



Métabolisme lipidique et cycle du glyoxylate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Affoue Philomene Kabran-Gnankon

► To cite this version:

Affoue Philomene Kabran-Gnankon. Métabolisme lipidique et cycle du glyoxylate chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Biotechnologies. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0060 . pastel-00625879

HAL Id: pastel-00625879

<https://pastel.hal.science/pastel-00625879>

Submitted on 22 Sep 2011

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.



Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de
l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Biotechnologie

Présentée et soutenue publiquement par

Affoué Philomène KABRAN GNANKON

le 30 septembre 2010

**METABOLISME LIPIDIQUE ET CYCLE DU GLYOXYLATE
CHEZ LA LEVURE *YARROWIA LIPOLYTICA***

Directeur de thèse : **Dr. Jean-Marc NICAUD**

Co-directeur de thèse : **Dr. Cécile Neuvéglise**

JURY :

M. Yves Waché, Maître de conférences, Université de Bourgogne,
M. Thierry Berges, Professeur PhyMoTS Université de Poitiers,
M. Claude Gaillardin, Professeur, Agro-Paris-Tech Institut MICALIS,
M. Stéphane Guillouet, Maître de conférences, INSA de Toulouse,
Mme Cécile Neuvéglise, Chargée de recherche INRA, Institut MICALIS,
M. Jean-Marc Nicaud, Directeur de recherche CNRS, Institut MICALIS,

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire (UMR INRA-CNRS-AgroParisTech) anciennement dirigé par Jean-Marie Beckerich. Depuis janvier 2010, le Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire est inclus dans l'UMR MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé humaine) dirigée par Stéphane Aymerich. Cette thèse a été financée par la présidence de la République de Côte d'Ivoire et le département MICA de l'INRA.

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Jean-Marc Nicaud pour m'avoir encadrée tout au long de ces trois années de thèse et pour tout ce qu'il m'a apporté comme connaissances scientifiques. Je vous remercie au fond du cœur de m'avoir guidée tout au long de ces années de thèse et pour l'intérêt que vous avez accordé à mon travail.

La deuxième personne que je tiens à remercier du fond du cœur, c'est le Dr Cécile Neuveglise qui a accepté de co-encadrer ma thèse. Cécile je vous remercie non seulement pour toutes vos connaissances scientifiques que vous avez partagées avec moi, mais également pour votre patience, votre gentillesse et votre dévouement. Je vous remercie aussi pour l'aide que vous m'avez apportée pour la rédaction de ma thèse et pendant les moments difficiles.

Je remercie les Professeurs Thierry Bergès (Université de Poitiers) et Yves Waché (AgroSup Dijon) pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Professeur Stéphane Guillouet (INSA de Toulouse) d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie vivement le Professeur Claude Gaillardin pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également au Docteur Jean-Marie Beckerich, qui en tant que directeur du laboratoire a mis tous les moyens en œuvre pour que cette thèse se passe dans de bonnes conditions.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Josef Deutscher pour le rôle important qu'il a joué dans le déroulement de cette thèse. Merci pour les conseils scientifiques, le soutien et l'aide pendant les périodes difficiles.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe GM27 qui ont contribué de près ou de loin à mon travail de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Franck Fudalej qui m'a appris les bases de la biologie moléculaire et avec qui j'ai construit mes premiers mutants. Merci Franck pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour toutes tes connaissances scientifiques que tu as partagées avec moi.

Je remercie Dr. Pierre-Henri Benetti de m'avoir encadrée pour une partie de mon travail. PH, merci de m'avoir aidé dans mes démarches administratives à la préfecture de Versailles.

Je remercie Dr. Nguyen Vang pour m'avoir encouragé à m'inscrire pour cette thèse, son aide et ses conseils.

Je remercie Dr Thanos pour son amitié et pour tout ce que j'ai appris avec lui sur l'extraction des lipides chez la levure.

Je tiens aussi à remercier Dr Thomas Desfougères pour tout l'aide scientifique qu'il m'a apportée pour la production et la purification des protéines.

Je remercie Dr. France Thevenieau pour ses conseils et pour m'avoir donné les petites astuces pour les manip à mon arrivée au laboratoire.

Je remercie particulièrement Dr Thierry Dulermo pour sa gentillesse ses conseils scientifiques, ses encouragements. Il m'a été très agréable de partager le bureau avec toi. Merci pour les repas que tu as organisés avec Crystal. Je remercie également Dr Vincent Sauveplane pour sa gentillesse et ses conseils. Merci pour le repas que vous avez organisé Fred et toi.

Je remercie Dr. Nicolas Morin pour son aide surtout pour avoir donné de son temps pour régler mes problèmes d'ordinateur à la veille de ma soutenance.

Un grand merci à Mariam Kéita pour sa gentillesse, sa tendresse et pour tous les bons moments qu'on a partagés lors de son stage et de son CDD au sein de l'équipe.

Merci à Meryem pour sa contribution à mon travail de thèse. Merci à Najla, pour ses conseils et sa gentillesse. Je remercie Marie Thérèse et Brigitte pour tous les services rendus au cours de mon travail. Merci pour vos conseils scientifiques et les petites astuces sur les clonages, les extractions d'ADN et surtout les transformations chez *Y. lipolytica*.

Je remercie le Professeur Colin Tinsley pour ses conseils scientifiques et pour sa disponibilité. Je remercie Stéphane Tribouillet pour son accueil, sa gentillesse, sa disponibilité, son amitié et pour toutes nos conversations. Je remercie Guy Label pour son aide et ses conseils, Denise et Annie pour le matériel, les produits et pour leur disponibilité.

Je remercie l'ensemble de membres du laboratoire de Grignon (Anita, Anne, Sandrine, Yvan, Philippe, Mathias, Dominique, Dominique, Catherine, Matthieu, Jamila, Serges), pour m'avoir accueillie et pour les agréables moments passés en leur compagnie. Je remercie également les thésards et les étudiants en masters que j'ai rencontrés au cours de ces trois années.

Un grand merci à Jacky Andrianne et sa famille pour leur soutien et pour tous les agréables moments passés en leur compagnie. Je remercie mes amis, Louise, Nadège, Pélagie, Rosemonde, Yguette, Arthur et tous ceux que j'ai oublié de citer.

Je tiens aussi à remercier ma famille pour son soutien pendant toutes ces années d'études.

Je dédie ce travail :

A mon père qui m'a inculqué le goût du savoir, des études et du travail et qui a toujours mis tout en œuvre pour que je puisse faire mes études dans de bonnes conditions. Merci papa pour ton amour et pour tous ces sacrifices.

A ma mère pour son amour, son soutien sans faille. Merci Maman d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir inculqué le courage et la persévérance.

A mes frères et sœurs, représentés par la benjamine Michelle Désirée, pour leur soutien et leur amour.

INTRODUCTION	1
A. Métabolisme des lipides chez les levures	1
A.1. Les lipides.....	1
A.1.1. Généralités	1
A.1.2. Classification des lipides	1
A.1.2.1. Les lipides simples.....	1
A.1.2.2. Les lipides complexes.....	4
A.2. Synthèse et stockage des lipides neutres chez les levures	7
A.2.1. Généralités	7
A.2.2. Voie de Kennedy	8
A.2.3. Voie de l'accumulation des lipides neutres	10
A.2.3.1. Les enzymes de la voie d'accumulation des lipides neutres.....	10
A.2.3.2. Les différentes étapes de la formation des triglycérides.....	14
A.2.3.3. La synthèse des esters de stérols.....	15
A.2.3.4. Mécanisme de formation des corps lipidiques.....	16
A.3. Mobilisation et dégradation des lipides	18
A.3.1. Mobilisation des triglycérides	18
A.3.2. La dégradation des esters de stérols	19
A.3.3. Mécanisme de β -oxydation.....	20
B. Cycles de Krebs et du glyoxylate chez les levures.....	22
B.1. Le cycle du TCA.....	22
B.1.1. Définition du cycle Krebs et son rôle	22
B.1.2. Les différentes étapes et les enzymes du cycle de Krebs	22
B.2. Le cycle du glyoxylate.....	26
B.2.1. Définition et rôle du cycle	26
B.2.2. Les différentes étapes et les enzymes du cycle du glyoxylate.....	27
B.2.2.1. L'isocitrate lyase.....	27
B.2.2.2. La malate synthase	28
B.2.2.3. La malate déshydrogénase	29
B.2.2.4. La citrate synthase.....	29
B.3. Interconnexion entre les cycles de Krebs et du glyoxylate.....	31
C. Les isoenzymes malate déshydrogénase	32
C.1. La malate déshydrogénase mitochondriale.....	32
C.2. La malate déshydrogénase cytoplasmique.....	33
C.3. La malate déshydrogénase peroxysomale.....	34
C.4. Les enzymes malate déshydrogénase chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	34
D. <i>Yarrowia lipolytica</i>.....	35
D.1. Taxonomie	35
D.2. Physiologie de la levure.....	36
D.3. Génomique de la levure.....	38
D.4. Etude génétique de la levure.....	38
D.4.1. Les différentes souches de <i>Yarrowia lipolytica</i>	39
D.4.2. Les outils génétiques	40
E. Compartimentation et signaux d'adressage chez <i>Yarrowia lipolytica</i>.....	40
E.1. Signaux d'adressage aux peroxysomes.....	41
E.2. Signaux d'adressage à la mitochondrie.....	43
E.3. Les signaux d'adressage au cytoplasme	44

MATERIEL ET METHODES.....	45
A. Matériel	45
A.1. Les souches.....	45
A.1.1. Les souches de levure : <i>Yarrowia lipolytica</i>	45
A.1.2. Les souches de bactérie : <i>Escherichia coli</i>	45
A.2 Les vecteurs	45
A.2.1. Les vecteurs d'expression.....	45
A.2.2. Les vecteurs pour la production de protéines	46
A.2.3. Les vecteurs pour le clonage des cassettes de disruption	47
A.3. Les milieux de culture	48
A.3.1. Les milieux pour <i>Yarrowia lipolytica</i>	48
A.3.1.1. Les milieux de culture classique pour <i>Yarrowia lipolytica</i>	48
A.3.1.2. Les milieux de culture pour la croissance des mutants <i>Yarrowia lipolytica</i>	48
A.3.1.3. Le milieu d'induction pour l'accumulation des triglycérides	49
A.3.1.4. Les milieux pour les analyses phénotypiques : tests en goutte.....	49
A.3.2. Les milieux pour <i>Escherichia coli</i>	50
A.3.2.1. Le milieu de culture complet : Luria-Bertani broth (LB)	50
A.3.2.2. Le milieu de culture pour la sélection des transformants	50
A.3.2.3. Le milieu de culture pour la production des protéines de fusion.....	50
B. Méthodes.....	50
B.1. Méthodes liées aux acides nucléiques	50
B.1.1. Techniques de préparation de l'ADN	50
B.1.1.1. Extraction d'ADN plasmidique de bactéries	50
B.1.1.2. Extraction d'ADN génomique de levures	51
B.1.2. Technique d'amplification de l'ADN (PCR).....	52
B.1.3. Analyses et utilisation de l'ADN	53
B.1.3.1. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction.....	53
B.1.3.2. Déphosphorylation de l'ADN	53
B.1.3.3. Méthodes de séparation par électrophorèse et purification de l'ADN.....	54
B.1.3.4. Ligature de l'ADN	54
B.1.4. Southern blot.....	54
B.1.4.1. Préparation et digestion de l'ADNg.....	54
B.1.4.2. Migration sur gel et transfert sur membrane	54
B.1.4.3. Sonde, hybridation et révélation	55
B.2. Méthodes de préparation des protéines.....	55
B.2.1. Préparation des extraits cellulaires pour l'analyse des protéines.....	55
B.2.2. Analyse sur gel d'électrophorèse des protéines intracellulaires	55
B.2.3. Western blot.....	56
B.2.3.1. Transfert des protéines sur membrane	56
B.2.3.2. Hybridation et révélation	56
B.3. Méthodes de transformation	56
B.3.1. Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	56
B.3.1.1. Technique de préparation des cellules compétentes	56
B.3.1.2. Clonage	57
B.3.1.3. Vérification des clones.....	58
B.3.2. Transformation de <i>Yarrowia lipolytica</i>	58
B.3.2.1. Préparation de compétentes	58
B.3.2.2. Transformation de cellules compétentes.....	59
B.3.2.3. Vérification des transformants	60

B.4. Méthodes de disruption.....	60
B.4.1. Mutation au locus par simple crossing over	60
B.4.2. Mutation par double crossing over	61
B.4.2.1. Construction de cassette de disruption par clonage	61
B.4.2.2. Construction de cassette par PCR 3 voies.....	62
B.5. Production et purification de protéines hétérologues	64
B.5.1. Conditions de culture et de production de protéines de fusion avec la MBP	64
B.5.2. Extraction de protéines	64
B.5.3. Purification des protéines sur colonne	64
B.6. Localisation par immunofluorescence	65
B.6.1. Préparation des cellules	65
B.6.2. Hybridation avec les anticorps.....	65
B.6.3. Coloration et visualisation au microscope	66
RESULTATS	67
A. Etude de la voie de synthèse des lipides.....	67
A.1. Localisation de <i>Lro1p</i> et de <i>Dga1p</i>	67
A.1.1. Construction et clonage des vecteurs de fusion <i>DGA1</i> et <i>LRO1</i> avec <i>YFP</i> dans <i>E. coli</i>	67
A.1.2. Transformation des cassettes d'expression dans <i>Yarrowia lipolytica</i>	70
A.1.3. Localisation <i>in vivo</i> par visualisation au microscope optique	71
A.2. Construction de vecteurs d'expression des gènes de la voie de synthèse des lipides dans <i>E. coli</i>	74
A.2.1. Stratégie de construction de vecteurs d'expression : fusion des gènes avec la Maltose binding protein (MBP).	75
A.2.2. Première étape de purification des protéines sur colonne d'amylose.....	77
B. La malate déshydrogénase et les gènes du cycle du glyoxylate chez <i>Y. lipolytica</i>	79
B.1. Etude de la malate déshydrogénase (<i>MDH</i>) chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	79
B.1.1. Analyse <i>in silico</i> des gènes de malate déshydrogénases.....	79
B.1.1.1. Comparaison des gènes chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>Y. lipolytica</i>	79
B.1.1.2. Modèle du gène YALI0E14190g.....	82
B.1.1.3. Analyse de cDNAs et confirmation de l'épissage alternatif	84
B.1.2. Construction des mutants du gène YALI0E14190g	85
B.1.2. 1. Stratégie de construction des mutants.....	85
B.1.2.2. Vecteurs : clonage dans <i>E. coli</i>	87
B.1.2.3. Transformation de <i>Yarrowia lipolytica</i>	88
B.1.2.4. Vérifications des mutants.....	88
B.1.2.5. Analyses phénotypiques.....	91
B.1.3. Localisation de la malate déshydrogénase des mutants <i>MDH4</i> et <i>MDH9</i>	97
B.1.3.1. Stratégie de construction des mutants de fusion	97
B.1.3.2. Constructions de vecteurs de fusion <i>MDH4</i> et <i>MDH9</i> avec le tag HA et <i>YFP</i>	98
B.1.3.3. Transformation des vecteurs de fusion dans <i>Yarrowia lipolytica</i>	99
B.1.3.4. Analyse des mutants	99
B.2. Etude des mutants du cycle du glyoxylate : disruption de <i>MLS1</i> , <i>ICL1</i> et <i>CIT2</i>	101
B.2.1. Voie du glyoxylate : Peroxisomes	101
B.2.2. Construction des vecteurs de disruption des gènes.....	102
B.2.3. Constructions des mutants : transformations de <i>Yarrowia lipolytica</i>	103
B.2.4. Analyses phénotypiques	104
B.2.4.1. Courbes de croissance des mutants	104
B.2.4.2. Tests en gouttes.....	106

