synthase (FAS).

C.2.5 L'acide gras synthase (FAS)

L'acide gras synthase '*Fatty Acid Synthase*' permet la condensation d'unités de malonyl-CoA sur un résidu acyl pré-existant, dans le cas de synthèse des acides gras, l'acétyl-CoA. Dans les cellules animales ainsi que chez les levures et les champignons deux types d'acide gras synthase coexistent, une FAS de type I et une de type II. La FAS de type I est cytosolique et issue de l'expression coordonnée de deux gènes *FAS1* et *FAS2* (Kottig *et al.*, 1991). Les synthases de type I sont des protéines multifonctionnelles composées de plusieurs sous-unités qui forment un complexe, chaque protéine individuelle catalysant une partie d'une réaction. Chez les levures, les deux sous-unités de la FAS du type I, nommées α et β , sont organisées sous forme d'hexamères ($\alpha_6\beta_6$). La sous-unité α , codée par le gène *FAS2*, est trifonctionnelle. Elle possède des fonctions β -cétuoacyl synthase, β -cétuoacyl réductase et de transporteur du groupement acyl (ACP : *Acyl Carrier Protein*) (Mohamed *et al.*, 1988). La sous-unité β est codée par le gène *FAS1*. Elle possède les activités d'acétyl-, de malonyl-, et de palmitoyl-transférase, ainsi que des activités déshydratases et énoyl réductases (Schweizer *et al.*, 1986; Chirala *et al.*, 1987). La sous-unité β catalyse alors le transfert du malonate depuis le coenzyme A vers le domaine ACP de la sous-unité α . Cette dernière réalise ensuite les étapes de condensation du malonyl-ACP et de l'acyl-ACP, de décarboxylation ainsi que de réduction de la molécule de β keto-acyl-ACP. La sous-unité β permet les étapes de déshydratation ainsi que la seconde étape de réduction (Schweizer *et al.*, 1986).

Les synthases du type II, par contre, sont mitochondriales et contiennent des enzymes qui peuvent être facilement séparées, purifiées et analysées individuellement. La FAS de type II porte des activités enzymatiques sur des polypeptides distincts. La protéine Acp1 porte le groupe prosthétique phosphopantéthéine. La protéine Cam1p porte l'activité β -cétuo-ACP-synthase et la protéine Oar1 porte l'activité 3-oxoacyl-ACP-réductase. L'Activité 3-hydroxyacyl-thioester-déshydratase est portée par la protéine Htd2 et l'activité énoyl-ACP-réductase par la protéine ETr1. La protéine PpT2p fonctionne comme une transférase phosphopantéthéine, elle catalyse l'attachement du groupe prosthétique phosphopantéthéine sur ACP. Le fonctionnement de la FAS est présenté dans la Figure II-11.

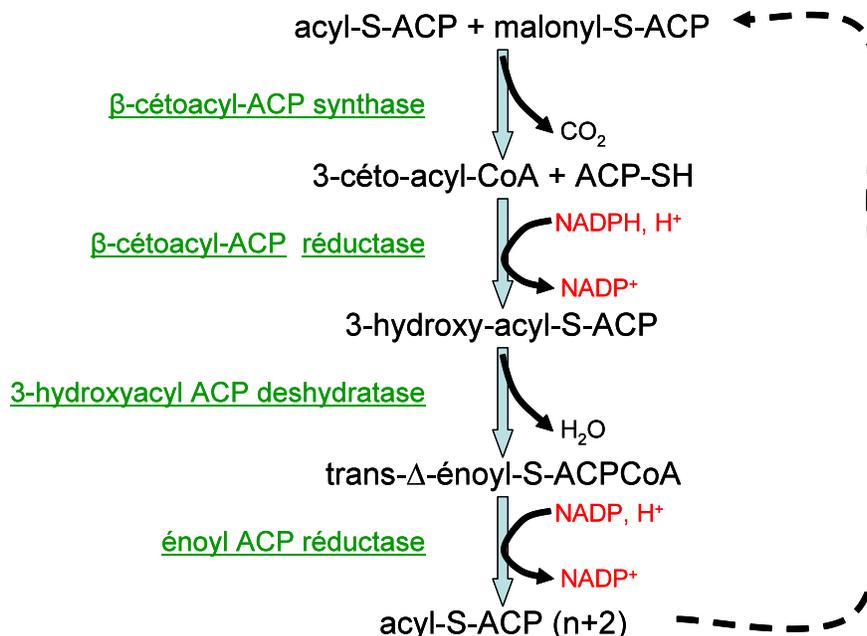
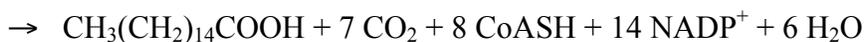


Figure II-11 : Synthèse d'un acide gras catalysée par l'acide gras synthase (FAS). Un acyl-CoA est condensé à un malonyl-CoA pour former un 3-cétoacyl-CoA qui est réduit en 3-hydroxy-acyl-CoA. Ce dernier est déshydraté en trans- Δ^2 -énoyl-CoA puis réduit en Acyl-CoA dont la chaîne comporte deux carbones de plus. A chaque cycle, un CO_2 et une H_2O sont produits et deux molécules de NADPH sont oxydées. Le cycle est répété jusqu'à ce que l'acyl-CoA atteigne une longueur de chaîne de 16 ou 18 carbones.

Voici en exemple la réaction totale de la synthèse du palmitate (C16 :0) :



Les acides gras sont toujours synthétisés sous forme d'acyl-CoA. L'acétate et le malonate sont transférés du CoA-SH sur l'ACP. La synthase ajoute deux carbones à l'acide gras en produisant du CO_2 et un acide gras allongé de deux carbones. Le groupe β -cétonique produit par cette condensation est ensuite éliminé par deux réductions et une déshydratation. Chaque cycle ajoute deux carbones à la chaîne aliphatique. L'élongation s'arrête en général après 7 à 8 cycles. Le résidu acyl à 16 ou 18 carbones est libéré du complexe FAS par l'hydrolyse via l'action d'une thiestérase ou par transfert d'un groupement acyl selon la réaction ci-dessous:



L'arrêt de l'élongation peut dépendre du rapport des concentrations intracellulaires en acétyl CoA et malonyl CoA, qui est lui-même fonction des activités acétyl CoA synthase et acétyl CoA carboxylase (Tehlivets *et al.*, 2007). Si le malonyl CoA est en grande quantité, les chaînes d'acides gras seront plus longues. Au contraire, lorsque le rapport acétyl CoA/malonyl CoA est supérieur à 0,1 et que l'activité acétyl CoA transacylase est élevée, la majorité des acides gras synthétisés à une longueur de chaîne inférieure à 14 carbones. Il est aussi possible que l'arrêt précoce de l'élongation des chaînes soit dû à l'action d'une seconde thioestérase qui hydrolyse sélectivement les chaînes d'acide gras de longueur moyenne (Wakil *et al.*, 1983)

La synthèse d'une mole de C16:0 nécessite 14 moles de NADPH/H⁺: 2 moles pour chaque réduction d'une mole de 3-céto-acyl-ACP obtenue après condensation de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA.

C.2.6 L'apport du NADPH est régulé par l'enzyme malique

L'activité FAS est finement régulée par l'apport du malonyl-CoA, par l'activité de l'ACC1, et par la disponibilité de NADPH/H⁺ produit en majorité par l'enzyme malique (EM) au cytosol :



L'activité de l'enzyme malique a été détectée chez la plupart des organismes oléagineux. Cette enzyme semble former un complexe avec l'ACL (ATP citrate lyase) et la FAS, assurant la canalisation directe du cofacteur vers la biosynthèse des acides gras. Il semblerait qu'il existe d'autres enzymes capables de synthétiser le NADPH, mais les membranes mitochondriales sont imperméables au NADPH/H⁺. Cependant, seule l'enzyme malique, étant transmembranaire, peut accéder à la fois à la FAS cytoplasmique et à une source de NADPH/H⁺ mitochondriale (Ratledge, 2002). L'apport des précurseurs nécessaires de la synthèse *de novo* est illustré dans la Figure II-12.

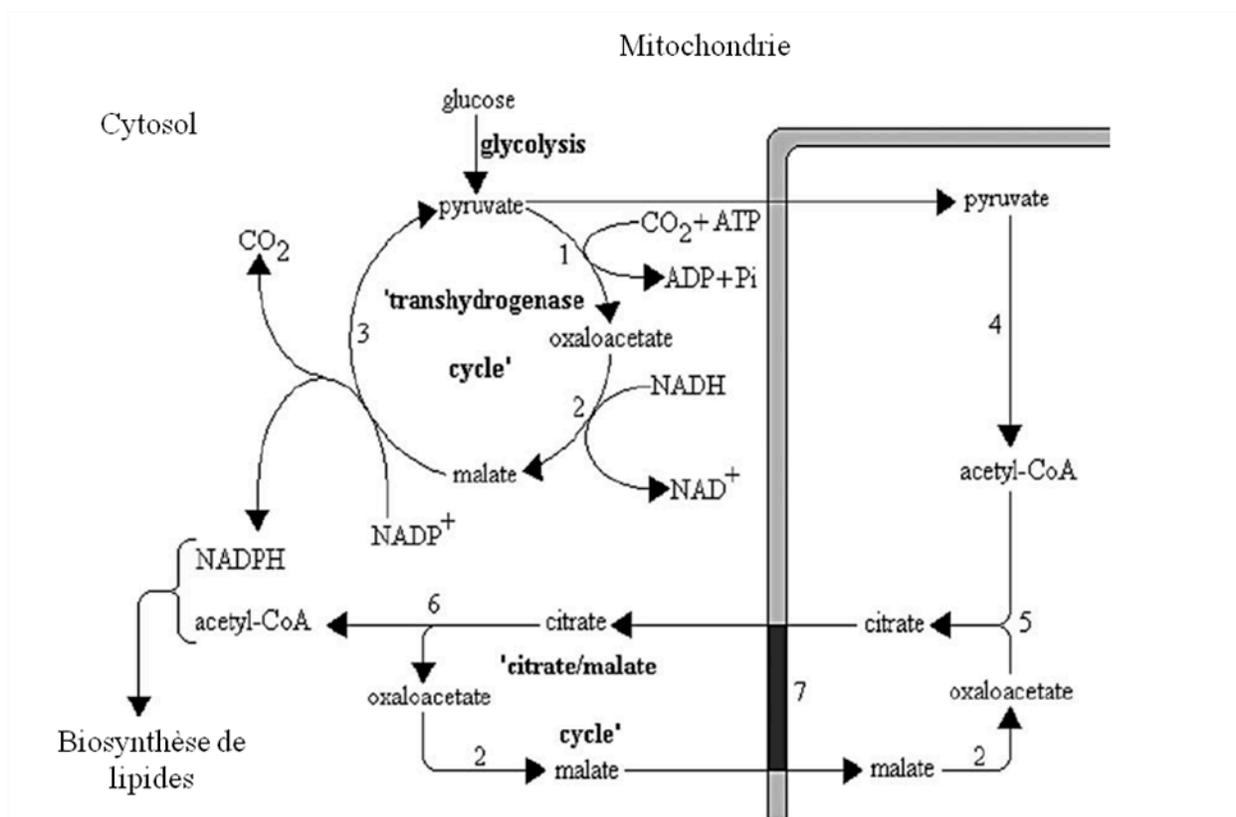


Figure II-12: Schéma qui montre l'apport de précurseurs de la synthèse *de novo* des acides gras par les cycles du citrate/malate et des transhydrogénases (cytosolique). Enzymes: 1, pyruvate décarboxylase; 2, malate déshydrogénase; 3, enzyme malique; 4, pyruvate déshydrogénase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. Balance du carbone (*net*): pyruvate + acétyl-CoA + CO₂. Réaction de la production du NADPH (cycle de transhydrogénases): NADH + NADP⁺ + ATP + NAD⁺ + NADPH + ADP + Pi. Le cycle des transhydrogénases opère indépendamment du cycle citrate/malate et assure l'apport du NADPH pour la synthèse des acides gras et leur désaturation. (Ratledge et Wynn, 2002).

L'expression de l'ACL permettrait aux levures d'accumuler des lipides dont le taux serait sous le contrôle d'une régulation par l'enzyme malique. Le niveau d'expression de cette dernière enzyme modifiera la capacité d'accumulation de lipides par les cellules. L'activité de l'enzyme malique est très liée à l'accumulation des lipides, et à la disponibilité en azote dans le milieu. Ce gène n'est plus exprimé si la synthèse de protéines est inhibée par l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse protéique (e.g. cycloheximide). On a alors une répression transcriptionnelle du gène corrélée à l'arrêt de l'accumulation de lipides (Ratledge, 2002). La concentration en enzyme

malique détermine les phases d'accumulation de lipides et par voie de conséquence influence le taux d'accumulation final dans la cellule.

La complémentation des enzymes et des voies métaboliques entre les différents compartiments cellulaires est présentée (Figure II-13).

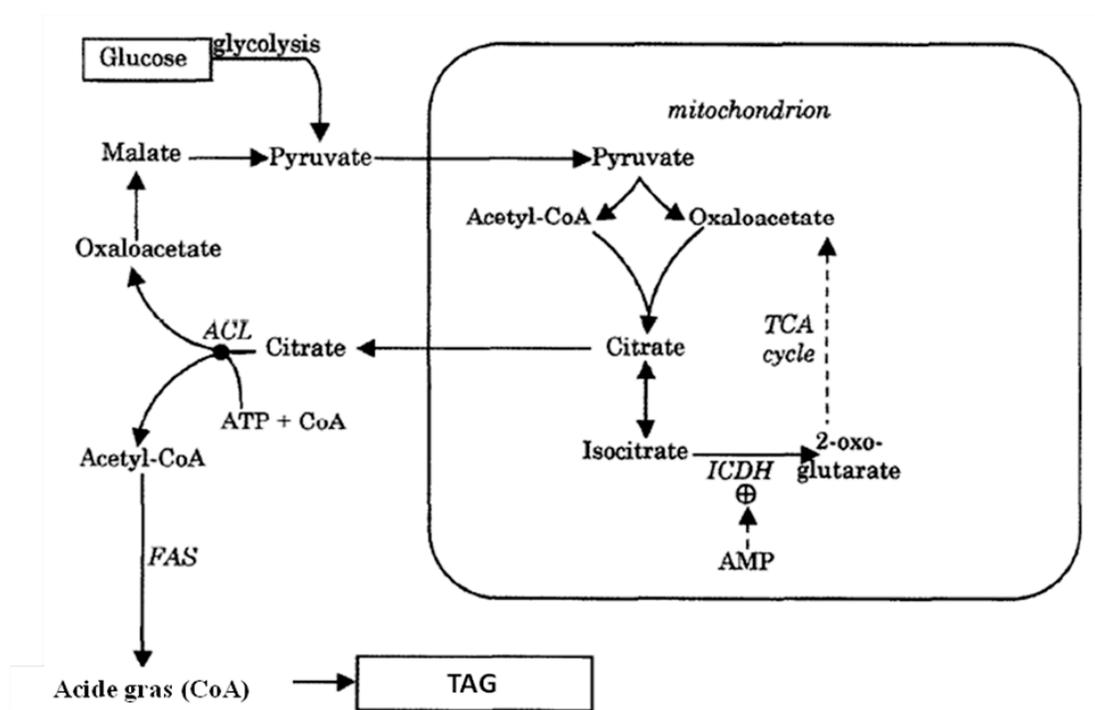


Figure II-13 : Spécificités métaboliques conduisant à l'accumulation des lipides chez les microorganismes oléagineux. (ICDH: AMP dépendante isocitrate déshydrogénase, TCA: cycle des acides tricarboxyliques, ACL: ATP citrate lyase, FAS: Fatty acid synthase). Figure adaptée de (Ratledge, 2002).

C.2.7 Régulation de l'ACC et de la FAS

Les expressions des gènes *FAS2*, *FAS1* et *ACC1* sont régulées de manière coordonnée. Les mutants haploïdes présentant des mutations dans le complexe de la synthèse d'acides gras ne sont pas viables sauf si le milieu est complété par les acides myristique (MC14:0), palmitique (MC16:0), stéarique (MC18:0), ou oléique (MC18:1) exogènes (Schweizer et

Bolling, 1970). A l'inverse, lors de la croissance des levures en présence d'acides gras exogènes, les activités ACC et FAS diminuent de 50% à 70%. Ceci est expliqué par la diminution de la transcription des gènes *FAS1*, *FAS2*, et *ACCI* en présence d'acides gras exogènes, conduisant à la répression de leur biosynthèse (Kamiryo *et al.*, 1976; Chirala, 1992). Lors de la surexpression de *FAS2*, l'expression de *FAS1* et *ACCI* augmente, suggérant une régulation coordonnée de ces trois gènes. L'activité de l'*ACCI* chez les levures est insensible au citrate et inhibée par les acyl-CoAs.

La régulation s'opère également de façon coordonnée, car l'expression de la FAS serait régulée par le même promoteur impliqué dans la synthèse des phospholipides et serait ainsi activé lors d'une limitation cellulaire en inositol et en choline (inositol/choline-response element (Chirala, 1992; Schuller *et al.*, 1992; Schwank *et al.*, 1995).

C.3 Réactions de modification

Les produits de la FAS sont majoritairement le palmitate (C16:0) et le stéarate C18:0). L'élongation au delà de 18 carbones se déroule dans le cytosol, sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) ou de la mitochondrie. La désaturation est réalisée par des protéines ancrées dans le RE. Les produits finaux de la synthèse des lipides sont donc dépendantes de l'expression des gènes chez les organismes.

C.3.1 Elongation

L'élongation conduit à la production d'acides gras à très longue chaîne (VLCFA; very long chain fatty acids), qui contiennent de 20 à 26 atomes de carbone. Ils sont synthétisés par élongation des acides gras saturés à 16 ou 18 carbones (LCFA : long chain fatty acids), grâce à des réactions périodiques semblables à celles de la synthèse *de novo*. Ainsi, l'élongation se fait par des molécules de malonyl-CoA fournies par l'Aac1p. Mais, contrairement à la synthèse *de novo*, l'élongation des acides gras a lieu dans le RE (van Meer *et al.*, 2008). Comme les VLCFA sont hydrophobes ils constituent de bons substrats pour la formation de céramides. Les céramides composés d'une base à longue chaîne comme la phytosphingosine, la dihydrosphingosine, N-acylée, avec un acide gras non substitué (C26:0) ou hydroxylé (HO-C26:0) sont des composants majeurs de sphingolipides chez les levures (Lester *et al.*, 1993). La production des VLCA dans le

RE facilite leur prise en charge par la céramide synthase, enzyme localisée dans la membrane du RE, afin que les céramides soient produits.

Il existe trois gènes codants pour des élongases chez la levure: *ELO1*, *ELO2* et *ELO3*. Elo1p est spécifique de l'allongement des acides gras de moyenne et longue chaîne (de 12 à 18 atomes de carbone). Elle est aussi capable d'allonger les acides gras mono-insaturés. Elo2p est spécifique pour des allongements jusqu'à 22 atomes de carbone et Elo3p pour des allongements jusqu'à 26 C. Elo2p et Elo3p présentent des similarités de séquence de 76 % et 72 % respectivement avec Elo1p. Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation simultanée de ces deux gènes est létale. Par contre, l'invalidation d'un seul gène entraîne une grande diminution de la quantité des acides gras C26:0. La réduction NADPH dépendante du 3-ketoacyl-CoA est alors prise en charge par la protéine Ybr159w (3-kéto- réductase, microsomale) (Rossler *et al.*, 2003). Comme les souches $\Delta elo2$ ou $\Delta elo3$ sont incapables de synthétiser des acides gras en C26:0, il y a accumulation des alcools à longue chaîne et absence de céramides (Oh *et al.*, 1997). Ainsi, les produits des gènes *ELO2* et *ELO3* semblent jouer un rôle essentiel dans la formation des VLCFA nécessaires à la biosynthèse des sphingolipides. Un quatrième gène, n'appartenant pas à la famille des élongases et impliqué dans la synthèse des VLCA à été identifié : il s'agit de celui codant pour l'énoyl-CoA réductase *TSC13* qui prend en charge l'étape finale de réduction (Kohlwein *et al.*, 2001). Les souches contenant une mutation du gène *TSC13* chez *S. cerevisiae* accumulent encore des LCFA, mais de faibles niveaux de VLCFA (Mitchell et Martin, 1997).

Récemment, des nouvelles preuves sur le mode d'action des élongases ont été fournies. Les élongases sont impliquées dans la condensation/ décarboxylation de l'acyl-CoA avec le malonyl-CoA fourni par l'Acc1p, mais ces protéines ne possèdent pas d'homologie de séquences avec les carboxylases, notamment au niveau du domaine de carboxylation de FAS2 (domaine KS). Néanmoins, des preuves sur la fonction de condensation sont données par des études sur la complémentation des protéines Elo par les enzymes de condensation Fae1 (FAE : formic-acid-extractable protein) de plantes. La famille des protéines FAE d'*Arabidopsis thaliana* ne présente pas d'homologie structurale avec les gènes *ELO*. Cependant l'expression hétérologue de plusieurs gènes de la famille *FAE* complémente le double mutant $\Delta elo1\Delta elo2$ (léta) de *S. cerevisiae* (Paul *et al.*, 2006).

C.3.2 Régulation de l'élongation

Les VLCFA sont des composants essentiels des sphingolipides et des protéines à ancre GPI. L'élongation des acides gras est une opération indispensable pour la cellule, car elle ne peut pas être remplacée par l'apport des VLCA extracellulaires. Une élongation défective a des effets sévères sur la formation de lipides, sur l'assemblage des protéines (par exemple l'ATPase de la membrane plasmique) et sur la structure de la membrane plasmique (Schneiter *et al.*, 1999; Gaigg *et al.*, 2001). L'introduction de mutations Elo dans des souches défectives pour la synthèse d'ergostérol diminue l'interaction fonctionnelle des sphingolipides et des stérols dans la circulation vésiculaire (Eisenkolb *et al.*, 2002). La plupart des phénotypes associés à une capacité de formation de VLCFA affaiblie sont attribués aux lipides membranaires.

La régulation transcriptionnelle des enzymes d'élongation n'est pas encore entièrement comprise. L'expression du gène *ELO1* est stimulée de 3 à 5 fois en présence d'acide myristique, et réprimée par l'ajout ou la production de l'acide palmitique (Toke et Martin, 1996). Les trois gènes *ELO* sont réprimés en phase stationnaire et en carence azotée. Par contre, les réductases *YBR159w* et *Tsc13p* ne sont pas affectées (Gasch *et al.*, 2000). Ceci pourrait indiquer que le contrôle transcriptionnel s'applique seulement sur les enzymes de condensation. Toutes les enzymes participant à l'élongation sont localisées dans le RE et forment un complexe qui a été mis en évidence par immuno-précipitation (Kohlwein *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2005).

C.3.3 Désaturation des acides gras

Les acides gras insaturés sont des composants essentiels des lipides des membranes et de stockage chez les eucaryotes. Ils sont d'ailleurs les acides gras les plus répandus des phospholipides membranaires. L'insaturation des acides gras se produit en présence ou en absence d'oxygène. Malgré le fait que la voie anaérobie se rencontre rarement, elle est présente chez *E.coli*, où les réactions de désaturation sont prises en charge par le complexe FAS. Le mécanisme le plus fréquent dans le vivant (levures, algues, plantes et animaux) est celui où une double liaison est introduite directement dans un acide gras à longue chaîne. Il utilise l'oxygène et un agent de réduction (comme le NADH) comme cofacteurs. La plupart des acides gras mono-insaturés ont une double liaison à la position $\Delta 9$. Il existe tout de même des

exceptions comme les liaisons $\Delta 7$ chez les algues, des $\Delta 5$ et $\Delta 10$ chez les bacilles et les $\Delta 6$ chez quelques plantes.

Les acides gras peuvent être mono- ou poly- insaturés. Toutefois, seules les plantes supérieures, les algues et quelques très rares animaux sont capables de synthétiser *de novo* des acides gras polyinsaturés. Ces acides gras poly- insaturés sont nécessaires au développement des mammifères ce qui rend l'acide linoléique (C18 :2 (9,12)) et l'acide γ -linoléique (C18 :3 (9,12,15)) essentiels pour ces organismes. Ces acides gras sont nécessaires pour la production des précurseurs d'hormones, qui régulent un grand nombre de fonctions comme la pression et la coagulation sanguine, le niveau des lipides sanguins, la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire aux infections issues de blessures. Dans le cas des organismes fongiques, certains sont capables de synthétiser des acides gras poly insaturés comme *Neurospora crassa* ou *Candida albicans*, alors que d'autres en sont incapables ; c'est le cas de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Schizosaccharomyces pombe*.

Chez la levure, l'acide gras est désaturé séquentiellement à partir de la position $\Delta 9$ puis $\Delta 12$ et enfin parfois en position $\Delta 15$ (Holloway et Katz, 1972). Le résidu oléoyl doit d'abord être transféré de l'ACP ou du coenzyme A sur un phospholipide, généralement la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidyléthanolamine (PE) pour que la désaturation de la chaîne puisse se poursuivre (Ferrante et Kates, 1983). La $\Delta 9$ désaturase à l'origine de ces produits est localisée dans le réticulum endoplasmique et est codée par le gène *OLE1* (Stukey *et al.*, 1990; Mitchell et Martin, 1995). *OLE1* code une protéine ayant une région interne présentant 60% de similarité avec la stéaroyl-CoA désaturase du rat. Une fusion protéique contenant les 27 acides aminés de la région N-terminale d'Ole1p et la stéaroyl-CoA désaturase de rat complémente fonctionnellement le mutant $\Delta ole1$ (Stukey *et al.*, 1990). Ole1p est considérée comme la seule désaturase exigée pour la synthèse des acides gras mono-insaturés chez *S. cerevisiae* (Stukey *et al.*, 1989).

Pour les acides gras polyinsaturés, la plupart des acides gras synthétisés contiennent des doubles liaisons interrompues par un groupe méthyle. Des enzymes sont capables d'introduire de nouveau des insaturations entre une double liaison existante et le groupe de carboxyle. Le précurseur des acides gras polyinsaturés est l'acide oléique. La double liaison suivante est

introduit à la position 12,13 par la $\Delta 12$ désaturase afin de produire de l'acide linoléique (C18 :2). Le C18 :2 est l'acide gras produit en majorité chez *Y. lipolytica*, quand les conditions de culture favorisent la synthèse *de novo* des acides gras. L'insaturation, chez certains organismes est alors suivie par l'introduction d'une double liaison à la position 15,16 à l'aide de la $\Delta 15$ désaturase, afin de former l'acide α -linoléique. Le processus de désaturation est présenté dans la Figure II-14.

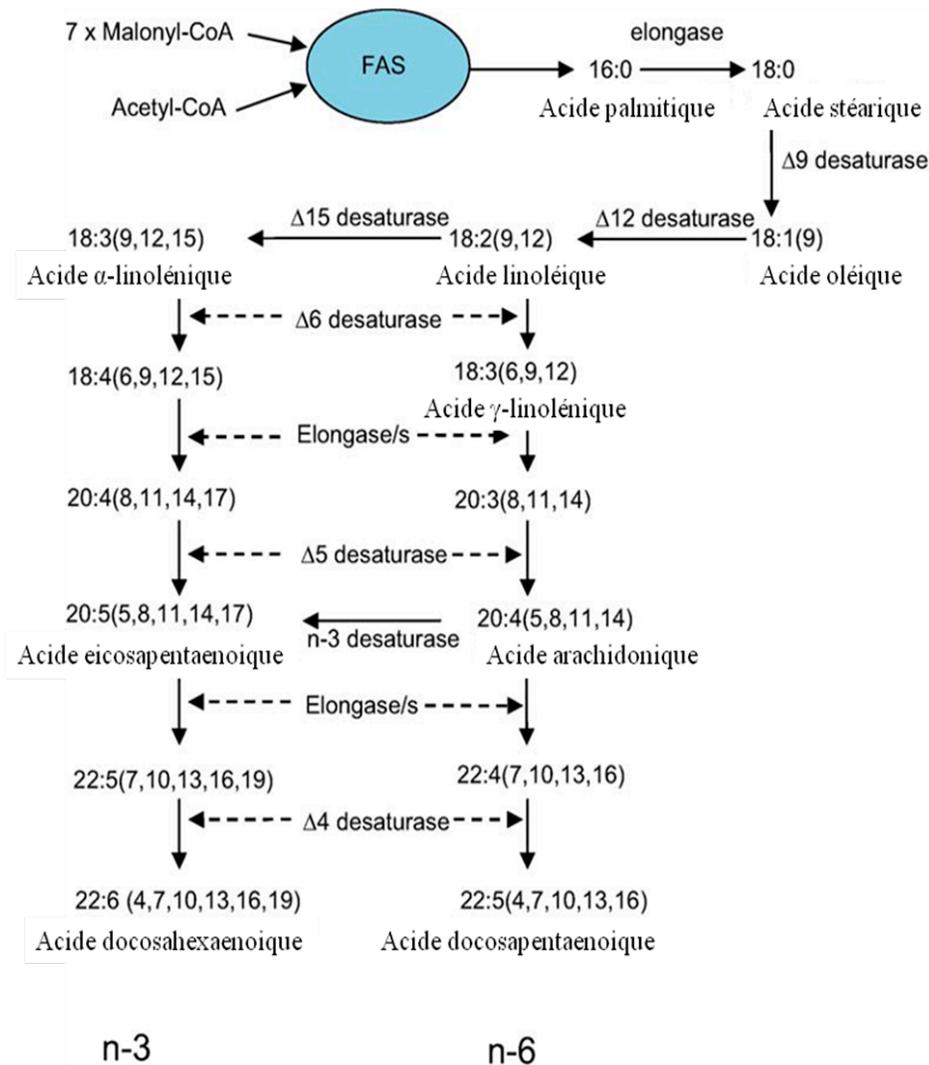


Figure II-14 : Voies de synthèse possibles des acides gras à longue chaîne et polyinsaturés chez la levure (Ratledge, 2004).

Il existe deux types de désaturases : une soluble, identifiée chez les plantes, et une qui s'accroche à la membrane du RE. La désaturase membranaire est la plus fréquente chez les levures. A la différence de l'enzyme des mammifères, l'enzyme des levures est une protéine chimérique consistant en un domaine $\Delta 9$ désaturase N-terminal de 397 résidus enchainé à un domaine de cytochrome b5 de 100 résidus. *Saccharomyces* exprime en plus un cytochrome b5 membranaire (codé par le gène CYB5) qui contribue au transfert des électrons pour le compte des désaturases membranaires du RE, qui sont dépourvues de cette partie cytochrome b5. Stuckey *et al.* (Stukey *et al.*, 1989) ont proposé un modèle dans lequel la désaturase est accrochée à la membrane par deux boucles qui positionnent la majorité de la protéine, son site actif inclus, à la surface cytosolique du RE. Cette orientation est en accord avec la localisation du site actif du cytochrome b5, de la b5 réductase et des acyl-CoA dérivés par la FAS.

L'introduction d'une double liaison en position *cis* nécessite le retrait de 2 électrons et protons à partir de deux groupes méthyle consécutifs. La réaction demande environ 412 kJ/mol (95 kCal/ mol) d'énergie car la liaison C-H est une de plus stables de la nature. Le site catalytique de la désaturase contient 2 atomes de fer qui forment des liaisons avec les acides aminés de la protéine (Lindqvist *et al.*, 1996). Les atomes du fer sont capables de lier et dissocier l'oxygène en passant par une étape d'oxydation (Fe^{III}) à un état de réduction (Fe^{II}) (Shanklin et Cahoon, 1998). La réaction d'insaturation est catalysée en deux étapes. Dans un premier temps, le cytochrome b5 s'associe avec une molécule de dioxygène formant ainsi une espèce hautement réactive. Cette forme du cytochrome b5 peut alors réduire la molécule d'acyl-CoA au niveau de la liaison. Une fois la réduction effectuée, le cytochrome b5 libère une molécule d'eau. Il est ensuite réduit par un cytochrome b5 réductase qui utilise comme cofacteur le NAD/H^+ , et libère une seconde molécule d'eau (Figure II-15).



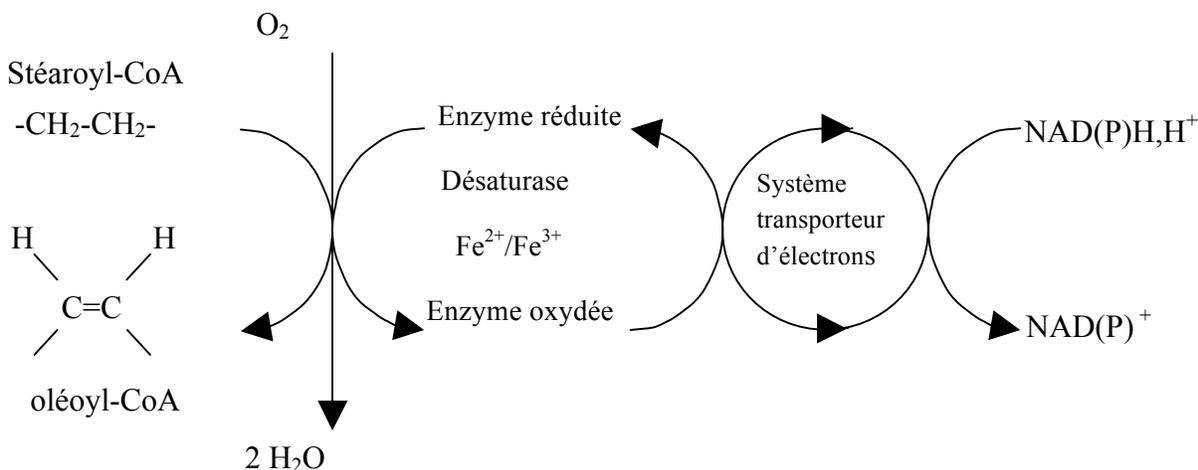


Figure II-15 : Schéma représentant le système de désaturation aérobie

Les désaturases solubles et les désaturases membranaires ont des origines phylogénétiques différentes et suivent probablement des mécanismes réactionnels différents. Malgré le fait que le mécanisme de désaturation/ hydroxylation ait fait l'objet de débats en ce qui concerne les enzymes solubles, il semble que la réaction catalysée par les désaturases membranaires peut dans certains cas s'arrêter au niveau d'un intermédiaire, conduisant à l'apparition de dérivés hydroxylés (Behrouzian et Buist, 2002).

C.3.4 Régulation des désaturases

La régulation de l'expression d'*OLE1* se déroule au niveau de la transcription (McDonough *et al.*, 1992) et *via* la stabilité de l'ARNm (Gonzalez et Martin, 1996). La stabilité d'ARNm est pour sa part régulée par plusieurs facteurs. Pendant une culture, l'activité du gène *OLE1* augmente de 2,8 quand les cellules passent de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Quand la culture s'effectue en sources de carbone non- fermentescibles, comme le glycérol ou le lactate, le niveau de ARNm augmente 6 fois par rapport aux cellules cultivées en glucose (Smith *et al.*, 2002). En même temps, l'expression du gène *OLE1* est 6 à 20 fois plus importante par rapport aux souches cultivées en glucose. L'induction du gène peut être une réponse à une demande accrue de lipides insaturés pour les membranes. La température de

croissance est également importante pour la régulation du gène *OLE1*. La plupart des organismes poïkilothermes, qui sont les organismes qui peuvent réguler leur température par apport aux besoins environnementales, s'adaptent aux températures plus basses par une augmentation de production des lipides insaturés afin de maintenir la fluidité de membranes. Chez *S. cerevisiae* le taux des ARNm et l'expression du *OLE1* augmente de 4 à 6 fois quand la température de croissance passe de 30 à 10°C. Après 4h de culture à basse température le taux d'expression du gène se stabilise (Nakagawa *et al.*, 2002). De plus, la désaturase est fortement réprimée quand des lipides insaturés sont apportés par le milieu de culture (Bossie et Martin, 1989).

La régulation de l'expression du gène *OLE1* dépend de la formation d'acyl-CoA par les acyl-CoA synthases, Faa1p et Faa4p, et de la fixation d'acyl-CoA par l'Acblp. Ceci indique que le métabolisme des acides gras est nécessaire. Deux types de régulation de l'activité acyl-CoA désaturase ont été observés. D'une part, les acides gras saturés et insaturés modulent la transcription d'*OLE1* (Choi *et al.*, 1996) et d'autre part les acides gras insaturés réduisent la stabilité des ARNm codés par ce gène. L'étude du promoteur du gène *OLE1* a permis de mettre en évidence un élément *cis*-régulateur nommé FAR (Fatty Acid Regulator), compris entre 576 et 476 paires de base en 5' du cadre ouvert de lecture. Cet élément est essentiel pour la régulation de l'expression d'*OLE1* par les acides gras.

Des travaux portant sur les transcrits codés par ce gène ont montré que les acides gras peuvent réduire de 50 % la demi-vie des ARNm *OLE1* (McDonough *et al.*, 1992; Gonzalez et Martin, 1996). Des mutants, insensibles à la répression d'*OLE1* par les acides gras insaturés (McHale *et al.*, 1996; Fujimori *et al.*, 1997) ou incapables de lever la répression *OLE1* en réponse aux acides gras saturés, ont été isolés. Deux facteurs redondants de transcription, codés par les gènes *SPT23* et *MGA2*, sont exigés pour la transcription d'*OLE1*. L'expression d'*OLE1* sur un plasmide ou une complémentation avec des acides oléique ou palmitoléique supprime la létalité du double mutant de *Dspt23 Dmga2* (Zhang *et al.*, 1999). Une étude récente suggère que le passage de *Spt23p* de la forme liée à la membrane et inactive, à la forme soluble, est régulée par le pool d'acides gras via un processus dépendant de l'ubiquitine et du protéasome (Hoppe *et al.*, 2000).