DISCUSSION	110
A. Localisation de Dga1p et Lro1p par la fluorescence	110
B. La malate déshydrogénase et les gènes du cycle du glyoxylate chez <i>Y. lipolytica</i>	111
B.1. Etude de la malate déshydrogénase (MDH) chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	111
B.1.1. Rappel sur les enzymes malate déshydrogénase.....	111
B.1.2. Délétion de la malate déshydrogénase peroxysomale	112
B.1.2.1. Phénotype $\Delta mdh3$ chez <i>S. cerevisiae</i>	112
B.1.2.2. Phénotype de l'équivalent de $\Delta mdh3$ chez <i>Y. lipolytica</i>	113
B.1.3. Délétion de la malate déshydrogénase cytoplasmique	115
B.1.3. 1. Phénotype $\Delta mdh2$ chez <i>S. cerevisiae</i>	115
B.1.3.2. Phénotype $\Delta mdh2$ chez <i>Y. lipolytica</i>	115
B.2. Etude des mutants du cycle du glyoxylate : disruption de <i>MLS1</i> , <i>ICL1</i> et <i>CIT2</i>	117
B.2.1. Disruption de <i>ICL1</i>	117
B.2.2. Disruption de <i>MLS1</i>	118
B.2.3. Disruption de <i>CIT2</i>	120
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
LISTE DES ABREVIATIONS	144

AVANT PROPOS

La levure *Yarrowia lipolytica* est une levure ascomycète qui se retrouve dans les milieux naturels riches en lipides et protéines comme les produits laitiers, fromage ou saucisses. Elles sont capables d'utiliser comme seule source de carbone, les substrats hydrophobes tels que les acides gras, les triglycérides et les alcanes etc. C'est une levure oléagineuse capable d'accumuler des grandes quantités de lipides et qui représente un modèle eucaryote pour des études fonctionnelles sur des phénomènes de sécrétion, de biogenèse des peroxysomes, et d'analyse des différents métabolismes impliqués dans l'utilisation des substrats hydrophobes.

La première partie de la revue bibliographique donnera des informations d'une part sur les lipides à savoir les différents catégories de lipides et de l'autre la synthèse et la dégradation de ces lipides neutres chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Elle traitera donc des différentes étapes de la synthèse des lipides neutres, principalement des triglycérides, et les enzymes impliquées dans la voie d'accumulation des lipides neutres et la formation des corps lipidiques. Le travail s'articulera autour de la localisation cellulaire des protéines que codent les gènes *DGA1* et *LRO1* avec le tag Yfp d'une part et de l'autre par la production des protéines impliquées dans la voie de synthèse et de mobilisation des lipides neutres en vue de la production d'anticorps dirigés contre ces protéines.

La deuxième partie de la bibliographie traitera du cycle du glyoxylate qui est requis pour la croissance sur les substrats hydrophobes et les composés en C2. Le shunt glyoxylique important pour la régénération des cofacteurs, l'utilisation de l'acetyl CoA formé et pour la production d'énergie via le cycle de krebs (cycle du TCA). Plusieurs compartiments cellulaires dont les peroxysomes, sont impliqués dans le shunt glyoxylique. Les peroxysomes sont des compartiments cellulaires fortement induits au cours de la croissance sur les substrats hydrophobes. Cette deuxième partie donnera des informations sur les enzymes du cycle du glyoxylate et également sur ceux du cycle du TCA car il y a une interconnexion entre les deux cycles. Elle traitera également des signaux d'adressage aux différents compartiments cellulaires (mitochondrie, peroxysomes et cytoplasme).

Ces différents points à savoir l'accumulation des lipides, l'utilisation des substrats hydrophobes impliquant la β -oxydation, le cycle du glyoxylate et l'utilisation des composés en C2 constitueront les points essentiels de cette étude dans le but de comprendre ces différents phénomènes chez la levure *Y. lipolytica* et les relations qui existent entre eux.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. Métabolisme des lipides chez les levures

A.1. Les lipides

A.1.1. Généralités

Les lipides constituent la matière grasse des êtres vivants et constituent la troisième grande classe de nutriments, après les glucides et les protéines. Ce sont des molécules organiques hydrophobes ou amphiphiles insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène, le chloroforme et l'éther. Les lipides sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et ont une densité inférieure à celle de l'eau.

Les lipides représentent environ 20% du poids du corps humain et sont une réserve énergétique mobilisable stockée dans le tissu adipeux. Ils jouent également un rôle de précurseurs pour la synthèse des stéroïdes, des vitamines, des prostaglandines et assurent un rôle structurel car ils sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. Les lipides peuvent se présenter à l'état solide dans les composés tels que la cire, ou à l'état liquide, comme dans les huiles.

A.1.2. Classification des lipides

Les lipides des organismes vivants sont divisés en deux classes. La classe des lipides simples auxquelles appartiennent des molécules comme les glycérides et les stérides (cholestérol) et une classe de lipides complexes regroupant les glycérophospholipides qui sont les constituants essentiels des membranes biologiques. Par leur imperméabilité dans les membranes ils permettent de former les barrières entre les différents compartiments des cellules.

A.1.2.1. Les lipides simples

➤ Les acides gras

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique (Figure 1). Il est le constituant naturellement retrouvé dans les lipides tels que les huiles et les graisses animales et végétales, ou les cires sous forme estérifiée. Les acides gras sont des monoacides, linéaires, à nombre pair de carbone, car la biosynthèse des acides gras implique l'acétyl-coenzyme A

qui permet l'ajout de deux atomes de carbone à chaque étape de la synthèse des acides gras. On retrouve généralement dans les acides gras naturels une chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone. Les acides gras se caractérisent par la longueur de la chaîne aliphatique, le degré d'insaturation. Ils sont dit acides gras saturés [acide butyrique (4C); acide palmitique (16C); acide stéarique (18C)], quand il n'y a pas de double liaison et insaturés lorsqu'il y a au moins une double liaison dans la chaîne carbonée. Les acides gras sont également caractérisés par le nombre, la localisation et la conformation (cis/trans) de la double liaison. Dans les acides gras insaturés, la position de la première double liaison peut s'exprimer soit en partant du carboxyle (1^{er} carbone); le symbole est Δ , soit en partant du méthyle (dernier carbone); le symbole est oméga (ω). En médecine clinique et en biologie, la désignation des acides gras insaturés la plus courante est celle qui fait appel au symbole oméga (ω). Ainsi nous avons comme exemple de cette catégorie l'acide oléique (C18:1 ω_9), l'acide linoléique (C18:2 ω_6) et l'acide α -linoléique (C18:3 ω_3). Lorsque le symbole Δ est utilisé nous avons l'acide oléique qui est symbolisé par C18:1 Δ^9 (avec la double liaison en position 9 à partir du groupement carboxyle), l'acide linoléique par C18:2 $\Delta^{9,12}$ et l'acide α -linoléique par C18:3 $\Delta^{9,12,15}$. La solubilité des acides gras dépend du nombre de carbone par exemple l'acide butyrique qui a 4 carbones est soluble dans l'eau, puis cette solubilité des acides gras baisse progressivement lorsque le nombre de carbone augmente et ils deviennent insolubles à partir de C₁₀. En ce qui concerne le point de fusion il est aussi fonction du nombre de carbone et de double liaison.

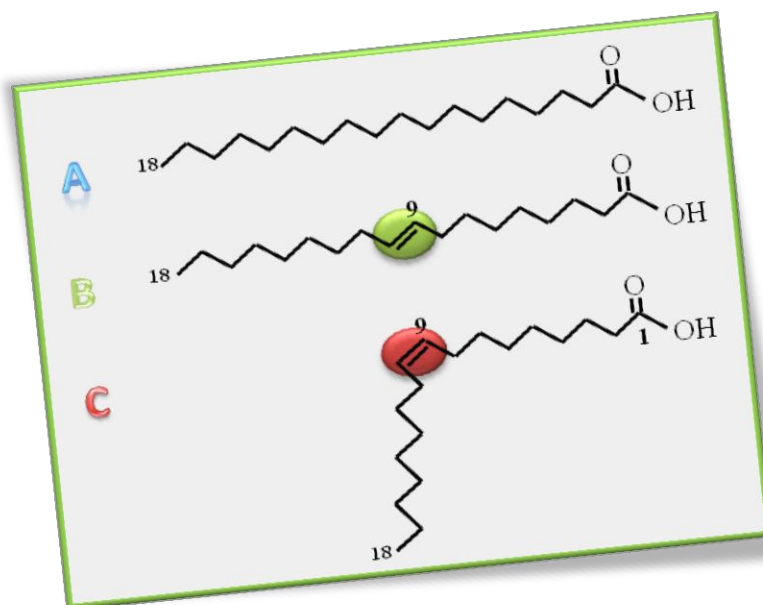


Figure 1: Schéma d'illustration de différentes catégories d'acides gras, avec la différence de degré d'insaturation et la différence entre les deux conformations cis et trans. A : acide gras saturé (acide octadécanoïque ou acide stéarique). B : acide gras saturé trans (acide *trans*-9-octadécénoïque. C : acide gras saturé cis (acide *cis*-9-octadécénoïque ou acide oléique).

➤ Les glycérides ou acyle glycérols

Les glycérides sont des esters d'acide gras et de glycérol (Figure 2). Ils constituent une classe composée de monoglycérides (MAG), de diglycérides (DAG) et de triglycérides (TAG). Parmi ces catégories de lipides, les triglycérides également appelés triacylglycérols sont les plus abondants dans les cellules eucaryotes (Daum *et al.*, 2006) et ont été les plus étudiés. Ce sont des glycérides dans lesquels les trois groupements hydroxyles du glycérol sont estérifiés par des acides gras. Les triacylglycérols représentent les lipides naturels les plus nombreux, présents dans le tissu adipeux (graisses de réserve) et dans de nombreuses huiles végétales et graisses animales. Ils représentent une réserve énergétique importante chez l'homme. Ils sont solubles dans l'acétone ce qui les différencie des phospholipides (ils sont très apolaires).

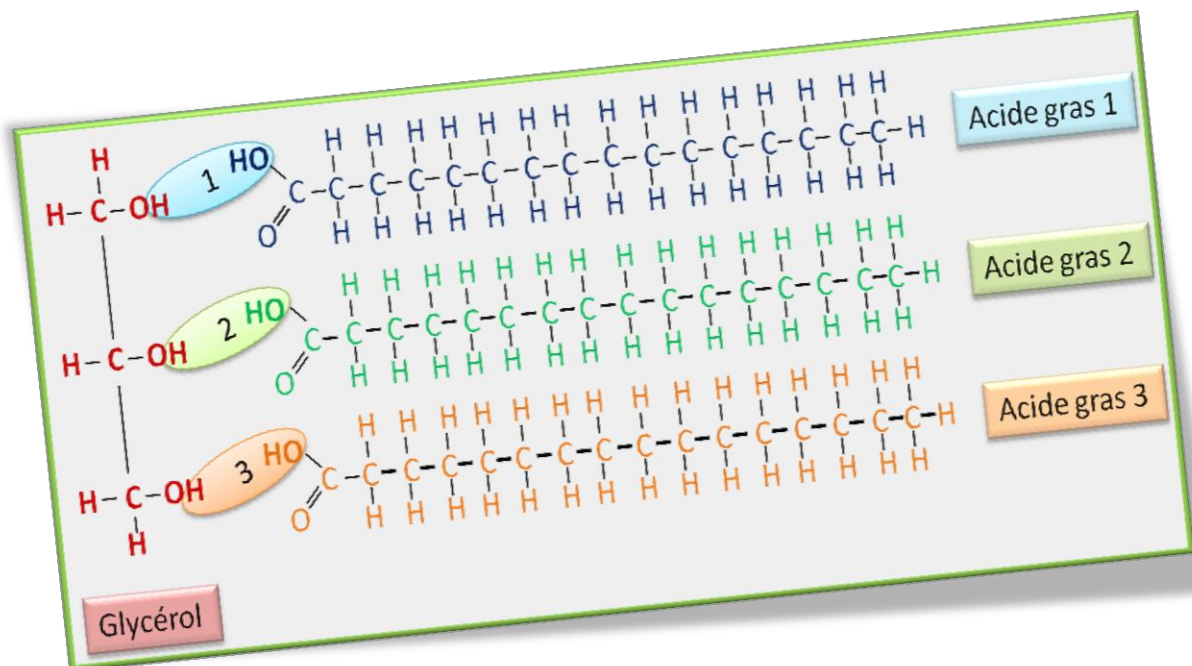


Figure 2 : Représentation schématique des glycérides. Les trois types de glycérides sont issus des combinaisons du glycérol avec les acides gras. Glycérol+1=Monoacylglycérol (MAG); glycérol+1+2 = Diacylglycérol (DAG) et glycérol+1+2+3 = Triacylglycérol (TAG).

➤ Les stérides (stérols et dérivés)

Les stérols sont des lipides essentiels et spécifiques des cellules eucaryotes (Wagner et Daum, 2005) et sont bien représentés chez les animaux. Ils existent sous forme libre et sous forme estérifiée. Ils constituent une famille de lipides dérivés du noyau stérol dont le plus connu est le cholestérol. Les stérols constituent des tampons de fluidité, et 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. Les stérols libres sont des molécules amphiphiles qui sont incorporés dans les membranes, en revanche les esters de stérols sont des composés fortement hydrophobes et forment avec les triglycérides le noyau des particules lipidiques. Le principal stérol de la levure est l'ergostérol, qui se distingue du cholestérol chez les mammifères par une double liaison en position C7 et C22 et la présence d'un groupement méthyle sur le carbone C24 (Figure 3).

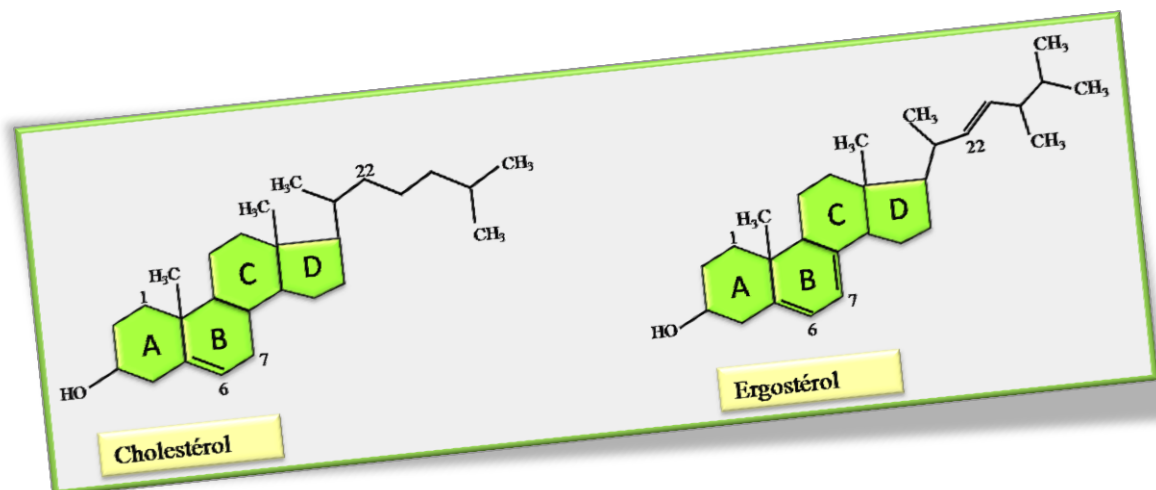


Figure 3 : Représentation de la structure du cholestérol et de l'ergostérol. Présence de double liaison en C7 et C22 dans l'ergostérol. Ces doubles liaisons sont absentes dans le cholestérol. Présence également d'un groupement méthyle en C₂₄ dans l'ergostérol et inexistant dans le cholestérol.