D. La synthèse *ex novo*

Les levures sont capables de synthétiser *de novo* tous les acides gras dont elles ont besoin à partir d'une source de carbone (Ratledge, 1994; Daum *et al.*, 1998). Mais, dans le cas où des nutriments proches de la structure des acides gras nécessaires sont disponibles dans leur milieu de croissance elles peuvent les utiliser directement pour leurs fonctions biologiques. C'est le cas des acides gras ou de leur dérivés présents dans l'environnement. Même en présence de sources de carbone facilement assimilables / utilisables, leur capacité à importer des acides gras constitue un avantage, en terme d'énergie (voir plus loin).

Y. lipolytica contient plusieurs familles multi-géniques impliquées dans les voies métaboliques des substrats hydrophobes. La multiplicité de ces familles donne à cette levure un grand potentiel d'utilisation des ces hydrophobes. Cet organisme a été récemment utilisé comme un modèle d'étude des mécanismes impliqués dans l'assimilation et dégradation des substrats hydrophobes.

Pour que les acides gras provenant du milieu participent à une réaction métabolique, leur incorporation, transport et activation en thioesters est nécessaire. Si le substrat est sous forme de TAG, les acides gras libres sont obtenus après hydrolyse des TAG par les lipases. Néanmoins, les mécanismes d'incorporation des AGL dans la cellule restent mal connus.

D.1 Assimilation du substrat

Les substrats hydrophobes afin d'être incorporés par le milieu subissent plusieurs modifications pour améliorer leur accessibilité. *Y. lipolytica* est bien connue pour ces activités lipolytiques et protéolytiques extracellulaires (Barth *et al.*, 2003). Pour assimiler les substrats hydrophobes à partir du milieu, elle produit des surfactants qui réduisent la taille des gouttelettes en augmentant ainsi la surface de contact entre la cellule et le substrat (Mlickova *et al.*, 2004). Elle secrète de plus un émulsifiant extracellulaire, le liposan, et une lipase extracellulaire, Lip2p, permettant l'hydrolyse des TAG. Progressivement plusieurs petites gouttelettes se forment, facilitant le transport indirect par la surface. Alternativement, les alcanes peuvent être attachés à des protrusions formées à la surface de la cellule et puis migrant vers le RE via la membrane plasmique par transport direct d'interface (Figure II-16). A partir de ce moment ils peuvent être

hydroxylés par le système de P450 monooxygénase (ω -oxydation) (Tanaka et Fukui, 1989; Mlickova *et al.*, 2004).

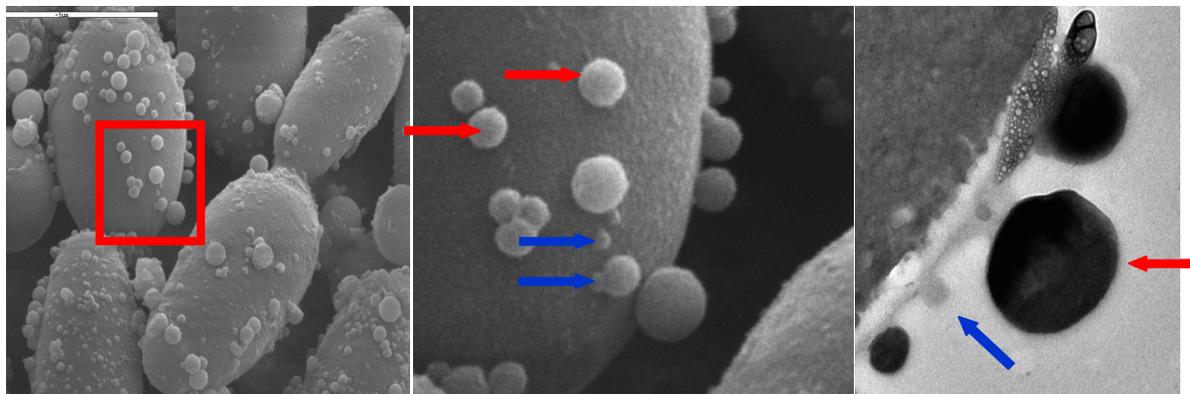


Figure II-16 : Analyse de la surface cellulaire de *Y. lipolytica* en présence d'acide oléique. Les cellules de *Y. lipolytica* se développent sur un milieu minimum en présence d'acide oléique. Des gouttelettes lipidiques (flèche rouge) et des protrusions (flèches bleues) sont observées (Mlickova *et al.*, 2004).

Une fois les substrats sont incorporés dans la cellule, il existe plusieurs voies facilitant leur dégradation, telles que l'oxydation mono-terminale des alcanes, la β -oxydation le cycle de glyoxylate et du citrate. Ces voies sont localisées dans des différents compartiments cellulaires comme le RE, les peroxysomes et la mitochondrie. La dégradation des substrats hydrophobes s'achève par la voie de la β -oxydation située dans les peroxysomes. Néanmoins, en présence d'excès de substrat hydrophobe, les substrats sont accumulés dans les corps lipidiques (CL) sous forme de TAG et d'ES. Les lipides accumulés peuvent alors être mobilisés après une étape d'hydrolyse catalysée par les lipases, codés par les gènes *TGL*. Chez *Y. lipolytica* il existe deux orthologues de *TGL*, mais leur fonction est encore inconnue. Le destin des substrats hydrophobes est présenté dans le schéma qui suit (Figure II-17).

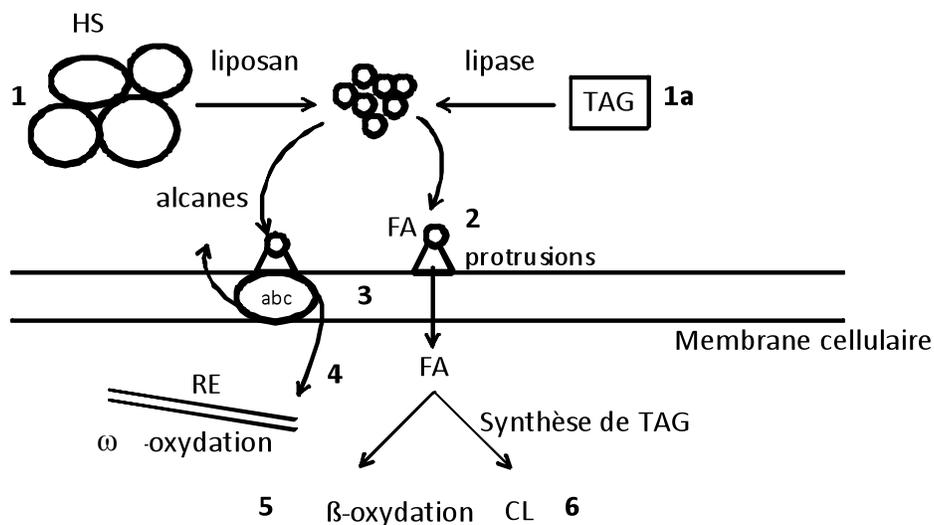


Figure II-17 : Représentation schématique de l'assimilation du substrat hydrophobe (SH) par *Y. lipolytica*. (1a, 1b) Les SH forment des émulsions et la taille des gouttelettes est réduite par le liposane sécrété. (1b) les TAG sont clivés par la lipase extracellulaire afin de libérer les acides gras. (2) Les gouttelettes de substrat s'accrochent aux protrusions cellulaires. (3) L'incorporation se fait par les mécanismes de transport (i.e. transporteurs ABC, voir plus loin). (4) La modification du substrat se fait par des différentes voies (i.e. ω -oxydation pour les alcanes au RE, et le système monoxygénase P450). (5) Dégradation par la voie de la β -oxydation où (6) accumulation des lipides en forme de TAG.

D.2 Transport des AGL

La majorité des études concernant le transport des substrats hydrophobes ont été réalisées chez *S. cerevisiae*. Leur fixation et leur transport à travers la membrane plasmique sont des processus rapides, particulièrement pour les acides gras libres (Kamp *et al.*, 1995). Des études *in vitro* ont démontré que les acides gras libres pouvaient traverser rapidement une bicouche lipidique synthétique à pH physiologique (Hamilton, 1998). Un modèle propose ainsi que l'import des acides gras soit uniquement réalisé par diffusion à travers la membrane cellulaire (Doody *et al.*, 1980; Kleinfeld et Storch, 1993).

La circulation intracellulaire et le stockage des lipides sont assurés par les protéines solubles d'accrochage des lipides (soluble lipid binding proteins, SLBP). Parmi les SLBPs on

peut citer les protéines affines des acides gras (fatty acid binding proteins, FABP), les protéines liant les acyl CoA (acyl-CoA binding proteins, ACBP), les protéines de transfert des lipides (non specific lipid transfer protein, nsLTP) et la protéine transportant les stérols (sterol carrier protein, SCP). Ces protéines sont réparties de manières différentes suivant les règnes. La FABP est uniquement trouvée chez les animaux, l'ACBP et la SCP2 sont trouvées chez les animaux, les levures et les plantes, la nsLTP est spécifique des plantes (van Meer *et al.*, 2008). Cette distribution irrégulière indique une complémentarité de fonction entre les différentes SLBPs.

Les acides gras à longue chaîne peuvent perméabiliser les membranes grâce à la diffusion passive ou l'accrochage aux SLBPs. Cependant, comme la localisation de ces protéines est assez spécifique dans la membrane, les acides gras se répartissent dans des pools intracellulaires. L'activation métabolique en CoA et l'accrochage à l'ACBP assure leur maintien dans le pool. Donc, l'accrochage aux SLBP et l'estérification en CoA établit un gradient de concentration d'acides gras à longue chaîne tout au travers de la membrane et de ce fait influence leur transport pour des raisons thermodynamiques (Ferreya *et al.*, 2006). En fait, la diffusion des AGL est un processus très rapide, dit '*flip-flop*', qui se produit quand la concentration extracellulaire des acides gras est 10-20 fois plus importante que la concentration intracellulaire. De plus, l'accrochage aux SLBP protège des effets toxiques des AGL sur les membranes, la traduction du signal, et le contrôle transcriptionnel (Zimmerman et Veerkamp, 2002).

Chez *S. cerevisiae*, une ACBP est codée par le gène *ACB1* (Rose *et al.*, 1992; Knudsen *et al.*, 1994). Elle a une masse d'environ 10 kDa, et est responsable de la liaison avec des acides gras activés d'une longueur de 14 à 22 atomes de carbone (Faergeman et Knudsen, 1997). Bien que les conséquences de l'absence d'Acb1p dans la β -oxydation n'aient pas été directement étudiées, on peut supposer qu'elle n'a que des effets indirects, dû à sa capacité à réguler les concentrations intracellulaires en acyl-CoA (Schjerling *et al.*, 1996; Faergeman et Knudsen, 1997; Trotter, 2001).

Chez *Y. lipolytica*, l'existence d'au moins une protéine FABP ainsi que son induction en présence de palmitate ont été démontrées (Dell'Angelica *et al.*, 1992). Cette protéine appartient à la famille des *SCP* (sterol carrier proteins) impliquées dans le transport du stérol. Elle semble être importante pour l'utilisation efficace des acides gras par *Y. lipolytica* (Ferreya *et al.*, 2006). Aucun homologue de cette protéine de ce type n'a été mis en évidence chez *S. cerevisiae*.

Un deuxième modèle de transport, également « protéino-dépendant » a été décrit chez les procaryotes, où un transporteur lié à la membrane serait responsable du transport des acides gras exogènes. Chez *Escherichia coli*, l'importation des acides gras dépend de deux protéines : le transporteur associé à la membrane externe, *FadL*, et la synthase cytosolique des acyl-CoA, *FadD* (Figure II-9). Dans ce modèle, l'importation et l'activation pourraient être intimement liées. L'activation de l'acide gras importé assurerait sa conservation dans la cellule (Black, 1990; Faergeman *et al.*, 2001).

Les protéines ABC (cassette de liaison à l'ATP, Adenosine Binding Cassette) constituent une superfamille extrêmement vaste que l'on retrouve dans l'ensemble du règne vivant, des bactéries à l'homme (Holland *et al.*, 2003). Ces protéines présentent une remarquable conservation dans leur architecture moléculaire et leur organisation structurale. Néanmoins, les protéines ABC accomplissent une étonnante variété de fonctions, s'étendant du transport transmembranaire, dépendant de l'ATP, d'une grande diversité de molécules, à la régulation d'importants processus cellulaires (Dean et Annilo, 2005).

Les études structurales et biochimiques menées sur l'induction de l'hydrolyse de l'ATP par la fixation d'un substrat très spécifique, ont démontré l'existence d'un changement conformationnel du complexe ABC induisant un décalage du substrat sur un site de fixation de plus faible affinité. Le substrat transporté est alors déchargé dans l'espace cytoplasmique ou extracellulaire. L'hydrolyse de l'ATP au niveau du second site de fixation de l'ATP restaure la conformation originale du transporteur ABC qui est de nouveau prêt à fixer un autre substrat (Palmieri *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2001).

Une fois à l'intérieur des cellules, les acides gras diffusent ou sont transportés vers les différentes organelles, telle que la mitochondrie, les peroxysomes, par des protéines à petite taille (14-15 kDa), et aussi des FABPs, sont impliquées dans ce transport. La plupart des FABPs ont une affinité pour les acyl-CoAs.

Les processus et les mécanismes impliqués dans l'assimilation des substrats hydrophobes par *Y. lipolytica* sont présentés en détail dans la publication suivante.

D.3 PUBLICATION II

Uptake and Assimilation of Hydrophobic Substrates by the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*

F. Thevenieau, A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, K. Albertin, S. Zinjarde, J-M. Nicaud

Titre en français : L'absorption et l'assimilation des substrats hydrophobes par la levure oléagineuse *Y. lipolytica*.

Résumé : L'incorporation de substrats hydrophobes tels que les acides gras, les triglycérides et les alcanes par des microorganismes a récemment attiré l'intérêt de la communauté scientifique à cause de la potentialité d'utilisation de ces microorganismes pour des applications biotechnologiques. Cette revue résume les processus d'incorporation des substrats hydrophobes par la levure oléagineuse *Y. lipolytica*, qui est connue comme résidant des environnements contenant des lipides. Cette levure est devenue capable d'utiliser des substrats hydrophobes, en développant un système qui consiste tout d'abord en l'incorporation des ces substrats et puis de leur canalisation vers les différents voies métaboliques. Parmi les stratégies employées par *Y. lipolytica* en réponse à l'exposition à des substances hydrophobes, on notera les processus de transport de surface et du transport interfacial, la production des biosurfactants, l'hydrophobation de la membrane cytoplasmique et la formation de protrusions. Plusieurs systèmes de transport ont été jugés essentiels pour la croissance dans des milieux contenant des composés hydrophobes. Ces systèmes sont soit impliqués dans l'incorporation des substrats hydrophobes, soit dans l'exportation de produits intermédiaires cellulaires afin de maintenir les concentrations intracellulaires de ces composés à des niveaux non toxiques. Finalement, cette étude présente les progrès récents sur le devenir métabolique des composés hydrophobes à l'intérieur de la cellule: leur oxydation, leur poursuite vers les voies de dégradation ou leur accumulation dans les corps lipidiques.

38 Uptake and Assimilation of Hydrophobic Substrates by the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*

E. Thevenieau^{1,*} · *A. Beopoulos*¹ · *T. Desfougeres*¹ · *J. Sabirova*² ·
*K. Albertin*³ · *S. Zinjarde*⁴ · *J-M. Nicaud*¹

¹Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, Thiverval-Grignon, France

*jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr

²Laboratory of Industrial Microbiology and Biocatalysis, Department of Biochemical and Microbial Technology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

³Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa

⁴Institute of Bioinformatics and Biotechnology, University of Pune, Pune, India

⁵Oxyrane UK Limited, Greenheys House, Manchester Science ParkManchester, UK

1	<i>Introduction</i>	2
2	<i>Solubilization and Binding of HS onto the Cell Surface</i>	3
3	<i>Transport/Export of HS into the Cells</i>	6
4	<i>Modification of HS into the Cells</i>	9
5	<i>Degradation through the -Oxidation Pathway</i>	10
6	<i>Storage as Triglyceride and Sterol Ester</i>	12
7	<i>Research Needs</i>	13

Abstract: The transport of hydrophobic substrates such as fatty acids, triglycerides, and alkanes into a microbial cell has recently begun to receive interest by the scientific community, especially due to the potential biotechnological applications. Here we present an overview on how this process is likely to proceed in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, an organism which is known to inhabit various lipid containing environments. It is, therefore, well adapted to utilizing these hydrophobic substrates, a process involving firstly their transport into the cells followed by their entry into the subsequent metabolic pathways. Among the strategies employed by *Yarrowia* in response to exposure to hydrophobic substances are surface-mediated and direct interfacial transport processes, production of biosurfactants, hydrophobisation of the cytoplasmic membrane and the formation of protrusions. Several transport systems have been found to be essential for the growth on hydrophobic compounds, these being either involved in importing the hydrophobic substrate, or in exporting cellular intermediates in order to maintain intracellular concentrations of such compounds at non-toxic levels. Finally, this review also discusses recent advances on the metabolic fate of hydrophobic compounds inside the cell: their terminal oxidation, further degradation or accumulation in the form of intracellular lipid bodies.

1 Introduction

In order to assimilate hydrocarbons/oils substrates, microorganisms have to elaborate sophisticated mechanisms. In particular, these carbon sources have to be modified, transported into the cells without damage and then are to be either degraded for the production of energy or stored for further use.

The yeast *Yarrowia lipolytica* is often found in environments that are rich in hydrophobic substrates such as alkanes or lipids. This organism was recently used as a model system to study the mechanisms involved in the degradation of hydrophobic substrates (HS). Among the various yeasts that are able to assimilate HS (see section 20H- The hydrocarbon-degrading yeast *Yarrowia lipolytica*), *Y. lipolytica* presents several advantages: (1) recently, the entire sequence of the six chromosomes has been determined (Dujon et al., 2004); (2) this species is haploid which is not the case for most HS degrading yeast species such as *Candida tropicalis*; (3) many genetic tools are nowadays available for gene manipulation in *Y. lipolytica* which has been reviewed previously (Barth and Gaillardin, 1996). For example, classical *in vivo* genetics was used for the isolation of mutants affected in oleic acid utilisation and in peroxisomal assembly (Nuttley et al., 1993). The identification of the mutated genes was obtained by complementation studies and sequencing of the complementing genes. Recently, tagged mutants affected in HS utilization and in colony morphology were isolated. The mutated genes were identified by sequencing of the insertion border using reverse PCR (Mauersberger et al., 2001). In addition, recently, microarrays have become available for this yeast.

This review will focus on the recent advances of the physiology and genetics of *Y. lipolytica* in relation to the assimilation of HS.

The fate of HS from the media into the cells is depicted schematically in [Fig. 1](#). The first change that occurs is the modification of the substrates in order to improve their accessibility. *Y. lipolytica* is well known for its extracellular lipolytic and proteolytic activities (Barth et al., 2003). For this purpose *Y. lipolytica* utilizes two mechanisms: (1) the *surface-mediated transport* by producing surfactants during growth on HS. Such surfactants reduce the size of the HS droplets, thereby increasing the possible contact surface with the substrate (Mlickova

E. Accumulation de lipides de réserve

Tous les organismes du vivant nécessitent de l'énergie pour survivre. L'estérification des acides gras avec le glycérol pour la production des TAG apporte une forme concentrée d'énergie métabolique d'environ 38 kJ/g (9 kcal/g). Les acyl-CoA formés ou assimilés peuvent être utilisés dans la voie de synthèse des lipides selon deux voies : soit celle des esters de stérols soit celle des triglycérides. *Y. lipolytica* étant une levure oléagineuse, contrairement à *S. cerevisiae*, elle stocke ces réserves lipidiques en majorité sous forme des TAG dans les corps lipidiques. La synthèse des lipides neutres commence avec le glycérol-3-phosphate qui offre le squelette de carbone en vue des acylations successives. La voie du glycérol phosphate est la synthèse *de novo* des TAG, premièrement décrite par le biochimiste Kennedy et communément appelée la voie Kennedy (Kennedy, 1956) (Figure II-18). La synthèse des TAG peut être divisée en deux parties : la première comprend les réactions menant au diacylglycérol (DAG), la deuxième l'acylation du DAG en TAG.

E.1 La voie de synthèse des TAG

Le précurseur de la synthèse *de novo* du DAG, le glycérol-3-phosphate (G-3-P), peut être synthétisé de deux manières différentes : soit directement à partir de glycérol, soit à partir de dihydroxy-acétone-phosphate (DHAP) métabolite provenant de la glycolyse.

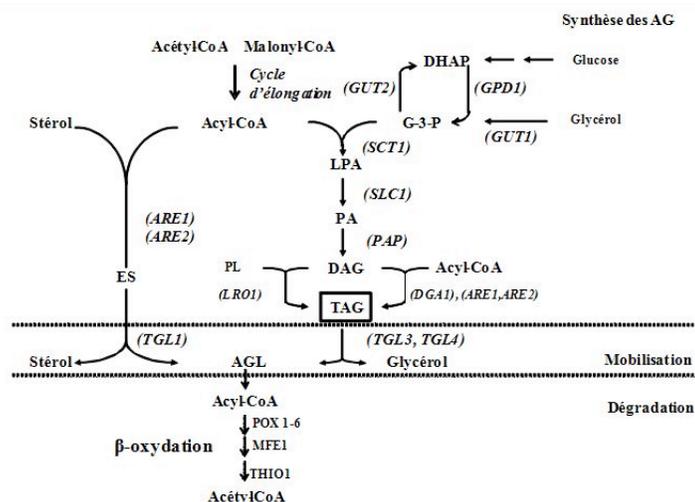


Figure II-18: La voie de biosynthèse des lipides neutres.

Dans le premier cas, le glycérol est transporté et phosphorylé en glycérol-3-phosphate par une seule enzyme, la glycérol kinase *GUT1*. La conversion du DHAP en G-3-P chez *S. cerevisiae* est catalysée par deux enzymes, *GPD1* et *GPD2* (Czabany *et al.*, 2007) respectivement, alors que chez *Y. lipolytica* un seul gène est identifié (*GPD*) (Athenstaedt et Daum, 2006). Chez *Y. lipolytica* la réaction reverse, (deshydrogénation du G-3-P en DHAP), est catalysée par une seule enzyme la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (*GUT2*). Les deux voies réactionnelles sont catalysées chez *Y. lipolytica* par des isomères spécialisés de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (*GPD1*, *GUT2*) (Ansell *et al.*, 1997).

La surexpression de la G-3-P déshydrogénase chez *S. cerevisiae* a entraîné une augmentation de 20 fois du taux du G-3-P (Nguyen *et al.*, 2004). En revanche, la délétion de *GPD1* chez *S. cerevisiae*, bloquant la conversion du DHAP en G-3-P, a réduit fortement l'accumulation des TAG en favorisant la production de glycerol (Overkamp *et al.*, 2002). Chez la plante *Brassica napus*, une augmentation par deux de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase par surexpression du gène codant la G-3-P déshydrogénase de *S. cerevisiae* a entraîné 4 fois plus de G-3-P, ce qui a conduit à une augmentation de 40 % de l'accumulation des lipides de réserve des graines (Vigeolas *et al.*, 2007).

L'expression du gène *GUT2* semble être régulée par la source de carbone. La transcription est réprimée lorsque les cellules sont cultivées sur des sources de carbone fermentescibles comme la glucose, mais elle est induite lorsque de culture des sources de carbone non- fermentescibles comme le glycérol et l'éthanol (Sprague et Cronan, 1977; Grauslund *et al.*, 1999; Grauslund et Ronnow, 2000). Dans ce dernier cas, l'induction du *GUT2* a besoin de la protéine kinase Snf1p et du complexe de transcription/ activation Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p (Grauslund et Ronnow, 2000). En outre, le régulateur négatif Opi1p facilite la répression du *GUT2*. Des mutations dans l'homologue humaine de *GUT2*, le *GPD2*, sont associées avec la forme de diabète *mellitus* qui est indépendante de l'insuline (Brown *et al.*, 1996; Novials *et al.*, 1997).

La voie de formation des TAG comprend chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*, 4 acyltransférases différentes catalysant les différentes étapes de transfert d'acyle sur le squelette glycérol. Elles sont des gènes uniques codées par *SLC1*, *SCT1*, *LROI* et *DGAI*. *SCT1* est spécifique pour la première acylation du squelette de glycérol en position *sn-1* donnant l'acide

lysophosphatidique (LPA). Ensuite, l'acylation de la position *sn-2* par Slc1p donne l'acide phosphatidique (PA). Cette enzyme présente une activité 1-acyl-G-3-P acyltransférase (AGAT). Le PA est ensuite dephosphorylé par la phosphatidyl acyl -phosphatase (PAP) afin de produire le diacylglycérol (DAG).

Il existe une voie alternative pour la production de LPA utilisant le DHAP. Cette route comprend une réaction d'acyltransférase portée par la même enzyme qui catalyse l'acylation du G-3-P en position *sn-1*, *SCT1*. Le produit, 1-acyl-DHAP, est alors converti en LPA par l'acyl DHAP réductase Ayr1p. Slc1p prend ensuite en charge le substrat pour former le PA qui, après déphosphorylation, donne le DAG. A part la synthèse *de novo*, le PA peut être formé par dissociation de la tête d'un glycérophospholipide à l'aide de la phospholipase D (McDermott *et al.*, 2004). Par ailleurs, le DAG peut être obtenu par dégradation directe de phospholipides via la phospholipase C, et finalement par la dé-acylation des TAG via les TAG lipases (Oelkers *et al.*, 2002; Sorger et Daum, 2003).

L'acyltransférase Slc1p présente une forte homologie avec l'enzyme de mammifère GPAT (Glycérol Phosphate Acyltransférase). Chez les mammifères, GPAT a une spécificité vis-à-vis les acyl-CoA saturés. Par contre, Sct1p est homologue de la famille LPAT (Lyso-Phospholipide Acyltransférase). Chez l'homme, LPAT est localisé au RE et possède également 2 isoformes, α et β , ayant 46% d'homologie entre elles. LPAT- α est présente dans tous les tissus, tandis que l'isoforme β se trouve dans le cœur, le foie et le pancréas. Les LPAT présentent une spécificité vis-à-vis les acyl-CoAs mono et doublement insaturés. Les TAG possèdent préférentiellement des acides gras saturés en position *sn1* et des insaturés en position *sn2*. Chez les mammifères, la GPAT possède deux isoformes, l'une associée au RE et l'autre à la membrane mitochondriale externe. Les sites actifs de ces enzymes sont orientés vers le cytosol. Cependant, les différences de spécificité de ces isoformes ne sont pas encore connues. La GPAT a été premièrement purifiée à partir de membranes d'*E.coli*. Une enzyme mitochondriale de foie de rat a été également purifiée. L'enzyme de la bactérie (83kDa) est inactive, mais l'activité est obtenue lors de la renaturation de la protéine en présence de phospholipides, principalement la cardiolipine et le phosphatidylglycérol (Smith *et al.*, 2000).

La deuxième étape de formation des TAG *de novo*, l'acylation du DAG, peut suivre différentes voies chez les levures: l'une utilise les phospholipides comme donneurs d'acyle et

l'autre est acyl-CoA dépendante. La réaction acyl-CoA indépendante est catalysée par la Lro1p qui transfère le groupe acyl de la position *sn-2* de la phosphatidylcholine (PtdCho) ou de la phosphatidyléthanolamine (PtdEtn) sur la position *sn-3* du DAG (Dahlqvist *et al.*, 2000; Oelkers *et al.*, 2002). Cette enzyme combine des fonctions phospholipase et acyltransférase. Chez l'homme, une lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) a été identifiée combinant aussi ces deux fonctions, mais elle utilise uniquement la PtdCho comme donneur d'acyle. La protéine LCAT est localisée dans les mitochondries et les microsomes. Elle a été d'abord purifiée chez le porc. La caractérisation biochimique de cette enzyme a permis de montrer qu'*in vitro*, et en absence de cholestérol, cette enzyme acylait le DAG en présence de PtdCho, formant du TAG, et une molécule de lyso-PtdCho (Czarnecka et Yokoyama, 1993). Lro1 catalyse la même réaction et présente 27% d'identité de séquence avec la LCAT humaine (Dahlqvist *et al.*, 2000; Oelkers *et al.*, 2002). Contrairement à son orthologue des mammifères, ce gène code pour une phospholipide: diacyl glycérol-acyl-transférase (PDAT) incapable de synthétiser les esters de stérols. De plus, cette enzyme utilise préférentiellement comme source d'acide gras la PtdEtn (Dahlqvist *et al.*, 2000). *In vitro*, Lro1p peut transférer l'acyl en position *sn-2* du DAG, mais *in vivo* elle est spécifique de la position *sn-3* (Czabany *et al.*, 2006).

L'homologue de Lro1p chez le tournesol et le ricin, possède une activité de transfert d'acides gras depuis les phospholipides vers les TAG (Dahlqvist *et al.*, 2000). Chez *A. thaliana* un gène codant une PDAT (*AtPDAT*) présentant 28% d'homologie de séquence avec l'enzyme de levure (*LROI*) et 16% avec la LCAT humaine a été trouvé. *AtPDAT* catalyse la synthèse du DAG à partir des phospholipides, mais contrairement à Lro1p, elle utilise le PtdCho avec une plus grande efficacité que le PtdEtn (Stahl *et al.*, 2004). Chez les levures, l'activité de Lro1p est présente au RE (Sorger et Daum, 2002) et très probablement dans les corps lipidiques (Athenstaedt *et al.*, 1999). La délétion de ce gène réduit de 40% la quantité de TAG dans les cellules de *S. cerevisiae* (Sorger et Daum, 2002), l'incorporation des acides gras provenant des phospholipides étant bloquée chez les mutants (Oelkers *et al.*, 2002). *LROI* code donc pour la seule protéine appartenant à la famille PDAT chez la levure.

Dans la réaction acyl-CoA dépendante, l'acylation du DAG est catalysée par l'acyltransférase Dga1p. Dga1p est un membre de la famille *DGAT* (diacyl glycérol acyl transférase) qui comprend un nombre de protéines issues d'espèces variées. Chez les levures les

premières enzymes appartenant à la famille des *DGAT* ont été caractérisées dans les corps lipidiques du champignon oléagineux *Mortierella ramanniana*. Les *DGATs* de *M. ramanniana* et du *S. cerevisiae* ont une homologie de séquences de 44% (Lardizabal *et al.*, 2001).

La famille des *DGATs* comporte deux sous familles (enzymes de type 1 et 2). La première *DGAT-1* a été identifié chez la souris grâce à son homologie avec la protéine *ACAT-1* (acyl-CoA : cholestérol acyl transferase) provenant du même organisme. Ces deux enzymes présentent 20% d'homologie (Cases *et al.*, 1998) et notamment un domaine conservé (FYxDWWN) nécessaire à la liaison de *ACT-1* avec les acides gras (Lin *et al.*, 1998). Cette séquence est caractéristique des *DGAT-1*, dont d'autres membres ont été identifiées depuis. Chez *A. thaliana*, la suppression du gène homologue *AtTAG1* codant pour une *DGAT* (Routaboul *et al.*, 1999) réduit de 55% la quantité de TAG dans les cellules de graines de cette plante. Par contre, la mutation des deux copies du gène *DGAT-1* chez les mammifères n'entraîne pas de modification majeure du tissu adipeux (Smith *et al.*, 2000), une autre enzyme étant capable de compenser l'absence de cette protéine. Ceci a permis l'identification d'une deuxième *DGAT-2* catalysant la même réaction, mais dont la séquence diffère de celle des *ACATs*.

Ces enzymes présentent la caractéristique d'être sensibles à une forte concentration ionique (100 nM) de Mg^{2+} (Turkish *et al.*, 2005). Contrairement aux protéines de la famille *DGAT-1*, les protéines de la famille *DGAT-2* semblent impliquées dans la différenciation des adipocytes des mammifères : *DGAT-2* y est exprimé de façon 30 fois plus importante que les autres lignées cellulaires. Chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*, le gène *DGAI* présente une homologie de séquence élevée avec les protéines de la famille *DGAT-2*. La protéine *Dga1p* catalyse la synthèse de TAG à partir d'acyl-CoA et de DAG, et est sensible à une forte concentration en K^+ et Mg^{2+} (Oelkers *et al.*, 2002; Sorger et Daum, 2002). Les enzymes catalysant la synthèse de TAG sont principalement localisées dans le RE où les TAG s'accumulent afin de former les CL. Toutefois, chez *S. cerevisiae* *Dga1p* est associé au moins en partie aux CL (Sorger et Daum, 2002). Des études *in vitro* ont démontré la préférence de *Dga1p* pour l'oléoyl-CoA et le palmitoyl-CoA (Oelkers *et al.*, 2002).

La contribution relative de *Lro1p* et de *Dga1p* à la synthèse des TAG varie suivant la phase de croissance. Tandis que *Lro1p* est principalement active pendant la phase exponentielle, *Dga1p* présente une activité majeure pendant la phase stationnaire (Oelkers *et al.*, 2002). Le

double mutant ($\Delta dgal\Delta lro1$) présente encore une activité TAG synthase, ce qui a conduit à l'identification de deux autres enzymes capables de catalyser l'acylation du DAG à partir d'acyl-CoA. Il s'agit chez *S. cerevisiae* de Are1p et Are2p, deux esters de stérol (ES) synthases responsables de cette activité résiduelle. Chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica* ces protéines appartiennent à la famille des ACAT. Elles catalysent principalement la synthèse des ES mais elles possèdent aussi une activité (DGAT) acyl CoA dépendante. Enfin, l'absence totale de lipides neutres, chez un quadruple mutant $\Delta dgal \Delta lro1 \Delta are1 \Delta are2$, suggère une large spécificité de substrat des protéines *Are* (Sandager *et al.*, 2002; Sorger *et al.*, 2004).

E.2 La synthèse des esters de stérols

Les stérols sont des lipides essentiels pour les cellules eucaryotes car ils sont des constituants majeurs des membranes en régulant entre autres leur fluidité et en agissant comme messagers de traduction du signal. Ils existent sous forme libre ou estérifiée. Les stérols libres sont des molécules amphiphiles incorporées dans les membranes. Les esters de stérol (ES), sont très hydrophobes et sont trouvés dans les corps lipidiques. L'estérification des stérols s'effectue entre le groupe hydroxyle de la position 3 et un acyle provenant soit d'un acyl-CoA, soit d'un glycérophospholipide. L'estérification et l'hydrolyse des stérols sont des processus très importants dans le métabolisme, car leur excès ou leur déficit est nuisible à la cellule (van Meer *et al.*, 2008).

Les ES synthases (ACAT) identifiés chez les levures sont les protéines Are1p et Are2p. Chez *S. cerevisiae*, ces deux enzymes ont 49 % d'identité de séquence entre eux et 24 % avec l'ACAT (acyl-CoA : cholestérol acyltransferase) humaine (Athenstaedt et Daum, 2006). La synthèse des esters de stérols chez ces organismes est un processus dépendant uniquement de l'acyl-CoA. L'analyse du profil des stérols chez des mutants dépourvus de ces protéines a révélé qu'Are1p estérifiait l'ergostérol et ses précurseurs, avec une préférence pour le lanostérol. Are2p préfère l'ergostérol comme substrat (Figure II-19). L'ergostérol étant le stérol majoritaire chez les levures, la délétion d'*Are1* chez *S. cerevisiae* n'affecte pas la quantité totale des ES. Par contre, la délétion d'*Are2* réduit la quantité des ES de 26 %. Le double mutant est lui complètement dépourvu d'ES, confirmant ainsi que ces protéines sont les seules enzymes capables d'estérifier les stérols. L'observation microscopique de ces enzymes fusionnées avec la protéine fluorescente GFP a révélé leur localisation au RE (Sorger *et al.*, 2004).

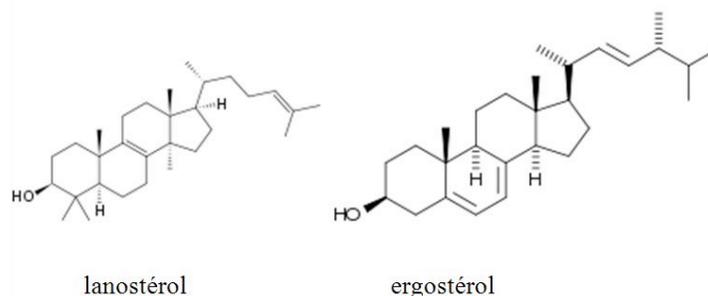


Figure II-19 : Représentation des précurseurs de synthèse des esters de stérol

E.2.1 Régulation de la synthèse des esters de stérols

La concentration des stérols libres reste quasiment la même chez le double mutant ($\Delta are1\Delta are2$) et chez la souche sauvage de *S. cerevisiae*, ce qui indique que la synthèse des stérols est régulée par l'expression des gènes *ARE* (ou par la synthèse d'esters des stérols) (Yang et al., 1996). Chez le double mutant ($\Delta are1\Delta are2$), une diminution de 30 à 50 % de la synthèse des stérols a été observée. L'hypothèse est que l'expression du gène *ERG3* qui encode une C5 stérol désaturase est réprimée dans les cellules invalidées des gènes *ARE*. En plus, une déstabilisation de la squalène époxydase *Erg1p* peut être mise en évidence (Sorger *et al.*, 2004).

E.3 Stockage dans les corps lipidiques

Selon les conditions environnementales, les levures, telles que *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*, sont capables de mobiliser les acides gras libres ou de les stocker sous forme de triacylglycérol (TAG) et d'esters de stérol (SE) dans des corps lipidiques (Ratlege et Tan, 1990). La composition protéique interfaciale des corps lipidiques conditionnerait en partie ou complètement leur nombre, leur taille, ainsi que la teneur globale en lipides, l'organisation subcellulaire, la mobilisation des lipides et le flux de carbone (Athenstaedt et Daum, 2006). Ainsi, la composition lipoprotéique des corps lipidiques posséderait un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule lors d'une phase d'accumulation des lipides. La teneur et la composition des corps lipidiques dépendent également des conditions de culture et de la composition du substrat (Papanikolaou et Aggelis, 2003a; Athenstaedt *et al.*, 2006). Chez *S. cerevisiae* on trouve des quantités d'ES et de TAG équivalentes (Czabany *et al.*, 2007),

contrairement à *Y. lipolytica* chez où les ES sont minoritaires (moins de 5 % de lipides totaux (Mlickova *et al.*, 2004)).