A.1.2.2. Les lipides complexes

➤ Les glycérophospholipides

Les lipides complexes sont des lipides simples liés à des molécules de sucre, d'acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore ou du soufre. Les phospholipides ont une partie hydrophobe constituée par deux chaînes d'acides gras et une partie hydrophile, représentée par le groupement phosphate, qui peut être liée à une autre molécule telle que la

choline. L'élément de base des glycérophospholipides est l'acide phosphatidique, formé d'un noyau glycérol, de deux acides gras et d'un groupement phosphate (H_3PO_4). Les carbones C1 et C2 du noyau de glycérol portent les acides gras et le carbone C3 porte le groupement phosphate (Figure 4). L'acide phosphatidique combiné à des composés comme la sérine, l'éthanolamine, la choline et l'inositol permet d'aboutir à un glycérophospholipide. La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phospholipides cellulaires sont associées aux membranes. Dans les cellules de mammifères, la majorité des phospholipides est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (Dennis *et al.*, 1972). Néanmoins les phospholipides requis dans les fonctions mitochondriales telles que la cardiolipine et son précurseur le phosphatidylglycérol ainsi que la phosphatidyléthanolamine, elle-même issue de décarboxylation de la phosphatidylsérine, sont synthétisés dans les membranes mitochondriales (Daum *et al.*, 1985). Plusieurs enzymes sont impliquées dans la dégradation des phospholipides. La phospholipase D coupe la liaison entre la choline et le phosphate, la phospholipase C a pour rôle l'hydrolyse de la liaison entre le phosphate et le carbone C3 du noyau de glycérol et les phospholipases A1 (PLA1) et A2 (PLA2) sont chargées de libérer des acides gras respectivement de carbone C1 et C2 du noyau de glycérol (Figure 4).

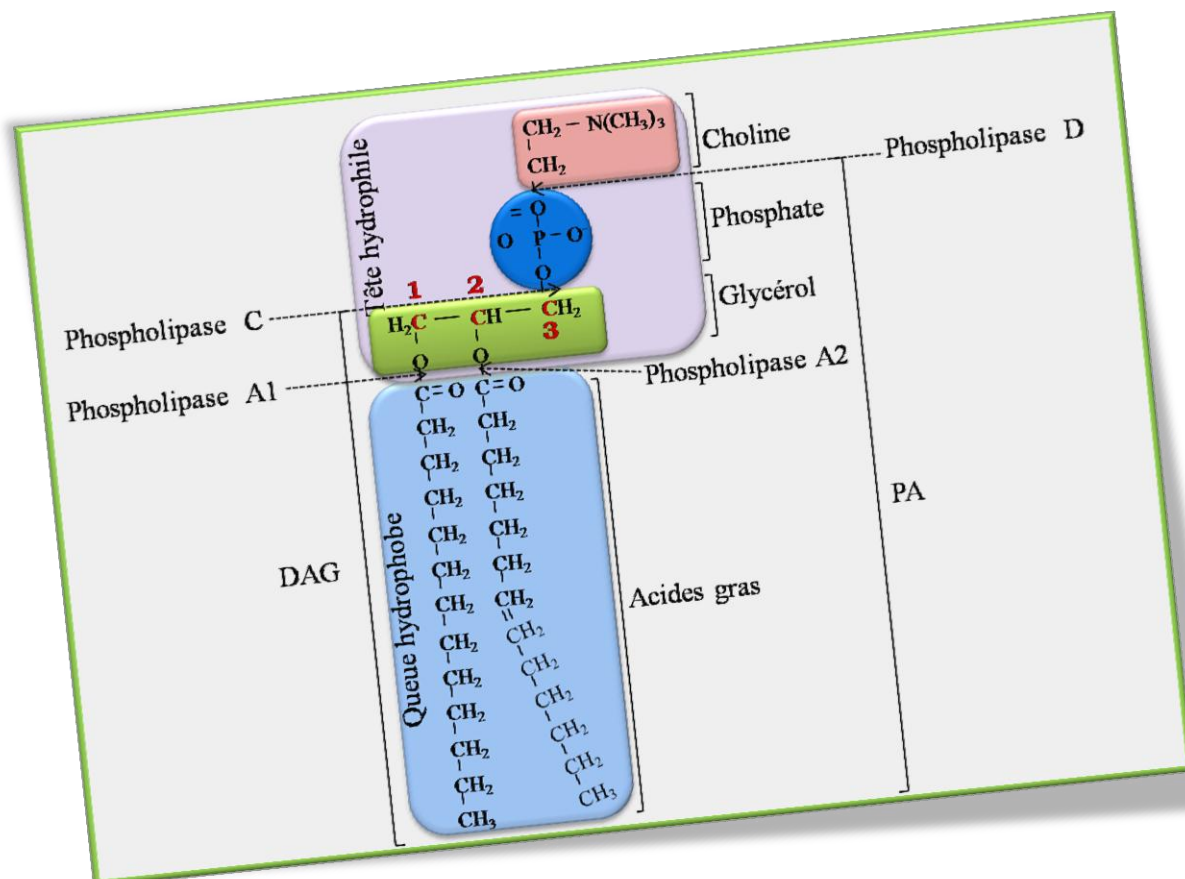


Figure 4: Représentation d'un phospholipide cas de la phosphatidylcholine

La phosphatidylcholine (PC) plus connue sous le nom de lécithine, est le phospholipide le plus abondant dans les membranes des eucaryotes. En dehors du fait qu'il joue un rôle de composant membranaire, il intervient dans la transduction du signal comme précurseur des lipides impliquant un acide phosphatidique (PA) et un DAG (Exton, 1998; Rudge *et al.*, 2001). Une perturbation du métabolisme de la PC a été trouvée dans de nombreux cas pathologiques tels que la maladie d'Alzheimer (Nitsch *et al.*, 1992), et dans l'apoptose (Cui *et al.*, 2002) montrant l'importance de cette molécule chez les eucaryotes. Pour l'étude des fonctions spécifiques de la phosphatidylcholine, *Saccharomyces cerevisiae* constitue un organisme modèle car environ 50% des phospholipides chez cette levure sont de la phosphatidylcholine (Daum *et al.*, 1999). Comme chez les mammifères il existe deux voies de biosynthèse de la phosphatidylcholine. La voie la plus importante correspond à la triple méthylation de la phosphatidyléthanolamine (PE), qui est également un phospholipide, par les enzymes Cho2 et Opi3 (Carman *et al.*, 1996). La deuxième voie implique le transfert d'une phosphocholine de la CDP-choline (forme activée de la choline) sous l'action d'une diglycéride phosphocholine transférase (voie de Kennedy) à partir d'un diglycéride membranaire (Kent, 1995; McMaster *et al.*, 1994).

La phosphatidylsérine (PS) peut être considérée à la fois comme un produit fini et un intermédiaire de biosynthèse car elle est retrouvée dans les membranes des cellules eucaryotes, et constitue un précurseur de la phosphatidyléthanolamine. Néanmoins son rôle dans la membrane est moins important que son rôle d'intermédiaire de biosynthèse parce que les cellules incapables de faire la synthèse de la PS peuvent croître en présence d'éthanolamine (Voelker et Frazier, 1986), de P-éthanolamine (Kuge *et al.*, 1986), chez les autres eucaryotes et de choline chez la levure (Atkinson *et al.*, 1980; Nikawa *et al.*, 1981). La PS est synthétisée par le transfert d'un phosphate à partir du CDP (cytidine diphosphoglycérol) diacylglycérol chez la levure ou à partir de la phosphatidyle-éthanolamine ou d'un phosphatidylcholine chez les mammifères. La phosphatidyle-éthanolamine chez les eucaryotes, peut provenir soit de décarboxylation de la phosphatidyle-sérine soit à travers l'incorporation d'une éthanolamine via la voie de la CDP-éthanolamine (voie de Kennedy). Le phosphatidyle-inositol (PI) a été l'objet de nombreuses études car il joue un rôle important dans la transduction du signal. La phosphatidyle-inositol-4,5-bisphosphate (PI-4,5-P₂) constitue un substrat pour la phospholipase C qui est activée en réponse à une large variété de stimuli hormonaux.

➤ Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des amides de la sphingosine qui se forment par liaison du carboxyle de l'acide gras sur le NH_2 de la sphingosine. Le plus simple des sphingolipides est la céramide ou acylesphingosine qui comporte un acide gras saturé à longue chaîne. Parmi les sphingolipides on distingue aussi la sous-classe des sphingomyélines constituée de l'association d'une sphingosine, d'un acide gras et d'une phosphorylcholine. Chez les mammifères, l'acide gras le plus fréquent dans les sphingolipides est l'acide lignocérique qui est une molécule ionisée au pH du sang. La sphingomyéline est un composé qui se retrouve généralement dans le tissu nerveux (gaines de myéline) et dans les membranes. Et la déficience en sphingomyélinase entraîne son accumulation dans le cerveau, la rate et le foie.

Une autre catégorie de sphingolipides est constituée de glycolipides et regroupe d'une part les cérébrogalactosides ou galactosylcéramides constitués de sphingosine, d'un acide gras et d'une β -D-galactose, et de l'autre par les cérébroglucides ou glucosylcéramides, constitués d'une sphingosine, d'un acide et d'une molécule de β -D-Glucose. Les glucides sont liés à la sphingosine par une liaison β osidique. La troisième classe de glycolipides chez les mammifères est constituée par les gangliosides ou oligosylcéramides constitués de sphingosine, d'un acide gras et d'une chaîne constituée de plusieurs oses et dérivés d'oses. Ils sont abondants dans les ganglions d'où leur nom. Ces oligosides sont présents sur la face externe de la membrane plasmique. Ils sont spécifiques et reconnus par des protéines telles que les toxines bactériennes.

A.2. Synthèse et stockage des lipides neutres chez les levures

A.2.1. Généralités

La synthèse des lipides neutres est un phénomène qui se produit dans tous les règnes de la vie (Müllner *et al.*, 2004), reflétant un processus métabolique de base (Wagner et Daum., 2005). Les lipides synthétisés sont mis en réserve sous forme de triacylglycérols (TAGs) et d'esters de stérols (SE) qui sont par conséquent la plus importante forme de stockage des lipides (Müllner *et al.*, 2004), d'énergie et des acides gras nécessaires pour la biosynthèse des membranes chez les eucaryotes (Sorger et Daum, 2003; Wagner *et al.*, 2009). Ces lipides neutres, stockés dans les corps lipidiques (Sorger et Daum, 2003), et notamment rencontrés chez les plantes et chez les levures comme *S. cerevisiae* (Czabany *et al.*, 2006) et chez certaines levures qualifiées de levures oléagineuses telles que *Y. lipolytica*. Bien que considérée comme non oléagineuse, *S. cerevisiae* accumule des triacylglycérols et des esters

de stérol sous forme de particules lipidiques qui se composent de 51% de TAG et 44% de SE et contribuent jusqu'à 70% de la teneur en lipides totaux (Leber *et al.*, 1994). La teneur totale en lipides chez *S. cerevisiae* varie en fonction des conditions de culture et peut aller de 3,5 et 10,7% du poids sec cellulaire (Johnson *et al.*, 1972). Par contre chez les levures oléagineuses, les lipides peuvent représenter 40 à 70% du poids sec (Ratledge, 1994).

A.2.2. Voie de Kennedy

Comme indiqué plus haut, la phosphatidylcholine est le produit final de la synthèse des phospholipides et le constituant majeur des membranes chez *S. cerevisiae*. Il y a deux voies alternatives pour la synthèse de la phosphatidylcholine chez cette levure. Nous avons la voie du CDP-DAG et la voie de la CDP-choline qui est également appelée la voie Kennedy. Il existe un élément essentiel, appelé CTP (Cytidine triphosphate) synthétase, qui forme le CTP à partir de l'UTP et fournit les intermédiaires pour la synthèse des phospholipides que sont la CDP-DAG, la CDP-éthanolamine et le CDP-choline (Carman et Henry, 2007 ; Chang et Carman, 2008).

Tous les principaux phospholipides proviennent du phosphatide (PA), via le CDP-diacylglycérol (CDP-DAG) et le diacylglycérol (DAG). Le CDP-DAG est également utilisé pour la synthèse de phosphatidylglycérol et de la cardiolipine (Li *et al.*, 2007). Le DAG est utilisé pour la synthèse des lipides de stockage (TAG) d'une part et de l'autre pour la synthèse de la PE et de la PC. La synthèse de la PE et de la PC se fait respectivement via les branches de la CDP-éthanolamine et de la CDP-choline qui constituent la voie de Kennedy (Chang *et al.*, 2008 ; Rajakumari *et al.*, 2008). La PC est principalement synthétisée chez *S. cerevisiae* par la voie du CDP-DAG alors que la voie de la CDP-choline (voie de Kennedy) n'est essentielle pour la synthèse de la PC, que lorsque les enzymes de la voie du CDP-DAG sont défectueuses. Par exemple, des mutants défectueux dans la synthèse du PS, PE ou PC ont besoin de choline pour la croissance afin de synthétiser la PC via la voie de CDP-choline. Les mutants pouvant synthétiser de la PS et de la PE peuvent également synthétiser la PC si de l'éthanolamine est ajoutée dans le milieu de culture. L'éthanolamine est utilisée pour la synthèse de la PE par la voie CDP-éthanolamine et la PE peut être méthylée pour former la PC via la voie du CDP-DAG. La voie de la CDP-choline est donc considérée comme une voie auxiliaire ou de secours pour les cellules lorsque la voie du CDP-DAG est compromise (Carman et Henry, 1999). L'éthanolamine et la choline, qui sont nécessaires pour la voie de Kennedy, peuvent être obtenues par conversion de la PE et de la PC issues de la voie de la

CDP-DAG sous l'action de la phospholipase D (Patton-Vogt *et al.*, 1997). Il a été montré que les mutants (cho1, psd1/psd2, cho2 et opi3) défectueux pour la voie du CDP-DAG pouvaient synthétiser de la PE ou de la PC si le milieu de culture était complété par l'éthanolamine, la choline, la lysoPE et la lysoPC (Riekhof et Voelker, 2006). L'éthanolamine et la choline sont convertis en PE et PC par le biais de la voie de Kennedy tandis que la lysoPE et la lysoPC sont acylées pour donner respectivement la PE et la PC sous l'action d'une lysophospholipide acyltransférase (Riekhof *et al.*, 2007 ; Jain *et al.*, 2007).

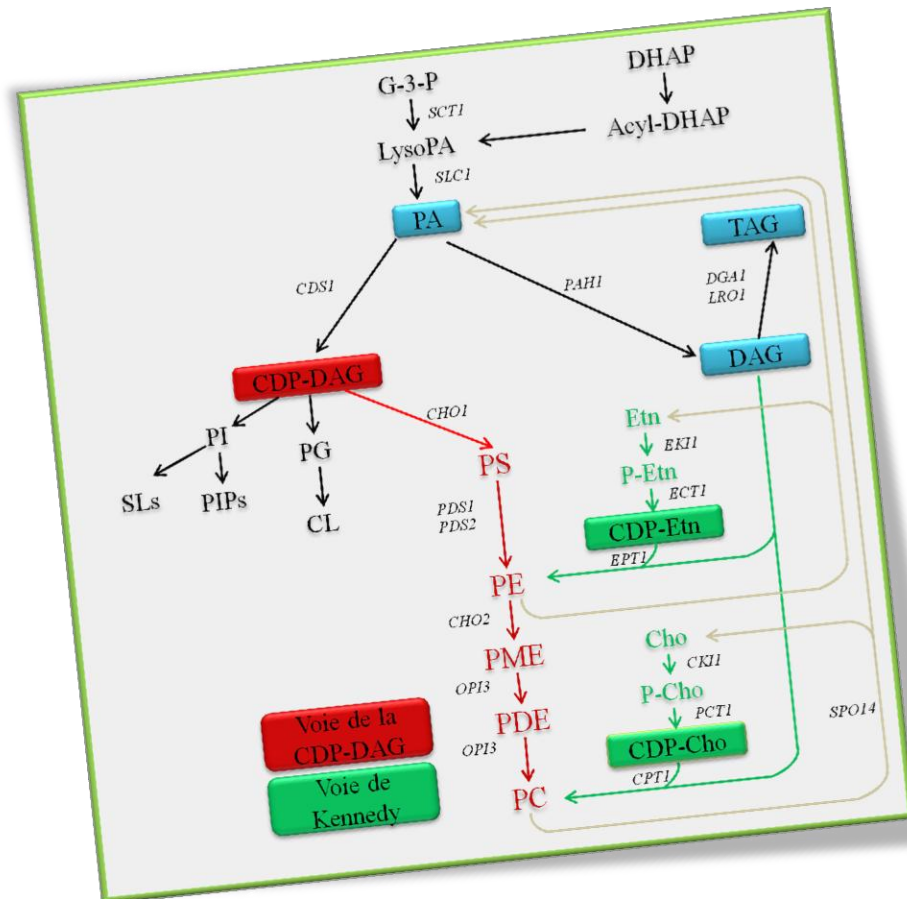


Figure 5 : Représentation schématique de la voie de synthèse des phospholipides mettant en évidence les voies de la CDP-DAG et de Kennedy. La voie de Kennedy est représentée en vert et la voie du CDP-DAG en rouge. Les deux voies sont impliquées dans la synthèse de la phosphatidylcholine qui est le principal phospholipide chez *S. cerevisiae*. PA (phosphatidate) ; Etn (éthanolamine) ; P-Etn (phosphoéthanolamine) ; CDP-DAG (CDP-diacylglycerol) ; CDP-Etn (CDP-éthanolamine) ; CDP-Cho (CDP-choline) ; PI (phosphatidylinositol) ; PG (phosphatidylglycerol) ; PS (phosphatidylserine) ; PE (phosphatidylethanolamine) ; CL (cardiolipine) ; PC (phosphatidylcholine) ; SLs (sphingolipids) ; PIPs (polyphosphoinositides) ; TAG (triacylgcérols) ; DAG (diacylgcérols) ; PME (phosphatidylmonométhylethanolamine) ; PDE, phosphatidyl diméthylethanolamine) (Carman et Henry, 2007).

A.2.3. Voie de l'accumulation des lipides neutres

A.2.3.1. Les enzymes de la voie d'accumulation des lipides neutres

Plusieurs gènes interviennent dans l'accumulation des lipides chez les levures. Certains de ces gènes sont responsables de la synthèse des protéines spécifiques qui interviennent à des étapes précises de la voie de synthèse des lipides neutres chez les eucaryotes en général et chez les levures en particulier. La levure *S. cerevisiae*, est un organisme modèle pratique pour l'étude des lipides eucaryotes parce que la biosynthèse des lipides et glycolipides chez cette levure est très similaire à celle d'un large éventail d'espèces y compris les plantes supérieures et les mammifères.

➤ Les enzymes intervenant dans l'accumulation des triglycérides.

Il a été clairement montré que la première étape de la biosynthèse des phospholipides, implique l'acylation du glycérol-3-phosphate (G-3-P) à la position sn-1 par une glycerol-3-phosphate acyle transferase (Zheng et Zou, 2001) pour former l'acide lysophosphatidique (LPA) qui constitue le précurseur pour la synthèse des glycérophospholipides en général et en particulier des triacylglycérols chez les eucaryotes (Dircks *et al.*, 1999; Christiansen, 1978). Cette enzyme est codée par le gène *SCT1* chez les levures telles que *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*. Dans les cellules eucaryotes, il existe plusieurs formes de la G-3-P acyle-transférase et ces isoenzymes sont localisées dans différents compartiments cellulaires (Dircks *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 1997). Les gènes codant pour des G-3-P acyle-transférases mitochondriales chez les mammifères et chez les plantes ont été isolés (Dircks *et al.*, 1997; Murata *et al.*, 1997).

L'enzyme 1-acyle-sn-glycérol-3-phosphate acyle-transférase (AGAT) codée par le gène *SLC1* (Figure 6), catalyse l'acylation de l'acide lysophosphatidique pour former l'acide phosphatidique. C'est une activité enzymatique intermédiaire clé dans la formation de glycérophospholipides et triacylglycérols dans le métabolisme lipidique en général. Cette enzyme se retrouve dans les particules lipidiques et les microsomes (Athenstaedt *et al.*, 1997; Athenstaedt *et al.*, 1999).

L'enzyme 3-sn-phosphatidate phosphohydrolase (PAP), (EC 3.1.3.4) catalyse la déphosphorylation (Mg^{2+} dépendante) de l'acide phosphatidique permettant la formation d'un diglycéride (DAG) et d'un phosphate inorganique. Le diglycéride ainsi formé va, par la voie de synthèse *de novo* des lipides ou voie de Kennedy, être utilisé pour la formation d'un phospholipide (Carman *et al.*, 2006). L'activité de la phosphatidate phosphatase a été révélée pour la première fois chez les animaux par Kennedy et ses collaborateurs (1957). Depuis cette

date de nombreuses études ont montré l'importance de la phosphatidate phosphatase dans le métabolisme des lipides (Carman, 1997 ; Nanjundan *et al.*, 2003). Plus récemment un gène codant pour cette enzyme a été isolé chez *S. cerevisiae*. Ce gène nommé *PAH1* était au préalable nommé *SMP2* (Han *et al.*, 2006). Le rôle de la phosphatidate phosphatase (PAP) dans le métabolisme des lipides a été élucidé en menant des études avec les souches dont le gène *PAH1*, codant pour cette protéine a été disrupté. Ces études ont montré que le mutant Δ pah1 accumule de fortes concentrations de PA et présente un très faible taux d'accumulation de DAG et de TAG. La suppression de ce gène entraîne une augmentation de la quantité des principaux phospholipides, des esters de stérols, et des acides gras libres (Han *et al.*, 2007). Toutes ces observations montrent l'importance de cette enzyme dans le métabolisme des lipides. L'absence du gène codant pour la PAP, réduit l'accumulation des TAG d'environ 90% (Petérffy *et al.*, 2001 ; Donkor *et al.*, 2007 ; Nadra *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont été menées sur la formation des TAGs à partir de DAG. Parmi les enzymes qui catalysent cette dernière étape de la formation des triglycérides, il y a l'acyl-coenzyme A: diacylglycérol acyle-transférase (DAGAT, EC 2.3.1.20) qui utilise un di-acyl-glycérol (DAG) et l'acyl-CoA comme substrats (Lehner *et al.* 1996). Cette enzyme codée par le gène *DGA1* (Figure 6) chez les levures comme *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*, est sans doute la plus importante de la voie de biosynthèse des triacylglycérols (TAG). Pendant longtemps la DAGAT a été considérée comme la seule enzyme impliquée dans la formation des triglycérides mais des gènes codant des enzymes ayant des séquences très proches de celle de l'acyl-CoA: cholestérol acyle-transférase (ACAT) humaine, ont été identifiés dans les plantes (Hobbs *et al.*, 1999 ; Routaboul *et al.*, 1999 ; Zou *et al.*, 1999) et la souris (Cases *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999). Cependant une autre enzyme avec une séquence très différente de celle des ACATs, a été découverte dans le champignon oléagineux *Mortierella ramanniana* (Lardizabal *et al.*, 2000). Les enzymes DAGATs sont principalement retrouvées dans les microsomes (Settlage *et al.*, 1995; Triki *et al.*, 1999) mais aussi dans les corps lipidiques (Kamisaka *et al.*, 1994 ; Kamisaka *et al.*, 1997; Pilla *et al.*, 1998 ; Kamisaka *et al.*, 1999). Chez la levure *Rhodotorula glutinis* un complexe multienzymatique cytoplasmique contenant une DAGAT a été révélé (Gangar *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que la fraction membranaire et la fraction soluble sont impliquées dans la formation TAG.

Un homologue de l'acyl-coenzyme A: diacylglycérol acyltransférase (DAGAT) codé par le gène YALIOE32769g a été identifié chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Une souche délétée pour *DGA1* montre une baisse du taux d'accumulation des triglycérides de 55% par rapport à la souche sauvage (Beopoulos *et al.*, 2008) montrant que *DGA1* joue un rôle majeur

dans la synthèse des triglycérides chez la levure *Y. lipolytica*. La contribution dans l'accumulation des lipides de Dga1p est de 30% pendant la phase exponentielle et de 60% pendant la phase stationnaire (Beopoulos *et al*, 2008).

La formation des triglycérides via la voie indépendante d'un acyle-CoA nécessite un glycérophospholipide comme donneur d'acyle pour l'estérification du diglycéride. L'enzyme codée par le gène *LRO1* (Figure 6), catalyse le transfert du groupement acyle et combine les fonctions d'une phospholipase A₂ et d'une acyle-transférase. Cette réaction aboutissant à la formation de triglycérides est catalysée par la phosphatidylcholine di-acyle-glycérol acyle-transférase et c'est une voie de synthèse qui a été identifiée chez les plantes et également chez les levures (Dahlqvist *et al*, 2000) telles que *S. cerevisiae* (Oelkers *et al*, 2000).

Chez les mammifères ces deux fonctions (fonctions de phospholipase et d'acyltransférase) sont assurées par une lécithine-cholestérol acyle-transférase (LCAT) (McLean *et al*, 1986). Une analyse poussée du gène *LRO1* de la levure a révélé une similarité de 27% de la protéine phosphatidylcholine-DAGAT codée par *LRO1* avec la LCAT humaine. Comme son nom l'indique l'enzyme humaine utilise la phosphatidylcholine comme donneur d'acyle et des stérols comme accepteurs de groupement acyle, pour former des esters de stérols. Néanmoins une LCAT de porc purifiée a permis d'obtenir une petite quantité de triglycérides lorsque le substrat est un diglycéride (Czarnecka *et al.*, 1993). Comme son homologue humain, Lro1p utilise des glycéro- phospholipides comme donneurs d'acyles mais transfère le groupement acyle en position sn-3 du diglycéride. *In vitro*, Lro1p catalyse le transfert du groupement acyle de la position sn-2 de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) sur le diglycéride avec une certaine préférence de substrat pour la PE.

La disruption du gène *LRO1* chez *S. cerevisiae* entraîne une réduction de 40% de la quantité de triglycérides accumulés par rapport à la souche sauvage (Sorger et Daum, 2002). Chez *Y. lipolytica* l'homologue de *LRO1* est YALIOE16797g (*YILRO1*), qui code un phospholipide: diacylglycérol acyle-transférase et joue un rôle très important dans l'accumulation des lipides chez cette levure. Il a été montré que *YILRO1* est responsable de la formation de 35% des lipides à la fin de la phase stationnaire et a un rôle mineur au cours de la phase exponentielle, contrairement à *S. cerevisiae*, chez qui la délétion de *LRO1*, entraîne la réduction de l'accumulation des lipides de 75 % en phase exponentielle. Chez *Yarrowia* on note une diminution de l'accumulation des lipides neutres de 70% en phase stationnaire dans une souche délétée pour *YILRO1*.

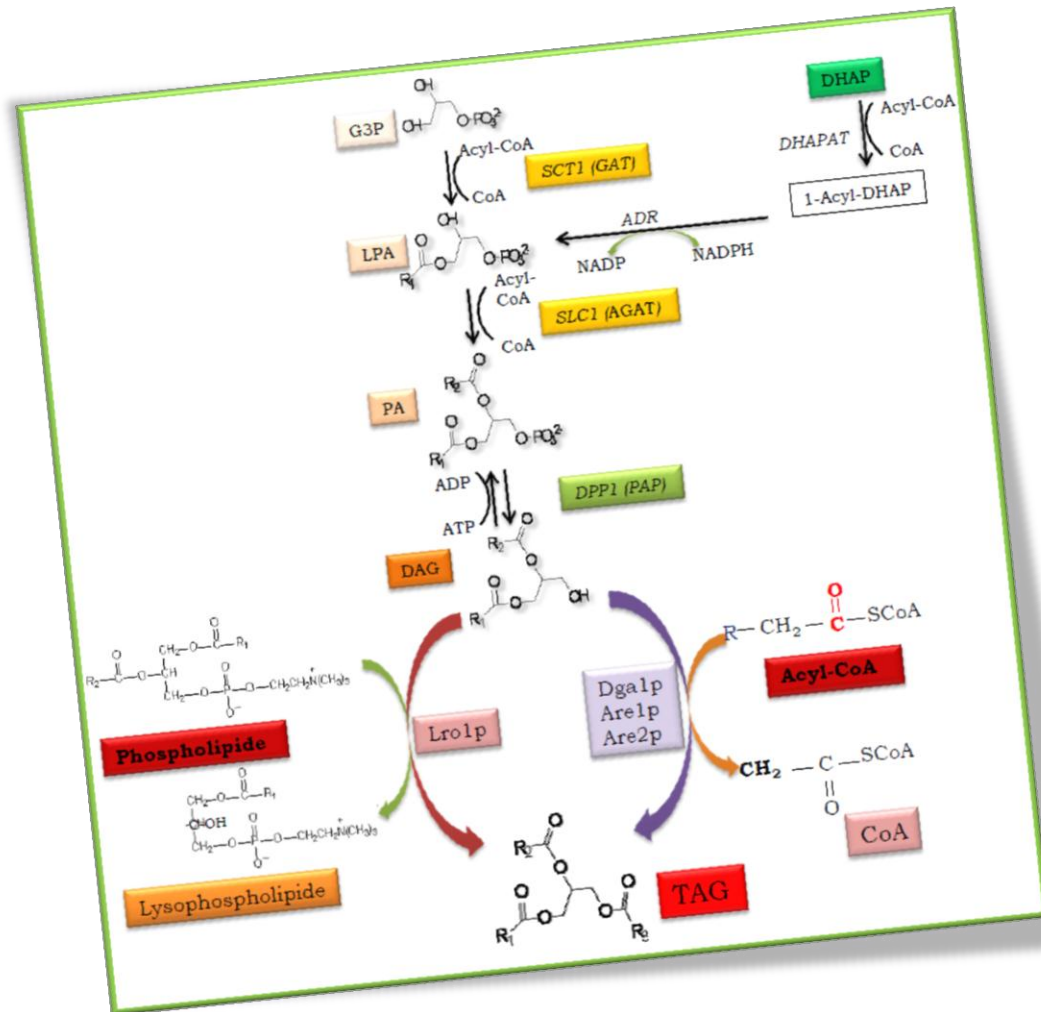


Figure 6 : Représentation schématique la voie de synthèse des triglycérides (TAG). Cette voie implique différentes enzymes : ADR (1-acyle-dihydroxyacétone-phosphate réductase); AGAT (1-acyle-glycérol-3-phosphate acyle-transférase); DAG (di-acyle-glycérol), DGAT (di-acyle-glycérol acyle-transférase); DHAP (dihydroxyacétone-phosphate); DHAPAT (dihydroxyacétone-phosphate acyle-transférase), G3P (glycérol-3-phosphate), GAT (glycérol-3-phosphate acyle-transférase), LPA (acide lysophosphatidique), PA (acide phosphatidique) PAP (phosphatidate phosphatase), TAG (triacylglycérol), CoA : coenzyme A.