E.4 Biosynthèse des corps lipidiques

Pendant ces dernières années il y a eu plusieurs études portant sur la biogenèse des corps lipidiques, mais les mécanismes et les protéines impliquées dans leur formation restent largement inconnus.

Une des hypothèses parmi les plus crédibles suggère que la formation des CL se réalise grâce à des sites distincts de la surface cytosolique du RE. Ces sites comportant une concentration importante en adipophilines (protéines PAT : *perilipin/ adipophilin/ TIP47*) englobent les lipides accumulés en formant les CL (Robenek *et al.*, 2006). De plus, ces régions spécifiques seraient des sites de concentration des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides, comme les acyltransférases ACAT et DGAT favorisant ainsi la biosynthèse des lipides neutres. Après avoir atteint une certaine taille, les corps lipidiques matures, chargés des protéines qui ont perdu leur domaine transmembranaire se détachent du RE en bourgeonnant (Czabany *et al.*, 2006; Ohsaki *et al.*, 2009) (Figure II-20, A). Le modèle en question ne propose pas de mécanisme de transfert et d'organisation des TAG par le RE afin de former un CL (Thiele et Spandl, 2008)

Selon un deuxième modèle (Figure II-20, B) la monocouche de CL est formée directement par la membrane du RE et la cisternae jointe (Murphy et Vance, 1999). Une fois que les lipides commencent à se concentrer en formant des microgouttelettes, le RE les englobe en formant le CL. Cela explique l'origine de la demi-membrane des CL et aussi que certaines protéines du RE se retrouvent dans la membrane des CL et participent à l'accumulation de lipides (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995; Ohsaki *et al.*, 2009).

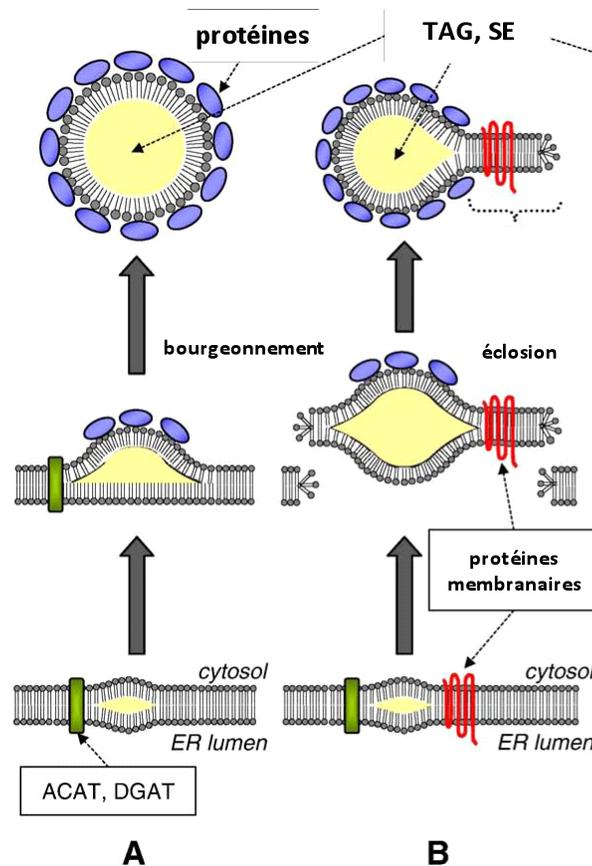


Figure II-20 : Modèles hypothétiques de biogenèse des CL. (A) Chez les cellules eucaryotes, les acyltransférases de synthèse des lipides neutres (DGAT, ACAT) sont distribuées dans la membrane du RE, et les esters s'accumulent entre les deux couches membranaires. Le modèle A est le plus commun et il suppose que la libération de CL se produit par bourgeoisement. Le RE englobe les lipides neutres en formant les CL. (B) Selon le modèle B les lipides neutres se concentrent dans la membrane du RE (entre la partie cytosolique et lumenale). Une fois les lipides se concentrent en formant de microgouttelettes les CL se forment par éclosion. Ce modèle explique l'apparition de certaines protéines du RE se dans la membrane des CL. Figure adaptée de Ohsaki et collaborateurs (Ohsaki *et al.*, 2009)

La structure de CL semble varier selon l'organisme. La microscopie électronique a révélé des images des CL avec des lipides structurés en couches (Robenek *et al.*, 2004) ainsi que des compartiments membranaires à l'intérieur du globule (Wan *et al.*, 2007). Chez *S. cerevisiae* les différents ES forment de couches entourant le noyau des TAG (Czabany *et al.*, 2008). Chez *Y. lipolytica*, qui tolère de concentrations importantes en acides gras libres, il est fortement probable que ces acides gras libres sont incorporés dans les corps lipidiques (Beopoulos *et al.*, 2008a).

De nombreuses études cognitives portant sur les CL des levures ont été réalisées chez *S. cerevisiae*. Malheureusement, ce n'est pas une levure oléagineuse, et ses réserves lipidiques sont limitées à 5-10% de son poids sec (Daum *et al.*, 1998). La plupart des études portant sur la manipulation de l'accumulation lipidique se concentrent sur les enzymes de la biosynthèse des acides gras, mais certaines se sont intéressées aux effets de modifications de flux de carbone de manière à faire varier la disponibilité des précurseurs de la synthèse des TAG.

La levure oléagineuse *Y. lipolytica* peut stocker dans ses CL des quantités de lipides neutres importantes, allant jusqu'à 36 % (Ratledge, 1994). Le nombre et la taille des CL contenus dans cette levure peuvent être affectés par la nature du milieu, ou encore par son contexte génétique. Sur milieu glucose, favorisant la synthèse *de novo* des acides gras, peu de CL sont observés. Au contraire, sur des milieux contenant des acides gras ou des TAG, l'accumulation lipidique est plus importante et le nombre de CL est plus important. La teneur et la composition des corps lipidiques dépendent des conditions de croissance et de la composition du substrat (Papanikolaou et Aggelis, 2003b; Beopoulos *et al.*, 2008a). Chez *Y. lipolytica*, la modification du contexte génétique *POX* (codant pour des acyl CoA oxydases peroxysomales) peut influencer sur la taille des corps lipidiques ainsi que sur leur composition. Des petits corps lipidiques peu nombreux sont observés quand seule l'Aox4p est exprimée, alors que les souches exprimant Aox3p présentent un phénotype sauvage des CL. Enfin, Aox2p régulerait la taille et la quantité des corps lipidiques (Mlickova *et al.*, 2004).

F. Voie de dégradation des réserves lipidiques

Une fois que les lipides neutres sont déposés dans les CL, ils peuvent servir comme dépôt des molécules requises pour faire face aux changements environnementaux. La dégradation des SE et TAG conduit à la libération des stérols, des DAG et des acides gras libres. L'ergostérol peut s'incorporer directement dans les membranes et les précurseurs des stérols peuvent servir comme substrats des enzymes de la voie de biosynthèse de stérols (Daum *et al.*, 1998). Les DAG peuvent soit se réintroduire dans la voie de biosynthèse de TAG, soit réagir avec la CDP-éthanolamine ou la CDP-choline afin de former la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine, respectivement (Kent, 1995). Les acides gras libérés peuvent s'activer avec les thiolesters et s'incorporer dans les glycerophospholipides et les sphingolipides. A part l'utilisation des TAG pour la synthèse des phospholipides, ils peuvent être utilisés comme source d'énergie grâce à la β -oxydation. Plusieurs maladies humaines graves, comme l'athérosclérose, l'obésité et le diabète surviennent à cause de dysfonctionnements dans la voie de mobilisation de lipides, ce qui reflète l'importance de ce processus.

F.1 Les TAG lipases

La première étape du catabolisme implique l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et en glycérol par les enzymes lipolytiques (lipases), identifiées par Peters et Nelson en 1948 (Peters et Nelson, 1948). Les TAG lipases sont responsables de la conversion du TAG en DAG et un acide gras. Dans tous les organismes eucaryotes, elles sont associées à la membrane des particules lipidiques. *Y. lipolytica* est capable de produire plusieurs lipases (activité extracellulaire, membranaire et intracellulaire) et l'activité lipolytique dépend des conditions environnementales (Guerzoni *et al.*, 2001b; Fickers *et al.*, 2003b). Une activité lipase extracellulaire et deux lipases membranaires ont été décrites (Barth et Gaillardin, 1996). Le gène *LIP2* code une lipase extracellulaire, Lip2p (Pignede *et al.*, 2000a), qui hydrolyse préférentiellement les triglycérides à longues chaînes des résidus oléiques (Barth et Gaillardin, 1996). Deux gènes, *LIP7* et *LIP8*, codent des lipases membranaires qui semblent être spécifiques, du caproate (MC6:0) et du caprate (MC10:0) respectivement (Fickers *et al.*, 2005). *LIP1*, *LIP3* et *LIP6* codent des carboxylestérases (Dominguez *et al.*, 2003). Une récente analyse du génome de *Y. lipolytica* a révélé un gène supplémentaire codant une carboxylestérase/lipase similaire à *LIP1* et treize gènes supplémentaires appartenant à la famille des

triacylglycérol/lipases, similaires à *LIP2* (Thevenieau *et al.*, 2007). Certaines de ces lipases pourraient être impliquées dans l'hydrolyse des TAG cellulaires. Il existe aussi des homologues à TGL3 et 4 qui sont impliqués dans la mobilisation des TAG chez *S. cerevisiae*.

F.2 Voie de la β -oxydation

La β -oxydation est une voie de dégradation des acides gras. Chez les levures elle se situe uniquement dans les peroxysomes car durant l'évolution elles ont perdu les enzymes requises pour la β -oxydation mitochondriale (Kunau *et al.*, 1995). Cette voie permet la formation d'acétyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne paire et de propionyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne impaire. Pour chaque molécule d'acétyl CoA produite (ou de propionyl CoA), une molécule de NADH₂ et une molécule de FADH₂ sont formées.

La β -oxydation comporte quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée de l'acyl-CoA est réduite de deux atomes de carbone. Une fois la réaction opérée, l'acyl-CoA réduit de deux carbones peut retourner dans la spirale de la β -oxydation (hélice de Lynen) et subir une nouvelle réduction de deux carbones. Ces cycles de décarboxylation peuvent être interrompus suivant la nature de l'acyl-CoA, la disponibilité en substrat, la présence de coenzyme A, d'acétyl-CoA ou selon le ratio NAD⁺/NADH.

F.2.1 Les acyl-CoA oxydases

Dans un premier temps, après la libération des acides gras des TAG par les lipases, la forme active d'acyl-CoA formé est oxydé par une molécule de FAD pour former une molécule de trans- Δ^2 -enoyl CoA grâce à l'action d'une acyl CoA oxydase (Aox). Il existe 6 acyl-CoA oxydases chez *Y. lipolytica*, codées par les gènes *POX1* à 6 (Wang *et al.*, 1999b). Le peroxyde d'oxygène produit par cette réaction est détoxifié en H₂O et O₂ par la catalase peroxysomale. Cette enzyme est codée par le gène *CTA1* (Cohen *et al.*, 1985).

Chez *Y. lipolytica*, les acyl-CoA oxydases présentent des spécificités différentes vis-à-vis du substrat. L'acyl-CoA oxydase 2 (*POX2*) est spécifique des acides gras à chaîne longue (Luo *et al.*, 2002) et l'acyl-CoA oxydase 3 (*POX3*) des acides gras à chaîne courte (Wang *et al.*, 1999a; Luo *et al.*, 2000). Les acyl-CoA oxydases Aox4 et Aox5 présentent une faible activité envers un large spectre de longueur de chaîne. Par contre, l'acyl-CoA oxydase Aox1 et l'Aox6 sont

impliquées dans la reconsommation des diacides (Luo *et al.*, 2000; Thevenieau, 2006). Il existe ainsi une sélectivité plus ou moins prononcée des différentes acyl-CoA oxydases.

Néanmoins, le rôle des protéines Aox ne se limite pas à la dégradation du substrat. Ces oxydases forment un complexe qui est pré- assemblé au cytosol et puis importé aux peroxysomes avec Aox2p et Aox3p jouant un rôle crucial dans le processus (Titorenko *et al.*, 2002). Ces protéines semblent réguler la division des peroxysomes en ayant une interaction avec une protéine peroxysomale membranaire, Pex16p, qui de sa part régule la fission des membranes. Cette interaction empêche la division des peroxysomes immatures. La présence de grands peroxysomes chez les mutants $\Delta pox4$ et $\Delta pox5$ de *Y. lipolytica* a confirmé cette hypothèse (Guo *et al.*, 2003).

Le phénotype de *Y. lipolytica* est aussi affecté par le génotype *POX*. Chez des mutants exprimant uniquement Aox4p, de petits corps lipidiques peu nombreux sont formés, et la souche possède un phénotype ‘maigre’. Ce phénotype est encore plus évident chez les mutants chez lesquels les gènes *POX 2, 3, 4, et 5* ont été inactivés. Au contraire, les souches exprimant soit Aox2p ou Aox2p et Aox4p, forment un nombre limité de grands corps lipidiques, résultant en un phénotype ‘obèse’. La surexpression du gène *POX2* dans le quadruple mutant $\Delta pox2-5$, non seulement restaure l’accumulation de lipides, mais conduit aussi à un phénotype obèse (Mlickova *et al.*, 2004) (Figure II-21).

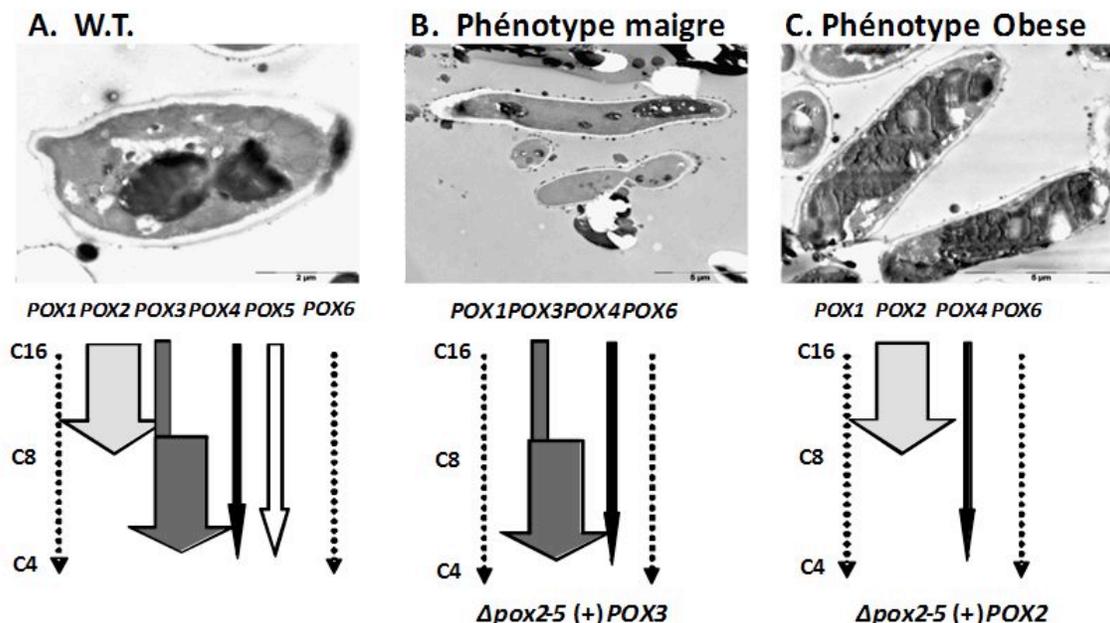


Figure II-21 : Microscopie électronique des mutants ayant des génotypes POX différents. Représentation schématique de la spécificité *POX* vis-à-vis la longueur des acyl-CoA. La modification du génotype POX peut mener à des phénotypes différents: (A) souche sauvage (B) phénotype ‘maigre’ du mutant $\Delta pox2-5$ avec réintégration du gène *POX3* (C) phénotype ‘obèse’ du mutant surexprimant le gène *POX2*. Figure adaptée de (Mlickova *et al.*, 2004; Beopoulos *et al.*, 2009).

F.2.2 Les enzymes impliquées dans la voie de la β -oxydation

Le trans- Δ^2 -enoyl CoA est hydraté par la 2-énoyl-CoA hydratase. La molécule de 3-hydroxyacyl CoA formée est oxydée par le NAD^+ pour former une molécule de 3-cétoacyl CoA. Ces deux dernières étapes sont catalysées par une protéine bifonctionnelle codée par le gène *MFE1* (enzyme multifonctionnelle- Multi-Functional-Enzyme). Le 3-oxoacyl CoA thioester est clivé par une 3-oxoacyl CoA thiolase codée par le gène *POT1* (Einerhand *et al.*, 1995). Un coenzyme A est ajouté pour former un acétyl CoA et un acyl CoA diminué de deux carbones. Les acides gras insaturés sont dégradés de la même manière que les acides gras saturés. Cependant, des enzymes sont spécifiques des acides gras dont l’insaturation est cis et en position impaire tel que l’acide oléique 18 :1n9. L’intermédiaire formé est le 2,5 di- énoyl CoA. Après un cycle d’oxydation, une double liaison 3-cis est formée et isomérisée par une Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-

énoyl-CoA isomérase. D'autres enzymes permettent d'oxyder les acides gras cis-insaturés en position paire en formant du 2-trans-4-cis-diénoyl CoA. Celui-ci est oxydé en 3-énoyl-CoA par une 2,4 diénoyl-CoA réductase (NADPH dépendante). Une isomérisation intervient pour former du 2-énoylCoA par l'action de la Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-énoyl-CoA isomérase (Figure II-22). La dégradation des acides gras à travers le cycle de la β -oxydation permet de disposer d'une source d'acyl-CoA nécessaire à l'anabolisme dans des conditions de limitation en carbone. Toutefois la β -oxydation peut intervenir alors que la synthèse des acides gras est active (Marchesini et Poirier, 2003). Il apparaît ainsi un cycle futile synthèse/dégradation qui affecte le rendement global de conversion du substrat en lipides.

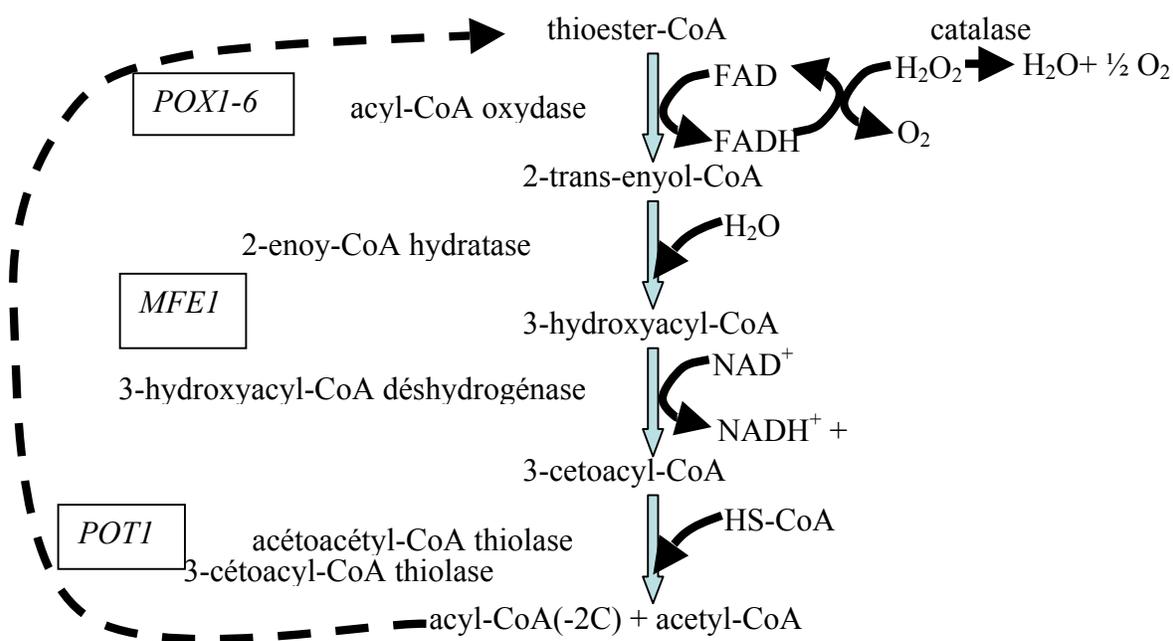


Figure II-22 : Voie de la β -oxydation chez les levures

F.3 Le destin de l'acétyl-CoA issue de la β -oxydation

Une fois l'acide gras dégradé, l'acétyl-CoA est exporté du peroxysome. Il existe deux voies d'exportation de l'acétyl-CoA provenant des peroxysomes. Selon la première l'acétyl-CoA peut être transporté vers les mitochondries en tant qu'acétyl-carnitine grâce à l'action d'une

acétyl-carnitine acyl-transférase codée par le gène *CAT2*. Elle est localisée dans les peroxysomes et les mitochondries (van Roermund *et al.*, 1998).

Selon la deuxième voie, l'acétyl- CoA peut également être métabolisé *via* le cycle du glyoxylate dans les peroxysomes. Le cycle de glyoxylate présent dans les peroxysomes et les mitochondries suit le même schéma que le cycle de Krebs.



F.4 Interaction des voies du métabolisme

L'interaction de voies de synthèse et de dégradation et les mécanismes qui conduisent à l'accumulation des lipides sont présentés en détail dans la publication qui suit.

F.4.1 PUBLICATION III

***Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation**

Athanasios Beopoulos, Thierry Chardot, Jean-Marc Nicaud

Titre en français : *Yarrowia lipolytica* : Un model et un outil pour la compréhension des mécanismes impliqués dans l'accumulation des lipides.

Résumé : La levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* est connue pour résider dans plusieurs environnements riches en lipides. Une des caractéristiques les plus frappantes de cette levure est la présence de plusieurs familles multigénique dans son génome qui sont impliquées dans les voies métaboliques de l'utilisation des substrats hydrophobes. La complexité et la multiplicité de ces gènes offre à *Y. lipolytica* une vaste capacité d'utilisation et d'accumulation des substrats hydrophobes. L'accroissement des connaissances du métabolisme de cette levure et le développement d'outils génétiques efficaces, offrent de nouvelles perspectives d'utilisation de *Y. lipolytica* comme un organisme modèle pour l'étude des mécanismes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces mécanismes sont associés à l'absorption, le stockage, le dépôt, et la mobilisation des lipides. Les nutriments présents dans le milieu et les conditions de culture semblent également jouer un rôle important dans l'obésité cellulaire.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation

Athanasios Beopoulos^a, Thierry Chardot^b, Jean-Marc Nicaud^{a,*}

^aLaboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585, AgroParisTech, CBAL, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France

^bLaboratoire de Chimie Biologique, INRA, UMR206, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, 78850 Thiverval-Grignon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2008

Accepted 13 February 2009

Available online 25 February 2009

Keywords:

Yarrowia lipolytica

Lipid accumulation

Triglycerides

Obesity

ABSTRACT

The oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* is known to inhabit various lipid-containing environments. One of the most striking features in this yeast is the presence of several multigene families involved in the metabolic pathways of hydrophobic substrate utilization. The complexity and the multiplicity of these genes give *Y. lipolytica* a wide capability range towards hydrophobic substrate (HS) utilization and storage. The combination of the increasing knowledge of this yeast's metabolism and the development of more efficient genetic tools is offering new perspectives in using *Y. lipolytica* as a model organism to study the mechanisms involved in lipid metabolism associated to fat uptake, storage, deposition, mobilization and regulation. Nutrient status and culture conditions seem to play a major role in obesity.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Living organisms gained a significant metabolic advantage when they became able to store additional energy in the form of lipids. However, in mammals, the over accumulation of lipids results in obesity. This could be viewed as an energy balance disorder which could lead to lipid diseases and various syndromes including diabetes, cardiovascular and liver dysfunctions. Nevertheless, lipid accumulation is also a major stake for green and white chemistry.

Storage lipids are mainly accumulated in the form of triglycerides (TAGs) and steryl esters (SEs) to a specialized compartment of the cell having different names: lipid particle, oleosome, lipid body, lipid droplet, oil body, etc. The structure of this organelle consists of a lipid core encased by a phospholipid monolayer embedded with numerous proteins with wide-ranging biochemical activities. Lipid bodies (LBs) participate in the circulation of components around the cell, store energy and possibly maintain and regulate the cell membrane composition. Recently, a handful of proteins in lipid bodies were found involved in lipid production and degradation [1–5]. Although all cells seem to be able to generate lipid droplets, their biogenesis, regulatory mechanisms and interactions with other organelles remain largely elusive.

Nowadays, few models exist for the study of lipid metabolism, the regulation of fat uptake, the accumulation and the mobilization of lipids. In nature, there exist some microorganisms with a great propensity to accumulate substantial amounts of oil, sometimes up to and even in excess of 70% of their biomass. For instance, the bacterium *Rhodococcus opacus* can accumulate lipids up to 87% of its dry weight [6]. Similarly, few yeasts are able to accumulate lipids in excess, such as *Rhodotorula glutinis*, reaching 72% of its dry weight [7]. Microorganisms that are naturally capable of oil synthesis and accumulation of at least 25% of their dry weight are called oleaginous. Lipid storage can either result from *de novo* synthesis, implicating the enzymes of the Kennedy pathway [8], or from the direct uptake of hydrophobic substrates (HSs), such as alkanes, fatty acids and triglycerides, from the environment.

Enzymes participating in TAG biosynthesis, storage and degradation present a great homology between species, thus provoking a great interest in the study of lipid metabolism in model organisms. Yeasts, especially due to the availability of molecular tools, can be a great model to study lipid biogenesis and regulation. The commonly used yeast model, *Saccharomyces cerevisiae*, is not an oleaginous microorganism, however, lipid accumulation and mobilization are present and currently under study [9]. Among the oleaginous yeasts *Yarrowia lipolytica* is the only one with developed genetic tools. *Y. lipolytica* is now long used as a model organism for hydrophobic substrate degradation and lipid accumulation in our group [10–13]. Thus, we use *Y. lipolytica* as a model for obesity. This idea was also proposed by Pembroke [14].

* Corresponding author. Tel.: +33 01 30 81 54 50; fax: +33 01 30 81 54 57.
E-mail address: jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr (J.-M. Nicaud).

G. Les outils génétiques existants pour la modification de *Y. lipolytica*

Afin de mieux utiliser les aspects microbiologiques de cette levure, et d'étudier le métabolisme de la levure de plus près, la génie génétique s'implique au seins des plusieurs études. *Y. lipolytica* a fait l'objet de développement d'outils génétiques adaptés et performants. Ainsi, un système de transformation (Gaillardin *et al.*, 1985; Davidow *et al.*, 1987), un système de disruption (Fickers *et al.*, 2003a), des vecteurs de type répliatif (Fournier *et al.*, 1991) et intégratif (Gaillardin et Ribet, 1987), un système d'amplification de gènes (Le Dall *et al.*, 1994) et la caractérisation de promoteurs fortement régulés ou constitutifs (Barth et Scheuber, 1993; Blanchin-Roland *et al.*, 1994) facilitent l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique. La section qui suit est une complémentation de l'introduction aux éléments génétiques présentés dans la publication I (The hydrocarbon degrading oleaginous yeast *Y. lipolytica*).

G.1 Les marqueurs de sélection

Peu de marqueurs de sélection sont disponibles chez *Y. lipolytica*. En effet, cette levure est insensible à la plupart des antibiotiques à l'exception de ceux du groupe bléomycine/phéomycine ainsi qu'à l'hydromycine-B (Cordero et Gaillardin, 1996). Chez *Y. lipolytica*, l'utilisation de marqueurs d'auxotrophie est la méthode de sélection la plus courante. Les deux marqueurs les plus employés sont conçus à partir du gène *LEU2* codant l'isopropyl malate déhydrogénase et du gène *URA3* codant l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase. Le marqueur *leu2-270* présente une délétion d'une partie du gène *LEU2* et confère une auxotrophie à la leucine et la délétion du gène *URA3* (remplacement du gène *URA3* par *pXPR2-SUC2*, marqueur *Ura3-302*) confère une auxotrophie à l'uracile. Récemment, le marqueur *ade2-844* et *gut2-744* ont été développés au laboratoire, ainsi que les souches multi-marquées correspondantes (Brevet français N° 08/50736) (Nicaud *et al.*, 2008).

G.2 Les promoteurs

De promoteurs inductibles, présentant une régulation par les substrats hydrophobes ont été utilisés avec succès : (i) le promoteur du gène *POX2* codant l'acyl CoA oxydase 2, (ii) le promoteur du gène *POT1* codant la 3-oxo-acyl-CoA thiolase et (iii) le promoteur du gène *ICL1* codant l'isocitrate lyase (Juretzek *et al.*, 2001). Ces trois promoteurs sont fortement induits par les alcanes ou les triglycérides et sont réprimés en présence de glucose ou de glycérol. De plus

des promoteurs constitutifs ont été développés. Les promoteurs des gènes *TEF* et *RPS7* ont été isolés chez *Y. lipolytica* et utilisés pour l'expression de protéines hétérologues (Muller *et al.*, 1998). Dès le début de la phase de croissance, ces promoteurs sont fortement induits. Le promoteur constitutif hp4d a été développé au laboratoire (Nicaud *et al.*, 2002; Madzak *et al.*, 2004) et un kit d'expression est commercialisé par la société Yeasterm (*Yeasterm Biotech Co. Ltd*).

G.3 Les systèmes d'amplification

Des vecteurs réplicatifs ont été construits et utilisés chez *Y. lipolytica*. Cependant, les transformants obtenus, possèdent un faible nombre de copies du vecteur (1 à 3 copies par cellule) et il est nécessaire de maintenir la pression de sélection du vecteur pour conserver les copies (Vernis *et al.*, 1997). Des vecteurs intégratifs ont été conçus pour une insertion de la cassette d'expression dans le génome de *Y. lipolytica*. Ces vecteurs présentent des éléments d'origine bactérienne en plus des éléments nécessaires à l'expression du gène d'intérêt dans *Y. lipolytica*. Après linéarisation du vecteur au locus cible (le plus souvent dans le marqueur de sélection) la cassette d'expression s'intègre dans le génome de l'hôte, de façon stable, par simple crossing-over (Barth et Gaillardin, 1996). Cependant, la présence de cet ADN bactérien dans la souche de levure est un inconvénient pour les applications commerciales. C'est pourquoi, des vecteurs d'expression «auto-clonants» dont la partie bactérienne peut être éliminée avant la transformation ont été développés (Pignede *et al.*, 2000b). Néanmoins l'utilisation de ces vecteurs « auto-clonants » amène à une intégration au hasard dans le génome. Des systèmes d'intégration multicopie ont été développés afin d'augmenter le nombre de copies de la cassette d'expression (Le Dall *et al.*, 1994).

G.4 Le système Cre lox recombinase

Les études génétiques nécessitent souvent la disruption séquentielle des gènes. Comme chez *Y. lipolytica* n'existent pas assez de marqueurs de sélection, le système *Cre lox* recombinase représente un moyen efficace de réutiliser le marqueur. Ce système est une fusion entre la méthode SEP (Sticky-End Polymerase chain reaction) et le système de recombinaison *Cre lox* (Sauer, 1987; Maftahi *et al.*, 1996). Cette méthode consiste à synthétiser une large région promotrice et terminatrice du gène d'intérêt séparée par une séquence de 16 pb contenant un site

de restriction rare. Ce fragment d'ADN est cloné puis digéré par l'enzyme de restriction spécifique. A ce site, on insère un marqueur d'auxotrophie homologue (*y1URA3*, *y1LEU2*) ou de résistance (*hph*) qui présente de part et d'autre, les séquences *lox* (*LoxP* et *LoxR*), reconnues spécifiquement par la recombinaise Cre. La cassette d'expression ainsi constituée est amplifiée et utilisée pour la disruption du gène d'intérêt par un évènement de double crossing-over. Après obtention de la souche invalidée, le marqueur d'auxotrophie ou de résistance peut être excisé. L'excision du marqueur, par recombinaison aux sites *lox*, est effectuée par l'expression de la protéine Cre sur un plasmide répliatif. Le marqueur peut être de nouveau utilisé pour d'autres modifications géniques.

H. Applications Biotechnologiques de *Y. lipolytica*

Les propriétés spécifiques de *Y. lipolytica*, telles que l'utilisation très efficace des substrats hydrophobes et sa capacité élevée de sécrétion de métabolites et de protéines, ont mène sur plusieurs projets impliquant cette levure, principalement, dans des procédés de bioconversion pour les industries alimentaires et chimiques. La quantité importante de brevets déposés concernant l'utilisation de *Y. lipolytica* démontre l'importance industrielle de cette souche. Pour plusieurs types d'utilisation, des améliorations génétiques ont été réalisées afin d'intensifier les performances des bioprocédés. Cette partie est détaillée en mettant l'accent sur les applications oléochimiques dans la publication qui suit.

H.1 PUBLICATION IV

***Yarrowia Lipolytica* as a Cell Factory for Oleochemical Biotechnology**

A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, J-M Nicaud

Titre en français : L'utilisation de *Y. lipolytica* comme une usine unicellulaire pour la biotechnologie oléochimique.

Résumé : La levure *Y. lipolytica* a développé un mécanisme très efficace pour la dégradation et l'utilisation de substrats hydrophobes. En outre, sa capacité à accumuler de grandes quantités de lipides place *Y. lipolytica* parmi les levures oléagineuses. L'achèvement du séquençage du génome de *Y. lipolytica* et l'existence d'outils génétiques pour des manipulations génétiques permettent l'utilisation de ses fonctions métaboliques pour des applications biotechnologiques. Des exemples sont présentés montrant que les souches sauvages et les souches génétiquement modifiées de *Y. lipolytica* peuvent être utilisées pour la bioconversion des acides gras, la valorisation des substrats, la production d'acides gras polyinsaturés, la bioremediation des eaux polluées par les lipides et la production des huiles cellulaires. Cette étude présente également les utilisations potentielles de cette levure dans le domaine oleochimique.

45 *Yarrowia Lipolytica* as a Cell Factory for Oleochemical Biotechnology

A. Beopoulos¹ · T. Desfougères¹ · J. Sabirova² · J-M Nicaud¹

¹Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, Thiverval-Grignon, France

²Laboratory of Industrial Microbiology and Biocatalysis, Department of Biochemical and Microbial Technology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

1	Introduction	2
2	Applications of <i>Y. Lipolytica</i> in Oleochemical Biotechnology	2
2.1	Single Cell Oils	2
2.2	PUFA Production	4
2.3	Fine Chemistry	4
2.4	Bioremediation	6
3	Research Needs	6

Abstract: The yeast *Y. lipolytica* has developed a very efficient mechanism in the degradation and utilization of hydrophobic substrates. In addition, its capacity to accumulate great amounts of lipids places it among the oleaginous yeasts. The completion of the sequence of the *Y. lipolytica* genome and the existence of genetic tools for gene manipulation allow the use of its metabolic functions for biotechnological applications. Examples are presented demonstrating that wild type and genetically engineered strains of *Y. lipolytica* can be used for fatty acid bioconversion, substrate valorization, polyunsaturated fatty acids production, oil polluted water bioremediation and single cell oil production. This review also presents the potential uses of this yeast as an alternative production (cell) factory in the oleochemical field.

1 Introduction

The application of biotechnology to industrial production holds many promises for sustainable development, but many products still have to prove their economic viability. In the start of the twentieth century organic chemistry developed methods to create energy, clothing, synthetic polymers and plastics from oil. However, synthetic biology may be having its turn to play in the field. Stricter environmental regulations, the growing mass of non-degradable synthetics, and growing concerns about the dependence on imported oil, together with its price are in its favor. Exploring the nature's diversity and using the already existing biological functions of organisms to produce molecules with equivalent or even improved properties compared with those derived from fossil will be a challenge.

This review will focus on the potential applications of *Y. lipolytica*, an oleaginous yeast, in the field of white biotechnology. One of the most striking features in this yeast is the presence of several multigene families involved in metabolic pathways. The complexity and the multiplicity of these genes give *Y. lipolytica* a wide capability range towards hydrophobic substrate (HS) utilisation and valorisation. The combination of the increasing knowledge of this yeast's metabolism and the development of more efficient genetic tools are offering new perspectives for creating yeast cell factories with great potential in biotechnological applications.

2 Applications of *Y. Lipolytica* in Oleochemical Biotechnology

2.1 Single Cell Oils

Single cell oils (SCO) might be defined as edible oils obtained from microorganisms being similar in type and composition to those oils and fats from plants or animals. Nowadays, SCO have become accepted biotechnological products fulfilling key roles in the supply of the major polyunsaturated fatty acids (PUFA), known to be essential for human nutrition and development. First attempts to produce SCO, apart from academic interest, were performed before World War II, when oils and fats were rare. In later years, the lack of safe sources of PUFA from plants and animals made SCO a commercial target. Apart from human nutrition, the use of the whole SCO biomass, without the additional extraction cost and losses, may offer an economic opportunity for functional nutrition in the animal field.

The producers with the highest oil contents are found among various species of yeasts and fungi, several algae being also able to produce PUFA. Oleaginous yeasts are defined as

I. Conclusion

Cette revue bibliographique a permis de tracer le bilan des connaissances sur la production des lipides par les microorganismes, et notamment les levures, parmi les quelles l'accent est mise à *Y. lipolytica*. Une vue globale de tous ces aspects et les interactions entre les différentes voies métaboliques vers la production des lipides peut être également trouvé dans la publication qui suit.

Ce qui reste et qui fait partie de cette étude est d'améliorer les connaissances sur le métabolisme d'une levure oléagineuse, en mettant l'accent sur les enzymes et les mécanismes impliqués à la dégradation des substrats hydrophobes et à l'accumulation des lipides. Mais l'aspect fort de cette étude est l'intérêt d'utiliser les connaissances acquises sur la régulation du métabolisme en combinaison avec le génie génétique afin d'augmenter la teneur de lipides de *Y. lipolytica* pour produire des lipides d'une composition intéressant et d'une valeur ajoutée ayant un intérêt biotechnologique. La première partie de l'étude sera donc l'effort d'améliorer la teneur lipidique de *Y. lipolytica* afin de procéder en suite à l'étude du mécanisme de production des lipides neutres et modifier leur composition.

I.1 PUBLICATION V

***Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production**

Athanasios Beopoulos, Julien Cescut, Ramdane Haddouche, Jean-Louis Uribebarrea, Carole Molina-Jouve, Jean-Marc Nicaud

Titre en français : *Yarrowia lipolytica* comme un modèle de production des huiles biologiques

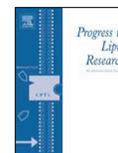
Résumé : La levure *Yarrowia lipolytica* a développé des mécanismes très efficaces pour détériorer et utiliser les substrats hydrophobes. Elle est considérée comme une levure oléagineuse à cause de sa capacité à accumuler de grandes quantités de lipides. L'achèvement du séquençage du génome de *Y. lipolytica* et l'existence d'outils adaptés pour les manipulations génétiques ont permis d'utiliser les fonctions métaboliques de cette levure pour des applications biotechnologiques. En cours de cette revue, nous décrivons l'action coordonnée des voies du métabolisme des lipides, de stockage et de mobilisation chez cette levure, en se concentrant en particulier sur les rôles et la régulation de différentes organelles et des enzymes impliquées dans ces processus. Les réponses physiologiques de *Y. lipolytica* aux substrats hydrophobes incluent les processus du transport médiat des surfaces et le transport direct interfaciale, la production de biosurfactants, l'hydrophobisation de la membrane cytoplasmique et la formation de protrusions. Nous discutons également les conditions de culture, y compris les modes de contrôle de la culture et le milieu de culture, car ces conditions peuvent être modifiés afin d'améliorer l'accumulation de lipides de composition spécifique et à identifier les liens entre les différents processus biologiques qui se produisent dans les cellules de la levure. Des exemples sont présentés démontrant l'utilisation potentielle de *Y. lipolytica* dans la bioconversion des acides gras, la valorisation du substrat et la production des huiles cellulaires (SCO-*single cell oils*). Enfin, cette revue examine les progrès récents dans la compréhension du devenir métabolique des composés hydrophobes à l'intérieur de la cellule: leur oxydation terminale, la poursuite de leur dégradation ou leur accumulation dans les corps lipidiques intracellulaires.

Progress In Lipid Research
(soumis en Juillet 2009)



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Lipid Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plipres

Review

Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil productionAthanasios Beopoulos^a, Julien Cescut^b, Ramdane Haddouche^a, Jean-Louis Uribealrea^b,
Carole Molina-Jouve^b, Jean-Marc Nicaud^{a,*}^a Microbiology and Molecular Genetic Laboratory, CNRS UMR2585, INRA UMR1238, AgroParisTech, INRA centre de Versailles-Grignon BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France^b Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, CNRS UMR5504, INRA UMR792, INSA, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2009

Received in revised form 18 August 2009

Accepted 20 August 2009

Keywords:

Lipid

Yeast

Yarrowia lipolytica

Triacylglycerol

Lipid particle

 β -oxidation

Fermentation

ABSTRACT

The yeast *Yarrowia lipolytica* has developed very efficient mechanisms for breaking down and using hydrophobic substrates. It is considered an oleaginous yeast, based on its ability to accumulate large amounts of lipids. Completion of the sequencing of the *Y. lipolytica* genome and the existence of suitable tools for genetic manipulation have made it possible to use the metabolic function of this species for biotechnological applications. In this review, we describe the coordinated pathways of lipid metabolism, storage and mobilization in this yeast, focusing in particular on the roles and regulation of the various enzymes and organelles involved in these processes. The physiological responses of *Y. lipolytica* to hydrophobic substrates include surface-mediated and direct interfacial transport processes, the production of biosurfactants, hydrophobization of the cytoplasmic membrane and the formation of protrusions. We also discuss culture conditions, including the mode of culture control and the culture medium, as these conditions can be modified to enhance the accumulation of lipids with a specific composition and to identify links between various biological processes occurring in the cells of this yeast. Examples are presented demonstrating the potential use of *Y. lipolytica* in fatty-acid bioconversion, substrate valorization and single-cell oil production. Finally, this review also discusses recent progress in our understanding of the metabolic fate of hydrophobic compounds within the cell: their terminal oxidation, further degradation or accumulation in the form of intracellular lipid bodies.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	376
2. Lipid synthesis and accumulation factors in oleaginous microorganisms	376
2.1. Oleaginous yeasts	376
2.2. Lipid accumulation pathways	377
2.3. The <i>de novo</i> lipid synthesis pathway and non-polar lipid synthesis	377
2.4. Biochemistry and regulation of lipid accumulation potential in oleaginous yeast	379
3. Factors affecting lipid accumulation	380
4. Modes of culture for ensuring high levels of lipid accumulation	381
4.1. Batch mode	381
4.2. Continuous mode	382
4.3. Fed-batch mode	382
5. Mastering lipid production	383
5.1. The <i>ex novo</i> lipid accumulation pathway	383
5.2. The β -oxidation degradation pathway	383
5.3. Growth conditions and genetic modifications favoring lipid production	384

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ACAT, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; ACC, acyl-CoA carboxylase; ACL, ATP citrate lyase; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; DAG, diacylglycerol; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FFA, free fatty acids; GLA, γ -linolenic acid; G-3-P, glycerol-3-phosphate; HS, hydrophobic substrates; IMP, inosine 5'-monophosphate; LB, lipid body; MAG, monoacylglycerol; ME, malic enzyme; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SCO, single-cell oil; SE, steryl esters; TAG, triacylglycerols (triglycerides).

* Corresponding author.

E-mail address: Jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr (J.-M. Nicaud).

0163-7827/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.plipres.2009.08.005

III. MATERIEL ET METHODES

A. Matériels

A.1. Souches

Les différentes souches de départ, utilisées pour les transformations génétiques, sont présentées dans le Tableau III-1. Les souches de *Y. lipolytica* dérivent par l'isolat français, W29 (ATCC 20460).

Tableau III-1. Souches de *Y. lipolytica* utilisées dans cette étude

Souche	Génotype	Référence
W29	MatA, sauvage	(Barth et Gaillardin, 1996)
Po1d	MatA, <i>leu2-270, ura3-302, xpr2-322</i>	(Barth et Gaillardin, 1996)
JMY330	MatA, <i>leu2-270 xpr2-322</i>	(Beopoulos <i>et al.</i> , 2008b)

Les souches d'*Escherichia coli* utilisées au cours de cette étude sont présentées dans le tableau III-2.

Tableau III-2. Souches d'*E.coli* utilisées dans cette étude

Souche	Génotype	Source
Mach1-T1	F ⁻ ▲ <i>mcrA</i> ▲ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ▲ 80 <i>lacZ</i> ▲ M15 ▲ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> ▲ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> .	kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning, Invitrogen
DH5a	F80d <i>lacZ</i> Dm15, <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17</i> (rk-, <i>mk+</i>), <i>supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argF)</i> U169	Promega

A.2 Vecteurs

A.2.1 Plasmides

Les plasmides utilisés comme vecteurs, afin de permettre le clonage de fragments PCR sont le PCR®4Blunt-TOPO (Invitrogen), le pDRIVE et le pBluescript II KS⁺ (*ColE1 ori*, *LacZ*, *bla* - Stratagene). Les vecteurs d'expression sont les suivantes :

A.2.2 Vecteurs d'expression

Ces vecteurs permettent l'intégration stable dans le génome de *Y. lipolytica* grâce aux éléments zéta (transposons). Ils contiennent également un promoteur inductible ou constitutif et un gène de résistance à un antibiotique spécifique (hygromycine, kanamicine, ampiciline).

JMP61-URA3ex : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur d'auxotrophie *URA3* (Figure III-1).

JMP61-LEU2ex : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur d'auxotrophie *LEU2* (Figure III-1).

JMP61-hphex : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur de résistance à l'hygromycine *hph* (Figure III-1).

pRRQ2 : vecteur réplcatif qui contient le gène *cre* sous le promoteur constitutif *hp4d* (Madzak et al., 2000) et le marqueur d'auxotrophie *LEU2* (Figure III-2).

pUB4-Cre : vecteur réplcatif qui contient le gène *cre* sous le promoteur constitutif *hp4d* (Madzak et al., 2000) et le marqueur de résistance à l'hygromycine *hph*.

JMP61-URA3, **JMP62-URA3** et **JMP21-LEU2** : vecteurs navettes entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Ils contiennent l'origine de répliation Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. Ce sont des vecteurs de type intégratif comportant le promoteur fort inductible *pPOX2*, les séquences zeta ainsi que le marqueur d'auxotrophie *URA3* (Figure III-2).

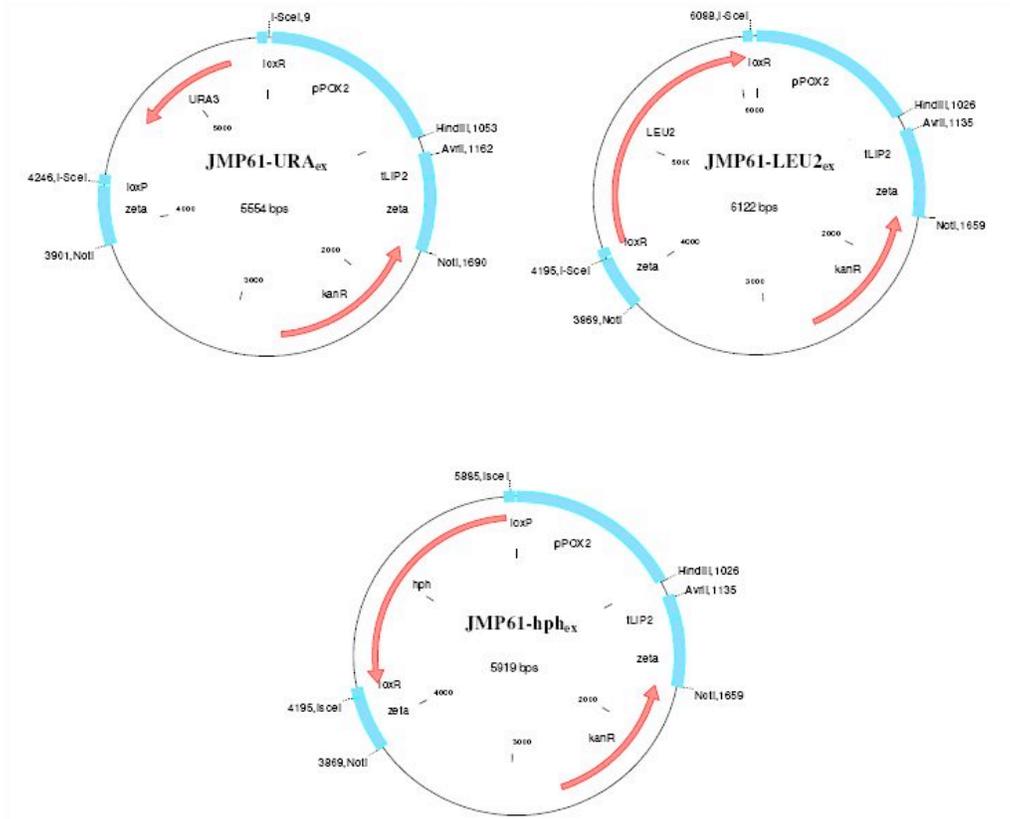


Figure III-1. Vecteurs d'expression excisables. Vecteurs navettes entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Ils contiennent l'origine de répliation Col E1 d'*E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. JMP61 est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur inductible *pPOX2*, les séquences zeta et *lox* ainsi qu'un marqueur de sélection d'auxotrophie (*URA3*, *LEU2*) ou de résistance (*hph*).

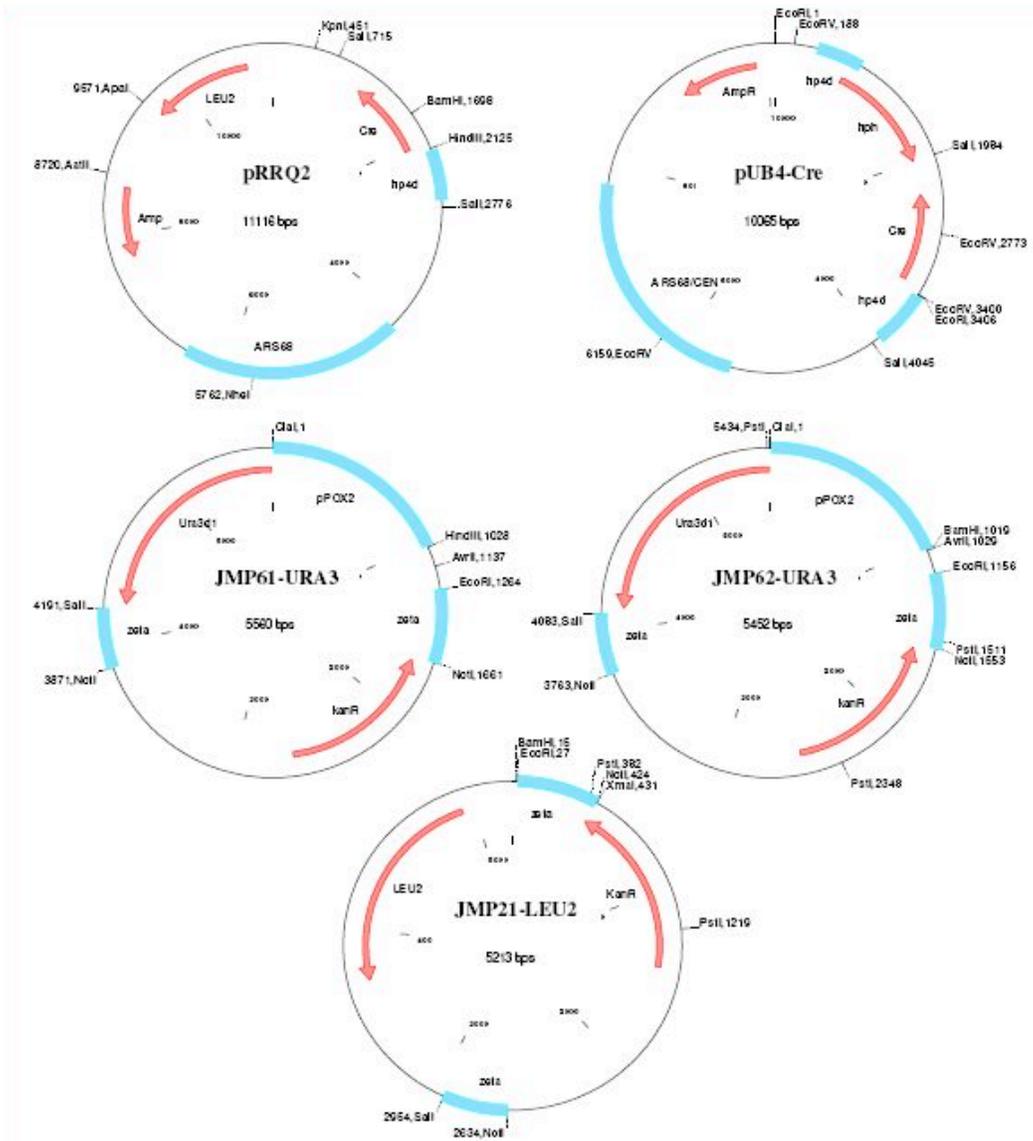


Figure III-2. Vecteurs répliatifs et vecteurs d'expression. Les vecteurs répliatifs, pRRQ2 et pUB4-Cre, contiennent le gène *cre* sous le promoteur constitutif *hp4d* et un marqueur d'auxotrophie *LEU2* ou de résistance *hph*, respectivement. Les vecteurs JMP61-*URA3*, JMP62-*URA3* et JMP21-*LEU2* sont des vecteurs navettes entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Ils contiennent l'origine de répliation Col E1 d'*E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. Ce sont des vecteurs de type intégratif comportant le promoteur inductible *pPOX2*, les séquences zeta ainsi que le marqueur d'auxotrophie *URA3*.

A.3. Milieux de culture

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

A.3.1. Milieu de culture complet pour *E.coli* : LB

- 10 g/L Bactotryptone
- 5 g/L Extrait de levure (Yeast Extract, Difco, Detroit, MI)
- 10 g/L NaCl
- pH ajusté à 7

A.3.2. Milieux de sélection des transformants d'*E. coli*

Le milieu de culture complet contenant un antibiotique, selon le plasmide utilisé.

LB rajoutant la Kanamycine (50 à 100 µg/mL) ou l'Ampicilline (50 à 100 µg/mL).

A.3.3. Milieux de culture pour *Y. lipolytica*

- Milieu complet YPD
- 10 g/L Bactopeptone
- 10 g/L Extrait de levure (Yeast Extract, Difco, Detroit, MI)
- 10 g/L Glucose
- Milieu minimum YNB w/o
- Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (Difco, Detroit, MI.)
- 5 g/L NH₄Cl
- 50 mM PO₄ NaK pH 6,8
- 10 g/L Glucose
- Milieu minimum YNB(YE)

Le milieu YNB avec l'ajout de 10 g/L d'extrait de levure (Yeast Extract, Difco, Detroit, MI)

Selon les auxotrophies la leucine (casaminoacides 2g/L) et l'uracille (0,05 g/L) sont rajoutées dans le milieu

A.3.4. Milieux de sélection des transformants de *Y. lipolytica*

La leucine ou l'uracile sont ajoutés pour compenser les auxotrophies

- YNB *Casa*

Milieu permettant de cribler les souches Leu-, Ura+ composé d'YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g/L) et des casaminoacides (2 g/L).

- YNB *Ura*

Milieu permettant de cribler les souches Leu+, Ura-, composé d'YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g/L) et de l'uracile (0,05 g/L).

A.3.5. Milieux de synthèse des acides gras

La composition des milieux permettant le suivi de synthèse *de novo* des acides gras chez la levure est présente dans le Tableau III-3 :

Tableau III-3. Composition des milieux de synthèse

Milieu de Base	Glucose (g/L)	Glycérol (g/L)	Bactopeptone (g/L)
YNB(YE)	-	-	-
YNB(YE)D	10	-	-
YNB(YE)G	-	10	-
YPD	-	-	10
YP2D4	40	-	20

Selon les auxotrophies la leucine (casaminoacides 2g/L) et l'uracille (0,05 g/L) sont rajoutées dans le milieu de culture.

A.3.6. Milieux d'accumulation des acides gras

La composition des milieux permettant une forte accumulation des lipides est présente dans le tableau III-4 :

Tableau III-4. Composition des milieux d'accumulation

Milieu de base	Glucose (g/L)	Acide Oléique (mL/L)	Bactopeptone (g/L)
YNB(YE)O	-	10	-
YNB(YE)O ₃	-	30	-
YNB(YE)D _{0.5} O ₃	5	30	-
YPDO	-	10	10
YP2D ₄ O ₃	40	30	20

L'acide oléique est rajouté dans le milieu en forme d'émulsion à 20% :

Préparation d'une solution stérile de Tween 40 à 0,625% dans de l'eau ultra pure (UP). Ajout de 20 mL de solution Tween 40 et 5 mL d'acide oléique. Traitement du mélange aux ultrasons (amplitude 50 %) pendant 1-2 min.

Deux catégories d'acide oléique ont été utilisées, l'une avec une pureté de 65% (Merk), l'autre, notée u.p. (ultra pure) a une pureté de 99% (Sigma).

B. Méthodes Génétiques

B.1 Analyse *in silico* des séquences d'intérêt.

Les séquences ont été analysées par le logiciel Bioedit sequence alignment editor (1997-2001, Tom Hall department of microbiology, North Carolina State University, USA) ou par le logiciel Protparam tool, disponible sur le site : <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>. L'hydrophobie des protéines a été déterminée par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) disponible dans le logiciel Bioedit (Kyte et Doolittle, 1982). Pour cela, il existe une échelle « d'hydropathie », définie à partir des propriétés hydrophile / hydrophobe de chacun des vingt acides aminés. Le programme analyse la séquence protéique en se déplaçant par segments de tailles prédéfinies en acides aminés et détermine ainsi l'hydropathie moyenne par segment.

Pour la comparaison de gènes entre différentes levures, notamment *S. cerevisiae*, on utilise les séquences disponibles sur le site SDG (<http://www.yeastgenome.org/>) et on procède à un blast sur le site de géolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>).

B.2. Méthodes de préparation/ extraction de l'ADN

B.2.1 Préparation de l'ADN plasmidique bactérien

Les quantités de plasmides désirées et la finalité de l'extraction définissent les volumes de culture du départ.

Les mini-préparations (*mini-prep*) réservées pour des analyses rapides sont réalisées avec 3 mL de milieu de culture sélectif (LB + antibiotique). Le culot de centrifugation est repris dans 200 µL de tampon STET (3% saccharose, 5% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8), auxquels sont ajoutés 10 µL de lysozyme 10 mg/mL. Les suspensions sont bouillies au bain-marie pendant une minute avant d'être refroidies et centrifugées pendant 10 min à 15000 rpm à 4°C. Le surnageant est précipité par addition de 200 µL d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est re-suspendu dans 50 µL d'eau stérile. Quand l'ADN plasmidique doit être de meilleure qualité (pur), il est préparé en utilisant le kit « QIAprep™ Spin Miniprep » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Les préparations moyennes (*midi-prep*) sont réalisées avec 50 mL de culture afin d'obtenir des stocks de plasmides en grande quantité. Les purifications sont faites avec le kit de purification d'ADN plasmidique "QIAprep™ Midiprep" (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

B.2.2 Préparation de l'ADN génomique de levure

La souche d'intérêt est cultivée pendant 15h dans 5 mL YPD à 28 °C, sous agitation (120rpm). Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 0,5 mL de tampon sorbitol (Sorbitol 1M, Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 0,1 M) auxquels sont ajoutés 50 mL de zymolyase à 3 mg/mL (Zymolyase 100T Seikagaku Corp. Coger préparée dans du tampon sorbitol) puis 50 mL de β -mercaptoéthanol 0,28 M. La préparation est alors incubée 1 h à 37°C. Après centrifugation, le culot est re-suspendu dans 500 mL de TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA). 50 mL de SDS 10 % (v/v) sont ajoutés avant une incubation de 20 min à 65 °C suivie d'une incubation de 30 min dans la glace après avoir ajouté de 200 mL d'acétate de potassium 5 M. Après centrifugation, le surnageant est récupéré dans 800 μ L d'éthanol 100%. Le culot récupéré après une nouvelle centrifugation est repris dans 400 mL de TE-Rnase A (TE + 100 μ g.mL⁻¹ de RNase A) et incubé à 37°C pendant 30 min. La précipitation de l'ADN est effectuée en ajoutant 40 μ L d'acétate de sodium 2,5 M pH 5,2 et 1 mL d'éthanol 100%. Un lavage de l'ADN est réalisé avec 700 μ L d'éthanol 70 % (v/v). Après centrifugation le culot est séché et repris dans 100 μ L d'eau.

B.3. Amplification des séquences par PCR

L'amplification des fragments d'ADN codant les protéines d'intérêt est réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) dans un appareil 2720 Thermal Cycler, AB Applied Biosciences (CA, USA).

La technique de PCR (Mullis *et al.*, 1986) permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN. Il s'agit d'une amplification enzymatique *in vitro* à l'aide d'une polymérase thermostable : c'est alors une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

Pendant l'étude nous avons utilisé deux enzymes : la Taq polymérase (New England Biolabs) et la Pyrobest (TaKaRa). La Pyrobest est une polymérase beaucoup plus fidèle que la Taq polymérase. La PCR se déroule en cycles d'amplification successifs (généralement 30 cycles). Chaque cycle est composé de 3 étapes :

- une étape de dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 94°C
- une étape d'hybridation des 2 amorces spécifiques pendant 30 sec entre 45 et 60°C
- une étape d'élongation de la copie d'ADN à 72°C (vitesse d'élongation : 1 kb / minute)

Le choix de la température d'hybridation se fait en fonction de la température de fusion (T_m) des amorces utilisées.

Les oligonucléotides à façon ont été commandés auprès de la société Eurogentec S.A. (Liège, Belgium) ont été obtenus sous forme lyophilisée. Ils sont re-dissous dans de l'eau milli-Q (Millipore) stérile à 100 pmol/ μ L puis conservés à -20 °C. Ils codent les extrémités N- et C-terminales des protéines d'intérêt et comprennent des sites de restriction additionnels aux fins de clonage orienté. Les séquences d'oligonucléotides correspondantes sont celles indiquées sur la partie correspondante à la construction (Résultats).

Les réactions de PCR sont réalisées dans des microtubes de 0,5 mL. Le mélange réactionnel standard est composé de l'ADN matrice (environ 10 ng), 50 pmoles de chaque amorce, 200 μ M de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U de Taq polymérase ou 5 U de Pyrobest et le tampon fourni avec l'enzyme à la concentration indiquée, dans un volume final de 50 μ L. Pour les réactions de fusion de fragments d'ADN par PCR, nous avons réalisé 5 cycles à une température d'hybridation basse de 55°C et 20 cycles au T_m des amorces utilisées. La matrice utilisée pour l'amplification peut être une préparation d'ADN (plasmidique ou génomique) ou une colonie jeune de *Y. lipolytica* ou *E. coli* repiquée directement de la boîte dans le mélange réactionnel. A partir de colonies, un cycle de 10 min à 95°C est effectué avant d'ajouter la polymérase.

B.4. Techniques de préparation et d'analyse de l'ADN

B.4.1. Purification de fragments d'ADN

Les fragments de PCR ou les fragments de restriction sont purifiés avant d'être clonés. La purification s'effectue à l'aide des kits « Qiaquick™ gel extraction kit » ou « Qiaquick™ PCR purification kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

B.4.2. Analyse des fragments d'ADN par séparation électrophorétique

La polymérisation de l'ADN codant les protéines d'intérêt est ensuite vérifiée par électrophorèse des produits de la réaction en gel d'agarose (Appligène, qualité biologie moléculaire) : 0,8 % (p / v) pour une séparation de fragments de taille jusqu'à 1000 pb ou à 3% d'agarose « *low melting* » pour une séparation de fragments de taille supérieur de 1000 pb, dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) en présence de Bromure d'éthidium (0,5 µg/L). Les échantillons sont préparés comme suit : 2 µL de produit de PCR + 1 µL de « PCR loading buffer 6x » (Sigma) complétés à 6 µL avec de l'eau milli-Q. Selon la taille des gènes, 4 µL de « PCR marker » (Sigma) correspondant, sont déposés dans une puits du le gel. La migration se fait à 80 V (l'intensité doit alors être inférieure à 25 mA) pendant environ 45 min. A la fin de la migration, le gel est observé sous un transilluminateur UV peu énergétique à 365 nm, ce qui provoque la fluorescence du BET, agent intercalant de l'ADN.

B.4.3. Dosage de l'ADN

L'ADN est quantifié par mesure de $A_{260 \text{ nm}}$ et la contamination en protéines par une mesure de $A_{280 \text{ nm}}$. Si le rapport $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ est compris entre 1,8 et 2, on peut amplifier le fragment par PCR, sachant qu'une unité d' $A_{260 \text{ nm}}$ représente 50 µg/mL d'ADN double brin et qu'il en faut quelques nanogrammes pour effectuer une PCR.

B.4.4. Hydrolyse par des endonucléases de restriction

Les endonucléases de restriction (New England Biolabs) sont utilisées à raison de 1 à 5 unités par µg d'ADN. La réaction s'effectue pendant 1 à 2 heures dans les conditions préconisées par le fournisseur.

B.4.5. Déphosphorylation de l'ADN

Afin d'insérer, avec une bonne efficacité, un fragment d'ADN dans un vecteur linéarisé, il est recommandé de déphosphoryler les extrémités 5' de ce dernier afin d'éviter sa recircularisation. La phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP, New England Biolabs) est utilisée pour la déphosphorylation à raison de 0,1 unité/pmole d'extrémités sortantes, 1 unité/pmole d'extrémités 3' sortante ou franches. La réaction s'effectue pendant 45 min à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 min à 75°C en présence de 5mM EDTA. Le vecteur ainsi dephosphorylé est extrait par un traitement au phénol (pH 7,4) et au chloroforme puis concentré par précipitation dans l'éthanol 95% (2,5 vol) et acétate de potassium 3M (0,1 vol).

B.4.6. Ligature de l'ADN

La ligature de 2 fragments d'ADN s'effectue grâce à une ligase du phage T4, qui permet la liaison ester entre un fragment 5' phosphate et un autre fragment 3' OH. Les conditions de ligature varient suivant la nature des extrémités de l'ADN. En général, la ligature de l'ADN s'effectue pendant une nuit à 18°C, dans un volume final de 10 à 40 µL, dans les conditions préconisées par le fournisseur.

B.5. Techniques de transformation

B.5.1. Transformation d'*E. coli*

- Préparation des cellules compétentes

La bactérie est cultivée dans 50 mL de milieu SOB à 37°C jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,3 à 0,5. La culture est incubée sur glace pendant 20 min puis centrifugée à froid 10 min à 5000 rpm. Les cellules sont lavées avec 16 mL de la solution 1 froide (acétate de K 30mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glycérol 15%, ajuster au pH 5,8). Les cellules sont gardées dans la glace pendant 15 min. Après une centrifugation de 5 min à 5000 rpm à 4°C, les cellules compétentes sont reprises dans 4 mL de solution 2 (PIPES 10 mM, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15%, ajuster au pH 6,8). Les cellules sont ensuite aliquotées par 100 µL et congelées à -80°C.

- Transformation de cellules compétentes

Pour 10 à 15 μL d'ADN transformant, 100 μL de bactéries compétentes ainsi préparées sont ajoutées. Après 30 min à 4°C, un choc thermique de 2 min à 42°C est réalisé. Ce choc thermique permet l'introduction du plasmide dans la bactérie via des membranes fragilisées. Après une incubation de 5 min à 4°C, il est ajouté 900 μL de milieu SOC et une incubation de 1 heure à 37°C est effectuée. Différentes quantités sont étalées sur milieu sélectif (ampicilline ou kanamycine). Les boîtes sont alors incubées à 37 °C sur la nuit. Les colonies bactériennes sont dénombrées, afin de mesurer l'efficacité de la transformation.

- Extraction et vérification du plasmide

A partir des colonies qui se sont développées sur les boîtes, des cultures de 5 mL en milieu sélectif liquide sont effectués pour procéder à l'extraction du plasmide. Le plasmide est alors analysé par sur gel agarose par électrophorèse et dans certains cas, 2 à 5 μg de plasmide et les amorces correspondantes sont envoyées pour séquençage à la société Eurogentec S.A. (Liège, Belgium).

B.5.2. Transformation de *Y. lipolytica*

- Préparation des cellules compétentes :

La méthode utilisée pour transformer *Y. lipolytica* repose sur l'utilisation de l'acétate de lithium pour perméabiliser les cellules (Gaillardin *et al.*, 1985). Les cellules sont cultivées à 28°C dans 20 mL de milieu YPD complété de tampon citrate 50 mM pH 4. Deux cultures sont ensemencées : la première à 5.10^5 cellules/mL et la deuxième à 1.10^5 cellules/mL. Après 16 heures d'incubation, la culture présentant la concentration cellulaire la plus proche de 10^8 cellules/mL est centrifugée. Les déterminations de concentration s'effectuent par comptage des levures dans une cellule de Malassez, sous microscope. Le culot est lavé deux fois avec 10 mL de TE (10 mM Tris- HCl, pH 8, 1 mM EDTA). La compétence est acquise après incubation des cellules, re-suspendues dans 20 mL d'acétate de lithium 0,1 M pH 6, pendant 1 heure à 28°C sous une agitation de 100 rpm. Les cellules sont ensuite centrifugées à basse vitesse (2 min à 2000 rpm) et elles sont reprises dans la même solution afin d'obtenir une concentration de 5.10^8 cellules/mL.

- Transformation des cellules compétentes :

La transformation s'effectue en ajoutant 5 μ L d'ADN entraîneur (fragments d'ADN de saumon d'environ 500 pb d'acide désoxyribonucléique en présence de sel de sodium à 5 mg/mL) et 10 μ L d'ADN à transformer à 100 μ L de cellules compétentes du jour. Pour une intégration monocopie (non défectif, *ura3d1*) 200 à 500 ng d'ADN sont transformés et pour une intégration multicopie (défectif, *ura3d4*) 1 à 2 μ g d'ADN. Le mélange est incubé sans agitation 15 min à 28°C, puis 0,7 mL de PEG 4000 (40%) en acétate de lithium 0,1 M pH 6 sont ajoutés. Ce mélange est incubé sous une agitation de 250 rpm pendant 1 heure à 28°C. Seulement dans le cas d'une intégration multicopie (défectif, *ura3d4*) : ajouter 80 μ L de DMSO (soit 10% final). Ceci permet d'augmenter l'intégration non homologue (taux de transformants augmente en général de 2 à 7 fois). Puis, les cellules subissent un choc thermique de 10 min à 39°C. Le mélange est dilué par addition de 1,2 mL de solution d'acétate de lithium 0,1 M pH 6. La transformation est étalée à raison de 200 μ L par boîte de milieu sélectif. Les transformants monocopies apparaissent entre 3 et 5 jours d'incubation à 28°C et les transformants multicopies apparaissent entre 7 jours et 30 jours d'incubation.

- Conservation de cellules Après vérification de la transformation, les souches sont cultivées, en tube en verre, dans 5 mL d'YPD pendant 15 h à 28 °C, sous agitation (190 rpm). Les cellules sont récoltées par centrifugation puis le culot est re-suspendu dans 1 mL du mélange glycérol – eau 50%, dans des cryotybes. Les tubes sont alors congelés rapidement à -80°C.

B.6. Construction de vecteurs de disruption/ surexpression

B.6.1. Construction des cassettes de disruption

Les cassettes de disruption sont généralement générées par deux étapes d'amplification PCR selon la méthode SEP (Maftahi *et al.*, 1996). La première étape consiste à la construction d'une cassette P-T (promoteur-terminateur). Les parties nommées promoteur (P) et terminateur (T) du gène sont situées respectivement en amont et en aval de l'ORF du gène d'intérêt. Ces deux régions, d'environ 1kb, sont amplifiées en utilisant comme patron (template) l'ADN génomique de la souche sauvage de *Y. lipolytica*, W29.

L'amplification se fait à l'aide des paires d'amorces des oligonucleotides P1/P2 (pour la partie promoteur) et T1/T2 (pour la partie terminateur). Les amorces P2 et T1 contiennent en extension le site rare de reconnaissance de la méganucléase I-SceI. Les fragments PCR, P-I-SceI et I-SceI-T, sont ensuite mélangés et utilisés comme matrice pour l'amplification PCR de la cassette P-I-SceI-T en utilisant les amorces P1 et T2. Cette cassette est ensuite clonée dans le plasmide pCR4[®]-Blunt TOPO (Invitrogen). Ce plasmide est ensuite analysé par restriction enzymatique et séquencé en utilisant les amorces universelles T6/SP7. Le plasmide portant la cassette PT et le plasmide portant le marqueur de sélection d'intérêt sont digérés par I-SceI. Après déphosphorylation du produit de digestion du plasmide PT, une ligature entre celui-ci et le marqueur de sélection (*LEU2*, *URA3* ou *hph*) est réalisée. Les plasmides résultant présentant les modules P-*URA3*-T, P-*LEU2*-T ou P-*hph*-T sont analysés par restriction enzymatique pour déterminer l'orientation du gène.

Les cassettes de disruption PUT, PLT et PHT sont générées par amplification PCR en utilisant les plasmides correspondants et les amorces P1/T2. Ces fragments PCR sont ensuite utilisés pour la disruption du gène d'intérêt par transformation de *Y. lipolytica* par la méthode de l'acétate de lithium, décrite précédemment.

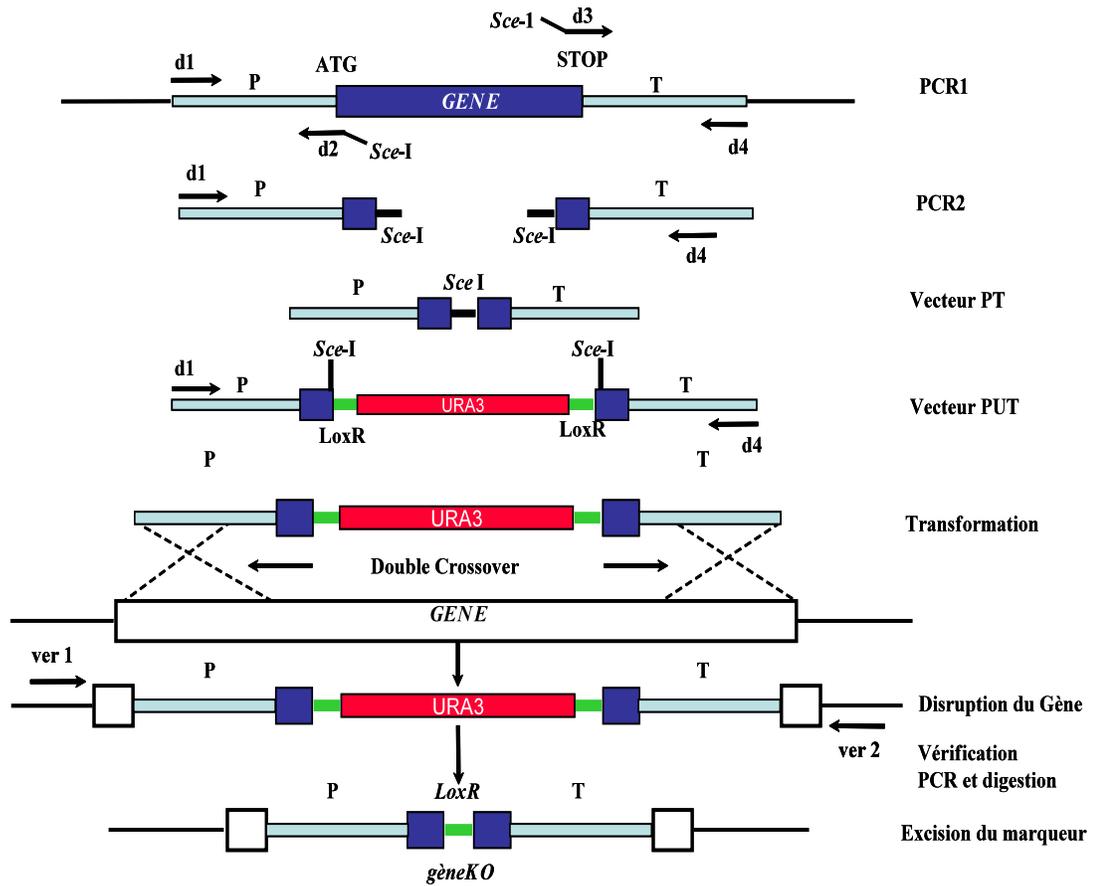


Figure III-3. Stratégie de disruption de gène : méthode *Cre lox SEP*.