➤ Les enzymes intervenant dans la synthèse des esters de stérols

Les stérols peuvent être estérifiés par deux types d'enzymes pour donner les esters de stérols. L'une des enzymes chez l'être humain est la lécithine : cholestérol acyle-transférase (LCAT), qui catalyse la formation des esters de stérol indépendamment de l'acyle-CoA en utilisant des phospholipides comme donneurs d'acyle. La seconde est une acyle-CoA cholestérol acyletransférase (ACAT) qui forme les esters de stérols en utilisant un acyle-CoA comme donneur d'acyle. Des études par Blast ont été menées en utilisant l'ACAT humaine pour rechercher des homologues chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et ont permis d'identifier deux gènes *ARE1* et *ARE2* qui sont responsables de la synthèse d'ester de stérol

chez cette levure. Ils codent deux isoenzymes qui sont des acylcoenzyme A: stérol acyle-transférases (ASAT) (Yang *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Zweytick *et al.*, 2000).

Ces deux gènes présentent 50% de similarité entre elles et 24% de similarité avec l'ACAT humaine (Yu *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). La localisation de ces deux enzymes a été réalisée par des analyses biochimiques (Zinser *et al.*, 1993) et par visualisation au microscope optique après la fusion des protéines avec la GFP. Il a été montré que l'enzyme Erg4p (catalysant l'étape finale de la biosynthèse de l'ergostérol) chez *S. cerevisiae* est aussi localisée dans les membranes du réticulum endoplasmique (Zweytick *et al.*, 2000).

La délétion des gènes *ARE1* et *ARE2* entraîne la suppression totale de l'estérification des stérols montrant bien que ces deux gènes sont les seuls responsables de la synthèse des esters de stérols (SE). La surexpression des protéines Are1p ou Are2p dans une souche délétée de ces deux gènes a montré que Are2p seule permet de restaurer l'activité de synthèse des esters de stérols (STE synthase) à un niveau comparable à celui de la souche sauvage. Mais bien que le gène *ARE2* soit délété, on note une activité ester de stérol synthase résiduelle montrant ainsi que *ARE1* joue aussi un rôle dans l'estérification des stérols. Néanmoins *ARE2* reste le principal responsable de la synthèse des esters de stérol chez cette levure.

A.2.3.2. Les différentes étapes de la formation des triglycérides

Les triglycérides encore appelés triacylglycérols (TAG) sont la plus importante forme de stockage des lipides (Sorger *et al.*, 2003) et comme dans les cellules de mammifères, la synthèse *de novo* de triglycérides a été initiée à partir de deux voies différentes, à savoir la voie du glycérol-3-phosphate (G-3-P) et la voie de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), (Athenstaedt *et al.*, 1999). La synthèse des triglycérides se fait en deux phases. La première phase comporte différentes réactions aboutissant à la formation de diacylglycérol (DAG) et dans la deuxième phase, une réaction d'acylation convertit le diacylglycérol en triacylglycérol (TAG).

Au cours de la première phase, le glycérol-3-phosphate (G-3-P) est acylé par la G-3-P acyle-transférase (GAT) à la position sn-1 pour former l'acide lyso-phosphatidique (LPA) qui est à son tour acylé par la 1-acyle-G-3-P acyle-transférase (AGAT) à la position sn-2, produisant ainsi de l'acide phosphatidique (PA). Alternativement, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est acylé à la position sn-1 par le dihydroxyacétone phosphate acyle-transférase (DHAPAT) pour donner la 1-acyle- dihydroxyacétone phosphate (1-acyle-DHAP) qui est ensuite réduit par la 1-acyle-DHAP réductase (ADR) pour donner l'acide

lysophosphatidique (LPA). L'acide phosphatidique peut également se former à partir de phospholipides sous l'action de la phospholipase D ou à partir de la phosphorylation d'un diacylglycéride (DAG) par une diacylglycérol-kinase. Une déphosphorylation de l'acide phosphatidique est par la suite catalysée par une phosphatidate phosphatase (PAP) pour donner un diacylglycérol (DAG), qui peut également être formé à partir d'un triacylglycérol (TAG) sous l'action d'une triacylglycérol lipase ou à partir de phospholipides sous l'action de la phospholipase C.

La deuxième étape de la formation du triglycéride à partir du diglycéride peut se faire avec différents donneurs d'acyles. Le diacylglycérol (DAG) est d'une part, un précurseur de la synthèse de l'amino-glycéro-phospholipide par la voie de Kennedy, donc un intermédiaire clé dans la formation de lipides membranaires (Kent, 1995; Carman *et al.*, 1996; Daum *et al.*, 1998; Carman *et al.*, 1999; Voelker, 2000), et de l'autre un substrat pour la formation de tri-acyle-glycérols. La conversion du diglycéride en triglycéride peut se faire par une acylation en utilisant un acétyl coenzyme A et la réaction sera donc catalysée par une diacylglycérol acyletransférase (DAGAT) codée par le gène *DGA1* (Oelkers *et al.*, 2002; Sorger et Daum, 2003). La formation des TAG peut également se faire en utilisant un phospholipide. L'enzyme responsable de l'acylation des DAG à partir de phospholipides utilisés comme donneurs d'acyles (Dahlqvist *et al.*, 2000; Oelkers *et al.*, 2000) est une DAGAT homologue à la LCAT humaine et est codée par le gène *LRO1* chez les levures telles que la levure *Y. lipolytica*.

A.2.3.3. La synthèse des esters de stérols

Les esters de stérols sont le résultat d'une estérification en C3 du groupement hydroxyle et comme pour les triglycérides le donneur d'acyl peut être un acyl-CoA ou un glycérophospholipide.

La synthèse *de novo* de l'ergostérol commence avec le précurseur de l'acétyl-CoA et comprend une série de réactions de condensation, de déméthylation, de déshydratation et d'une méthylation en C24 avec le S-adenosyl méthionine. Chez la levure *S. cerevisiae*, l'estérification des stérols est une réaction qui utilise comme donneur d'acyl un acyl-CoA, et cette réaction est catalysée par une enzyme qui a des caractéristiques biochimiques proches de l'acyl-CoA : cholestérol, acyl-transférase (ACAT) humaine (Chang *et al.*, 1993).

A.2.3.4. Mécanisme de formation des corps lipidiques

Comme nous l'avons dit plus haut les principaux lipides neutres chez les eucaryotes et les levures comme *S. cerevisiae* (Czabany *et al.*, 2006) et *Y. lipolytica* (Athenstaedt *et al.*, 2006) sont les triacylglycérols (TAG) et les esters de stérol (SE). Ces lipides non chargés sont, chez la majorité des eucaryotes et chez certaines bactéries Gram-positives, séquestrés dans des compartiments intracellulaires appelés particules lipidiques, gouttelettes lipidiques, corps lipidiques ou encore oléosomes et sphérosomes chez les plantes.

La structure des corps lipidiques est similaire à celle des lipoprotéines de mammifères (Kostner *et al.*, 1989) et est constituée d'une monocouche de phospholipides contenant quelques protéines entourant un noyau formé par les lipides neutres. Chez *S. cerevisiae*, les triglycérides et les esters de stérols sont à peu près en mêmes quantités dans les corps lipidiques (Leber *et al.*, 1994). En revanche, chez *Y. lipolytica*, les corps lipidiques contiennent principalement des triacylglycérols et seulement une faible quantité d'esters de stérol. La forte proportion de triglycérides par rapport aux esters de stérols chez *Y. lipolytica* fait que les corps lipidiques de cette levure ressemblent plus à ceux des adipocytes qu'à ceux d'autres levures (Athenstaedt *et al.*, 2006). Chez *Y. lipolytica*, la composition en lipides et protéines des corps lipidiques dépend des conditions de croissance. Le passage de la culture en milieu glucose à la culture en milieu acide oléique permet l'augmentation de la taille et aussi le changement de la composition des particules lipidiques.

La biogenèse des corps lipidiques n'est pas encore clairement élucidée. Le modèle de biogénèse proposé par Czabany et ses collaborateurs (2007), stipule que les enzymes impliqués dans l'accumulation des lipides sont localisées dans certaines régions spécifiques du réticulum endoplasmique granuleux favorisant la synthèse des lipides neutres dans ces régions.

Les triglycérides et les esters de stérols étant incapables de s'intégrer dans la bicouche phospholipidique, des microgouttelettes qui sont les précurseurs des corps lipidiques, sont formés par ces molécules hydrophobes entre les deux feuillets de la bicouche du réticulum endoplasmique. Lorsque ces gouttelettes lipidiques atteignent une certaine taille, elles forment par bourgeonnement du réticulum endoplasmique (Murphy *et al.*, 2001), des corps lipidiques avec des protéines dépourvues de domaines transmembranaires. La participation de certains composés lipophiles, tels que les hormones stéroïdes ou les prostaglandines, a été démontrée dans la formation des corps lipidiques (Weller *et al.*, 1994).

Plusieurs résultats expérimentaux ont permis d'appuyer ce modèle de biogénèse des corps lipidiques. D'abord l'analyse de toutes les protéines localisées dans les corps lipidiques a montré qu'elles sont toutes impliquées dans le métabolisme des lipides. Ensuite il a été montré que la plupart des protéines des particules lipidiques (LP) sont dépourvues de domaines transmembranaires d'après les prédictions *in silico* (Athenstaedt *et al*, 1999). La quasi-totalité des protéines que l'on trouve dans les corps lipidiques a été également détectée dans le réticulum endoplasmique. Une représentation schématique de la formation des corps lipidiques est décrite dans la Figure 7.

Enfin, dans une souche de *S. cerevisiae* délétée pour les gènes *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* et *ARE2*, codant pour la synthèse de TAG et SE, on note une absence totale de formation de corps lipidiques, mais la croissance de ce quadruple mutant n'est pas affectée (Sorger *et al*, 2004). Cette observation indique que le stockage et la synthèse des lipides neutres n'est pas indispensable pour la levure (Sorger et Daum, 2002; Sandager *et al*, 2002).

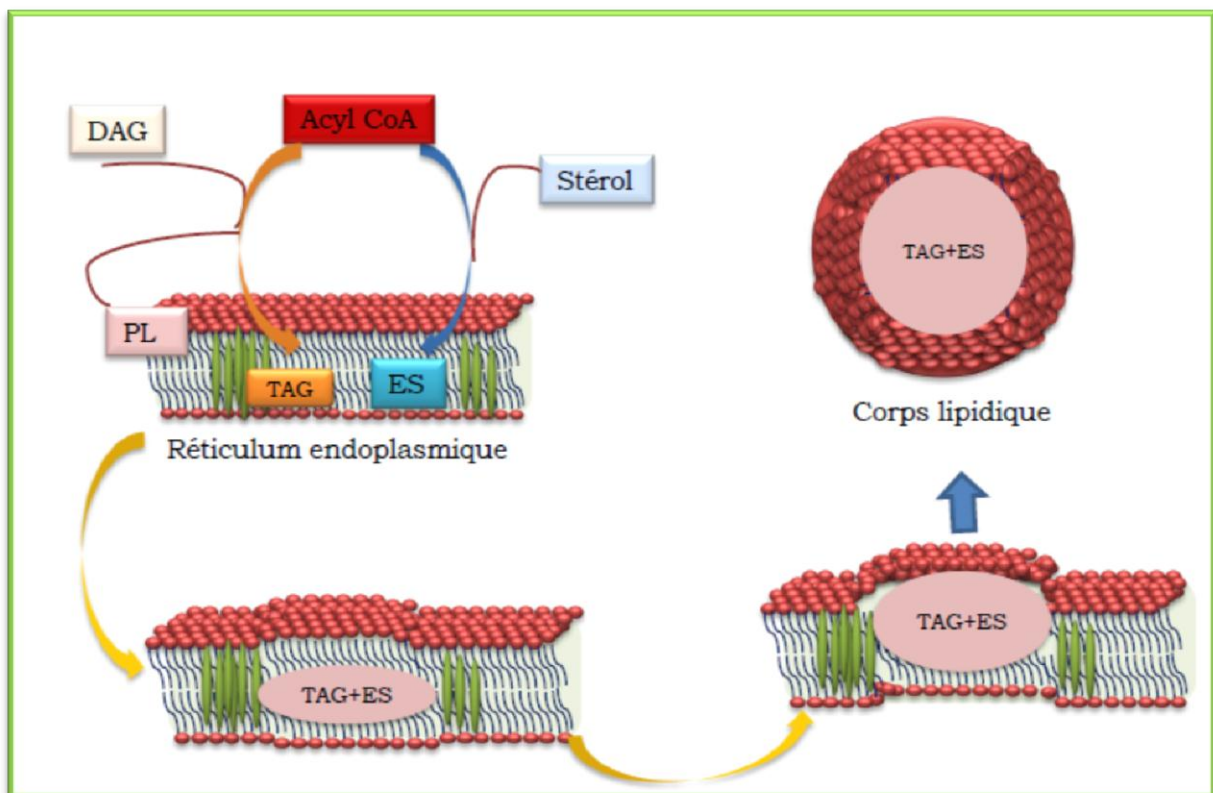


Figure 7 : Représentation schématique d'un modèle de formation des particules lipidiques. Les triacylglycérols (TAG) et les esters de stérol (ES) synthétisés s'accumulent entre les deux feuillets de la bicouche phospholipidique. Ces lipides neutres finissent par bourgeonner pour donner les particules lipidiques matures (Czabany *et al*, 2006).

A.3. Mobilisation et dégradation des lipides

Les lipides neutres accumulés dans les corps lipidiques peuvent servir de réserve pour répondre rapidement au changement de conditions environnementales. La dégradation des triglycérides et des esters de stérols conduit à la libération de diglycérides, de stérols et d'acides gras libres. Les stérols libérés vont servir de substrat pour la synthèse de l'ergostérol (Daum *et al*, 1998). Les diglycérides peuvent rentrer dans la voie de synthèse des lipides via la voie de Kennedy. Ils réagissent alors avec le CDP-éthanolamine ou la CDP-choline pour engendrer la phosphatidyle-éthanolamine et la phosphatidyle-choline (Kent *et al*, 1995). Les acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides et des esters de stérols peuvent réagir avec un CoA pour être ensuite incorporés dans les glycérophospholipides et les sphingolipides. Un dysfonctionnement dans la mobilisation des lipides neutres et de la β -oxydation peut entraîner chez l'homme des maladies comme l'athérosclérose, l'obésité et le diabète démontrant l'importance de ce processus métabolique

A.3.1. Mobilisation des triglycérides

La mobilisation des triglycérides implique l'hydrolyse des triglycérides qui est catalysée par les triacylglycérol lipases (Tglp). Les enzymes qui interviennent dans l'hydrolyse des triglycérides chez la levure *S. cerevisiae* ont été identifiés. Il s'agit des enzymes Tgl1p, Tgl3p, Tgl4p et Tgl5p (Figure 8) qui ont une forte affinité pour les triglycérides et non pour les esters de stérols à l'exception de Tgl1p. Ces enzymes font partie d'une nouvelle famille de lipases comprenant aussi la lipase ATGL homologue de Tgl3p récemment découverte chez les mammifères (Zimmermann *et al*, 2004), de la lipase "Brummer" de *Drosophila melanogaster* (Grönke *et al*, 2005), et de la lipase SDP1 récemment identifiée chez *Arabidopsis thaliana* (Eastmond, 2006). Une triacylglycérol lipase CpLIP2 qui présente les mêmes caractéristiques que Tgl3p, Tgl4p et Tgl5p a été identifiée également chez *Candida parapsilosis*, mais la recherche d'homologie avec les autres lipases a montré que cette lipase CpLIP2 a des similarités avec 11 lipases de *C. albicans* (42±61%) et la lipase A *Candida antarctica* (31%) mais pas avec les autres lipases (Neugenot *et al*, 2002). Les enzymes Tglp sont localisés dans les corps lipidiques (Czabany *et al.*, 2006) et dans la membrane plasmique.

A.3.2. La dégradation des esters de stérols

La dégradation des esters de stérols a longtemps été un sujet mal élucidé car dans un premier temps certains chercheurs avaient montré que les hydrolases d'ester de stérol étaient localisés dans les mitochondries (Taketani *et al*, 1978), tandis que les recherches plus récentes sur la localisation de ces hydrolases menées par Zinser et ses collaborateurs (1993) ont révélé une activité ester de stérol hydrolase dans la membrane plasmique.

Il a été montré par la suite que l'hydrolyse des esters de stérol, chez *S. cerevisiae* est catalysée par une enzyme codée par un gène nommé *YEH2*. Cette enzyme est localisée dans la membrane plasmique (Müllner *et al*, 2005). Mais des chercheurs ont montré que chez le mutant *yeh2Δ* on note toujours une activité d'hydrolase d'ester de stérol et à la suite de toutes ces analyses et observations ils ont pu révéler l'existence de deux autres gènes codant deux protéines Tgl1p et Yeh1p (Figure 8) ayant des caractéristiques communes aux membres de la famille des hydrolases d'ester de stérol chez les levures (Köffel *et al*, 2005).

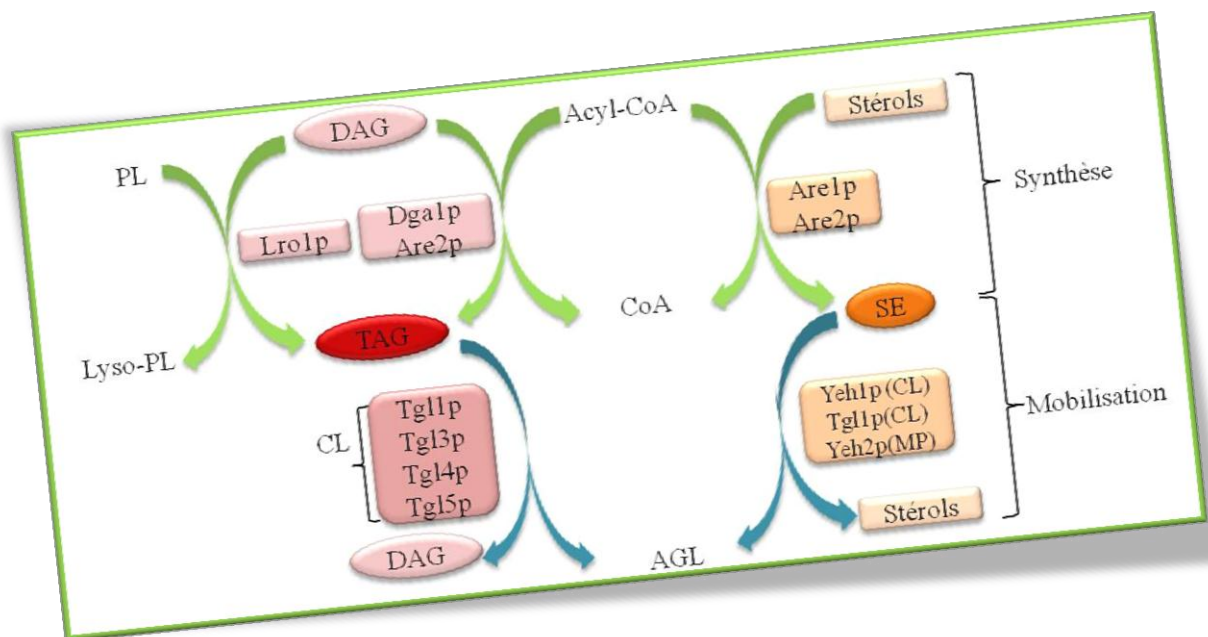


Figure 8 : Représentation schématique de la dégradation des triglycérides et des esters de stérol. La dégradation de TAG libère des acides gras libres (AGL) et des diglycérides (DAG) sous l'action des triacylglycérol lipases Tgl1p, Tgl3p, Tgl4p, Tgl5p. La dégradation des esters de Stérol (SE) sous l'action des hydrolases d'ester de stérol Tgl1p, Yeh1p et Yeh2p engendre des acides gras libres et des stérols (Athenstaedt et Daum, 2005 ; Czabany *et al.*, 2006).

L'enzyme Tgl1p hydrolyse aussi bien les triglycérides que les esters de stérol chez *S. cerevisiae* (Jandrositz *et al.*, 2005). Contrairement à Yeh2p qui a été localisé dans la membrane plasmique, les deux autres enzymes rencontrées chez les levures Tgl1p et Yeh1p se retrouvent dans les corps lipidiques. Chez le triple mutant *yeh1Δ yeh2Δ tgl1Δ* on observe

une abolition complète de l'activité ester de stérol-hydrolase. La Figure 8 rappelle aussi la dernière étape de la synthèse des TAG impliquant les diacylglycérol acyltransférases Lro1p, Dga1p et Are1p et la synthèse des esters de stérol impliquant Are1p et Are2p.

A.3.3. Mécanisme de β -oxydation

La bêta-oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Elle se caractérise par l'élimination de deux atomes de carbone de l'acide gras (Cruz *et al*, 2004). C'est un processus métabolique central qui fournit des électrons à la chaîne respiratoire et par conséquent de l'énergie chez les eucaryotes en conditions aérobies (Ghisla, 2004).

Dans les cellules de mammifères, la dégradation des acides gras s'effectue par le biais d'une β -oxydation qui se déroule dans les mitochondries et les peroxysomes. En revanche, chez les levures, les enzymes qui interviennent dans cette voie de dégradation sont essentiellement localisées dans les peroxysomes.

La dégradation des acides gras est un processus qui se déroule en plusieurs étapes nécessitant l'implication de quatre réactions enzymatiques. La première étape de la β -oxydation est catalysée par un acyle coenzyme A (CoA) oxydase (Aoxp). De nombreuses études ont été effectuées sur les gènes responsables de cette première étape. Ces études ont en partie montré, qu'il existe un seul gène codant l'acyle coenzyme A (CoA) oxydase (Aoxp) chez *S. cerevisiae* (Wang *et al*, 1994). En revanche, chez *Y. lipolytica* les études ont d'abord montré l'existence de cinq gènes *POX (1-5)* codant cinq isoenzymes Aoxp avec différentes spécificités de substrat et différents niveaux d'activité (Wang *et al.*, 1999). Le séquençage complet du génome de *Y. lipolytica* a révélé l'existence d'un sixième gène *POX6* (Dujon *et al.*, 2004). La protéine Aox2p intervient préférentiellement dans la dégradation des acides à longue chaîne (Luo *et al*, 2002), en revanche Aox3p est spécifique des acides gras à chaîne courte (Luo *et al.*, 2000) chez *Y. lipolytica*. Les protéines Aox4p et Aox5p ne présentent pas de spécificité de substrat en fonction de la longueur des acides gras (Wang *et al.*, 1999) chez *Y. lipolytica*.

Chez les plantes, plusieurs isoenzymes Aoxp appartenant à la même famille présentent également différentes spécificités de substrat (Eastmond *et al.*, 2000 ; Schillmiller *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004). Comme chez la levure *Y. lipolytica*, 6 gènes codant des acyle-CoA-oxydases ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* mais seulement 5 ont été confirmés (Adham *et al* 2005). La première étape de la β -oxydation peroxysomale qui est catalysée par une acyle-CoA-oxydase permet la formation d'un 2-trans-enoyl-CoA. L'acyle-CoA-oxydase

utilise une molécule d'oxygène comme accepteur d'électron et génère une molécule de H_2O_2 . En revanche dans les mitochondries cette première étape est catalysée par une Acyle-CoA-déshydrogénase et génère par cette réaction un électron qui va contribuer à la formation d'un ATP. La deuxième étape de la bêta-oxydation est catalysée par une enzyme multifonctionnelle codée par le gène MFE. Cette enzyme va par deux réactions successives produire du 3-cetoacyl-CoA qui à son tour sous l'action d'une 3-cetoacyl-CoA-thiolase qui catalyse la dernière étape de la β -oxydation, va donner une nouvelle molécule d'acyle-coA ayant deux atomes de carbones en moins que la molécule de départ (Figure 9).

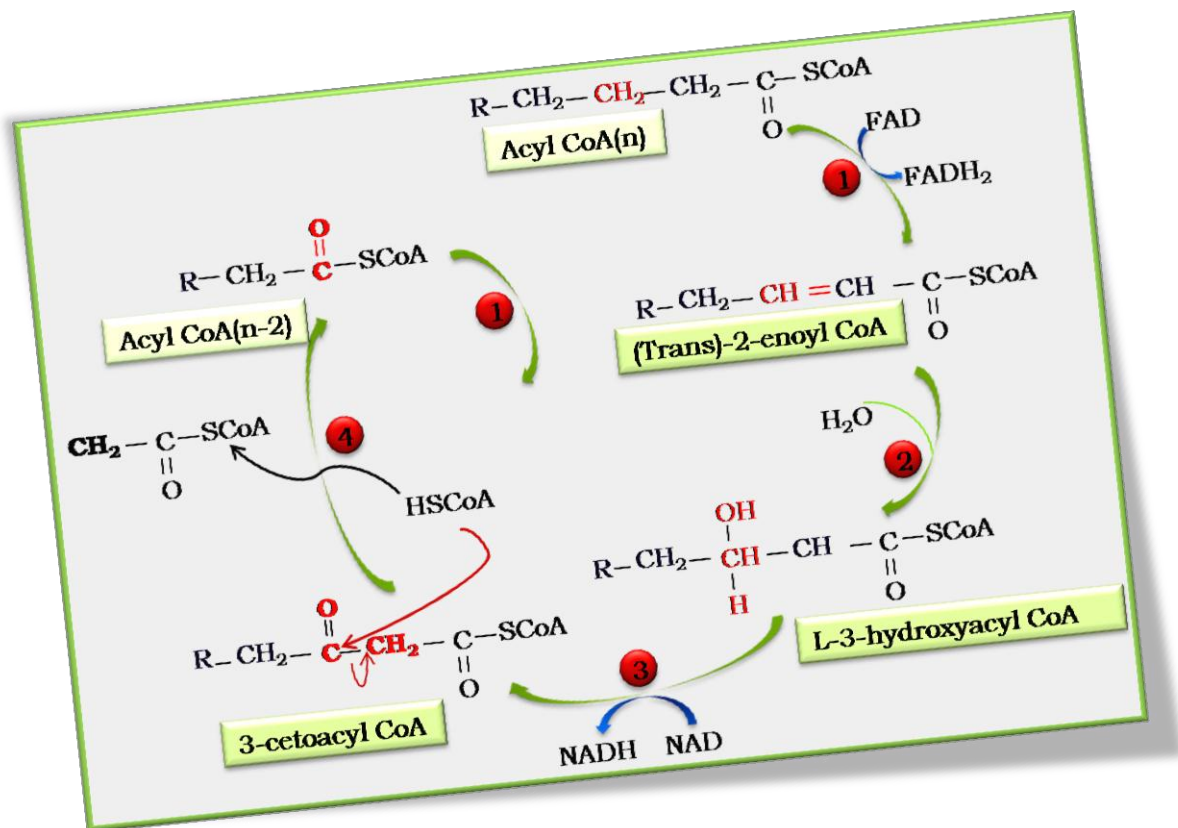


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme de la β -oxydation dans les peroxysomes. Les différentes étapes sont catalysées par les 4 réactions enzymatiques suivantes : 1 : Acyle-CoA oxydase, 2 : Enoyl CoA hydratase, 3 : L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, 4 : Acyle-CoA thiolase, permettant d'obtenir un acyle-CoA de n-2 carbones à partir d'un acyle-CoA de n carbone.

B. Cycles de Krebs et du glyoxylate chez les levures

B.1. Le cycle du TCA

B.1.1. Définition du cycle Krebs et son rôle

Le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA) est une série de huit réactions enzymatiques et constitue l'étape finale du catabolisme oxydatif des glucides (glycolyse, voie des pentoses phosphates), des lipides (hélice de Lynen) et des acides aminés (protides), car tous ces catabolismes aboutissent à la formation d'acétyl-coenzyme A (Figure 10), qui est une forme de transport des groupements acyle. Il assure la plus grande part des besoins énergétiques de la cellule grâce à la formation d'une molécule d'ATP et des coenzymes réduits (NADH, H^+) qui seront réoxydés dans la chaîne respiratoire mitochondriale et produiront 11 autres molécules d'ATP (énergie). Le cycle de Krebs se déroule dans la matrice de la mitochondrie chez les eucaryotes ou dans le cytoplasme des bactéries, en conditions aérobies. Les enzymes catalysant cette série de réactions sont localisées dans la matrice mitochondriale (cytoplasme chez les bactéries) ou au niveau de la membrane interne mitochondriale (membrane interne chez les bactéries).