Les séquences promoteur et terminateur du gène d'intérêt sont amplifiées par PCR. Les fragments PCR (P et T) présentant un site de restriction rare (*I-SceI*) sont fusionnés par PCR. Le fragment P-T est cloné. Le plasmide PT est digéré par *I-SceI* afin d'introduire le marqueur de sélection (*URA3*). La cassette PUT est amplifiée par PCR et utilisée pour la disruption du gène d'intérêt. La disruption du gène est vérifiée par PCR. Quand la disruption du gène d'intérêt a été réalisée avec un marqueur excisable, l'excision du marqueur de sélection peut être réalisée par la transformation d'un plasmide réplcatif exprimant la recombinase Cre. Le marqueur de sélection peut être de nouveau utilisé.

B.6.2. Construction de vecteurs de surexpression

La séquence génétique de la protéine d'intérêt est amplifiée par PCR en utilisant comme template la souche sauvage de *Y. lipolytica*, W29 et les oligonucléotides correspondantes. La séquence est alors incluse dans un vecteur d'expression parmi celles décrites précédemment. Le vecteur possède un gène de résistance à un antibiotique (ampicilline, kanamycine), un marqueur de sélection (*URA3*, *LEU2* ou *hph*) et un promoteur. Le gène d'intérêt peut se mettre sous le contrôle soit d'un promoteur inductible (pPOX2) soit d'un promoteur constitutif (pTEF). Le promoteur POX2, acyl-CoA oxydase 2, est fortement inductible en présence des acides gras, et moyennement en présence de glucose (Juretzek *et al.*, 2001). Après purification du plasmide, la partie bactérienne est clivée grâce aux sites de restriction *NotI* existants sur son génome (Figure III-4). La transformation de *Y. lipolytica* se fait alors par la méthode de l'acétate de lithium, décrite précédemment. Ils existent deux types d'intégration du gène : aléatoire (multicopie ou monocopie, selon le plasmide utilisé et la méthode de transformation) ou sur site (mis sous le contrôle d'un promoteur fort).

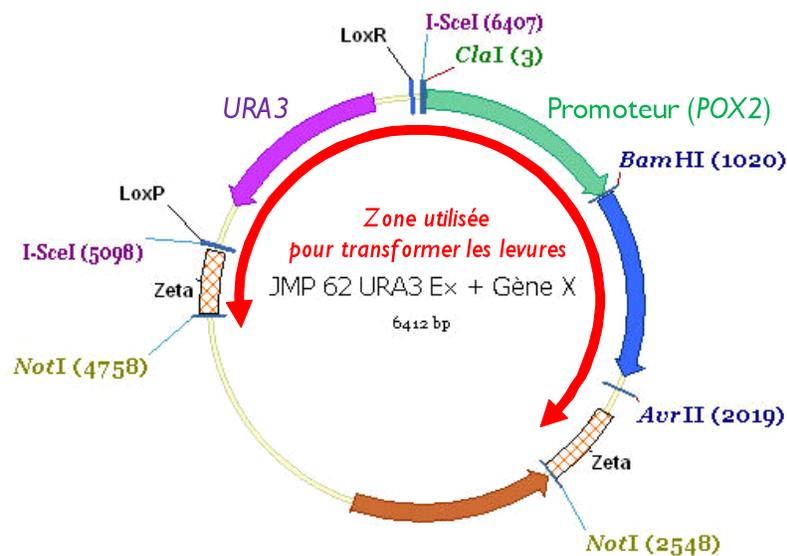


Figure III-4. Système de surexpression d'un gène chez *Y. lipolytica*. Le gène d'intérêt se met sous le contrôle d'un promoteur (par exemple POX2) dans un vecteur d'expression (ici JMP62

URA3 Ex). Après purification du plasmide, la partie bactérienne est clivée grâce aux sites de restriction *NotI*.

B.6.3. Excision du marqueur de sélection - expression de la recombinase Cre

Quand l'insertion ou la disruption du gène d'intérêt a été réalisée avec un marqueur excisable tel qu'*URA3ex*, *LEU2ex* ou *hphex*, nous pouvons exciser le marqueur par expression de la recombinase Cre : elle permet la recombinaison de sites *loxR* qui sont situés en amont et en aval du marqueur de sélection et par conséquent l'excision du marqueur (Fig.X). Les cellules de levure sont transformées par le plasmide pRRQ2 (*hp4d-cre*, *ylLEU2*) pour le marqueur d'excision *ylURA3ex* ou *hphex* ou par le plasmide pUB-CRE (*hp4d-cre*) quand les marqueurs *ylLEU2ex* ou *ylURA3ex* sont utilisés. Les transformants sont ensuite sélectionnés pour les phénotypes *Leu+* ou *HygR* sur milieu YNBura et YEAhyg, respectivement. Pour permettre l'expression de la recombinase Cre, les cellules poussent sur milieu YPD pendant 12h à partir d'une préculture YPD diluée à 1/1000. Les cellules transformées par pRRQ2 sont ensuite striées sur milieu YNBcasa, sur lequel les transformants *Leu-* sont aisément identifiables. La perte du plasmide pUB-CRE est vérifiée par des répliques sur boîtes YPD et YEAhyg.

B.6.4. Vérification de la transformation et de l'excision

La vérification de la délétion du gène d'intérêt est réalisée par PCR suivie dans certains cas, par une restriction enzymatique du produit PCR. L'utilisation des amorces Ver1 et Ver2, spécifiques du gène d'intérêt et situées à l'extérieur de la cassette de disruption, permet de vérifier la disruption correcte du gène. Pour la vérification de l'insertion d'un gène, on fait appel au même principe, en utilisant des amorces situées en amont et en aval de la partie insérée (gène + promoteur). Alternativement, l'hybridation par Southern blot est également utilisée. Dans ce cas, la sonde utilisée est soit le marqueur d'auxotrophie ou de résistance, soit un fragment du gène d'intérêt.

B.7. Conditions de culture et de croissance de souches

B.7.1. Conditions de culture

En général, la culture s'effectue selon le protocole suivant: Les souches, fraîchement décongelées, sont cultivées sur milieu solide YPD pendant 24-48h à 28°C. Une pré-culture en

milieu YPD liquide (5mL en tube, 170rpm, 28°C, 6h) est ensuite réalisée. On ensemence une seconde pré-culture à 0,05 $A_{600\text{ nm}}$ en milieu minimum (YNBD, en respectant les auxotrophies) pendant 12h (15mL en 50mL fioles Erlenmeyer, 170 rpm). Les cellules, qui sont en phase exponentielle, sont centrifugées et utilisées pour ensemencer la culture sur le milieu de choix à 0,5 $A_{600\text{ nm}}$. L'absorbance est suivi pendant toute la culture, afin de déterminer la croissance, et des prélèvements sont effectués en cours de la culture pour des analyses. Quand la culture s'effectue dans des milieux contenant des acides gras ou des huiles, trois lavages du culot avec une solution 0,5% BSA et un lavage avec une solution 9g/L NaCl sont réalisés. Pour les milieux de culture ne contenant pas des acides gras, un lavage avec la solution NaCl 9g/L est effectué.

B.7.2. Estimation de la croissance /biomasse

La croissance des cellules a été estimée par la lecture de l'absorbance à 600 nm et puis par détermination de la matière sèche. La matière sèche est déterminée après lyophilisation de cellules. Dans le cas des cultures en présence des acides gras, la culture est lavée avec les milieux décrits précédemment. La densité optique à 600 nm est ensuite mesurée.

B.8. Techniques analytiques

B.8.1. Microscopie optique

Pour la microscopie optique, 10 mL d'une culture de levures en croissance sont préfixées en rajoutant 1,34 mL de solution formaldéhyde (50mM tampon sodium phosphate, pH 6,8 ; 0,5mM MgCl₂ ; 4,8% formaldéhyde). Les cellules sont ensuite incubées pendant 1h à 28°C sous agitation forte (250 rpm). Après centrifugation, ils sont ré-suspendues dans la solution de formaldéhyde de façon à attendre 2,5 unités de D.O. à $A_{600\text{ nm}}$. Suivant une incubation pendant 5h en température ambiante, les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon sodium phosphate (50 mM, pH 6,8) et observées sous microscope. Le microscope utilisé est un Olympus BX 51 avec un objectif x100 à immersion d'huile. Les photos sont prises grâce à une appareil CoolSNAP (Photometrics), en utilisant le logiciel correspondant.

B.8.2. Coloration de cellules au rouge Nil / Microscopie de fluorescence

La coloration des cellules par le rouge Nil est réalisée dans les cellules non fixées en rajoutant 4mL d'une solution de rouge Nil dilué dans de l'acétone à 1µg/mL pour 1 mL de

culture de cellules et incubée 30 min à la température ambiante à l'obscurité. La suspension cellulaire est ensuite lavée en deux reprises avec 1 mL d'eau et ré-suspendu en tampon sodium phosphate (pH 6,8) de façon à atteindre une D.O. de 2,5 unités à $A_{600\text{ nm}}$. Les cellules sont alors observées sous le microscope équipé d'un émetteur de fluorescence (olympus BX 51) avec un objectif x100 à immersion d'huile.

B.8.3. Extraction des lipides

La méthode d'extraction des lipides est fondée sur le protocole de Folch (Folch *et al.*, 1957). Un volume de culture lyophilisé correspondant à 20 unités de D.O. à $A_{600\text{ nm}}$ est ré-suspendue en 800 μL de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v). Après dilution et centrifugation, le surnageant est récupéré et une seconde extraction sur les cellules lyophilisées est effectuée, en rassemblant les deux extraits. Suivant l'ajout à l'extrait de $\frac{1}{4}$ de son volume (=0,4ml) NaCl 9g/L (proportion volumique finale en chloroforme/méthanol/eau de 8/4/3) on mélange fortement et on centrifuge. On procède au prélèvement de la phase organique et au lavage avec 0,4ml 'artificial upper phase' (chloroforme/ méthanol/ eau; 3 :48 :47 ; v/v/v). La phase organique est alors prélevée et le solvant est évaporé sous flux d'azote. L'extrait lipidique est repris immédiatement sur le volume désirable dans de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v) ou dans de chloroforme pur.

B.8.4. Séparation des lipides

Les lipides totaux sont séparés en triglycérols (TAG) et acides gras libres (AGL) pour quantification en utilisant la méthode de séparation sur phase solide (SPE – solid phase extraction). Des colonnes d'aminopropyle (Isolute, IST, France) sont utilisées. Le conditionnement de la colonne est effectuée avec 3 mL d'hexane en flux normal. 1 mL de lipides totaux extraites selon la méthode Folch reprises en chloroforme, sont chargés sur la colonne et la fraction contenant les lipides neutres (TAG) est collectée. L'élution total des lipides neutres est effectuée en lavant la colonne avec 3 mL de chloroforme/ isopropanol (2/1 ;v/v) en trois reprises. La fraction des AGL est collectée en lavant 3 fois la colonne avec 3 mL d'acide acétique (2%) en diéthyléther. Le solvant est alors évaporé sous azote par les deux fractions, et transméthylation directe est suivi pour la quantification de fractions par chromatographie phase gazeuse (CPG). Alternativement, les fractions après évaporation peuvent être reprises en chloroforme afin de déposer sur plaques de chromatographie sur couche mince (CCM).

B.8.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits lipidiques, peuvent être directement qualitativement analysés par CCM. Ainsi, des plaques d'aluminium de chromatographie pré-enduites de gels de silice (Merck Silica Gel 60F254) sont utilisées pour analyser les différents échantillons. La plaque est activée par chauffage à 105°C pendant 30 min. La migration s'effectue en deux étapes avec deux différents mélanges de solvants. En premier, on fait migrer la demie plaque en présence de la solution suivante : éther de pétrole/ éther éthylique/ acide acétique : 20/ 20/ 0,8 (v/v/v). Après séchage, on fait migrer la totalité de la plaque en présence de la solution : éther de pétrole/ éther éthylique : 49/ 1 (v/v). La révélation des plaques est réalisée en trompant la plaque dans une solution de 5 % acide phosphomolibdique en éthanol. Les taches de différentes fractions de lipides sont visualisées après séchage à 105°C pendant 15 minutes. Alternativement, les plaques peuvent être visualisés sous ultra-violet (UV) après incubation avec de la primuline préparée à 5mg/ 100mL dans un mélange acétone/ eau (8/2 ; v/v).

B.8.6. Transméthylation des acides gras

La méthode de transméthylation des lipides est fondée sur le protocole de Browse (Browse *et al.*, 1986). L'équivalent de 10 unités de D.O. à $A_{600\text{ nm}}$ de cellules lyophilisées sont chauffées pendant 90 min à 80°C, en présence de 1 ml de solution de 2,5 % acide sulfurique en méthanol (v /v), contenant 50 µg d'acide heptadecanoic comme standard interne pour la CPG. Des tubes Pyrex en verre à bouchon Teflon sont utilisées afin d'éviter l'évaporation du solvant. Suivant l'addition de 450 µL d'hexane et 1,5 mL d'eau, les esters méthyliques des acides gras sont extraits dans la phase organique par agitation du mélange. Les tubes sont centrifugés en basse vitesse afin de faciliter la séparation de phases. La phase organique, qui est prête à être quantifiée, est alors prélevée dans des tubes Varian, spécifiques pour la CPG.

B.8.7. Chromatographie Phase Gazeuse (CPG)

L'analyse des méthyles esters des acides gras est employée sur le chromatographe Varian 3900, muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne Varian FactorFour vf-23ms, dont la spécification à 260°C est de 3pA (30m ; 0,25mm ; 0,25µm). La CPG à été également équipé d'un passeur des échantillons Varian. Les acides gras sont identifiés en comparaison avec des standards des méthyles esters commerciaux (FAME 32, FAME mix C16-

C18, FAME C4-C24, Supelco, France ; C16 :1 n-9, Cayman, France) et quantifiés grâce à la méthode d'étalon interne. L'acide gras qui a servi comme étalon interne s'agit de l'acide heptadecanoïc (C17 :0, Sigma), ajouté dans la solution de acides gras, avant transestérification, en concentration 50 µg/ mL. Pour chaque pic identifié, la concentration de ce constituant (AG_x) se calcule, alors, de la manière suivante :

$$\text{Concentration } AG_x = (\text{concentration } C17) \times (\text{Aire } AG_x / \text{Aire } C17)$$

B.8.8. Quantification et analyse des corps lipidiques (CLs)

L'analyse des corps lipidiques s'effectue par observation microscopique de cellules en différents temps de croissance d'une culture, selon la méthode précédemment décrite. Des optiques Nomarski, spécifiques pour le contraste différentiel d'interface sont utilisées pour l'obtention des images. Le nombre des corps lipidiques dans les différentes étapes de croissance est calculé à partir des images ayants de focus variable. Dix images représentatives de chaque étape de croissance sont servies pour la détermination de la taille et du nombre de CLs. L'analyse d'image est effectuée en utilisant le logiciel de développement d'image 'ImageJ' (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Physiologie de l'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica*

Les conditions de culture (paramètres physiques, composition des milieux, conduite de la culture) peuvent affecter fortement l'accumulation des lipides chez les microorganismes. La température joue sur la vitesse de croissance et sur la composition lipidique, les faibles températures favorisant l'accumulation d'acides gras insaturés. Les modifications du pH peuvent orienter le métabolisme vers la production d'acides gras ou de métabolites secondaires (par exemple le citrate). La composition du milieu et le mode de culture sont très importants. Nous avons défini des milieux de culture contenant du glucose ou du glycérol permettant l'accumulation *de novo* des lipides, ou contenant de l'acide oléique, permettant leur accumulation *ex novo* des lipides. Nous avons également établi les conditions expérimentales pour suivre l'accumulation et la réconsommation des lipides.

A.1 Modes de culture affectant la production de lipides

Le mode de culture permet d'obtenir des niveaux d'accumulation très différents. Trois types de modes de culture sont couramment utilisés : culture en batch, cultures en continu et culture en 'fed-batch'. Il est établi que le mode 'fed-batch' permet d'atteindre des concentrations en biomasse élevées et des teneurs en lipides importantes (Papanikolaou et Aggelis, 2003a). Ce mode de conduite permet d'induire des changements de métabolisme (par exemple en provoquant une carence en azote, ou en ajoutant des lipides) au cours de la culture pour favoriser l'accumulation des lipides. La culture en mode continu peut aussi permettre d'obtenir des concentrations élevées en biomasse et des teneurs en lipides importantes. Toutefois l'obtention d'une culture stable est délicate et longue à obtenir, et ce mode n'est pas adapté pour l'étude des nombreuses souches génétiquement modifiées. Les conditions de culture en mode 'batch' sont fixées en début de culture (choix des substrats, rapport C/N, pH). Ce mode ne permet pas d'intervenir facilement au cours de la culture. Il est donc évident qu'avec ce mode de culture on obtient des niveaux d'accumulation réduits, mais c'est en revanche un outil efficace et rapide pour comparer les capacités d'accumulation et de réconsommation des nombreuses souches tout en gardant des conditions expérimentales identiques.

A.2 La modification génétique

La régulation des conditions physiologiques et le choix du mode de conduite de la culture peuvent faire varier la teneur lipidique d'un microorganisme, mais par contre ne modifient pas le **'potentiel d'accumulation'** d'une souche. Pour augmenter le potentiel d'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica* nous avons entrepris une approche **'d'ingénierie génétique'** portant sur la manipulation des voies métaboliques, par délétion ou surexpression de gènes impliqués dans ces voies. En parallèle une analyse fonctionnelle des enzymes - clés de ces voies a été réalisée afin de préciser leur rôle respectif dans la production des lipides.

B. Etude de l'accumulation de lipides chez la souche sauvage de *Y. lipolytica*

Afin d'évaluer les effets des modifications génétiques sur le métabolisme des souches, le plan d'expérimentation suivant a été établi: (i) criblage sur des milieux modèles solides comprenant différentes sources de carbone et analyse phénotypique, (ii) étude de la cinétique de croissance en milieux modèles liquides, (iii) étude fine des levures ayant poussé sur différentes sources de carbone (détermination de la biomasse, analyse quantitative et qualitative des lipides et acides gras accumulés en fonction du temps, étude de l'ultrastructure des corps lipidiques par microscopie optique), (iv) séparation des lipides en sous - classes (AGL, TAG, ES) et analyse quantitative et qualitative de chacune (v) observation des corps lipidiques (CL) au cours de l'accumulation (nombre, morphologie).

Au laboratoire, l'étude de l'effet des modifications génétiques a été réalisée en fiole (mode batch). Afin de confirmer les résultats expérimentaux et d'estimer les potentialités biotechnologiques de certaines souches, des études en fermenteur (mode fed-batch) ont été réalisées par Julien Cescut dans l'équipe dirigée par Carole Molina-Jouve à l'INSA de Toulouse.

B.1 Souches de référence

Afin de disposer de valeurs de paramètres de culture favorisant soit la production de lipides *de novo*, soit l'accumulation *ex-novo*, des milieux de culture standardisés ont été choisis et des cultures en mode batch ont été réalisées avec la souche sauvage afin de créer une base de données de référence.

Nous avons tout d'abord testé la croissance, étudié la production et déterminé la composition des lipides chez la souche sauvage française de *Y. lipolytica* W29 (Barth et Gaillardin, 1996) et chez la souche JMY330. La souche Po1d est issue de la souche W29 par modification génétique; délétion partielle du gène *LEU2* par la méthode 'POP-IN/POP-OUT' conférant l'auxotrophie pour la leucine (allèle *leu2-270*), délétion du gène *URA3* conférant l'auxotrophie pour l'uracile (allèle *ura3-302*), et délétion du gène codant pour la protéase alcaline extracellulaire (allèle *xpr2-322*). La souche Po1d est donc Leu^- , Ura^- . Pour introduire des modifications génétiques, nous utilisons principalement le marqueur *URA3*. Les souches modifiées sont donc en général, Leu^- , Ura^+ . C'est pourquoi nous utilisons la souche JMY330 qui dérive de la souche Po1d après transformation avec le marqueur *URA3*. C'est notre souche

témoin dite ‘sauvage’, en fait de même phénotype Leu^- , Ura^+ que les souches modifiées, utilisée comme contrôle avec W29 et Po1d selon les conditions de culture. Il est évident que les milieux de culture sont complétés en fonction des auxotrophies

B.2 Milieux de référence

La culture est réalisée à partir d'étalements sur des milieux solides YPD, suivis d'une préculture dans un milieu YPD liquide permettant la production de biomasse. Deux milieux principaux ont été choisis favorisant soit la synthèse (*de novo*), soit l'accumulation (synthèse *ex-novo*).

Milieux de synthèse (favorisant la synthèse *de novo*): un milieu minimum YNB(YE) contenant comme source de carbone soit 2% de glucose ou de glycérol, supplémenté avec une faible concentration d'extrait de levure (0,1%).

Milieux d'accumulation (favorisant la synthèse *ex novo*): il s'agit d'un milieu minimum YNB(YE) contenant 3% d'acide oléique pour l'accumulation des lipides, supplémenté avec une faible concentration d'extrait de levure (0,1%).

L'excès de carbone dans le milieu (par rapport à l'azote) induit rapidement la limitation en azote, ce qui déclenche l'accumulation des lipides. La composition exacte des milieux est donnée dans la partie Matériels et Méthodes.

B.3 Etude de la croissance des souches ‘sauvages’

Les cultures sont réalisées à 28°C en fioles de 500 ml, contenant 50 ml de milieu sélectif afin de permettre l'aération efficace des cellules, avec une densité optique (D.O.) initiale des cellules à 0,5 à 600 nm. Des prélèvements sont effectués au cours de la culture pour analyser la croissance (production de biomasse) et l'accumulation de lipides produits pendant les différentes phases de culture.

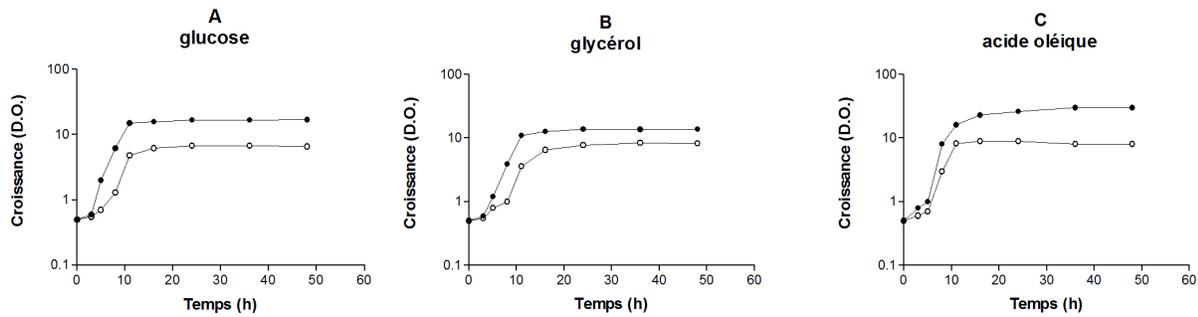


Figure IV-1. Cinétiques de culture des souches sauvages W29 (●) et JMY330 (○) en milieu minimum YNB(YE) contenant comme source de carbone : 2% glucose (A), 2% glycérol (B) et 3% acide oléique (C). La culture est réalisée à 28°C dans des fioles de 500 ml contenant 50 ml de milieu.

La souche W29 présente une plus forte croissance que la souche JMY330, et ce quelque soit le milieu. Cette différence est à attribuer au fait que la souche JMY330 est auxotrophe pour la leucine, mais l'addition de cet acide aminé (de 0,1 à 10 g/l) n'a pas permis de restaurer complètement la croissance de la souche JMY330. Par contre, la complémentation de l'auxotrophie pour la leucine permet d'obtenir une courbe de croissance similaire à celle de W29, d'où l'importance de rendre les souches prototrophes pour les études de fermentation. Le passage de la phase exponentielle de croissance à la phase stationnaire (accumulation de lipides) se produit à environ 11h de culture, quelle que soit la source de carbone. La limitation en azote en milieu YNB est indépendante de la source de carbone dans ces conditions.

B.4 Etude de l'accumulation des lipides des souches 'sauvages'

Afin de normaliser nos résultats de détermination de biomasse et de lipides totaux, nous avons décidé de faire chaque analyse de lipides sur l'équivalent de 10 D.O. de levures. La teneur en lipides de souches sauvages, exprimée en pourcentage de poids sec (P.S.) est présentée dans la figure IV-2.

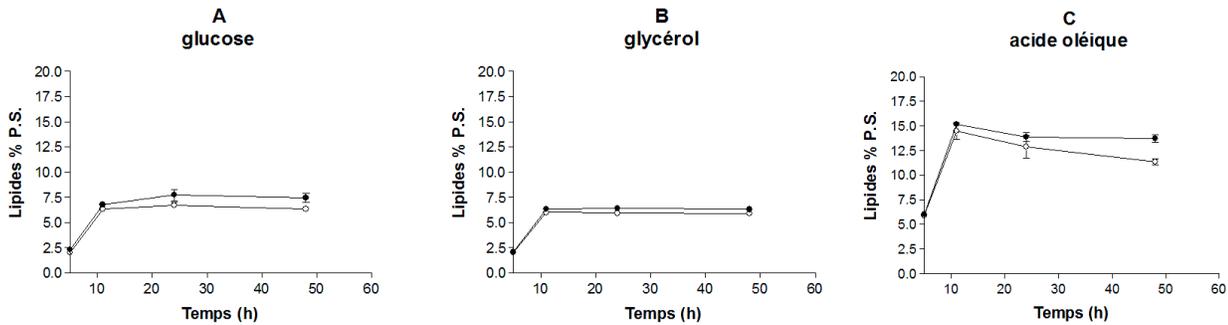


Figure IV-2. Accumulation des lipides chez les souches sauvages W29 (●) et JMY330 (○) en milieu minimum YNB(YE) contenant comme source de carbone : 2% glucose (A), 2% glycérol (B) et 3% Acide oléique (C) respectivement. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expérimentations indépendantes. La culture est réalisée à 28°C dans des fioles de 500 ml contenant 50 ml de milieu.

Les deux souches accumulent les lipides de manière très semblable, avec un maximum d'accumulation après 11h de culture. Par la suite, le contenu en lipides des souches reste constant pendant la première partie de la phase stationnaire (jusqu'à 24h) et puis diminue (figure IV-2). Ceci est vraisemblablement dû à la dégradation des lipides par β -oxydation peroxysomale, induite par la limitation des ressources de carbone dans le milieu. La dégradation est notable dans le cas où les levures sont cultivées en présence d'acide oléique. Ainsi, en milieu oléique les levures accumulent après 11 heures 2,5 fois plus de lipides qu'en milieu glucose, et deux fois plus en fin de culture (48h). On peut remarquer que la souche JMY330 a tendance à dégrader plus vite ses réserves lipidiques, ce qui est très marqué dans le cas de la culture en acide oléique (figure IV-2C). On pourrait expliquer ce comportement par le fait que la souche W29 arrive plus tard en phase stationnaire (voir figure IV-1C).

En ce qui concerne le taux d'accumulation, la souche sauvage cultivée en fiole en présence de sucres comme source de carbone accumule jusqu'à 7,5 % (g/g) de lipides. Dans de milieu contenant l'acide oléique le contenu maximal des souches en lipides atteint le 15 % du poids sec. Des valeurs très similaires ont été obtenues en mode batch par différentes équipes (Papanikolaou *et al.*, 2002). Par contre, le contenu maximal en lipides obtenu en fiole est nettement inférieur à ce qui peut être obtenu en mode fed-batch. En effet, dans la bibliographie,

l'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica* peut atteindre 36 % (g/g) (Ratledge, 1989). Ce résultat a été amélioré à l'INSA de Toulouse, où des taux proches de 40 % ont été obtenus (Cescut, 2009)

B.5 Etude du profil lipidique des souches sauvages

L'analyse de la composition globale des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet de déterminer le profil lipidique dans nos milieux-modèles.

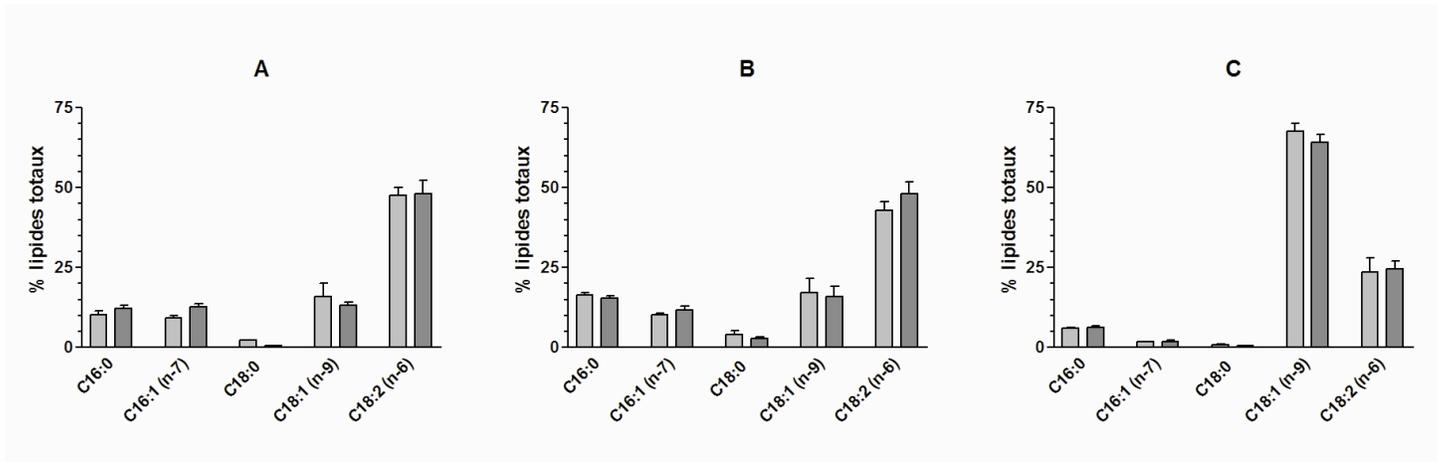


Figure IV-3. Composition lipidique des souches W29 (gris clair) et JMY330 (gris foncé) après 24h de culture en milieu minimum YNB(YE) contenant comme source de carbone : 2% glucose (A), 2% glycérol (B) et 3% Acide oléique (C) respectivement. Les résultats sont donnés en pourcentage de lipides totaux, et ce à partir de trois expérimentations indépendantes.

La composition en acides gras de la souche JMY330 n'est pas affectée par l'auxotrophie. Quand le glucose est la source de carbone, *Y. lipolytica* tend à produire (synthèse *de novo*) majoritairement de l'acide linoléique (C18 :2) et les taux d'accumulation de lipides (%) sont en accord avec ceux de la littérature (tableau IV-1).

Tableau IV-1. Composition lipidique des acides gras accumulées par la levure *Y. lipolytica* en fermenteur (Ratledge, 1994) et en mode batch (expérimentale) en présence de glucose comme source de carbone.

Acide Gras	C16 :0	C16 :1	C18 :0	C18 :1	C18 :2
% des lipides totaux fermenteur	11 - 16	6 - 10	0 - 2	20 -30	40 - 60
% des lipides totaux fiole	10 - 12	8 - 12	0 - 2	12 - 20	45 - 55

En présence de glycérol, la composition en acides gras insaturés (acide palmitique et stéarique) est un peu plus élevée. Par contre, lors d’une culture en milieu d’accumulation, la levure accumule directement l’acide oléique du milieu, qui représente jusqu’à 70 % de lipides totaux (figure IV-3.C). La quantité des autres lipides, produits de la synthèse *de novo*, diminue (Tableau IV-2).

Tableau IV-2. Profil lipidique des acides gras accumulés par la levure *Y. lipolytica* en fermenteur (Cescut, 2009) en présence de l’acide oléique comme source de carbone

Acide Gras	C16 :0	C16 :1	C18 :0	C18 :1	C18 :2
% des lipides totaux	6-8	1-3	0-1	65-70	12-20

B.6 Répartition des lipides des souches sauvages par classes

Les proportions relatives des différentes classes de lipides (esters de stérols, acides gras libres, TAG) ont été estimées après séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) de lipides extraits à partir de levures cultivées dans différents milieux.

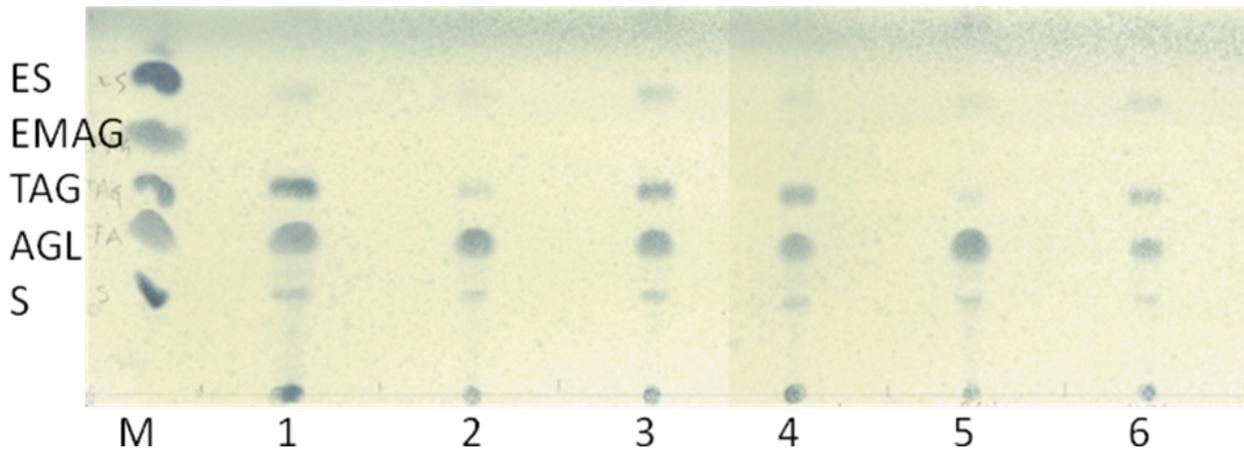


Figure IV-4. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) de lipides extraits à partir de 10 unités de DO de culture : Esters de stérols (ES), Esters méthyliques des acides gras (EMAG), triglycérides (TAG), acides gras libres (AGL) et stérols (S). M ; standards, Lipides à 11h, 24h et 48h pour la souche JMY330 (1, 2, 3) et W29 (4, 5, 6) respectivement.

On détecte dans ces conditions 4 classes de lipides. Il s'agit principalement de TAG et d'acides gras libres (AGL), ainsi que, dans une moindre mesure, de stérols et d'esters de stérols, et ce dans des proportions très similaires pour les deux souches. Au fur et à mesure du temps de culture, on observe une diminution des AGL et une augmentation des TAG. Après 24h de culture, la plupart des lipides sont sous forme libre. *Y. lipolytica* arrive à accumuler une forte quantité d'acides gras libres, sans qu'ils soient toxiques pour la cellule, contrairement à *S. cerevisiae* (Guerzoni *et al.*, 2001a). Au bout de 48 h de culture, les quantités de TAG et d'AGL sont de nouveau équivalentes.

Étant donné que les compositions en lipides et en acides gras ne sont pas affectées par l'auxotrophie de la souche JMY330, nous avons choisi de continuer nos travaux en utilisant la souche JMY330 comme souche 'sauvage' de référence. Les points retenus pour le suivi des cultures se situent à 11h ce qui correspond au point de passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire, puis à 24h où le stockage des lipides est maximal et enfin à 48h où la carence en carbone obligent les souches à consommer leurs réserves lipidiques en utilisant la voie de β -oxydation.

C. Étude comparative de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides

L'objectif de ce travail est l'obtention de levures dont on aura amélioré la capacité de production et de stockage de lipides en modifiant l'expression de gènes sélectionnés. Une étude comparative de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez *Y. lipolytica* (levure oléagineuse) et chez *S. cerevisiae* (levure non oléagineuse) a été réalisée *in silico* afin d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans le développement du caractère oléagineux. Les gènes impliqués dans l'accumulation et la mobilisation des lipides chez les levures ont été récemment décrits par Czabany et collaborateurs (Czabany *et al.*, 2007). Les séquences protéiques de *S. cerevisiae* (yeastgenome.org) ont été comparées à celles de *Y. lipolytica* à l'aide du programme Blast (Altschul *et al.*, 1997) (cbi.labri.fr/genolevures/). Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau VI-3. Le code de chaque gène est suivi du nom du gène chez *S. cerevisiae* et celui utilisé chez *Y. lipolytica*. Le numéro EC et la fonction enzymatique sont également indiqués.

TABLEAU IV-3. Gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*

gène	Nom SC	Nom YL	Numéro EC	Fonction
<i>GUT1</i>	YHL032c	YALI0F00484g	EC 2.7.1.30	Glycérol kinase
<i>GPD1</i>	YDL022w	YALI0B02948g	EC 1.1.1.18	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (NAD(+))
<i>GPD2</i>	YDL059w		EC 1.1.1.18	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (NAD(+))
<i>GUT2</i>	YIL155c	YALI0B13970g	EC 1.1.99.5	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
<i>SCT1</i>	YBL011w	YALI0C00209g	EC 2.3.1.15	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
<i>GPT2</i>	YKR067w		EC 2.3.1.15	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
<i>SLC1</i>	YDL052c	YALI0E18964g	EC 2.3.1.51	1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase
<i>PAP</i>	YMR165c	YALI0D27016g	EC 3.1.3.4	Phosphatidate phosphatase
<i>DGA1</i>	YOR245c	YALI0E32769g	EC 2.3.1.20	Diacylglycérol acyltransférase
<i>LRO1</i>	YNR008w	YALI0E16797g	EC 2.3.1.158	Phospholipid:diacylglycérol acyltransférase
<i>TGL3</i>	YMR313c	YALI0D17534g	EC 3.1.1.3	Triacylglycérol lipase
<i>TGL4</i>	YKR089c	YALI0F10010g	EC 3.1.1.3	Triacylglycérol lipase
<i>TGL5</i>	YOR081c		EC 3.1.1.3	Triacylglycérol lipase
<i>ARE1</i>	YCR048w	YALI0F06578g	EC 2.3.1.26	Acyl-CoA:stérol acyltransférase
<i>ARE2</i>	YNR019w	YALI0D07986g	EC 2.3.1.26	Acyl-CoA:stérol acyltransférase
<i>TGL1</i>	YKL140w	YALI0E32035g	EC 3.1.1.13	Cholesterol estérase
<i>POX1</i>	YGL205w	YALI0E32835g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>POX2</i>		YALI0F10857g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>POX3</i>		YALI0D24750g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>POX4</i>		YALI0E27654g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>POX5</i>		YALI0C23859g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>POX6</i>		YALI0E06567g	EC 6.2.1.3	Acyl-coenzyme A oxydase
<i>MFE1</i>	YKR009c	YALI0E15378g	EC 4.2.1.74	Protéine multifonctionnelle de β -oxydation
<i>POT1</i>	YIL160c	YALI0E18568g	EC 2.3.1.16	Oxoacyl- thiolase peroxysomale
<i>ACL1</i>		YALI0E34793g	EC:2.3.3.8	ATP citrate lyase, sous-unité a
<i>ACL2</i>		YALI0D24431g	EC:2.3.3.8	ATP citrate lyase, sous-unité b
<i>MAE1</i>	YKL029c	YALI0E18634g	EC 1.1.1.38	Enzyme malique
<i>ACC1</i>	YNR016C	YALI0C11407g	EC 6.4.1.2	Acetyl-CoA carboxylase

Données bioinformatiques obtenues des bases de données : Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) et Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>).

Tous les gènes de *S. cerevisiae*, ont des homologues chez *Y. lipolytica*. Par contre, certains gènes sont retrouvés uniquement chez *Y. lipolytica*. C'est le cas de l'ATP citrate lyase, enzyme responsable de la production de l'acyl-CoA, précurseur de synthèse des acides gras (dont l'expression est régulée par la quantité d'azote intracellulaire) qui est codée par deux gènes (*ACL1* et *ACL2*). Pour certaines activités enzymatiques, le nombre de gènes varie selon le microorganisme. Chez *Y. lipolytica*, les acyl-CoA oxydases forment une famille multigénique comportant six gènes (*POX1* à *POX6*), contrairement à *S. cerevisiae* qui n'a qu'un seul gène (*POX1*). Le nombre de ces enzymes illustre une grande spécialisation par rapport aux substrats à oxyder, ce qui permet à *Y. lipolytica* d'utiliser différents substrats hydrophobes. Par contre, *S. cerevisiae* exprime trois gènes codants pour des TAG lipases, probablement pour assurer une hydrolyse efficace des lipides neutres.

En conclusion, cette étude montre que les voies métaboliques semblent bien conservées entre les deux levures et permet d'identifier les gènes cibles à modifier.

C.1 Définition des approches mises en œuvre pour l'ingénierie métabolique

Deux approches ont été envisagées afin de modifier la teneur lipidique d'une souche. La première porte sur la modification de la direction des flux de carbone entre les voies de biosynthèse et de dégradation. La deuxième approche consiste à moduler le taux d'expression de certaines enzymes participant à l'accumulation lipidique, afin de déterminer si elles sont limitantes. En parallèle, une étude fonctionnelle basée sur la construction de souches invalidées (simples et multiples) et sur la surexpression de certaines gènes est réalisée pour approfondir nos connaissances fondamentales des enzymes clés (activité, spécificité de substrat, etc...)

Chez les levures, les acyl-CoA peuvent être estérifiés soit sur des stérols ce qui produit des esters de stérols (ES), soit sur les fonctions alcools du squelette glycérol permettant la formation de TAG (voie du glycérol). Le profil de lipides neutres de *Y. lipolytica*, contrairement à celui de *S. cerevisiae* indique que le métabolisme de *Y. lipolytica* est orienté vers la voie du glycérol. En effet, les esters de stérols représentent moins de 2% de lipides totaux chez *Y. lipolytica* (Mlickova *et al.*, 2004) contre une valeur atteignant 50 % chez *S. cerevisiae* (Daum *et al.*, 1998). La disponibilité du glycérol-3-phosphate (G-3-P) semble donc être un facteur crucial pour la formation des TAG.

Le glycérol-3-phosphate se situe au carrefour des voies de synthèse des TAG et de la dégradation énergétique, car il peut être converti en DHAP et puis poursuivre sa dégradation *via* la glycolyse et le cycle de Krebs. Le gène *GUT2* codant la glycérol-3-phosphate déshydrogénase assume la responsabilité de diriger le flux du glycérol du métabolisme des lipides vers la glycolyse. Le glycérol est utilisé comme squelette d'acylation dans la synthèse de lipides afin de produire les TAG. Le glycérol-3-phosphate peut soit dériver directement du glycérol, soit être obtenue par conversion (oxydation) du DHAP. Cette dernière réaction est réversible, chaque direction étant catalysée par un isomère spécialisé de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase : l'enzyme codée par *GPD1* catalyse la production du G-3-P à partir du DHAP, celle codée par *GUT2* catalyse la réaction inverse (figure IV-5).

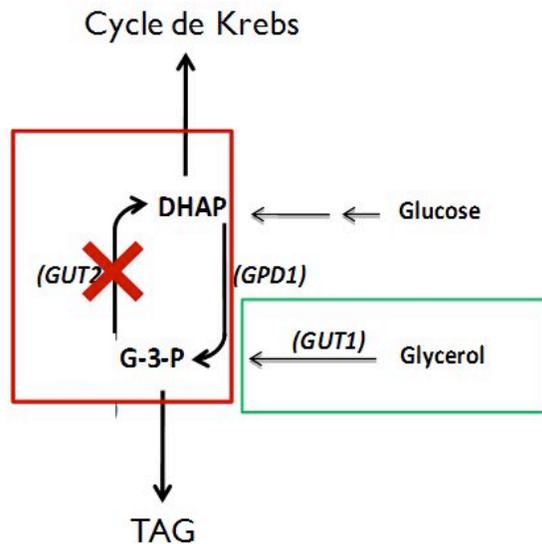


Figure IV-5. Représentation de gènes impliqués sur dans l'interconversion réversible du G-3-P et du DHAP chez *Y. lipolytica*. La délétion du gène *GUT2*, dont le produit catalyse la réaction menant du G-3-P vers le DHAP, pourrait augmenter le taux et la disponibilité du substrat initial de la synthèse de TAG. *GPD1* : YALI0B02948g ; *GUT2* : YALI0B13970g ; *GUT1* : YALI0F00484g (voir tableau IV-3).

Nous avons choisi d'inactiver le gène *GUT2*, codant la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, qui catalyse la conversion du G-3-P en DHAP, afin d'augmenter le taux et la disponibilité de G-3-P dans la cellule. L'objectif était de diriger le flux de carbone vers la

biosynthèse plutôt que la biodégradation (*une vue d'ensemble sur la voie de Kennedy et les enzymes impliquées a été présentée dans l'introduction*). Nous avons également choisi de jouer sur la reconsommation. Nous avons le choix de modifier le flux au niveau de TAG lipases (*TGL1, TGL3, TGL4*) ou bien de bloquer la voie de dégradation des acides gras (β -oxydation). C'est cette dernière possibilité que nous avons choisie.

C.2 Effet de la modification des flux sur l'accumulation de lipides

La souche chez laquelle le gène *GUT2* a été inactivé ($\Delta gut2$), n'est plus capable d'utiliser le glycérol comme source de carbone. Sur glucose la souche $\Delta gut2$ accumule environ 7 % de lipides (1,2 fois plus que la souche sauvage), mais sur milieux d'accumulation, ce chiffre est porté à 32 %, soit 2,6 fois plus que la souche sauvage. Cultivée sur l'acide oléique ultra pur, la souche $\Delta gut2$ est capable d'accumuler jusqu'à 70 % de lipides. Cette différence pourrait s'expliquer par une balance énergétique favorable, car dans un milieu ne contenant que de l'acide oléique le substrat est directement incorporé et stocké sous une forme non modifiée. Cependant, cette souche reconsomme ses réserves lipidiques en entrant dans la phase stationnaire.

De manière à continuer d'améliorer l'accumulation de lipides et afin de bloquer leur reconsommation, le gène *GUT2* a été inactivé dans la souche ayant subi au préalable l'inactivation des 6 gènes *POX* qui codent les acyl-CoA oxydases catalysant la première étape de la β -oxydation. La souche obtenue, dénommée $\Delta gut2\Delta pox1-6$, continue à accumuler des lipides dans la phase stationnaire et est incapable de dégrader ses réserves. La souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ peut accumuler jusqu'à 42 % de lipides, soit 3,5-fois plus que la souche sauvage et 1,3-fois plus que la souche $\Delta gut2$, du fait du blocage de la mobilisation de ses réserves lipidiques.

La constructions des souches $\Delta gut2$, $\Delta gut2\Delta pox1-6$ a permis d'obtenir des levures ayant un phénotype «obèse», présentant une accumulation accrue de lipides (supérieur à 42 % du poids sec). La composition des acides gras accumulés peut varier considérablement en fonction de la source de carbone. Les deux souches construites présentent une forte accumulation d'acides gras insaturés, surtout d'acide oléique (C18 :1) et d'acide linoléique (C18 :2), dont le ratio dépend du milieu de culture. L'analyse des classes de lipides a également démontré que *Y. lipolytica* est capable d'accumuler des quantités importantes d'acides gras libres (jusqu'à 30 % des lipides

totaux), sans perturber sa croissance. *Y. lipolytica* peut survivre en accumulant des grandes quantités d'acides gras libres, considérés généralement comme toxiques.

De plus, nous avons constaté que la souche $\Delta gut2$ était capable d'accumuler un acide gras spécifique, le C16 :1(n-9), qui est un dérivé de β -oxydation incomplète de l'acide oléique. Cet acide gras raccourci est accumulé à la fois dans la fraction acides gras libres et dans la fraction TAG, ce qui signifie qu'il sort des peroxysomes pour aller dans le cytosol et se dirige vers la voie de synthèse de TAG. Curieusement, le C16 :1(n-9) n'est pas dégradé ultérieurement, puisque on ne trouve pas de C14 :1 (n-9), ce qui démontre un effet de la délétion du gène *GUT2* sur la β -oxydation.

En parallèle, une étude morphologique des CL au cours du temps a été réalisée, démontrant que selon la capacité d'accumulation de la souche et le type des acides gras accumulés, le nombre, la forme et la taille des CL varient. Chez la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$, les réserves lipidiques sont trouvées dans des corps lipidiques peu nombreux et de grand diamètre, contrairement à la souche $\Delta gut2$ qui présente de nombreuses inclusions de petit diamètre. Cette différence pourrait s'expliquer soit par la teneur en lipides augmentée chez la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$, qui pourrait conduire à la coalescence des CL, soit par une différence dans la nature des lipides stockés.

C.3 Publication VI

Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*

Athanasios Beopoulos, Zuzana Mrozova, France Thevenieau, Marie-Thérèse Le Dall,
Ivan Hapala, Seraphim Papanikolaou, Thierry Chardot, and Jean-Marc Nicaud

Titre en Français: Le contrôle de l'accumulation de lipides chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Résumé : La comparaison génomique de *Yarrowia lipolytica* et de *Saccharomyces cerevisiae* indique que le métabolisme de *Y. lipolytica* est orienté vers la voie du glycérol. Afin de rediriger les flux de carbone vers la synthèse des lipides, le gène *GUT2*, qui code un des isomères de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, a été invalidé chez *Y. lipolytica*. Le mutant $\Delta gut2$ présente une augmentation d'un facteur trois de l'accumulation de lipides par rapport à la souche sauvage. Toutefois, la mobilisation des lipides de réserve par la voie de la β -oxydation survient dès la sortie de la phase exponentielle. *Y. lipolytica* possède six acyl-coenzyme A oxydases (AOX), codées par les gènes *POX1* à *POX6*, qui catalysent l'étape limitant de la β -oxydation peroxysomale. L'invalidation successive des gènes *POX1* à *POX6* dans la souche $\Delta gut2$ a conduit à une augmentation de l'ordre d'un facteur quatre de l'accumulation des lipides par rapport à la souche sauvage. La composition lipidique de l'ensemble des souches testées démontre une forte proportion d'acides gras libres. La taille et le nombre des corps lipidiques dépendent du niveau d'accumulation des lipides et de leur composition.

Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*[∇]

Athanasios Beopoulos,^{1,2,3} Zuzana Mrozova,^{1,2,4} France Thevenieau,^{1†} Marie-Thérèse Le Dall,¹
 Ivan Hapala,⁴ Seraphim Papanikolaou,³ Thierry Chardot,² and Jean-Marc Nicaud^{1*}

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France¹; Laboratoire de Chimie Biologique, INRA, UMR206, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, 78850 Thiverval-Grignon, France²; Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece³; and Institute of Animal Biochemistry and Proc Genetics, Slovak Academy of Sciences, Moyzesova 61, Ivanka pri Dunaji 900 28, Slovakia⁴

Received 24 June 2008/Accepted 17 October 2008

A genomic comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae* indicates that the metabolism of *Y. lipolytica* is oriented toward the glycerol pathway. To redirect carbon flux toward lipid synthesis, the *GUT2* gene, which codes for the glycerol-3-phosphate dehydrogenase isomer, was deleted in *Y. lipolytica* in this study. This $\Delta gut2$ mutant strain demonstrated a threefold increase in lipid accumulation compared to the wild-type strain. However, mobilization of lipid reserves occurred after the exit from the exponential phase due to β -oxidation. *Y. lipolytica* contains six acyl-coenzyme A oxidases (Aox), encoded by the *POX1* to *POX6* genes, that catalyze the limiting step of peroxisomal β -oxidation. Additional deletion of the *POX1* to *POX6* genes in the $\Delta gut2$ strain led to a fourfold increase in lipid content. The lipid composition of all of the strains tested demonstrated high proportions of FFA. The size and number of the lipid bodies in these strains were shown to be dependent on the lipid composition and accumulation ratio.

The oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* is one of the most extensively studied “nonconventional” yeasts. This yeast is able to accumulate large amounts of lipids (in some cases, more than 50% of its dry weight [DW]) (26). Several technologies including different fermentation configurations have been applied for single-cell oil production by strains of *Y. lipolytica* grown on various agro-industrial by-products or wastes (i.e., industrial fats, crude glycerol, etc.) (10, 23). Potential applications of these processes are targeting the production of reserve lipids with a specific structure and/or composition. These include (i) oils enriched in essential polyunsaturated FA as potential nutritional complements, (ii) lipids showing composition similarities to cocoa butter, and (iii) nonspecific oils destined for use as renewable starting materials for the synthesis of biofuels. Accordingly, increased research interest has focused on genetic and metabolic engineering approaches to “construct” yeast strains to be used as cell factories for storing and producing huge amounts of oil with an attractive FA composition (10).

Y. lipolytica is able to utilize hydrophobic substrates (e.g., alkanes, FA, and oils) efficiently as a sole carbon source (5, 10). Its superior capacity to accumulate lipids when grown on these substrates is probably related to protrusions formed on cell surfaces, facilitating the uptake of hydrophobic substrates from the medium (21). Internalized aliphatic chains can be either

degraded for growth requirements or accumulated in an unchanged or a modified form (10). Storage molecules such as triglycerides (TAG) and steryl esters (SE) are not suitable for integration into phospholipid bilayers. Therefore, they cluster to form the hydrophobic core of so-called lipid bodies (LB). Originally, LB were considered only as a depot of neutral lipids which can be mobilized under starving conditions. However, the view of the LB as a simple storage compartment, excluded from any metabolic process, had to be revised since many of its proteins were identified as enzymes involved in lipid metabolism, especially in TAG synthesis and degradation. Recently, a lipid binding protein identified in *Y. lipolytica* LB (2, 9) was shown to be involved in lipid trafficking between cytoplasm and LB. This indicates that LB are probably capable of accommodating free FA (FFA) as well (2, 6, 21, 23).

In yeasts, TAG synthesis follows the Kennedy pathway (15). FFA are activated to coenzyme A (CoA) and used for the acylation of the glycerol backbone to synthesize TAG. In the first step of TAG assembly, glycerol-3-phosphate (G3P) is acylated by G3P acyltransferase (*SCT1*) to lysophosphatidic acid (LPA), which is then further acylated by LPA acyltransferase (*SLC1*) to phosphatidic acid (PA). This is followed by dephosphorylation of PA by PA phosphohydrolase (PAP) to release diacylglycerol (DAG). In the final step, DAG is acylated either by DAG acyltransferase (*DG41* with acyl-CoA as an acyl donor) or by phospholipid DAG acyltransferase (*LRO1* with glycerophospholipids as an acyl donor) to produce TAG (Fig. 1 and Table 1) (8, 28).

Degradation of FA in yeasts occurs via the β -oxidation pathway, a multistep process requiring four different enzymatic activities. Enzyme localization is restricted to peroxisomes in yeasts, whereas in mammals these reactions are located in both mitochondria and peroxisomes. Mobilization of accumulated lipids occurs as a consequence of three different metabolic

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, INRA Centre de Grignon, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France. Phone: 33 01 30 81 54 50. Fax: 33 01 30 81 54 57. E-mail: jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr.

† Present address: Oxyrane UK Ltd., Greenheys House, Manchester Science Park, 10 Pencroft Way, Manchester M15 6JJ, United Kingdom.

[∇] Published ahead of print on 24 October 2008.

C.4 Valorisation de résultats

Après l'obtention des résultats présentés précédemment, notamment dans l'article publié dans AEM, une demande de brevet associant le CNRS et l'INRA et intitulée «nouvelles souches de levures mutantes capables d'accumuler une grande quantité de lipides» a été déposée en juillet 2008 sous le numéro de publication BIF 117612FR.

La culture des souches génétiquement modifiées ($\Delta gut2$, $\Delta gut2\Delta pox1-6$) en mode fed-batch sur glucose a été réalisée à l'INSA de Toulouse par Julien Cescut au laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des procédés (LISBP) sous la direction de Carole Jouve et de Jean-Louis Uribe Larrea. En ce qui concerne la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$, l'amélioration des performances par rapport à la souche sauvage est de 24 % au niveau du rendement et de 20 % au niveau de la productivité.

D. Le rôle des acyltransférases dans l'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica*

Selon les résultats de notre études sur l'accumulation des lipides, il apparait qu'une souche ayant une disponibilité en squelette de glycérol élevé (délétion du gène *GUT2*) présente une vitesse d'accumulation et une teneur en lipides améliorées. Par contre, la formation des TAG serait la résultante de trois facteurs : la disponibilité du glycérol-3-phosphate, la vitesse de synthèse des acyl-CoA et la vitesse d'estérification du squelette de glycérol. Les souches inactivées pour *GUT2* accumulent des grandes quantités d'acides gras libres, suggérant que les facteurs limitants pourraient être la vitesse d'estérification du glycérol, la disponibilité des acyltransférases ou leur spécificité vis-à-vis de l'acyl-CoA. Une autre possibilité serait que les lipases soient plus efficaces que les acyltransférases, résultant en une vitesse d'hydrolyse des TAG plus élevée que la vitesse de synthèse.

La question se pose alors de la possibilité d'augmenter la synthèse des TAG en modifiant le niveau d'expression des acyltransférases. En effet, chez *Y. lipolytica*, on ne détecte pas de monoacylglycérols (MAG) ni de diacylglycérols (DAG), ce qui suggère une forte régulation des différentes étapes de la synthèse des TAG. Il est possible que les acides gras libres puissent être des régulateurs (positifs ou négatifs) de la synthèse des lipides. De même, le pool de TAG pourrait être lié au pool des acides gras libres. Une augmentation de la fraction de TAG pourrait permettre une accumulation globale des lipides plus élevée.

Y. lipolytica, contrairement à *S. cerevisiae*, synthétise majoritairement des TAG (ils représentent plus de 90% des lipides neutres), et seulement une faible quantité d'esters de stérols (Mlickova *et al.*, 2004). Cette différence est probablement due à la spécialisation des enzymes de synthèse de lipides neutres, et particulièrement à la spécificité des acyltransférases. Chez *S. cerevisiae* les stérol acyltransférases présentent une faible activité diacyl-glycérol-acyltransférase, mais chez *Y. lipolytica* la spécificité des acyltransférases au niveau du donneur d'acyl (acyl-CoA ou phospholipides) et de l'accepteur (glycérol-3-phosphate ou stérol) n'est pas connue. Afin d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement des acyltransférases de *Y. lipolytica*, une analyse systémique a été réalisée. L'objectif de ces travaux est de mieux comprendre la spécificité de ces enzymes, afin de déterminer quelle enzyme serait la cible la plus approprié pour augmenter la teneur en TAG et/ou modifier le profil des lipides accumulés.

D.1 Analyse fonctionnelle des acyltransférases

L'acylation du glycérol pour la production du DAG se produit en deux étapes d'acylation acyl-CoA dépendantes: Sct1p (YALI0C00209g) est une glycérol-3-phosphate acyltransférase qui effectue spécifiquement la première acylation du squelette de glycérol en position *sn-1*, donnant l'acide lysophosphatidique (LPA). Ensuite, l'acylation de la position *sn-2* par Slc1p (YALI0E18964g) donne l'acide phosphatidique (PA). Cette enzyme présente une activité 1-acyl-G-3-P acyltransférase (AGAT). Le PA est ensuite dephosphorylé par la phosphatase PAP, codée par YALI0D27016g (voir tableau IV-3 et schéma dans l'introduction). Notre analyse s'est portée sur les gènes codant les acyltransférases impliqués dans la dernière étape d'acylation du glycérol, de DAG en TAG (figure IV-6).

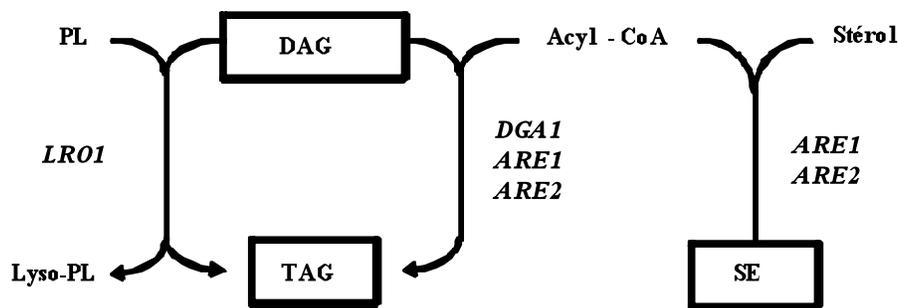


Figure IV-6. Représentation schématique des enzymes impliqués dans les voies de synthèse des TAG et des ES.

Pour l'acylation de la position *sn-3* du DAG, il existe deux types de réaction: une réaction acyl-CoA dépendante, catalysée par Dgalp (YALI0E32769g) et une réaction utilisant les glycérophospholipides comme donneurs d'acyl, catalysée par Lro1p (YALI0E16797g). Deux autres protéines, Are1p (YALI0F06578g) et Are2p (YALI0D07986g), caractérisées comme des stérols acyltransférases chez *S. cerevisiae* participent également à l'acylation du DAG en menant une réaction acyl-CoA dépendante. Le gène *ARE1* de *Y. lipolytica* présente une homologie de séquence de 30 % avec *S. cerevisiae*. Par contre, le gène *ARE2* présente une faible homologie avec le gène *ARE1/2* de *S. cerevisiae* (17 % identité), mais plus significative avec la DAG acyltransférase de la plante *Perilla Frutescens* (22%) et *A. thaliana* (25%) ou avec la DGAT1

humaine (28%). L'analyse des différentes souches a permis de démontrer que les protéines codées par ces gènes présentent une forte activité TAG acyltransférase chez *Y. lipolytica* contrairement à *S. cerevisiae* où l'activité TAG acyltransférase de Are1p, Are2p est très faible, voir négligeable. Nous avons également montré de manière originale que le niveau d'expression de ces acyltransférases variait au cours de la culture et qu'elles présentaient des affinités différentes vis-à-vis des substrats d'acylation (par rapport à leur longueur de chaîne et à leur degré d'insaturation).

D.2 Effet de l'inactivation des gènes codant les différentes acyltransférases

Afin de réaliser notre analyse de spécificité des acyltransférases, nous avons construit huit souches modifiées : quatre souches mono disruptées ($\Delta dga1$, $\Delta lro1$, $\Delta are1$ et $\Delta are2$), deux double mutants ($\Delta dga1\Delta lro1$ et $\Delta are1\Delta are2$), un triple mutant ($\Delta dga1\Delta lro1\Delta are1$) et le quadruple mutant ($\Delta dga1\Delta lro1\Delta are1\Delta are2$). Nous avons ensuite réalisé des cultures de ces différentes souches et procédé à l'analyse de leurs profils lipidiques au cours du temps. Nous avons également déterminé les profils d'acides gras, des acides gras libres (FFA) et des triglycérides (TAG). La souche $\Delta lro1$ présente une diminution de 38 % de la quantité de TAG accumulés, la souche $\Delta are1$ une diminution de 42 % des TAG, la souche $\Delta dga1$ une diminution de 50 % des TAG et le double mutant $\Delta dga1\Delta lro1$ une diminution de 80 % des TAG par rapport à la souche sauvage. Le taux d'accumulation des lipides totaux par contre présente peu de différences. Étonnamment, les souches invalidées pour *ARE2* forment des grands corps lipidiques, suggérant un rôle direct de cette enzyme dans la formation de cette organelle.

L'ensemble des résultats est présenté sous forme de publication. L'article a été soumis à Applied and Environmental Microbiology (AEM).

D.3 Publication VII

Role of storage lipid proteins in lipid accumulation and lipid profile in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*

Athanasios Beopoulos, Ramdane Haddouche, Philomène Kabran, Thierry Chardot, Jean-Marc Nicaud

Titre en français : Le rôle de protéines de synthèse de lipides neutres dans l'accumulation et le profil de lipides chez la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.

Résumé : Les triacylglycérols (TAG) et les esters de stérols (ES) sont les principaux lipides de stockage des cellules eucaryotes. Chez les levures, les lipides s'accumulent dans des organelles appelés corps lipidiques. La majorité des lipides neutres accumulés chez la levure oléagineuse *Y. lipolytica* sont des TAG, tandis que la quantité d'ES est faible. Nous avons identifié une acyltransférase additionnelle dans le génome de *Y. lipolytica*. Elle est codée par le gène *ARE2*. *DGAI*, *LRO1*, *ARE1* et *ARE2* sont les seuls gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de TAG chez cet organisme. La contribution relative des acyltransférases dépend de la phase de croissance, mais globalement c'est *Dga1p* qui a la contribution la plus importante dans la synthèse des TAG. Les protéines codées par les gènes *ARE* sont principalement impliquées dans la synthèse des TAG au cours de la croissance exponentielle. L'affinité de ces enzymes vis-à-vis du substrat d'acylation de TAG indique que les gènes *DGAI*, *ARE1* et *ARE2* codent pour des acyl-CoA acyltransférases possédant des fonctions complémentaires. De plus, les gènes *ARE1* et *ARE2* codent des protéines impliquées dans la synthèse des ES et semblent avoir une contribution synergique à l'estérification des stérols. La souche dont les quatre gènes codant pour les acyltransférases ont été invalidés est viable malgré l'absence de lipides neutres et ne présente pas de défauts de croissance ou de perte de viabilité même en fin de phase stationnaire. Ceci pourrait probablement être dû à la présence d'un taux élevé d'acides gras libres. Les souches invalidées pour le gène *ARE2* forment de grands corps lipidiques, suggérant un rôle direct des protéines de stockage sur la formation de ces organelles.

Soumis à AEM en Juillet 2009

**ROLE OF STORAGE LIPID PROTEINS IN LIPID ACCUMULATION AND LIPID PROFILE
IN THE OLEAGINOUS YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA***

Athanasios Beopoulos^{1,2}, Ramdane Haddouche¹, Philomene Kabran¹, Thierry Chardot², Jean-Marc Nicaud^{1*}

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, UMR1238, CNRS, UMR2585, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, BP 01, 78850 Thiverval-Grignon, France¹
Laboratoire de Chimie Biologique, INRA, UMR206, AgroParisTech, Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle, 78850 Thiverval-Grignon, France²

Address correspondence to: Jean-Marc Nicaud; phone: +33 01 30 81 54 50; fax: +33 01 30 81 54 57; e-mail: jean-marc.nicaud@grignon.inra.fr

ABSTRACT

Triacylglycerols (TAG) and steryl esters (SE) are the principal storage lipids in eukaryotic cells. In yeasts, these lipids accumulate in special organelles known as lipid bodies (LB). In the lipid accumulation-oriented metabolism of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, most of the storage lipids are TAG, and only small amounts of SE are present. We identified an additional acyltransferase in *Y. lipolytica* encoded by the *ARE2* gene, which, together with *DGAI*, *LRO1* and *ARE1*, are the only genes coding for proteins contributing to TAG synthesis in this organism. The relative contributions of the individual enzymes were found to depend on growth phase, with Dga1p making the most significant contribution to overall TAG synthesis. The proteins encoded by the *ARE* genes are the principal enzymes involved in TAG synthesis during exponential growth. The *DGAI*, *ARE1* and *ARE2* genes encode acyl-CoA-dependent acyltransferases with complementary functions, as demonstrated by their acyl substrate preferences. *ARE1* and *ARE2* were found to be the only genes encoding proteins involved in SE synthesis and making a synergic contribution to sterol esterification. A yeast lacking all four genes was viable despite lacking lipid bodies and had no growth defects, even in late stationary phase, probably due to the ability of *Y. lipolytica* to accumulate free fatty acids (FFA). Strains lacking the *ARE2* gene contained large lipid bodies, demonstrating a direct role of storage lipid proteins in LB formation.

Running head: Storage lipid proteins in *Y. lipolytica*

The abbreviations used are: FA, fatty acids; TAG, triacylglycerols; FFA, free fatty acids; LB, lipid bodies; SE, steryl esters; DGAT diacylglycerol O-acyltransferase; PDAT, phospholipid:diacylglycerol acyltransferase; ACAT, acyl-CoA sterol acyltransferase; TLC, thin-layer chromatography; SPE, solid-phase extraction; GC, gas chromatography; YNBO, yeast nitrogen base oleate; YE, yeast extract; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; FC, fluorescent cassette.

Acknowledgements: A. Beopoulos was supported by the Lipicaero French national research program (ANR-PNRB) No 0701C0089. P. Kabran was partly supported by an INRA fellowship from the MICA Department and by an Ivory Coast presidential fellowship. This work was financially supported in part by Aerospace Valley and Airbus. We thank Julie Sappa of Alex Edelman & Associates for her excellent help in correcting the English version of the manuscript.

D.4 La surexpression des acyltransférases

En termes de capacité d'accumulation lipidique, il semble exister une corrélation entre la teneur en TAG et la capacité maximale d'accumulation lipidique. Afin de vérifier si l'activité des acyltransférases est l'étape limitante pour la formation de TAG et par conséquent pour l'accumulation lipidique on a procédé, dans un premier temps, à la surexpression des acyltransférases majeures dans la souche 'obèse' $\Delta gut2\Delta pox1-6$. La surexpression des acyltransférases *SCT1*, *SLC1*, *LRO1* et *DGAI* (Figure IV-7) a été réalisée sous le contrôle du promoteur fort pPOX2.

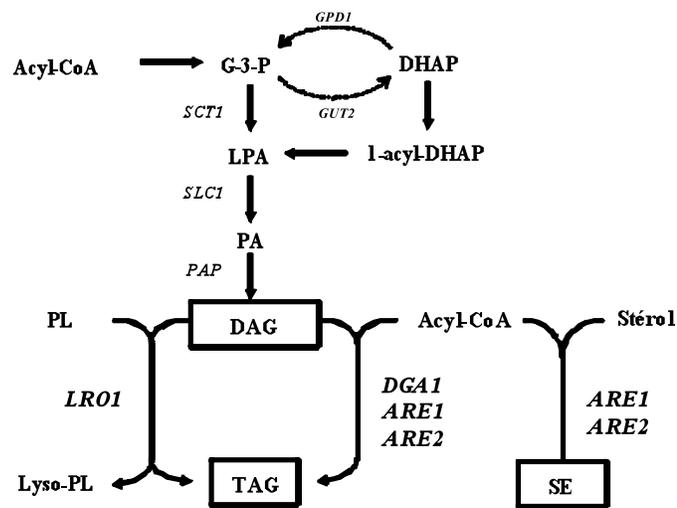


Figure IV-7. Représentation schématique des voies métaboliques de synthèse de lipides neutres

D.4.1 Construction des vecteurs d'expression et des mutants

Dans le but de surexprimer les gènes *SCT1*, *SLC1*, *LRO1* ou *DGAI*, nous avons construit les vecteurs d'expression suivants : JMP61-*SCT1* (*URA3*, pPOX2-y1*SCT1*), JMP61-*SLC1* (*URA3*, pPOX2-y1*SLC1*), JMP61-*LRO1* (*URA3*, pPOX2-y1*LRO1*) et JMP61-*DGAI* (*URA3*, pPOX2-y1*DGAI*) (chapitre A.2 et B.6.2, partie III- Matériel et Méthodes). Les gènes sont placés sous le contrôle du promoteur fort pPOX2 (promoteur du gène *POX2* codant pour l'acyl-CoA oxydase 2). Ce promoteur est induit en présence d'acides gras ou d'alcanes et peu exprimé en glucose (Juretzek *et al.*, 2000). La digestion enzymatique des vecteurs par *NotI* permet d'obtenir les cassettes d'expression, qui comportent deux séquences Zeta autorisant l'intégration dans le

génomique de *Y. lipolytica* d'une ou plusieurs copie(s) du gène d'intérêt de manière non-homologue. Ces cassettes sont transformées indépendamment dans la souche 'obèse' $\Delta gut2\Delta pox1-6$ auxotrophe pour l'uracile et la leucine. Les transformants obtenus sont vérifiés par PCR afin de sélectionner ceux qui présentent une copie supplémentaire du gène d'intérêt (Tableau IV-3).

Tableau IV-4. Caractéristiques des souches surexprimant les acyltransférases majeures de *Y. lipolytica*

Souches	Caractéristiques
JMY1370	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 $\Delta leu2$ $\Delta pox1-6$ $\Delta gut2$, JMP61-y DGAI-URA3</i>
JMY1372	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 $\Delta leu2$ $\Delta pox1-6$ $\Delta gut2$, JMP61-y LROI-URA3</i>
JMY1374	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 $\Delta leu2$ $\Delta pox1-6$ $\Delta gut2$, JMP61-y SCT1-URA3</i>
JMY1376	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 $\Delta leu2$ $\Delta pox1-6$ $\Delta gut2$, JMP61-y SLC1-URA3</i>

D.4.2 Test d'accumulation par des souches surexprimant les acyltransférases

Des tests d'accumulation de lipides en mode batch ont été réalisés sur les différentes souches construites afin de mesurer l'impact de la surexpression des acyltransférases codées par les gènes *DGAI*, *LROI*, *SCT1* et *SLC1* sur la teneur lipidique finale. Cet essai a été mené sur le milieu riche YP₂D₄ favorisant la synthèse *de novo* et sur le milieu d'accumulation YP₂D₄O₃, en utilisant comme contrôle la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ (III- Matériel et Méthodes, chapitre A.3.5). Les cultures ont été effectuées dans les conditions standard, précédemment décrites. Dans un premier temps nous avons mesuré l'accumulation lipidique totale en fonction du temps. Les courbes de croissance des souches modifiées sont présentées dans la Figure IV-8. Nous n'observons pas de différences de croissance sur ces deux milieux entre les différentes souches testées.

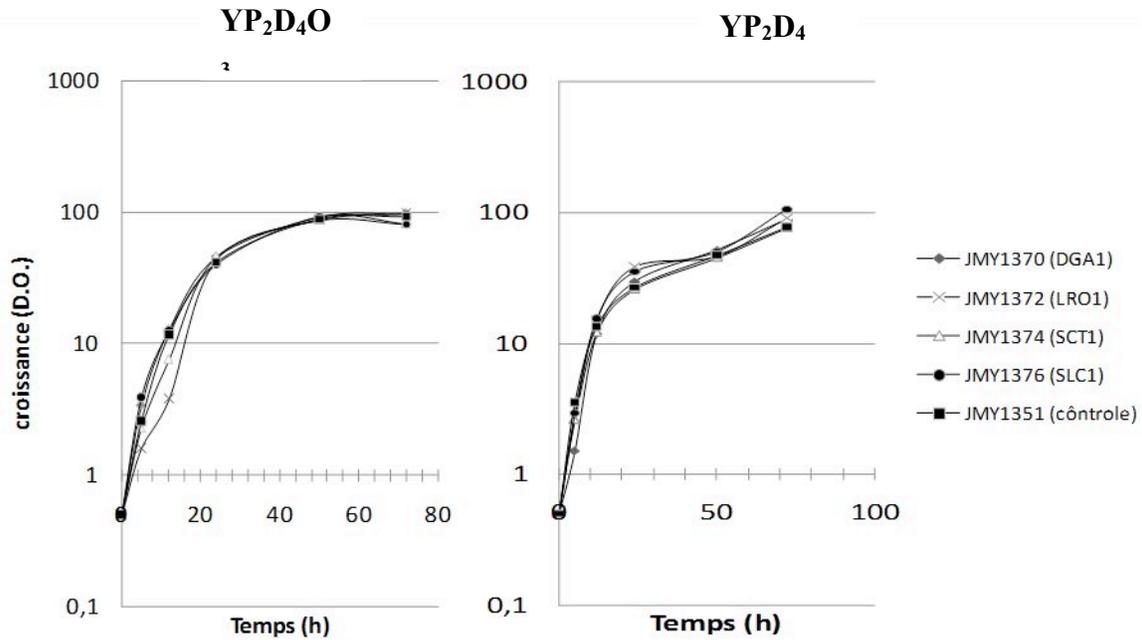


Figure IV-8. Courbes de croissance des souches surexprimant les acyltransférases majeures de *Y. lipolytica* dans les milieux YP₂D₄O₃ et YP₂D₄. Des prélèvements sont effectués à 5, 11, 24, 48 et 72 h. La souche JMY1351 ($\Delta gut2\Delta pox1-6$) est utilisée comme contrôle.