B.1.2. Les différentes étapes et les enzymes du cycle de Krebs

La première étape du cycle de Krebs commence avec un acétyl-CoA qui est une forme activée de l'acétate qui dérive de la glycolyse et l'oxydation du pyruvate à partir des hydrates de carbone, et de la β -oxydation des acides gras. Dans cette première étape deux carbones du groupement acétyle de l'acétyl-CoA sont transférés sur l'oxaloacétate qui est un composé à quatre carbones pour former le citrate, composé à six carbones (Figure 10). Cette première étape est catalysée par deux isoenzymes de la citrate synthase codée par deux gènes chez *S.cerevisiae*. La première enzyme codée par le gène *CIT1* a été identifiée et caractérisée par Suissa et ses collaborateurs (1984) qui ont montré que cette enzyme est localisée dans la mitochondrie et participe effectivement au cycle de Krebs. Une deuxième citrate synthase mitochondriale a été identifiée plus tard et est codée par le gène *CIT3* chez *S. cerevisiae* (Jia *et al.*, 1997). Bien que ces deux gènes soient responsables de l'activité citrate synthase mitochondriale, le gène *CIT3* joue un rôle moins important lorsque les cellules sont cultivées sur glucose car la délétion de *CIT3* dans une souche $\Delta cit1$ n'a aucun effet sur la croissance sur milieu glucose. En revanche *CIT3* joue un rôle très important dans la croissance sur milieu glycérol car la délétion du gène *CIT3* dans une souche $\Delta cit1$ réduit considérablement la

croissance sur glycérol. Une intégration multicopie du gène *CIT3* dans une souche $\Delta cit1$ améliore la croissance sur milieu acétate (Jia *et al.*, 1997). Il a été également montré que le gène *CIT1* code une citrate synthase en revanche *CIT3* code une méthyle citrate synthase (Graybill *et al.*, 2007), ce qui pourrait expliquer leur différence de fonctionnement.

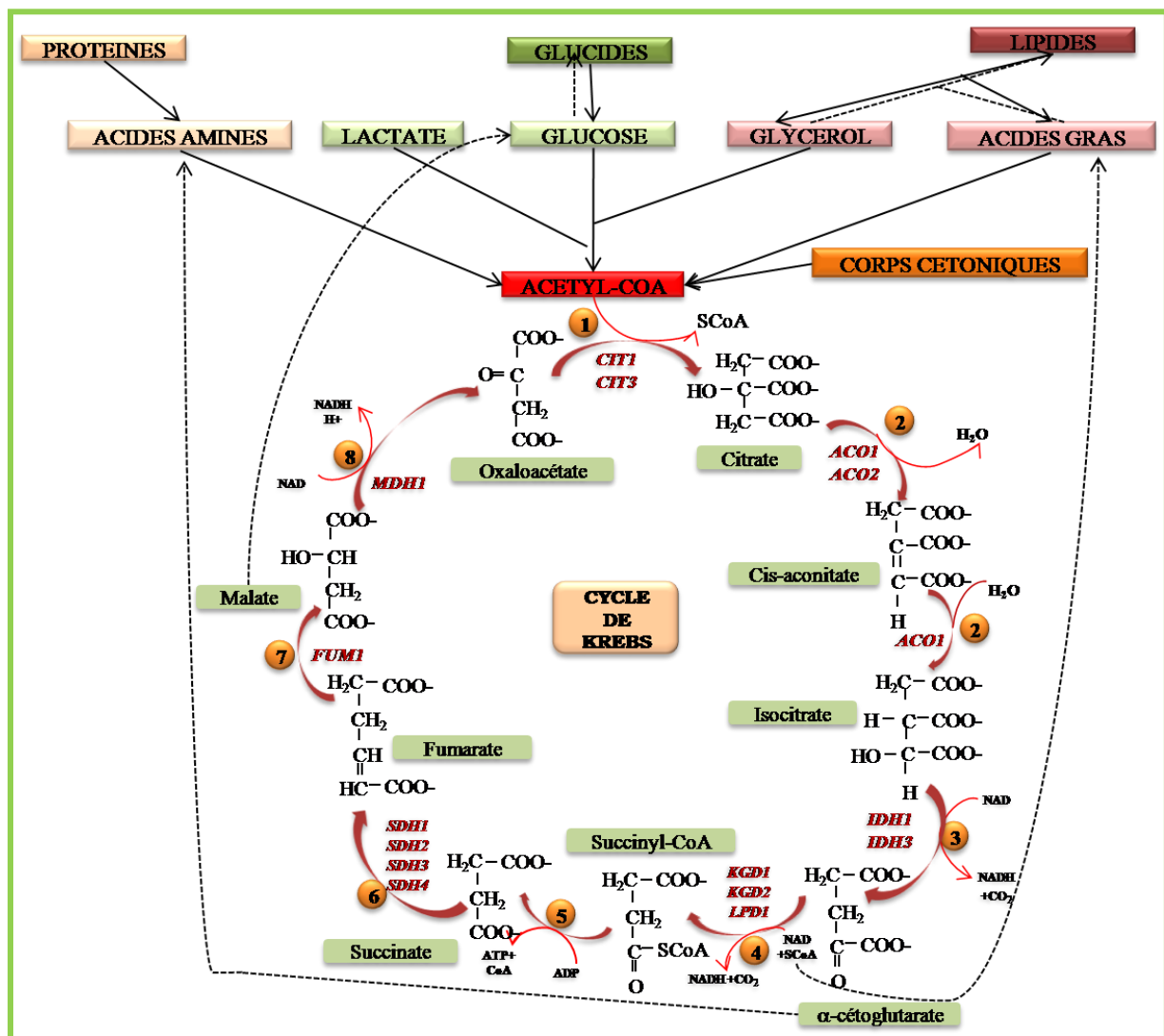


Figure 10: Représentation schématique du rôle que joue le cycle de krebs dans les processus métaboliques chez les eucaryotes. L'acétyl-CoA issu de l'hydrolyse des lipides, des glucides et des protéines est utilisé pour la production de l'énergie sous forme d'ATP et des métabolites qui vont être réutilisés pour leur synthèse.

La deuxième étape est constituée par une réaction de déshydratation réversible du citrate, catalysée par une lyase (cis-aconitase) qui produit du cis-aconitate suivie d'une réaction réversible d'hydratation du cis-aconitate catalysée par la même enzyme pour

engendrer l'isocitrate. L'aconitase soustrait d'abord une molécule d'eau au citrate en créant une double liaison entre le carbone qui porte la fonction alcool tertiaire et le carbone situé en dessous. Le composé intermédiaire qui est le cis-aconitate n'est pas libéré mais immédiatement réhydraté par addition d'une molécule d'eau, pour donner le produit final qui est l'isocitrate (Figure 10). L'aconitase encore appelée aconitate hydratase (EC 4.2.1.3), est une isomérase qui est codée par les gènes *ACO1* et *ACO2* chez *S. cerevisiae*.

De nombreuses études ont été menées sur Aco1p ont montré que cette enzyme est impliquée dans la stabilité et l'organisation de l'ADN mitochondrial (Chen *et al.*, 2005). Chez cette levure, l'inactivation *ACO1* entraîne une déficience respiratoire et une auxotrophie au glutamate entraînant l'absence d'une activité aconitase dans les cellules (Gangloff *et al.*, 1990). L'enzyme aconitase joue un rôle important dans le cycle TCA au niveau de la mitochondrie et est également impliquée dans la régulation du métabolisme du fer (Regev-Rudzki *et al.*, 2005). L'aconitase est une enzyme qui appartient également à la famille des protéines contenant du fer et du soufre (Gardner, 1997).

L'isocitrate va par la suite subir une oxydoréduction pour donner l'oxalosuccinate qui va à son tour produire par une décarboxylation, l' α -cétooglutarate. L'isocitrate déshydrogénase est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'isocitrate en α -cetoglutarate dans tous les organismes cellulaires. Cette réaction est une étape essentielle et limitante dans le cycle de l'acide citrique (Cupp et McAlister-Henn, 1992). L' α -cétooglutarate formé est requis pour la production de glutamate qui est un précurseur pour les acides aminés tels que l'arginine et la proline. L'isocitrate déshydrogénase a été purifiée à partir de divers organismes comprenant *S. cerevisiae* (Barnes *et al.*, 1971), le porc et le bœuf. La caractérisation de l'isocitrate déshydrogénase de *S. cerevisiae* a montré qu'elle formait un octamère composé de sous-unités enzymatiques non identiques codées par les gènes *IDH1* et *IDH2* (Keys et McAlister-Henn, 1990) de poids moléculaires respectifs estimés à 40.000 et 39.000 Da. Ces deux enzymes Idh1p et Idh2p sont spécifiques du cofacteur NAD^+ . Chez *S. cerevisiae* trois isoenzymes (IDPs) de l'isocitrate déshydrogénase, spécifiques de la NADP ont été identifiées. Ce sont des homodimères codés par des gènes distincts. Ces enzymes ont très fortes homologues avec plus 70% d'identité entre les séquences d'acides aminés, mais sont localisées dans différents compartiments cellulaires et présentent quelques différences dans les propriétés physiques et cinétiques. Parmi ces trois isoenzymes seule celle codée par *IDP1* est naturellement localisée dans la mitochondrie grâce à une séquence amino-terminale

d'adressage de 16 acides aminés qui n'existe pas au préalable dans la protéine mature (Haselbeck et McAlister-Henn, 1991). L'isoenzyme codée par *IDP2* est localisée dans le cytosol. Celle codée par *IDP3* a une séquence C-terminale Cys-lys-Leu, caractéristique d'un adressage aux peroxysomes. Des études ont montré qu'en échangeant les promoteurs et en modifiant les séquences d'adressage des trois isoenzymes elles pouvaient se remplacer mutuellement (Contreras-Shanon et McAlister-Henn, 2004). Néanmoins ces enzymes ne jouent pas de rôle dans le cycle du TCA. Les isoenzymes codées par *IDP1* et *IDP2* joueraient un rôle important dans l'approvisionnement, en α -cétooglutarate pour la synthèse du glutamate et dans l'approvisionnement de NADPH pour les différents compartiments cellulaires. *IDP3* serait induit seulement au cours de la croissance sur les acides gras (Henke *et al.*, 1998 ; Van Roermund *et al.*, 1998).

L' α -cétooglutarate va subir une décarboxylation oxydative qui est une réaction irréversible catalysée par l' α -cétooglutarate déshydrogénase et un complexe enzymatique qui va impliquer cinq coenzymes successifs qui sont la thiamine pyrophosphate, l'acide lipoïque, le NAD, le coenzyme A et le FAD, pour aboutir à la formation du succinyl-coA.

Le succinyl-coA sous l'action d'une succinyl-coA ligase (succinyl-CoA synthétase; succinate thiokinase) va être converti en succinate (Nishimura *et al.*, 1986). C'est une enzyme qui joue un rôle important dans le cycle du TCA et qui est également impliquée dans la dégradation des corps cétoniques chez les animaux. La succinyl-coA ligase est la seule enzyme du cycle du TCA qui produit directement un phosphate de haute énergie (ATP). C'est une enzyme composée de deux sous-unités α et β qui fonctionnent indépendamment de façon synergique avec le substrat chez *E. coli* (Mann *et al.*, 1991; Wolodko *et al.*, 1994). Chez *S. cerevisiae*, deux gènes *LSC1* (YOR142W) et *LSC2* (YGR244C) ont été identifiés. Ces deux gènes codent deux sous unités enzymatiques ayant de fortes similarités avec les sous unités enzymatiques des autres espèces (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). Ces deux sous unités enzymatiques se distinguent sur la base de leur préférence nucléotidique pour l'ATP ou le GTP. Les enzymes de *E. coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent utiliser soit l'ATP ou le GTP (Kavanaugh *et al.*, 1994; Jenkins et Weitzman, 1986) de même que la succinyl-CoA ligase des eucaryotes. Néanmoins chez les eucaryotes, alors que la succinyl-CoA ligase ATP-dépendante est impliquée dans le cycle du TCA, l'enzyme GTP-dépendante est associée à l'élimination des corps cétoniques et à la biosynthèse de l'hème (Freestone *et al.*, 1995; Jenkins et Weitzman, 1988).

Le succinate va à son tour être converti en fumarate par une oxydoréductase, la succinate déshydrogénase qui est une enzyme flavoprotéique à FAD codée chez *S. cerevisiae* par 4 gènes qui sont *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* et *SDH4*. Le fumarate va sous l'action de la fumarase donner le malate qui par la dernière étape du cycle va subir une réaction d'oxydoréduction catalysée par la malate déshydrogénase, et fournir de l'oxaloacétate. La malate déshydrogénase mitochondriale est codée par le gène *MDH1* chez *S. cerevisiae* et joue un rôle clé dans le cycle du TCA et dans la navette malate aspartate.

B.2. Le cycle du glyoxylate

B.2.1. Définition et rôle du cycle

Le cycle du glyoxylate, aussi appelé le shunt du glyoxylate, est une voie anabolique qui est présente chez les champignons, les plantes et les bactéries, mais pas chez les mammifères. Le cycle est essentiel pour la croissance sur des milieux avec comme seule source de carbone l'éthanol et l'acétate, grâce à sa capacité à convertir les composés à deux carbones (C2) en des composés anapleurotiques (composés intermédiaires du cycle de Krebs). Il contribue également à la fourniture de précurseurs pour les réactions de biosynthèse.

Le cycle du glyoxylate est composé d'un grand nombre de réactions existant aussi dans le cycle du TCA, mais n'inclut pas les deux réactions de décarboxylation. En conséquence, les substrats à deux carbones, qui entrent dans le cycle sous forme d'acétyl-CoA, peuvent être convertis en des composés à quatre carbones (C4) qui seront métabolisés pour donner des sucres et d'autres composés organiques essentiels.

Bien que plusieurs réactions du glyoxylate et du cycle TCA soient identiques, la majorité d'entre elles est catalysée par des isoenzymes différentes dans les différents compartiments cellulaires. Le cycle du glyoxylate se produit dans les peroxysomes et le cytoplasme, alors que le cycle du TCA se produit dans les mitochondries.

Les enzymes clés du cycle du glyoxylate que sont l'isocitrate lyase, la malate synthase, ainsi que la malate déshydrogénase, sont régulées dans la levure en fonction de la source de carbone du milieu de croissance. La synthèse de ces enzymes est réprimée dans les cellules cultivées sur glucose et induite dans les milieux comportant des sources de carbone autres que le glucose (Duntze *et al.*, 1969).

L'induction de la voie du glyoxylate est requise pour l'utilisation des composés tels que les alcanes, les acides gras, les alcools et les composés acétates. La voie du glyoxylate permet à plusieurs plantes et champignons de convertir les acides gras en hydrates de carbone,

et aux levures d'utiliser de l'éthanol et les autres composés à deux carbones comme seule source de carbone.

Chez les plantes, les enzymes de la voie du glyoxylate sont séquestrés dans des peroxysomes spécialisées appelés glyoxysomes, où a lieu cette voie métabolique. Le cycle du glyoxylate joue un rôle très important pendant la germination, car les réserves lipidiques doivent être transformées en glucides pour la croissance de l'embryon. Les lipides sont alors transformés en acétyl-CoA, qui est utilisé dans le cycle du glyoxylate.

De nombreuses recherches ont par la suite montré que les enzymes du cycle du glyoxylate chez la levure *S. cerevisiae* sont localisées dans les peroxysomes montrant ainsi que le peroxysome est impliqué dans cette voie métabolique. Le cycle du glyoxylate ne peut pas fonctionner dans les mutants qui ne peuvent pas produire de l'acétyl coenzyme A (Matsuoka *et al.*, 1980; Kujau *et al.*, 1992).