Les courbes d'accumulation des lipides exprimées en pourcentage du poids sec en fonction du temps sont présentées dans la figure IV-9.

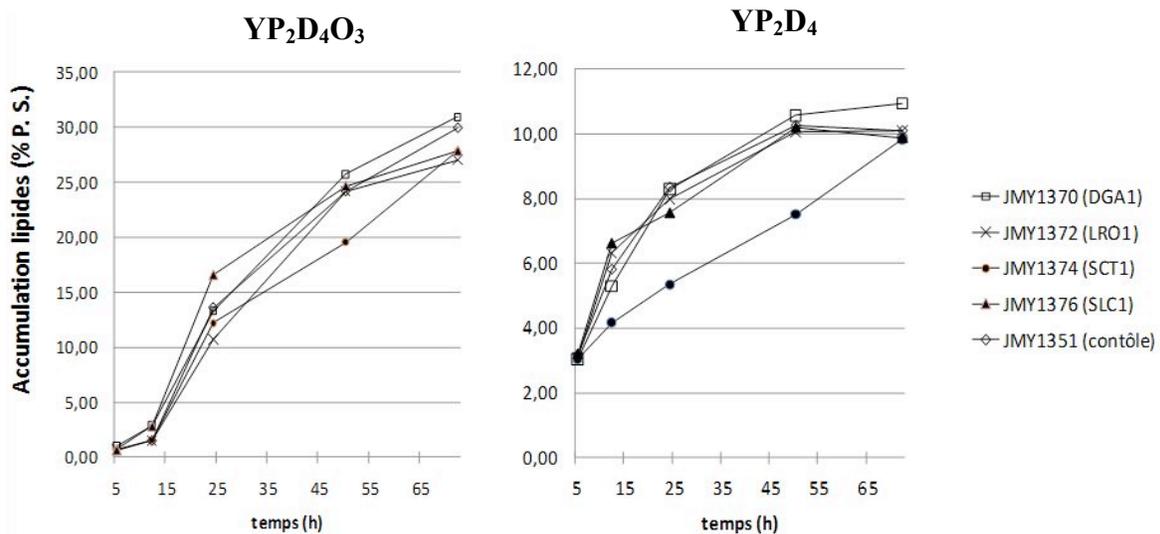


Figure IV-9. Accumulation des lipides totaux en fonction du temps de culture en milieux YP₂D₄O₃ et YP₂D₄. Les lipides totaux sont exprimés en pourcentage du poids sec. Des prélèvements sont effectués aux temps 5, 11, 24, 48 et 72 h. La souche JMY1351 ($\Delta gut2\Delta pox1-6$) est utilisée comme contrôle.

Toutes les souches, cultivées en milieux riches, accumulent progressivement des lipides jusqu'à la fin de la culture. La souche JMY1374, surexprimant l'acyltransférase codée par le gène *SCT1* accumule plus lentement les lipides, surtout en milieu glucose (synthèse *de novo*) (figure IV-9), cependant le niveau d'accumulation final des lipides est identique à celui de la souche témoin (JMY1351). La souche JMY1370, surexprimant l'acyltransférase codée par le gène *DGAI* accumule une quantité de lipides légèrement supérieure à celle accumulée par la souche contrôle (32 % contre 28 % en milieu YP₂D₄O₃ et 11% contre 10 % en milieu YP₂D₄). Les courbes d'accumulation des souches surexprimant les gènes codant les acyltransférases *LRO1* ou *SLC1* (JMY1372 et JMY1376) sont similaires à celles de la souche témoin. Le fait que la vitesse d'accumulation des lipides de la souche surexprimant *SCT1* (JMY1374) soit plus lente pourrait être dû à une toxicité du MAG ou à une rétrorégulation de la néosynthèse par le MAG. Cependant, nous pouvons écarter l'hypothèse de la toxicité puisqu'on n'observe pas de défaut de croissance. La rétrorégulation de la néosynthèse diminuerait le pool d'acyl-CoA, résultant en une diminution de la synthèse de TAG. Ceci est observé uniquement dans le milieu YP₂D₄, où seule la synthèse *de novo* a lieu. En revanche, la surexpression de l'acyltransférase codée par *DGAI* semble augmenter légèrement l'accumulation des TAG, résultat qu'il faudrait confirmer en fermenteur.

Les résultats concernant l'accumulation d'acide oléique au cours du temps sont présentés en pourcentage des lipides totaux dans le tableau IV-5 et IV-6.

Tableau IV-5. Cinétiques d'accumulation de l'acide oléique en milieu YP₂D₄.
Accumulation du C18:1 (n-9) en milieu YP₂D₄ (en % des AG totaux)

Temps (h)/ Souche	JMY1370 (DGAI)	JMY1372 (LRO1)	JMY1374 (SCT1)	JMY1376 (SLC1)	JMY1351 (contrôle)
5	13	13	18	12	13
12	25	24	31	25	26
24	23	24	30	26	25
48	23	21	33	23	23
72	26	24	32	26	26

Les résultats de l'analyse globale des lipides accumulés par les différentes souches ne présentent pas de différences significatives. Néanmoins, la souche JMY1374, qui surexprime l'acyltransférase codée par le gène *SCT1*, accumule de préférence l'acide oléique tout au long de la culture en YP₂D₄ (tableau IV-5). Cette accumulation ne se fait pas au détriment d'un acide gras particulier, mais résulte d'une diminution globale de l'accumulation de tous les autres acides gras (*résultats non montrés*), suggérant une meilleure affinité de Sct1p pour l'acide oléique.

Tableau IV-6. Pourcentage d'acide oléique dans les lipides totaux accumulés au cours du temps sur le milieu YP₂D₄O₃.

Accumulation du C18:1 (n-9) en milieu YP₂D₄O₃ (en % des AG totaux)

Temps (h)/ souche	JMY1370 (DGA1)	JMY1372 (LRO1)	JMY1374 (SCT1)	JMY1376 (SLC1)	JMY1351 (contrôle)
5	62	61	61	61	59
12	61	60	60	60	61
24	68	67	68	68	71
48	68	70	68	69	71
72	70	71	71	69	71

Dans le milieu YP₂D₄O₃, la souche surexprimant *SCT1* ne présente pas d'augmentation du pourcentage d'acide oléique (Tableau IV-6). Ceci confirme notre hypothèse de retrorégulation de la néosynthèse car le substrat CoA provient du milieu extracellulaire

D.4.3 Discussion sur la surexpression des acyltransférases

Les premiers résultats montrent que la surexpression des acyltransférases codées par les gènes *SCT1*, *SLC1* et *LRO1* sous le contrôle du promoteur pPOX2 ne permet pas d'augmenter l'accumulation de lipides chez *Y. lipolytica*. Par contre, il reste à vérifier si la surexpression de l'acyltransférase codé par le gène *DGA1* peut renforcer cette accumulation. Les résultats obtenus par la surexpression des acyltransférases montrent que la vitesse et/ou le potentiel

d'accumulation dépendent probablement de la disponibilité de l'acyl-CoA. La possibilité d'accumulation d'acide citrique, potentiellement précurseur d'acyl-CoA suggère qu'il pourrait exister une étape limitante à ce niveau. L'hypothèse la plus probable est que ce sont les vitesses de synthèse des acyl-CoA couplées à la vitesse d'estérification sur le glycérol qui engendrent un équilibre dynamique entre les différentes classes de lipides, et par voie de conséquence qui en déterminent la vitesse et le taux d'accumulation.

Afin de confirmer cette hypothèse, de nouvelles expérimentations portant sur l'analyse de classes de lipides sont prévues afin de mesurer le taux des TAG, DAG, MAG et des AGL dans les cellules. Cette analyse nous permettra de confirmer une éventuelle sélectivité d'estérification par apport aux acyl-CoA produits. En effet, nous avons remarqué qu'au cours de la culture, les acides gras libres et les TAG intracellulaires présentent des profils légèrement modifiés, suggérant une affinité différente des acyltransférases vis-à-vis des acides gras. Ceci pourrait être analysé par la surexpression individuelle des acyltransférases dans le quadruple mutant ($\Delta dga1\Delta lro1\Delta are1\Delta are2$). Alternativement, des mesures d'activité *in vitro* des acyltransférases pourraient être envisagées. Les souches surexprimant séparément chacune des acyltransférases de *Y. lipolytica* (*SCT1*, *SLC1*, *LRO1*, *DGAI*, *ARE1*, *ARE2*) sous le contrôle du promoteur constitutif TEF dans la souche sauvage et dans la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ (JMY1351) sont en cours de construction. Dans le futur l'expression des acyltransférases hétérologues, en combinaison avec des élongasses ou des désaturases pourrait modifier le profil des lipides accumulés par *Y. lipolytica*.

E. Modification du profil lipidique de *Y. lipolytica*.

Afin de produire des lipides d'une composition intéressante présentant une valeur ajoutée et un intérêt biotechnologique potentiel, on a procédé, dans un premier temps, à la modification du degré d'insaturation des lipides accumulés. L'objectif de cette étude est de produire des huiles « à façon », contenant des acides gras plus longs, à l'aide d'élongases, et plus insaturés, à l'aide de désaturases (les acides gras polyinsaturés ou AGPI présentent un intérêt nutritionnel). Chez la levure, l'acide gras est désaturé séquentiellement à partir de la position $\Delta 9$ et puis la $\Delta 12$. Le précurseur des acides gras polyinsaturés est l'acide oléique (C18 :1,n-9) (Figure C.8, chapitre C.1.5.2, introduction) et le produit majeur de la synthèse *de novo* chez *Y. lipolytica* est l'acide linoléique (C18 :2 n-9, n-12). Ceci montre que la désaturase $\Delta 12$ est fortement exprimée chez cette levure. Par contre, quand *Y. lipolytica* accumule des lipides à partir d'un milieu contenant de l'acide oléique, il le stocke en majorité sans le modifier (Beopoulos *et al.*, 2008b). De plus, il semble que l'acide oléique (sous forme d'Acyl-CoA) soit le substrat préféré des acyltransférases majeures. En revanche, le substrat de la désaturase $\Delta 12$ n'est pas connu (Acyl-CoA, PL ou TAG).

Afin de modifier le degré d'insaturation des acides gras accumulés et de mesurer l'impact de la désaturation sur les processus d'accumulation et de synthèse, deux souches ont été construites, l'une surexprimant la désaturase $\Delta 12$ sous le contrôle du promoteur pPOX2, et l'autre dont le gène qui code la désaturase $\Delta 12$ a été invalidé. Le mutant surexprimant la désaturase est également déficient pour la voie de la β -oxydation (Δ *pox1-6*). Nous avons choisi d'utiliser la souche Δ *pox1-6* afin d'éviter toute dégradation des acides gras au cours de la culture. La délétion du gène codant la désaturase $\Delta 12$ a été réalisée dans la souche Po1d, précédemment décrite.

E.1 Construction des vecteurs d'expression et des mutants $\Delta 12$

Le système combinant la méthode SEP (Maftahi *et al.*, 1996) et le système de recombinaison Cre lox (Fickers *et al.*, 2003a) a été utilisé une nouvelle fois afin d'obtenir une souche dont le gène codant la désaturase $\Delta 12$ est invalidé. La souche Po1d (auxotrophe pour l'uracile et la leucine) a été transformée avec la cassette de disruption Δ *12*-PUT permettant l'obtention de la souche JMY1358 (*ura3-302, leu2-270 xpr2-322, \Delta*12::URA3*).*

Afin de surexprimer le gène codant pour la désaturase $\Delta 12$, la souche $\Delta\text{pox1-6}$ a été utilisée comme souche hôte. La souche JMY1233 (MTLY92), auxotrophe pour l'uracile et la leucine, a été précédemment décrite (Beopoulos *et al.*, 2008b). Le vecteur d'expression JMP61- $\Delta 12$ (*URA3*, pPOX2-*yI $\Delta 12$*) a été construit (Matériel et Méthodes) en plaçant le gène de la désaturase $\Delta 12$ sous le contrôle du promoteur fort pPOX2. La digestion enzymatique du vecteur par *NotI* sépare la cassette d'expression, qui comporte deux séquences Zêta permettant d'intégrer dans le génome de *Y. lipolytica* une ou plusieurs copie(s) du gène d'intérêt de manière non-homologue. Les transformants obtenus sont vérifiés par PCR afin de sélectionner ceux qui représentent une copie supplémentaire du gène d'intérêt. La souche surexprimant la désaturase $\Delta 12$ est dénommée JMY1338 (Tableau IV-7).

Tableau IV-7. Génotype des souches utilisées pour modifier l'expression de la désaturase $\Delta 12$ de *Y. lipolytica*

Souches	Caractéristiques
Po1d	<i>MATa ura3-302, leu2-270 xpr2-322</i>
JMY1233	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 Δleu2 $\Delta\text{pox1-6}$</i>
JMY1358	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 leu2-270 $\Delta\Delta 12::\text{URA3}$</i>
JMY1338	<i>MATa ura3-302 xpr2-322 Δleu2 $\Delta\text{pox1-6}$, JMP61-<i>yI$\Delta 12$</i>-<i>URA3</i></i>

E.2 Test d'accumulation de lipides chez les souches modifiées pour la $\Delta 12$ désaturase

Les tests d'accumulation de lipides par les différentes souches construites ont été réalisés en mode batch dans les deux milieux riches précédemment décrits : YP₂D₄ favorisant la synthèse *de novo* et YP₂D₄O₃ favorisant l'accumulation de lipides. Les cultures ont été effectuées dans les standard, précédemment décrites.

Les premiers résultats de culture des souches JMY1358 et JMY1338 montrent une croissance équivalente aux souches témoins Po1d et $\Delta\text{pox1-6}$ (JMY1233). Par contre, quand la

souche JMY1338 surexprimant la désaturase $\Delta 12$, à été cultivé en fermenteur en mode fed-bach à l'INSA de Toulouse, un défaut de croissance a été observé. En effet, ce mutant a présenté une tendance à filamenter à partir de 24h de culture. Ses performances se sont avérées très en deçà de celle obtenues avec les autres souches de *Y. lipolytica* testées (souche sauvage, $\Delta gut2\Delta pox1-6$ et $\Delta pox1-6$). La culture de cette souche a dû être stoppée après 86h de culture devant une demande en oxygène atteignant les capacités de transfert du fermenteur alors que la production de biomasse et la teneur en lipides étaient faibles.

La filamentation peut être induit chez *Y. lipolytica* par de conditions physiologiques ou génétiques différentes (Dominguez *et al.*, 2000). La présence de N-acétylglucosamine ou d'albumine bovine dans le milieu induit la filamentation. De même la micro aérobie ou la présence d'acide myristique (C14 :0) ou d'acide laurique (C12:0) peuvent aussi favoriser la filamentation (Zinjarde *et al.*, 2008). Des nombreuses mutations génétiques provoquent un défaut de filamentation ou une hyperfilamentation. Par exemple les souches invalidées pour les gènes *SEC14*, *RAS2*, *BUD6*, *KEX2*, *GPI7*, *SNF5* et *PPH21* sont incapables de former des hyphes (Richard *et al.*, 2001). Les mutants affectés dans la biogénèse des peroxyosomes présentent aussi un défaut de filamentation (Nuttley *et al.*, 1993). Bien que la seule différence majeure qui existe entre les souches de *Y. lipolytica* testés au cours de cette étude et la JMY1238 est la surexpression de la désaturase, l'influence du profil acide gras des lipides (ratio C18 :1/C18 :2) sur la morphologie de la levure peut être envisageable.

E.3 Profil lipidique des souches modifiées pour la $\Delta 12$ désaturase

Les résultats de l'analyse des lipides accumulés par les différentes souches montrent que le degré d'insaturation des acides gras accumulés varie significativement selon le génotype des souches.

Les résultats de l'analyse lipidique de Po1d et du mutant porteur d'une délétion codant la désaturase $\Delta 12$, JMY1358, sont présentés dans la Figure IV.10. À 24h de culture, les deux souches de culture ont accumulé des lipides à environ 6 % de leur masse sèche en milieu YP₂D₄ et 10 % de leur masse sèche en milieu YP₂D₄O₃.

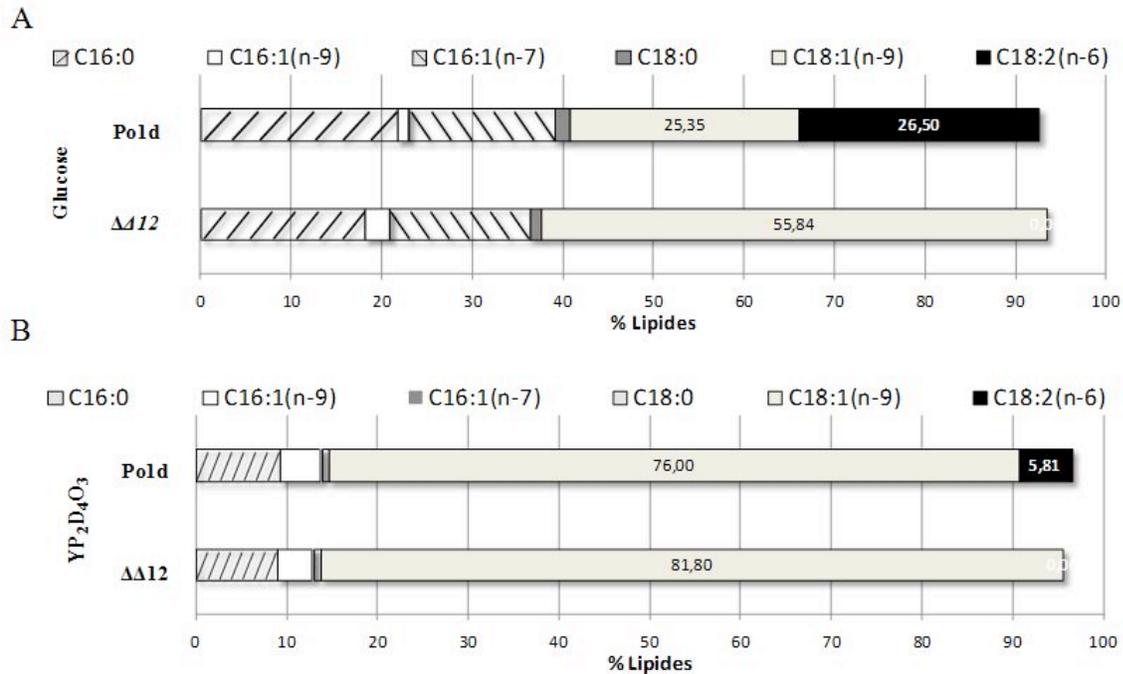


Figure IV-10. Effet de l’invalidation du gène codant la $\Delta 12$ désaturase sur le profil lipidique de cellules cultivées en milieux YP₂D₄ et milieu YP₂D₄O₃. Pourcentage des acides gras dans le total des lipides accumulés pour la souche témoin Po1d et par le mutant de délétion de la désaturase $\Delta 12$ ($\Delta\Delta 12$, JMY1358). Panel A : culture effectuée en milieu glucose (YP₂D₄). Panel B : culture effectuée en milieu riche contenant l’acide oléique (YP₂D₄O₃).

La souche invalidée pour la désaturase $\Delta 12$ ne contient plus d’acide linoléique (C18 :2) dans les deux milieux de culture. Le profil des acides gras en C16 est similaire à celui de la souche Po1d, de même que la quantité des acides gras en C18 (la quantité de C18 :1 + C18 :2 est toujours constante). On accumule que du C18 :1 puisque la désaturase n’est plus fonctionnelle. Ces résultats montrent d’une part qu’il n’existe qu’un seul gène codant la désaturase $\Delta 12$ chez *Y. lipolytica*, et d’autre part que la délétion de ce gène n’a pas d’effet sur la physiologie de la souche.

Les résultats de l’analyse lipidique de la souche surexprimant la désaturase $\Delta 12$ sont présentés à la Figure IV-11. À 24h de culture, les lipides accumulés par les deux souches représentent environ 7 % de leur masse sèche en milieu YP₂D₄ et 12 % de leur masse sèche en milieu YP₂D₄O₃.

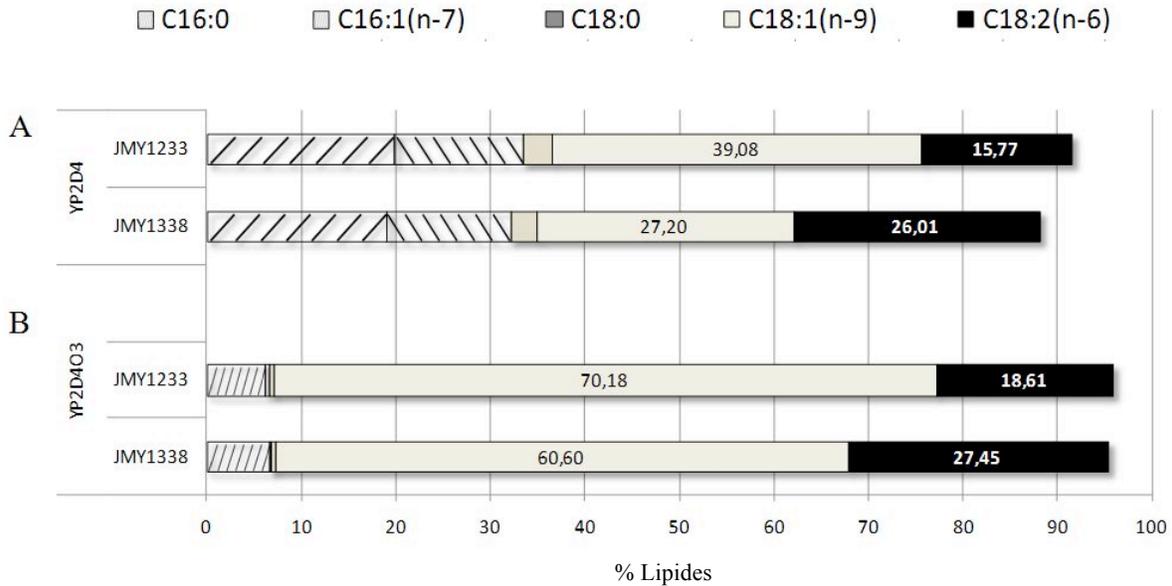


Figure IV-11. Profils lipidiques de la souche JMY1338 surexprimant la $\Delta 12$ désaturase et de la souche témoin JMY1233 ($\Delta poxI-6$) en milieu YP₂D₄ et milieu YP₂D₄O₃. Pourcentage des acide gras sur le total des lipides accumulés. Panel A : résultats de culture effectués sur milieu glucose (YP₂D₄). Panel B : résultats de culture effectués sur milieu riche contenant l'acide oléique (YP₂D₄O₃).

En milieu YP₂D₄ l'acide linoléique (C18 :2) représente 26 % des lipides totaux de la souche JMY1338 contre seulement 15,8 % pour la souche JMY1233. De même, en milieu contenant de l'acide oléique (YP₂D₄O₃), la souche JMY1338 accumule 27 % de C18 :2, contre 19 % pour la souche témoin. Dans les deux milieux nous observons une augmentation de la teneur en C18 :2, qui est de 65 % en YP₂D₄ et de 50 % en milieu YP₂D₄O₃. Cette augmentation se fait toujours aux dépens de l'acide oléique, qui est le substrat de la désaturase $\Delta 12$, démontrant que la $\Delta 12$ est limitante et que sa surexpression permet effectivement d'augmenter la teneur en C18 :2. Le profil des autres acides gras reste inchangé pour les deux souches testées.

Ces résultats représentent un premier pas vers la modification du profil des acides gras accumulés. Pour compléter ces résultats préliminaires, il serait intéressant d'analyser le profil des lipides accumulés dans les différentes fractions (TAG, AGL) ainsi que de déterminer la position

de C18 :2 dans les TAG. Les travaux vont se poursuivre par l'expression de désaturases et d'élongases (natives et/ou hétérologues) dans les souches performantes, afin de modifier le degré d'insaturation et la longueur des lipides accumulés. L'objectif de cette partie de l'étude est la valorisation de substrats industriels par bioconversion pour la production d'acides gras spécifiques présentant une forte valeur ajoutée.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première partie de ce travail avait un double objectif : d'une part il s'agissait d'étudier les mécanismes régissant la synthèse et l'accumulation des lipides chez les microorganismes et notamment chez la levure *Y. lipolytica* et d'autre part d'identifier et de faire une analyse comparative des gènes participant au métabolisme lipidique de microorganisme oléagineux et non oléagineux.

L'étude des enzymes du métabolisme des microorganismes oléagineux et de leurs particularités fonctionnelles, en comparaison avec les microorganismes non oléagineux, a permis de se focaliser sur des enzymes potentiellement candidates pour conférer le caractère oléagineux. Parmi les microorganismes oléagineux, *Y. lipolytica* dispose d'un potentiel remarquable de croissance dans des milieux hydrophobes (substrats de bioconversion). L'accumulation de lipides chez cette levure n'est des plus performantes (jusqu'à 35% de biomasse). Toutefois c'est la seule levure connue capable d'accumuler l'acide linoléique (C18 :2) dans des proportions dépassant les 50 % des lipides totaux. L'acide linoléique est le premier substrat pour la production des acides gras à longue chaîne et polyinsaturés, qui présentent un intérêt alimentaire et biotechnologique.

L'accumulation lipidique chez *Y. lipolytica* peut se produire par deux voies distinctes : la première est la biosynthèse *de novo* des acides gras à partir des précurseurs des acides gras que sont l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA. La deuxième est la voie d'accumulation *ex novo*, qui permet de transporter et de stocker les acides gras du milieu de culture. Cette voie nécessite l'hydrolyse des substrats hydrophobes, le transport et l'incorporation à l'intérieur de la cellule des acides gras libérés et finalement le réassemblage de ces acides gras en TAG et en ES pour leur stockage dans les corps lipidiques. Afin d'assimiler les substrats hydrophobes à partir du milieu de culture, cette levure a élaboré plusieurs mécanismes : d'une part elle produit des surfactants qui réduisent la taille des gouttelettes ce qui augmente la surface de contact entre la cellule et les substrats hydrophobes ; d'autre part elle secrète un émulsifiant extracellulaire, le liposan, et une lipase extracellulaire, la lipase Lip2p, permettant l'hydrolyse des TAG ; enfin elle forme des protrusions à la surface des cellules pour fixer les gouttelettes de substrat hydrophobe et faciliter leur incorporation. Tous ces mécanismes sont absents non seulement chez les microorganismes non oléagineux comme *S. cerevisiae*, mais probablement aussi chez la plupart des microorganismes.

Néanmoins, les voies d'accumulation *de novo* et *ex novo* sont plutôt antagonistes que complémentaires, car les enzymes de biosynthèse de lipides sont régulées par la composition des lipides extracellulaires. La quantité d'énergie nécessaire à la synthèse *de novo* est très supérieure à celle nécessaire à l'accumulation directe des lipides du milieu de culture. Si le milieu apporte aux organismes la source de lipide nécessaire, la synthèse et les modifications, telles que l'élongation et la désaturation, sont réprimées. Cependant, la composition lipidique d'un microorganisme peut varier considérablement en fonction du milieu de culture.

La synthèse des lipides neutres chez les microorganismes suit la voie de Kennedy, et le déclenchement de l'accumulation chez les organismes oléagineux se produit quand un nutriment essentiel, comme l'azote, devient limitant dans le milieu de culture. A partir de ce moment, plusieurs mécanismes propres aux organismes oléagineux se mettent en route. La prolifération cellulaire cesse, car l'azote nécessaire pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques devient limitant, et le carbone assimilé se dirige vers la voie de synthèse des lipides. Les organismes non oléagineux dirigent le carbone assimilé vers la production de sucres de réserve tel que les polysaccharides, les glucanes et les mannanes. Le comportement des organismes oléagineux, dans ces conditions limitantes, est dû au fonctionnement de leurs enzymes spécifiques. C'est le cas de l'ATP citrate lyase (ACL) dont l'expression est régulée par la quantité d'azote intracellulaire et qui pour sa part régule la production de l'acyl-CoA, précurseur de synthèse des acides gras. Ensuite l'apport du cofacteur pour la synthèse des lipides, NADPH, est assuré par l'enzyme malique.

L'importance du choix du mode de conduite de la culture (batch, fed-batch ou culture continue), permet de moduler le niveau d'accumulation de lipides. Le développement d'un procédé de production des lipides en bioréacteur réside dans l'optimisation du milieu de production, notamment dans le choix des sources de carbone et d'azote à employer. Il consiste à contrôler les apports, en fonction de l'avancement de la culture, afin que la source de carbone et les éléments nutritifs assurent, dans un premier temps, une phase de croissance exponentielle qui finisse par épuisement de la source azotée sans limitation de la source carbonée, induisant la production lipidique.

La capacité de *Y. lipolytica* à utiliser des substrats hydrophobes est aussi due à une spécialisation fonctionnelle au sein de la famille multigénique des acyl-CoA oxydases,

responsables de la première étape de β -oxydation des acides gras. Chez *Y. lipolytica*, six gènes (*POX1* à *POX6*) codant des acyl-CoA oxydases (Aox1 à Aox6) sont présents, ce qui la différencie des autres levures comme *C. tropicalis* (3 gènes), *C. maltosa* (2 gènes) et *S. cerevisiae* (1 gène). Des analyses fonctionnelles d'enzymes purifiées et de souches présentant des mutations des acyl-CoA oxydases montrent une grande spécialisation de ces enzymes : les acyl-CoA oxydases Aox2 et Aox3 sont spécifiques, respectivement, des acyl-CoA à chaîne longue et à chaîne courte et les acyl-CoA oxydases Aox4 et Aox5 présentent une faible activité envers un large spectre de longueur de chaîne. Par contre, les acyl-CoA oxydases Aox1 et l'Aox6 sont impliquées dans la reconsommation des diacides.

De ces premiers éléments de comparaison entre le métabolisme lipidique des organismes oléagineux et non oléagineux, et plus spécifiquement entre *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*, il est apparu que *Y. lipolytica* stocke ses réserves lipidiques sous forme de TAG (plus de 90 % de lipides neutres) contrairement à *S. cerevisiae* qui produit des quantités équivalentes de TAG et d'esters de stérol. Ce travail a permis d'identifier dans le génome de *Y. lipolytica* un gène présentant une faible homologie avec la stérol acyltransférase Are2p de *S. cerevisiae* (17 %), mais plus significative avec la DAG acyltransférase des plantes *Perilla Frutescens* (22 %), et *A. thaliana* (25 %) ou avec la DGAT1 humaine (28 %). Malgré une homologie entre les gènes de *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* il semble que ces enzymes présentent des spécificités différentes (activité acyltransférase plutôt que stérol acyltransférase). Ce qui pourrait expliquer que le métabolisme de *Y. lipolytica* a évolué vers la production de TAG.

Une autre différence significative entre le métabolisme de *Y. lipolytica* et de *S. cerevisiae*, se voit au niveau du flux de carbone entre la voie de synthèse des TAG et la voie de production d'énergie. Le glycérol-3-phosphate se situe au carrefour de ces voies car il peut, soit fournir le squelette de glycérol pour la production des TAG, soit être converti en DHAP pour entrer dans la glycolyse et le cycle de Krebs. Le gène *GUT2*, codant la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, est alors responsable de l'orientation du flux de glycérol du métabolisme des lipides vers la glycolyse. La conversion du G-3-P en DHAP est une réaction réversible, et chacune des deux voies réactionnelles est catalysée par un des isomères de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (*GPDI* et *GUT2*, respectivement). Nous avons modifié cette réversibilité pour diriger le flux de carbone vers la production de TAG par ingénierie génétique.

La seconde partie de ce travail a porté sur l'analyse fonctionnelle des gènes susceptibles d'avoir un effet sur le niveau d'accumulation de lipides, leur répartition par classe et le type de lipides accumulés. L'objectif de cette étude était d'augmenter la teneur lipidique chez *Y. lipolytica* afin de produire en grande quantité des lipides 'à façon' (modification du profil lipidique, longueur de chaîne des acides gras et degré d'insaturation) ayant un intérêt biotechnologique et/ou industriel. Ces huiles issues de microorganismes, appelées SCO (Single Cell Oils), peuvent aussi être utilisées pour la production de biocarburants, ou comme substrats pour la production d'adhésifs ou encore en cosmétique. Nous avons réalisé cette partie du travail en construisant des mutants de surexpression ou/et des mutants dont les gènes candidats ont été invalidés.

Afin d'étudier l'impact du gène *GUT2*, codant pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (qui catalyse la conversion du G-3-P en DHAP) sur l'accumulation lipidique, l'invalidation de ce gène a été réalisée. La souche $\Delta gut2$ ainsi obtenue est capable d'accumuler trois fois plus de lipides (32 %) que la souche sauvage, dans des milieux contenant de l'acide oléique. En présence d'acide oléique ultra pur, la souche $\Delta gut2$ est même capable d'accumuler jusqu'à 70 % de lipides (masse des lipides/ masse sèche). La différence des taux d'accumulation entre le milieu acide oléique et acide oléique pur, pourrait s'expliquer par une balance énergétique favorable, l'acide oléique pur étant directement incorporé et stocké sans modification. Cependant, nous avons démontré une forte reconsommation des lipides par β -oxydation, limitant ainsi l'accumulation de lipides par la souche $\Delta gut2$. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, nous avons inactivé la β -oxydation. Le mutant $\Delta gut2\Delta pox1-6$, incapable de remobiliser ses réserves lipidiques, est alors capable d'accumuler jusqu'à 42 % de lipides (masse de lipides / masse sèche) en milieu oléique minimum, soit 4 fois plus que la souche sauvage et 1,5 fois plus que la souche $\Delta gut2$. De plus, nous avons observé que la productivité et la vitesse d'accumulation des souches $\Delta gut2$ sont fortement augmentées par rapport à la souche sauvage. Nous avons aussi constaté que la souche $\Delta gut2$ était capable d'accumuler soit libre, soit dans les TAG, un acide gras spécifique, produit d'une β -oxydation incomplète de l'acide oléique, le C16 :1(n-9). Ces résultats ont révélé l'existence de mécanismes de régulations de la synthèse et de la dégradation des lipides. Ainsi, la redirection du flux de glycérol pourrait conduire à une β -oxydation réduite à un seul cycle de dégradation. Nous avons également observé qu'une grande proportion des lipides présents dans ces souches étaient sous forme d'acides gras libres,

suggérant que les corps lipidiques sont capables de les stocker. Cette hypothèse est confortée par le fait que la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ contient des grands corps lipidiques couvrant plus de 50 % du volume cellulaire. Selon la capacité d'accumulation de la souche et le type des acides gras accumulés, le profil des corps lipidiques variait en nombre, en forme et en taille. Il est vraisemblable que la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ de *Y. lipolytica* est proche de sa capacité d'accumulation maximale. Il est possible que les levures perdent leur capacité d'accumulation après une période de limitation en azote. Cette limitation nutritionnelle favorise l'accumulation, mais à plus long terme elle aurait un impact défavorable sur la physiologie de la levure. Une autre limitation pourrait être testée.

La souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$ montre un potentiel d'accumulation important et représente une souche hôte intéressante pour poursuivre les modifications d'ingénierie génétique visant à construire des souches avec un profil lipidique modifié. Un brevet protégeant cette souche et ses usages a été déposé.

La grande proportion d'acides gras libres dans la souche sauvage, ainsi que dans les mutants *GUT2*, nous a conduits à formuler l'hypothèse d'une étape limitante d'accumulation qui pourrait être la vitesse d'estérification du glycérol, la disponibilité des acyltransférases ou leur spécificité vis-à-vis du substrat CoA. En effet, il semblerait exister une corrélation entre la teneur en TAG et la capacité maximale d'accumulation lipidique. De plus, la différence fonctionnelle des acyltransférases entre *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* laisse entrevoir la possibilité de moduler la composition lipidique en jouant sur le niveau d'expression de ces enzymes.

Dans un premier temps, par une analyse fonctionnelle des acyltransférases, nous avons démontré que *DGAI*, *LRO1*, *ARE1* et *ARE2* sont les seules enzymes impliquées dans l'acylation du DAG et que leur niveau d'expression varie au cours de la culture. Les stérols acyltransférases *ARE1* et *ARE2* sont également les seules enzymes responsables de la formation des esters de stérols. Are2p présente une meilleure affinité d'acylation du DAG. Nous avons également montré que l'acyltransférase la plus active chez *Y. lipolytica* est Dga1p, en effet le mutant $\Delta dgal$ présente la plus forte diminution d'accumulation (50 %). La délétion de *LRO1* ne diminue que de 38 % la quantité de TAG accumulés et la délétion d'*ARE1* les diminue de 42 %. Chez le double mutant $\Delta lro1\Delta dgal$ une diminution de 80 % des TAG est observée. En revanche, le taux d'accumulation des lipides totaux ne présente pas de différences aussi importantes. Toutefois

dans le triple mutant ($\Delta lro1\Delta dga1\Delta are1$) et le quadruple mutant on observe une diminution des acides gras libres, suggérant une diminution de leur incorporation à partir du milieu. Les acyltransférases démontrent également des spécificités relatives vis-à-vis du substrat d'acylation : Dga1p utilise préférentiellement l'acide oléique et l'acide palmitique; Are1p utilise préférentiellement les substrats saturés, alors que Are2p utilise de préférence les substrats insaturés et notamment l'acide oléique. Lro1p, la seule acyltransférase qui utilise les phospholipides comme donneur d'acyle, ne présente pas de spécificité vis-à-vis de substrat. Étonnamment, les souches invalidées pour Are2p présentent des corps lipidiques de grande taille, suggérant un rôle direct de cette enzyme dans la formation de cette organelle.

Dans la suite de ce travail, nous avons procédé à la surexpression des acyltransférases majeures de *Y. lipolytica* (*DGAI*, *LROI*, *SCT1*, *SLC1*) dans la souche $\Delta gut2\Delta pox1-6$, afin de confirmer si leur activité était l'étape limitante pour l'accumulation des TAG. La surexpression des acyltransférases *SCT1*, *SLC1* et *LROI* sous le contrôle du promoteur pPOX2 ne permet pas d'augmenter l'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica*, mais on ignore encore si la surexpression de l'acyltransférase codé par le gène *DGAI* le permet. L'hypothèse la plus probable est que l'accumulation dépend de la vitesse de synthèse du glycérol-3-phosphate et des acyl-CoA couplées à la vitesse d'estérification des différentes espèces d'acyl-CoA. La délétion du gène codant Gut2p, a permis d'augmenter l'accumulation, mais la surexpression des acyltransférases sous le contrôle du promoteur pPOX2 n'a pas donné de résultats probant. Il reste, bien étendu, à surexprimer une par une et/ou par combinaison les acyltransférases de *Y. lipolytica* sous le contrôle du promoteur constitutif TEF. Par contre, la surexpression de l'acyltransférase Sct1p a révélé une diminution de la vitesse de synthèse des TAG, probablement à cause d'une retrorégulation de la synthèse de précurseurs (G-3-P ou acyl-CoA). La levée de cette retrorégulation pourrait permettre d'augmenter la synthèse de TAG.

Une autre approche pour augmenter la production de lipides serait de jouer sur la production des précurseurs nécessaires à leur néosynthèse, c'est-à-dire sur la production d'acétyl-CoA et de NADPH. L'ATP citrate lyase permet d'obtenir l'acétyl-CoA à partir du citrate. L'enzyme malique assure l'apport du NADPH. La surexpression de ces enzymes a permis d'augmenter le taux des lipides dans différents organismes (Zhang *et al.*, 2007). Au laboratoire,

nous avons initié l'étude de la surexpression de ces deux enzymes, mais les premiers résultats obtenus semblent indiquer qu'elle ne produit pas.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la modification du profil des lipides accumulés. Dans un premier temps nous avons entrepris la délétion et la surexpression de la désaturase $\Delta 12$ de la levure. Les mutants de délétion ne sont plus capables de synthétiser l'acide linoléique (C18 :2) et les mutants de surexpression présentent une augmentation significative de l'accumulation de cet acide gras, démontrant ainsi qu'il est possible de moduler le profil des lipides accumulés chez *Y. lipolytica*. La surexpression de désaturases hétérologues $\Delta 6$ et $\Delta 12$ hétérologues (provenant du champignon oléagineux *Mortierella Alpina* ou du rat) ont permis d'observer une faible accumulation d'acide linoléique (C18 :3). Ceci démontre que le C18 :3 est un substrat qui peut être pris en charge par les acyltransférases de *Y. lipolytica*. Il reste à optimiser cette production. Pour la production d'acides gras à longue chaîne il sera nécessaire d'exprimer d'autres désaturases et élongases hétérologues dans nos souches les plus performantes.

Au cours de cette étude nous avons approfondi nos connaissances du métabolisme lipidique chez la levure oléagineuse *Y. lipolytica*. Ceci nous a permis de construire des souches hyperaccumulatrices en jouant sur le flux du carbone et des souches aux profils lipidiques modifiés en jouant sur l'expression de désaturases et d'acyltransférases. La combinaison de ces différentes approches devrait permettre d'obtenir des souches performantes capables d'accumuler des lipides de composition intéressante, en utilisant des substrats peu onéreux comme le glycérol industriel (sous-produit de la filière biodiesel) ou des déchets industriels agroalimentaires. La production de lipides présentant une valeur ajoutée pourrait trouver des applications dans la filière des biocarburants ou la production de peintures et d'adhésifs par l'industrie chimique. Les souches génétiquement modifiées devraient être alors étudiées en fermenteur, afin de modéliser leur comportement, de choisir leur substrat de conversion et de maximiser leurs performances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Feel, W., S. S. Chirala and S. J. Wakil (1992). Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4534-8.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J. M. Thevelein and L. Adler (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J* **16**: 2179-87.
- Athenstaedt, K. and G. Daum (1997). Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 7611-6.
- Athenstaedt, K. and G. Daum (2006). The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1355-69.
- Athenstaedt, K., P. Jolivet, C. Boulard, M. Zivy, L. Negroni, J. M. Nicaud and T. Chardot (2006). Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* **6**: 1450-9.
- Athenstaedt, K., D. Zweytick, A. Jandrositz, S. D. Kohlwein and G. Daum (1999). Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 6441-8.
- Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, A. Shevchenko and K. Simons (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3254-9.
- Barth, G. and C. Gaillardin (1996). *Yarrowia lipolytica*. Non conventional Yeasts in Biotechnology. K. Wolf. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. **1**: 313-388.
- Barth, G., B. JM, A. Dominguez, S. Kerscher, D. Ogrydziak, V. Titorenko and C. Gaillardin (2003). Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. Fuctional Genetics of industrial yeasts. d. W. J.H. Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag. **1**: 227-271.
- Barth, G. and T. Scheuber (1993). Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol Gen Genet* **241**: 422-30.
- Beckman, M. (2006). Cell biology. Great balls of fat. *Science* **311**: 1232-4.
- Behrouzian, B. and P. H. Buist (2002). Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 577-82.

- Beopoulos, A., T. Chardot and J. M. Nicaud (2009). *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* **91**: 692-696.
- Beopoulos, A., Z. Mrozova, F. Thevenieau, M. T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot and J. M. Nicaud (2008a). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*.
- Beopoulos, A., Z. Mrozova, F. Thevenieau, M. T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot and J. M. Nicaud (2008b). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7779-89.
- Black, P. N. (1990). Characterization of FadL-specific fatty acid binding in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1046**: 97-105.
- Blanchette-Mackie, E. J., N. K. Dwyer, T. Barber, R. A. Coxey, T. Takeda, C. M. Rondinone, J. L. Theodorakis, A. S. Greenberg and C. Londos (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* **36**: 1211-26.
- Blanchin-Roland, S., R. R. Cordero Otero and C. Gaillardin (1994). Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **14**: 327-38.
- Bossie, M. A. and C. E. Martin (1989). Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J Bacteriol* **171**: 6409-13.
- Brown, L. J., M. Stoffel, S. M. Moran, A. A. Fernald, D. A. Lehn, M. M. LeBeau and M. J. MacDonald (1996). Structural organization and mapping of the human mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase-encoding gene and pseudogene. *Gene* **172**: 309-12.
- Browse, J., P. J. McCourt and C. R. Somerville (1986). Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem* **152**: 141-5.
- Cases, S., S. J. Smith, Y. W. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusic, S. K. Erickson and R. V. Farese, Jr. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13018-23.
- Carbon, J. and V. Calderon (1991). Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochim Biophys Acta* **1067**: 139-44.
- Cescut, J. (2009). Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés. Toulouse, Université de Toulouse: 283.

- Chen, C. C. and T. H. Wilson (1984). The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **259**: 10150-8.
- Chirala, S. S. (1992). Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10232-6.
- Chirala, S. S., M. A. Kuziora, D. M. Spector and S. J. Wakil (1987). Complementation of mutations and nucleotide sequence of FAS1 gene encoding beta subunit of yeast fatty acid synthase. *J Biol Chem* **262**: 4231-40.
- Choi, J. Y., J. Stuke, S. Y. Hwang and C. E. Martin (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* **271**: 3581-9.
- Cohen, G., F. Fessler, A. Traczyk, J. Rytka and H. Ruis (1985). Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol Gen Genet* **200**: 74-9.
- Cordero, O. and C. Gaillardin (1996). Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 143-148.
- Czabany, T., K. Athenstaedt and G. Daum (2006). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta*.
- Czabany, T., K. Athenstaedt and G. Daum (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 299-309.
- Czabany, T., A. Wagner, D. Zwegg, K. Lohner, E. Leitner, E. Ingolic and G. Daum (2008). Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**: 17065-74.
- Czarnecka, H. and S. Yokoyama (1993). Regulation of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction by acyl acceptors and demonstration of its "idling" reaction. *J Biol Chem* **268**: 19334-40.
- Dahlqvist, A., U. Stahl, M. Lenman, A. Banas, M. Lee, L. Sandager, H. Ronne and S. Stymne (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6487-92.
- Daum, G., N. D. Lees, M. Bard and R. Dickson (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1471-510.

- Davidow, L., A. Franke and J. De Zeeuw (1987). New *Yarrowia lipolytica* transformants used for expression and secretion of heterologous proteins, especially prorennin and human anaphylatoxin C5a. European Patent Application **EP 86 307 839**.
- Dean, M. and T. Annilo (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: 123-42.
- Dell'Angelica, E. C., C. A. Stella, M. R. Ermacora, E. H. Ramos and J. A. Santome (1992). Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Comp Biochem Physiol B* **102**: 261-5.
- DiRusso, C. C., P. N. Black and J. D. Weimar (1999). Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog Lipid Res* **38**: 129-97.
- Dominguez, A., M. Costas, M. A. Longo and A. Sanroman (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **25**: 1225-9.
- Dominguez, A., E. Ferminan and C. Gaillardin (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib. Microbiol.* **5**: 151-72.
- Doody, M. C., H. J. Pownall, Y. J. Kao and L. C. Smith (1980). Mechanism and kinetics of transfer of a fluorescent fatty acid between single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **19**: 108-16.
- Einerhand, A. W., W. Kos, W. C. Smart, A. J. Kal, H. F. Tabak and T. G. Cooper (1995). The upstream region of the FOX3 gene encoding peroxisomal 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase in *Saccharomyces cerevisiae* contains ABF1- and replication protein A-binding sites that participate in its regulation by glucose repression. *Mol Cell Biol* **15**: 3405-14.
- Eisenkolb, M., C. Zenzmaier, E. Leitner and R. Schneiter (2002). A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol Biol Cell* **13**: 4414-28.
- Faergeman, N. J., P. N. Black, X. D. Zhao, J. Knudsen and C. C. DiRusso (2001). The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. *J Biol Chem* **276**: 37051-9.
- Faergeman, N. J. and J. Knudsen (1997). Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323 (Pt 1)**: 1-12.
- Ferrante, G. and M. Kates (1983). Pathways for desaturation of oleoyl chains in *Candida lipolytica*. *Can J Biochem Cell Biol* **61**: 1191-6.

- Ferreira, R. G., N. I. Burgardt, D. Milikowski, G. Melen, A. R. Kornblihtt, E. C. Dell' Angelica, J. A. Santome and M. R. Ermacora (2006). A yeast sterol carrier protein with fatty-acid and fatty-acyl-CoA binding activity. *Arch Biochem Biophys* **453**: 197-206.
- Fickers, P., F. Fudalej, M. T. Le Dall, S. Casaregola, C. Gaillardin, P. Thonart and J. M. Nicaud (2005). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol* **42**: 264-74.
- Fickers, P., M. T. Le Dall, C. Gaillardin, P. Thonart and J. M. Nicaud (2003a). New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods* **55**: 727-37.
- Fickers, P., J. M. Nicaud, J. Destain and P. Thonart (2003b). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 136-42.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509.
- Fournier, P., L. Guyaneux, M. Chasles and C. Gaillardin (1991). Scarcity of ars sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **7**: 25-36.
- Freeman, D. A. and M. Ascoli (1982). Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem* **257**: 14231-8.
- Fujimori, K., S. Anamart, Y. Nakagawa, S. Sugioka, D. Ohta, Y. Oshima, Y. Yamada and S. Harashima (1997). Isolation and characterization of mutations affecting expression of the delta9- fatty acid desaturase gene, OLE1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **413**: 226-30.
- Gaigg, B., T. B. Neergaard, R. Schneiter, J. K. Hansen, N. J. Faergeman, N. A. Jensen, J. R. Andersen, J. Friis, R. Sandhoff, H. D. Schroder and J. Knudsen (2001). Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**: 1147-60.
- Gaillardin, C. and A. M. Ribet (1987). LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **11**: 369-75.
- Gaillardin, C., A. M. Ribet and H. Heslot (1985). Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **10**: 49-58.
- Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein and P. O. Brown (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-57.

- Gill, C. O. and C. Ratledge (1972). Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. strain 107. *Biochem J* **127**: 59P-60P.
- Gonzalez, C. I. and C. E. Martin (1996). Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript. *J Biol Chem* **271**: 25801-9.
- Goodridge, A. G., D. A. Fantozzi, S. A. Klautky, X. J. Ma, C. Roncero and L. M. Salati (1991). Nutritional and hormonal regulation of genes for lipogenic enzymes. *Proc Nutr Soc* **50**: 115-22.
- Grauslund, M., J. M. Lopes and B. Ronnow (1999). Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Res* **27**: 4391-8.
- Grauslund, M. and B. Ronnow (2000). Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* **46**: 1096-100.
- Guerzoni, M. E., R. Lanciotti and P. S. Cocconcelli (2001a). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* **147**: 2255-64.
- Guerzoni, M. E., R. Lanciotti, L. Vannini, F. Galgano, F. Favati, F. Gardini and G. Suzzi (2001b). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int J Food Microbiol* **69**: 79-89.
- Guo, T., Y. Y. Kit, J. M. Nicaud, M. T. Le Dall, S. K. Sears, H. Vali, H. Chan, R. A. Rachubinski and V. I. Titorenko (2003). Peroxisome division in the yeast *Yarrowia lipolytica* is regulated by a signal from inside the peroxisome. *J Cell Biol* **162**: 1255-66.
- Gurr, M. I., J. I. Harwood and K. N. Frayn (2002). *Lipid Biochemistry*. Oxford, Blackwell Science.
- Gwynne, J. T. and J. F. Strauss, 3rd (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* **3**: 299-329.
- Hamilton, J. A. (1998). Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**: 467-81.
- Han, G., K. Gable, S. D. Kohlwein, F. Beaudoin, J. A. Napier and T. M. Dunn (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J Biol Chem* **277**: 35440-9.
- Hanahan, D. J. (1954). Positional asymmetry of fatty acids on lecithin. *J Biol Chem* **211**: 313-9.

- Hasslacher, M., A. S. Ivessa, F. Paltauf and S. D. Kohlwein (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **268**: 10946-52.
- Holland, I., S. P. Cole, K. Kuchler and C. Higgins (2003). *ABC Proteins Bacteria to Man* Academic Press-Elsevier Science.
- Holloway, P. W. and J. T. Katz (1972). A requirement for cytochrome b 5 in microsomal stearyl coenzyme A desaturation. *Biochemistry* **11**: 3689-96.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich and S. Jentsch (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**: 577-86.
- Johnson, D. R., L. J. Knoll, D. E. Levin and J. I. Gordon (1994). *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* **127**: 751-62.
- Juretzek, T., M. Le Dall, S. Mauersberger, C. Gaillardin, G. Barth and J. Nicaud (2001). Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **18**: 97-113.
- Juretzek, T., H. J. Wang, J.-M. Nicaud, S. Mauersberger and G. Barth (2000). Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**: 320-326.
- Kamiryo, T., S. Parthasarathy and S. Numa (1976). Evidence that acyl coenzyme A synthetase activity is required for repression of yeast acetyl coenzyme A carboxylase by exogenous fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 386-90.
- Kamp, F., D. Zakim, F. Zhang, N. Noy and J. A. Hamilton (1995). Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* **34**: 11928-37.
- Kennedy, E. P. (1956). The biological synthesis of phospholipids. *Can J Biochem Physiol* **34**: 334-48.
- Kent, C. (1995). Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **64**: 315-43.
- Kleinfeld, A. M. and J. Storch (1993). Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry* **32**: 2053-61.
- Knudsen, J., N. J. Faergeman, H. Skott, R. Hummel, C. Borsting, T. M. Rose, J. S. Andersen, P. Hojrup, P. Roepstorff and K. Kristiansen (1994). Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *Biochem J* **302** (Pt 2): 479-85.

- Koffel, R., R. Tiwari, L. Falquet and R. Schneiter (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* **25**: 1655-68.
- Kohlwein, S. D., S. Eder, C. S. Oh, C. E. Martin, K. Gable, D. Bacikova and T. Dunn (2001). Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 109-25.
- Kottig, H., G. Rottner, K. F. Beck, M. Schweizer and E. Schweizer (1991). The pentafunctional FAS1 genes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* are co-linear and considerably longer than previously estimated. *Mol Gen Genet* **226**: 310-4.
- Kunau, W. H., V. Dommes and H. Schulz (1995). beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* **34**: 267-342.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-32.
- Lardizabal, K. D., J. T. Mai, N. W. Wagner, A. Wyrick, T. Voelker and D. J. Hawkins (2001). DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J Biol Chem* **276**: 38862-9.
- Le Dall, M. T., J. M. Nicaud and C. Gaillardin (1994). Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **26**: 38-44.
- Leber, R., K. Landl, E. Zinser, H. Ahorn, A. Spok, S. D. Kohlwein, F. Turnowsky and G. Daum (1998). Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol Biol Cell* **9**: 375-86.
- Lester, R. L., G. B. Wells, G. Oxford and R. C. Dickson (1993). Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J Biol Chem* **268**: 845-56.
- Lindqvist, Y., W. Huang, G. Schneider and J. Shanklin (1996). Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *Embo J* **15**: 4081-92.
- Luo, Y. S., J. M. Nicaud, P. P. Van Veldhoven and T. Chardot (2002). The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. *Arch Biochem Biophys* **407**: 32-38.
- Luo, Y. S., H. J. Wang, K. V. Gopalan, D. K. Srivastava, J. M. Nicaud and T. Chardot (2000). Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Arch Biochem Biophys* **384**: 1-8.

- Madzak, C., C. Gaillardin and J. M. Beckerich (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.* **109**: 63-81.
- Madzak, C., B. Treton and S. Blanchin-Roland (2000). Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 207-16.
- Maftahi, M., C. Gaillardin and J. M. Nicaud (1996). Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 859-68.
- Marchesini, S. and Y. Poirier (2003). Futile Cycling of Intermediates of Fatty Acid Biosynthesis toward Peroxisomal β -Oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 32596-32601.
- McDermott, M., M. J. Wakelam and A. J. Morris (2004). Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* **82**: 225-53.
- McDonough, V. M., J. E. Stucky and C. E. Martin (1992). Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* **267**: 5931-6.
- McHale, M. W., K. D. Kroening and D. A. Bernlohr (1996). Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene. *Yeast* **12**: 319-31.
- Miller, J. P., R. S. Lo, A. Ben-Hur, C. Desmarais, I. Stagljar, W. S. Noble and S. Fields (2005). Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12123-8.
- Mitchell, A. G. and C. E. Martin (1995). A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase. *J Biol Chem* **270**: 29766-72.
- Mitchell, A. G. and C. E. Martin (1997). *Fah1p*, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. *J Biol Chem* **272**: 28281-8.
- Mlickova, K., E. Roux, K. Athenstaedt, S. d'Andrea, G. Daum, T. Chardot and J. M. Nicaud (2004). Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3918-24.

- Mohamed, A. H., S. S. Chirala, N. H. Mody, W. Y. Huang and S. J. Wakil (1988). Primary structure of the multifunctional alpha subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from FAS2 gene sequence. *J Biol Chem* **263**: 12315-25.
- Muller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen and H. Dalboge (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**: 1267-83.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Munn, A. L. and H. Riezman (1994). Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* **127**: 373-86.
- Murphy, D. J. and J. Vance (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* **24**: 109-15.
- Nakagawa, Y., N. Sakumoto, Y. Kaneko and S. Harashima (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 707-13.
- Nguyen, H. T., A. Dieterich, K. Athenstaedt, N. H. Truong, U. Stahl and E. Nevoigt (2004). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-glycerol 3-phosphate. *Metab Eng* **6**: 155-63.
- Nicaud, J. M., E. Fabre and C. Gaillardin (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr Genet* **16**: 253-60.
- Nicaud, J. M., F. Fudalej, C. Neuveglise and J.-M. Beckerich (2008). Méthode d'intégration multiple ciblée chez la levure *Yarrowia lipolytica*. France. N° **08/50736**.
- Nicaud, J. M., C. Madzak, P. van den Broek, C. Gysler, P. Duboc, P. Niederberger and C. Gaillardin (2002). Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* **2**: 371-9.
- Novials, A., J. Vidal, C. Franco, F. Ribera, A. Sener, W. J. Malaisse and R. Gomis (1997). Mutation in the calcium-binding domain of the mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase gene in a family of diabetic subjects. *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 570-2.
- Nuttley, W. M., A. M. Brade, C. Gaillardin, G. A. Eitzen, J. R. Glover, J. D. Aitchison and R. A. Rachubinski (1993). Rapid Identification and Characterization of Peroxisomal Assembly Mutants in *Yarrowia-Lipolytica*. *Yeast* **9**: 507-517.

- Oelkers, P., D. Cromley, M. Padamsee, J. T. Billheimer and S. L. Sturley (2002). The *DGAI* Gene Determines a Second Triglyceride Synthetic Pathway in Yeast. *J. Biol. Chem.* **277**: 8877-8881.
- Oh, C. S., D. A. Toke, S. Mandala and C. E. Martin (1997). ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**: 17376-84.
- Ohsaki, Y., J. Cheng, M. Suzuki, Y. Shinohara, A. Fujita and T. Fujimoto (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 399-407.
- Overkamp, K. M., B. M. Bakker, P. Kotter, M. A. Luttik, J. P. Van Dijken and J. T. Pronk (2002). Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2814-21.
- Palmieri, L., F. M. Lasorsa, A. Voza, G. Agrimi, G. Fiermonte, M. J. Runswick, J. E. Walker and F. Palmieri (2000). Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 363-9.
- Palmieri, L., H. Rottensteiner, W. Girzalsky, P. Scarcia, F. Palmieri and R. Erdmann (2001). Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *Embo J* **20**: 5049-59.
- Papanikolaou, S. and G. Aggelis (2003a). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr Microbiol* **46**: 398-402.
- Papanikolaou, S. and G. Aggelis (2003b). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. *Biotechnol Lett.* **21**: 747-749.
- Papanikolaou, S., I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc and G. Aggelis (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 308-12.
- Paul, S., K. Gable, F. Beaudoin, E. Cahoon, J. Jaworski, J. A. Napier and T. M. Dunn (2006). Members of the *Arabidopsis* FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 9018-29.
- Peters, I. and F. Nelson (1948). Preliminary characterisation of the lipase of *Mycotorula lipolytica*. *J Bacteriol* **55**: 593-600.
- Pignede, G., H. Wang, F. Fudalej, C. Gaillardin, M. Seman and J. M. Nicaud (2000a). Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**: 2802-2810.

- Pignede, G., H. J. Wang, F. Fudalej, M. Seman, C. Gaillardin and J. M. Nicaud (2000b). Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3283-9.
- Ratledge, C. (1989). *Microbial lipids*. London, Academic Press.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. Technological advances in improved and alternative sources of lipids. B. S. Kamel, Kakuda, Y. . London, Blackie academic and professional,; 235-291.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans* **30**: 1047-50.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **86**: 807-15.
- Ratledge, C. and K. Tan (1990). Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*. H. Verachtert and R. De Mot. New York, Marcel Dekker: 223-254.
- Ratledge, C. and J. P. Wynn (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol* **51**: 1-51.
- Ratledge, C. and K. Tan (1990). Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*: 223-254.
- Richard, M., R. R. Quijano, S. Bezzate, F. Bordon-Pallier and C. Gaillardin (2001). Tagging Morphogenetic Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **183**: 3098-3107.
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, M. J. Robenek, D. Troyer and N. J. Severs (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* **119**: 4215-24.
- Robenek, M. J., N. J. Severs, K. Schlattmann, G. Plenz, K. P. Zimmer, D. Troyer and H. Robenek (2004). Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J* **18**: 866-8.
- Rose, T. M., E. R. Schultz and G. J. Todaro (1992). Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11287-91.
- Rosler, H., C. Rieck, T. DeLong, U. Hoja and E. Schweizer (2003). Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-long-chain fatty acid synthesis. *Mol Genet Genomics* **269**: 290-8.

- Routaboul, J. M., C. Benning, N. Bechtold, M. Caboche and L. Lepiniec (1999). The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol Biochem* **37**: 831-840.
- Sandager, L., M. H. Gustavsson, U. Stahl, A. Dahlqvist, E. Wiberg, A. Banas, M. Lenman, H. Ronne and S. Stymne (2002). Storage Lipid Synthesis Is Non-essential in Yeast. *J. Biol. Chem.* **277**: 6478-6482.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 2087-96.
- Schjerling, C. K., R. Hummel, J. K. Hansen, C. Borsting, J. M. Mikkelsen, K. Kristiansen and J. Knudsen (1996). Disruption of the gene encoding the acyl-CoA-binding protein (ACB1) perturbs acyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 22514-21.
- Schneiter, R., B. Brugger, R. Sandhoff, G. Zellnig, A. Leber, M. Lampl, K. Athenstaedt, C. Hrastnik, S. Eder, G. Daum, F. Paltauf, F. T. Wieland and S. D. Kohlwein (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**: 741-54.
- Schuller, H. J., A. Hahn, F. Troster, A. Schutz and E. Schweizer (1992). Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes FAS1 and FAS2 by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *Embo J* **11**: 107-14.
- Schwank, S., R. Ebbert, K. Rautenstrauss, E. Schweizer and H. J. Schuller (1995). Yeast transcriptional activator INO2 interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**: 230-7.
- Schweizer, E. and H. Bolling (1970). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in saturated fatty acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**: 660-6.
- Schweizer, M., L. M. Roberts, H. J. Holtke, K. Takabayashi, E. Hollerer, B. Hoffmann, G. Muller, H. Kottig and E. Schweizer (1986). The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. *Mol Gen Genet* **203**: 479-86.
- Shanklin, J. and E. B. Cahoon (1998). Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids1. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 611-641.
- Smith, J. J., M. Marelli, R. H. Christmas, F. J. Vizeacoumar, D. J. Dilworth, T. Ideker, T. Galitski, K. Dimitrov, R. A. Rachubinski and J. D. Aitchison (2002). Transcriptome

- profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J. Cell Biol.* **158**: 259-271.
- Smith, S. J., S. Cases, D. R. Jensen, H. C. Chen, E. Sande, B. Tow, D. A. Sanan, J. Raber, R. H. Eckel and R. V. Farese, Jr. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet* **25**: 87-90.
- Sorger, D., K. Athenstaedt, C. Hrastnik and G. Daum (2004). A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *J Biol Chem.*
- Sorger, D. and G. Daum (2002). Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **184**: 519-24.
- Sorger, D. and G. Daum (2003). Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 289-99.
- Sprague, G. F. and J. E. Cronan (1977). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *J Bacteriol* **129**: 1335-42.
- Stahl, U., A. S. Carlsson, M. Lenman, A. Dahlqvist, B. Huang, W. Banas, A. Banas and S. Stymne (2004). Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 1324-35.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough and C. E. Martin (1989). Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264**: 16537-44.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough and C. E. Martin (1990). The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* **265**: 20144-9.
- Tanaka, A. and S. Fukui (1989). Metabolism of n-alkanes. The yeast. *Metabolism and physiology of yeasts* A. H. Rose and J. S. Harrison. London, Academic Press. **3**: 261-287.
- Tehlivets, O., K. Scheuringer and S. D. Kohlwein (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 255-70.
- Thevenieau, F. (2006). Metabolic engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of long-chain dicarboxylic acids from renewable oil feedstock, PhD thesis. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Thevenieau, F., M. T. Le Dall, B. Nthangeni, S. Mauersberger, R. Marchal and J. M. Nicaud (2007). Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization. *Fungal Genet Biol* **44**: 531-42.

- Thiele, C. and J. Spandl (2008). Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 378-85.
- Titorenko, V. I., J. M. Nicaud, H. Wang, H. Chan and R. A. Rachubinski (2002). Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* **156**: 481-94.
- Toke, D. A. and C. E. Martin (1996). Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 18413-22.
- Trotter, P. J. (2001). The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **21**: 97-119.
- Turkish, A. R., A. L. Henneberry, D. Cromley, M. Padamsee, P. Oelkers, H. Bazzi, A. M. Christiano, J. T. Billheimer and S. L. Sturley (2005). Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases: members of the diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene superfamily. *J Biol Chem* **280**: 14755-64.
- Tzen, J. T. and A. H. Huang (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* **117**: 327-35.
- van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112-24.
- van Roermund, C. W., E. H. Hetteema, A. J. Kal, M. van den Berg, H. F. Tabak and R. J. Wanders (1998). Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *Embo J* **17**: 677-87.
- Vernis, L., A. Abbas, M. Chasles, C. M. Gaillardin, C. Brun, J. A. Huberman and P. Fournier (1997). An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **17**: 1995-2004.
- Vigeolas, H., P. Waldeck, T. Zank and P. Geigenberger (2007). Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnol J* **5**: 431-41.
- Voelker, T. and A. J. Kinney (2001). Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 335-361.
- Wagner, S. and F. Paltauf (1994). Generation of glycerophospholipid molecular species in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acid pattern of phospholipid classes and selective acyl turnover at sn-1 and sn-2 positions. *Yeast* **10**: 1429-37.

- Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi (1983). Fatty-Acid Synthesis And Its Regulation. Annual Review Of Biochemistry **52**: 537-579.
- Wan, H. C., R. C. Melo, Z. Jin, A. M. Dvorak and P. F. Weller (2007). Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. Faseb J **21**: 167-78.
- Wang, H., M. T. Le Dall, Y. Wache, C. Laroche, J. M. Belin and J. M. Nicaud (1999a). Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochem Biophys **31**: 165-74.
- Wang, H. J., M. T. Le Dall, Y. Wach, C. Laroche, J. M. Belin, C. Gaillardin and J. M. Nicaud (1999b). Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Bacteriol. **181**: 5140-5148.
- Yang, H., M. Bard, D. A. Bruner, A. Gleeson, R. J. Deckelbaum, G. Aljinovic, T. M. Pohl, R. Rothstein and S. L. Sturley (1996). Sterol esterification in yeast: a two-gene process. Science **272**: 1353-6.
- Zhang, S., Y. Skalsky and D. J. Garfinkel (1999). MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **151**: 473-83.
- Zhang, Y., I. P. Adams and C. Ratledge (2007). Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. Microbiology **153**: 2013-25.
- Zimmerman, A. W. and J. H. Veerkamp (2002). New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. Cell Mol Life Sci **59**: 1096-116.
- Zinjarde, S. S., B. V. Kale, P. V. Vishwasrao and A. R. Kumar (2008). Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. J Microbiol Biotechnol **18**: 1522-8.
- Zweytick, D., K. Athenstaedt and G. Daum (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta **1469**: 101-20.

Liste des Publications

Liste de publications**Thèse:**

1. A. Beopoulos, Z. Mrozova, F. Thevenieau, M.T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot, and J.M. Nicaud, *Control of lipid accumulation in the yeast Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(24): p. 7779-8779.
2. A. Beopoulos, T. Chardot, and J.M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation*. Biochimie, 2009. **91**(6): p. 692-696.
3. A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, and J.M. Nicaud, *Yarrowia Lipolytica as a cell factory for oleochemical biotechnology*, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, Editor. 2009, Springer.
4. A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, S. Zinjarde, C. Neuveglise, and J.M. Nicaud, *The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, Editor. 2009, Springer: Germany.
5. F. Thevenieau, A. Beopoulos, T. Desfougeres, J. Sabirova, K. Albertin, S. Zinjarde, and J.M. Nicaud, *Uptake and assimilation of hydrophobic substrates by the oleaginous yeast Yarrowia Lipolytica*, in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, Editor. 2009, Springer.
6. A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J.L. Uribe Larrea, C. Molina-Jouve, and J.M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production*. Prog Lipid Res, Submitted July 2009.
7. A. Beopoulos, R. Haddouche, P. Kabran, C. T., and J.M. Nicaud, *Role of storage lipid proteins in lipid accumulation and lipid profile in the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol, Submitted July 2009.

Master :

8. S. d'Andrea, M. Canonge, A. Beopoulos, P. Jolivet, M.A. Hartmann, M. Miquel, L. Lepiniec, and T. Chardot, *At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities associated with Arabidopsis thaliana seed oil bodies*. Biochimie, 2007. **89**(2): p. 222-229.

Brevet

9. J.M. Nicaud, A. Beopoulos, and T. Chardot, *Augmentation de l'accumulation de lipide et production de lipide par des souches mutantes de Yarrowia lipolytica*. BIF117612 FR2008: déposé Juillet 2008 France.

Liste des communications

- 1 **Turin Yeast Lipid Conference 2007-** Communication oral et Poster. *Fatty acids accumulation in yeast*. J-M Nicaud, A. Beopoulos, T. Chardot, F. Thevenieau, J. Cescut, L. Fillaudeau, P. Blanc, C. Molina-Jouve et J-L.Uribelarrea.
- 2 **LMO (Levures, Modèles et Outils) 2008, Nice–** Poster. *Identification des DAG acyltransférases chez la levure Yarrowia lipolytica*. Haddouche Ramdane, Beopoulos Athanasios, Chardot Thierry, Nicaud Jean-Marc
- 3 **EuroFed Lipids 2008, Athènes-** Poster. *Mastering oil accumulation in the yeast Y. lipolytica*. Beopoulos Athansios, Desfougeres Thomas, Chardot Thierry, Nicaud Jean-Marc
- 4 **GERLI (EuroFed) 2008, Compiègnes-** *Obésité de la levure Y. lipolytica, modèles et outils*. A. Beopoulos, T. Desfougeres, T. Chardot et JM Nicaud

Résumé

Titre : Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides.

Résumé : *Yarrowia lipolytica* est une levure oléagineuse qui possède un remarquable potentiel de croissance et d'accumulation de lipides dans des milieux hydrophobes. Au cours de cette étude nous avons approfondi nos connaissances du métabolisme lipidique chez cette levure en mettant l'accent sur la capacité d'accumulation et de dégradation des lipides, la régulation et les interactions des différentes voies métaboliques. L'étude des enzymes du métabolisme des microorganismes oléagineux et de leurs particularités fonctionnelles, en comparaison avec celles des microorganismes non oléagineux, a permis de se focaliser sur des enzymes candidates pour être impliquées dans le caractère oléagineux. L'objectif de cette étude est de combiner les connaissances physiologiques sur cette levure avec les outils génétiques existants afin d'utiliser *Y. lipolytica* comme une usine cellulaire pour la production de grandes quantités de lipides ayant un intérêt industriel. Afin de rediriger les flux de carbone vers la synthèse de lipides, le gène *GUT2*, qui code l'un de deux isomères de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, ainsi que la voie de la β -oxydation ont été invalidés chez *Y. lipolytica*, conduisant à une forte augmentation de l'accumulation des lipides. Afin d'identifier l'étape limitante de la synthèse des TAG et de construire des souches aux profils lipidiques modifiés nous avons joué sur le niveau d'expression des acyltransférases et des désaturases. La contribution relative des acyltransférases dépend de la phase de croissance et leurs affinités vis-à-vis des substrats donneurs d'acyle sont complémentaires. La modification des désaturases a permis d'accumuler des acides gras spécifiques, démontrant ainsi qu'il est possible de moduler le profil des lipides accumulés chez *Y. lipolytica*. Cette étude nous a permis de construire des souches hyperaccumulatrices aux profils lipidiques tels qu'ils permettront de leur trouver des applications biotechnologiques dans la filière des biocarburants ou dans l'industrie oléochimique en tant qu'unités alternatives pour la production de substrats spécifiques.

Mots clés : *Yarrowia lipolytica*, métabolisme lipidique, accumulation lipidique, acides gras, triacylglycérols, ingénierie génétique, biotechnologie, bioconversion

Abstract

Title: Genetic engineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for lipid production.

Abstract: *Yarrowia lipolytica* is an oleaginous yeast with a remarkable potential for growth and lipid accumulation in hydrophobic environments. In this study we have expanded our knowledge of lipid metabolism in this yeast with an emphasis on lipid accumulation and degradation capacity, and the regulation and interaction of the different metabolic pathways. The study of metabolic enzymes in oleaginous microorganisms and their functional specifications in comparison with the non-oleaginous microorganisms has led us to focus on the enzymes potentially conferring the oleaginous character. The objective of this study is to combine the knowledge of yeast's physiology with the existing genetic tools to use *Y. lipolytica* as a cell factory for the production of large amounts of lipids with an industrial interest. In order to redirect carbon flux towards lipid synthesis, the *GUT2* gene coding for a glycerol-3-phosphate dehydrogenase isomer and the β -oxidation pathway were invalidated in *Y. lipolytica* leading to a strong increase of lipid accumulation. As to identify the limiting step of TAG synthesis and to construct strains with altered lipid profiles, we have modified the expression level of acyltransferases and desaturases. The relative contribution of acyltransferases depends on the growth phase and their affinity towards the acylation substrate is complementary. The modification of desaturases allowed the accumulation of specific fatty acids, thus demonstrating the possibility of modulating lipid profile in *Y. lipolytica*. This study has enabled us to construct hyper accumulative strains with added-value lipid profiles that could find biotechnological applications in the energy (biodiesel) field or in the oleochemical industry as alternative units for specific substrate production.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, lipid metabolism, lipid accumulation, fatty acids, triacylglycerols, genetic engineering, biotechnology, bioconversion.