B.2.2. Les différentes étapes et les enzymes du cycle du glyoxylate

B.2.2.1. L'isocitrate lyase

L'isocitrate lyase, catalyse la formation de succinate et de glyoxylate à partir de l'isocitrate. C'est une réaction clé du cycle du glyoxylate (Vanni *et al.*, 1990). L'expression de *ICL1* est induite par la croissance sur l'éthanol et réprimée par la croissance sur glucose chez *S. cerevisiae* (Fernandez *et al.*, 1992 ; Luttik *et al.*, 2000). Le gène *ICL1* a été largement étudié (Kujau *et al.*, 1992) cloné et séquencé (Barth et scheuber , 1993). L'isocitrate lyase été purifiée à partir de nombreux organismes, tels qu'*Escherichia coli* (Conder *et al.*, 1988), *Neurospora crassa*, *Candida tropicalis* et *S. cerevisiae* (Lopez-Boado *et al.*, 1988).

Chez *S. cerevisiae*, l'enzyme que code *ICL1* a été décrite comme étant une protéine composée de quatre sous-unités identiques et ayant une masse moléculaire de 75 kDa. Les gènes *ICL* de plantes et de champignons filamenteux contiennent plusieurs introns, que l'on ne retrouve pas dans le gène *ICL1* de *S. cerevisiae* (Gainey *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 1992). De nombreuses études ont montré que les enzymes isocitrate lyases de plantes et de certains microorganismes (*A. nidulans*, *N. crassa*; *C. tropicalis*) sont localisées dans les peroxysomes, bien que l'isocitrate lyase de ces champignons filamenteux n'ait pas de séquence d'adressage à ces organites cellulaires. (Gainey *et al.*, 1992). L'isocitrate lyase de *S. cerevisiae* a une séquence C-terminale V-K-K qui diffère de la séquence d'adressage aux glyoxysomes qui est une séquence consensus (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) proposée par Gould et ses collaborateurs (1990). Par conséquent, cette observation amène à penser qu'il existe dans

la séquence de l'isocitrate lyase, un autre signal d'adressage aux peroxysomes chez *S. cerevisiae* (Fernandez *et al.*, 1992).

Le gène *ICL1* de *Y. lipolytica* cloné dans *E. coli* a permis de produire une protéine de 555 acides aminés avec un poids moléculaire de 62 kDa, qui correspond à la taille du monomère isocitrate lyase purifié directement à partir de *Y. lipolytica*. La comparaison de cette séquence protéique avec ses homologues a révélé de fortes similarités entre ces enzymes. L'isocitrate lyase de *Y. lipolytica* présente une forte similarité avec celles de *Candida tropicalis* et des champignons filamenteux ainsi qu'avec celle de *S. cerevisiae*. Elle possède une séquence d'adressage aux peroxysomes, S-K-L à l'extrémité C-terminale ce qui suggère qu'elle est bien localisée dans ce compartiment. La délétion du gène *ICL1* entraîne non seulement une inhibition de l'utilisation de l'acétate, l'éthanol et les acides gras comme sources de carbone, mais aussi une croissance réduite sur glucose (Barth et Sheuber, 1993).

B.2.2.2. La malate synthase

Le glyoxylate est produit comme intermédiaire à la fois pour le métabolisme du carbone et de l'azote chez la levure *S. cerevisiae* (Cooper, 1982). Ce glyoxylate est condensé avec l'acétyl CoA, produit au cours du catabolisme des substrats non fermentescibles telles que les acides gras, l'éthanol ou l'acétate, pour aboutir à la formation du malate (Figure 11). Cette réaction de condensation irréversible est catalysée par la malate synthase et constitue la deuxième étape spécifique du cycle du glyoxylate. Le malate constitue un précurseur pour la synthèse du glucose *via* la gluconéogenèse ou des métabolites ayant un rapport avec le glucose *via* le phosphoénolpyruvate (Fraenkel, 1982). Chez la levure *S. cerevisiae* deux gènes codant une malate synthase ont été identifiés. Ces deux gènes *MLS1* et *DAL7*, ont des structures très proches quand on compare leurs fonctions physiologiques, mais sont différemment régulés (Hartig *et al.*, 1992). Des chercheurs ont montré également l'importance de la malate synthase dans la virulence de certains microorganismes. Chez *Candida albicans*, le mutant n'ayant pas le gène *MLS1* perd sa capacité à former des pseudos hyphes et également sa virulence chez les souris (Lorenz et Fink, 2001) car selon ces auteurs le phagolysosome est riche en acides gras et leurs dérivés et ces acides gras ne peuvent être assimilés que par le cycle du glyoxylate pour fournir les composés nécessaires au cycle du TCA. La délétion de *MLS1* et *ICL1* inhibe la virulence car dans cet environnement le cycle du glyoxylate est la seule voie de synthèse du glucose nécessaire pour la croissance de *C. albicans*. Chez *S. cerevisiae*, l'absence de *MLS1* entraîne son incapacité à utiliser les sources

de carbone comme l'éthanol, l'acétate, ou l'acide oléique (Fernandez *et al.* 1992; Hartig *et al.*, 1992; Kunze *et al.*, 2002). Le gène *MLS1* est une enzyme clé dans la production de la riboflavine à partir d'huile de colza chez *Ashbya gossypii* (Sugimoto *et al.*, 2009).

B.2.2.3. La malate déshydrogénase

La malate déshydrogénase est la troisième enzyme du cycle du glyoxylate. Chez les levures telles que *S. cerevisiae* et les plantes oléagineuses, il existe trois isoenzymes malate déshydrogénase, codées par trois gènes *MDH1*, *MDH2* et *MDH3*. Parmi ces trois gènes *MDH3* est celle qui est impliquée dans le cycle du glyoxylate. *Y. lipolytica* présente une particularité d'avoir seulement deux gènes *MDH1* et *MDH2*.

B.2.2.4. La citrate synthase

La formation du citrate, à partir d'oxaloacétate et d'acetyl coenzyme A, dans le cycle du glyoxylate est catalysée par une troisième isoenzyme de la citrate synthase (Figure11). Cette enzyme est codée par le gène *CIT2* et avait été décrite au préalable comme une enzyme extra-mitochondriale (Kim *et al.*, 1986 ; Rosenkrantz *et al.*, 1986). Lewin *et al.*, (1990) ont par la suite démontré que cit2p est effectivement localisée dans les peroxysomes et participe au cycle du glyoxylate. L'analyse de séquences d'ADN révèle que les deux isoenzymes cit1p et cit2p sont similaires en taille et en structure primaire et la différence entre les deux isoenzymes se situe au niveau C-terminal où la protéine codée par le gène *CIT2* présente une séquence sérine-lysine-leucine (SKL) caractéristique d'un adressage aux peroxysomes (Lewin *et al.*, 1990). La protéine peroxysomale codée par le gène *CIT2* se distingue également des autres par une sensibilité au pH alcalin. Les souches dépourvues de citrate synthase extra-mitochondriale poussent normalement dans les milieux ayant pour source de carbone le glucose (Kim *et al.*, 1986), en revanche ces souches ont une croissance ralentie sur des sources de carbone non fermentescibles et ne poussent pas du tout sur des milieux ayant l'acétate comme seule source de carbone.

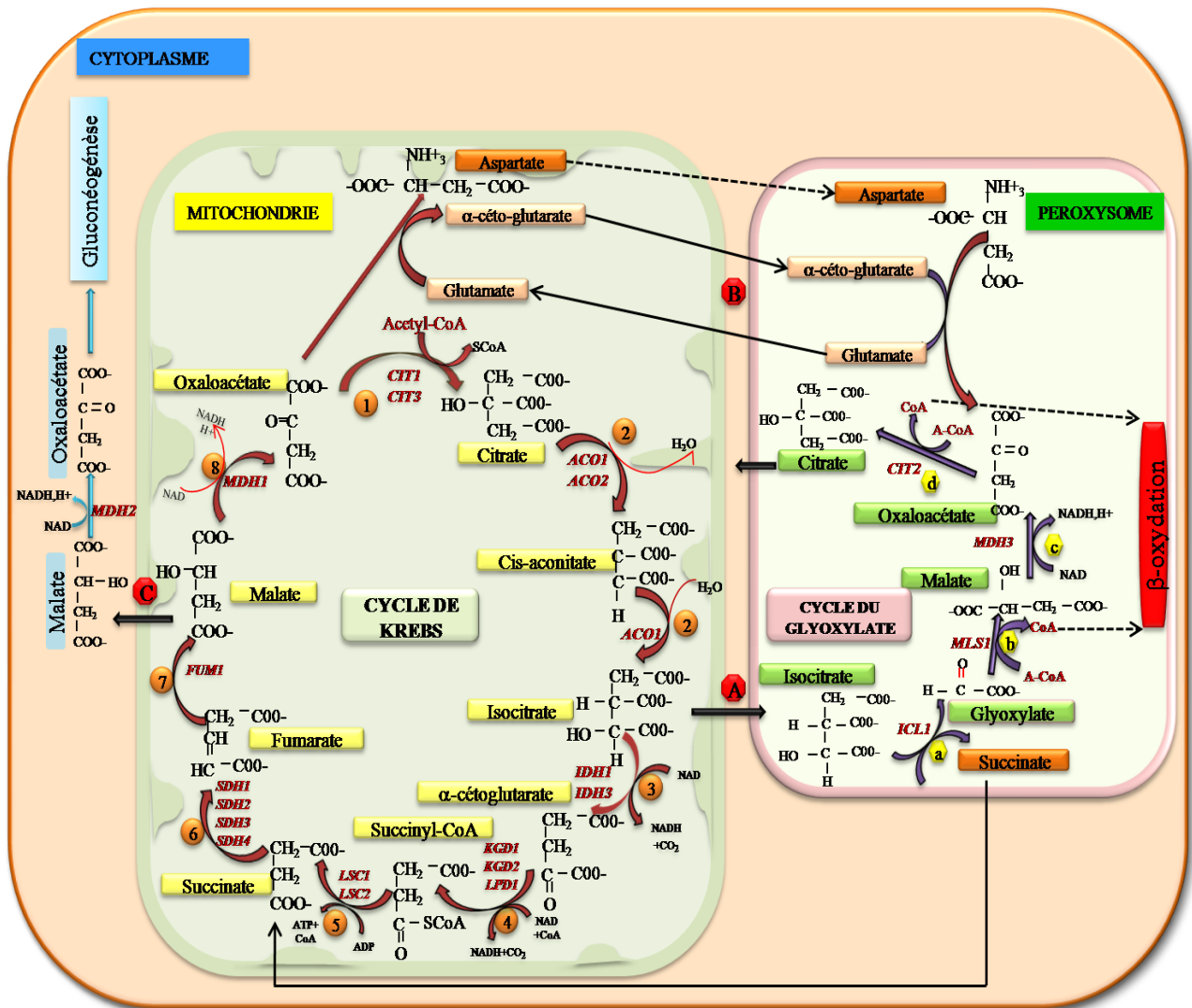


Figure 11 : Représentation schématique du cycle de Krebs, du cycle du glyoxylate et l'interconnexion entre les deux cycles. Au niveau du cycle de Krebs, plusieurs réactions (1 à 8) enzymatiques constituent le cycle de Krebs. 1: la citrate synthase codée par les gènes *CIT1* et *CIT3*; 2: l'aconitase codée par *ACO1* et *ACO2*; 3: l'isocitrate déshydrogénase codée par *IDH1* et *IDH2*; 4: le complexe enzymatique codée par les gènes *KGD1*, *KGD2* et *LPD1*; 5: la succinyl-coA ligase codée par *LSC1* et *LSC2*; 6: la succinate déshydrogénase codé par *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* et *SDH4*; 7: la fumarate hydratase codée par *FUM1*; 8: la malate déshydrogénase codée par *MDH1*

Dans le cycle du glyoxylate il y a 4 réactions enzymatiques (a à d). a: l'isocitrate lyase codée par *ICL1*; b: la malate synthase codée par *MLS1*; c: la malate déshydrogénase codée par *MDH3*; d: la citrate synthase codé par *CIT2*.

Il y a deux connexions entre les deux cycles. A: l'entrée dans les peroxysomes de l'isocitrate issu du cycle de Krebs qui va avec l'isocitrate lyase donner du glyoxylate et du succinate. Cette réaction est la première du cycle du glyoxylate. B: interconnexion entre les deux cycles via l'aspartate, qui sous l'action de l'aspartate aminotransférase, va fournir l'oxaloacétate qui est un composant essentiel pour les deux cycles.

C: le malate peut sortir de la mitochondrie et être transformé en oxaloacétate qui est également un précurseur de la gluconéogenèse.

B.3. Interconnexion entre les cycles de Krebs et du glyoxylate

L'utilisation de composés à deux carbones par des levures exige que le cycle du TCA aussi bien que la néoglucogenèse, soient régulés avec le cycle du glyoxylate. Il existe une connexion entre les cycles de Krebs et du glyoxylate, chez les organismes qui font appel à ces deux cycles pour leur besoins métaboliques et physiologiques. Chez les plantes oléagineuses, le cycle du glyoxylate joue un rôle très important pendant la germination lorsque les réserves lipidiques doivent être transformées en glucides pour la croissance de l'embryon. Les lipides sont alors transformés en acetyl-CoA, qui est utilisé dans le cycle du glyoxylate qui a lieu dans les glyoxysomes. L'isocitrate qui est un intermédiaire de ce cycle est scindé en glyoxylate et succinate. Le succinate est ensuite transporté dans la mitochondrie pour être utilisé dans le cycle de Krebs où il est converti en malate. Il peut également produire plus tard de l'aspartate qui va revenir dans le peroxysome et rentrer dans le cycle du glyoxylate via l'oxaloacétate.

Le malate peut également revenir dans le cytoplasme où il est transformé en oxaloacétate et éventuellement en glucose via la néoglucogenèse. Chez les levures oléagineuses, l'isocitrate est transporté de la mitochondrie, vers les peroxysomes où il rentre dans le cycle du glyoxylate.

C. Les isoenzymes malate déshydrogénase

La malate déshydrogénase catalyse la conversion de l'oxaloacétate et du malate en utilisant le système de coenzyme constitué par NAD^+ et NADH (Figure 11). C'est une enzyme ubiquitaire qui se présente sous plusieurs isoformes qui ont été identifiées chez de nombreux organismes. Ces isoenzymes se caractérisent par leur localisation dans la cellule et leur spécificité en fonction des coenzymes NAD^+ et NADH , qu'elles utilisent pour les réactions qu'elles catalysent. Chez les eucaryotes il existe au moins deux isoformes de l'enzyme malate déshydrogénase. La première est une enzyme clé du cycle du TCA qui a lieu dans la mitochondrie (*MDH1* chez *S. cerevisiae*) et la deuxième est retrouvée dans le cytoplasme (*MDH2* chez *S. cerevisiae*) et participe au shunt malate/aspartate. Une troisième isoenzyme a été trouvée dans les peroxysomes de la levure *S. cerevisiae* (*MDH3*) et des plantes, où elle convertit le malate produit à partir de glyoxylate, en oxaloacétate (Steffan et McAlister-Henn, 1992).

C.1. La malate déshydrogénase mitochondriale

La malate deshydrogénase codée par *MDH1* est une enzyme mitochondriale étroitement liée à la citrate synthase qui est l'enzyme qui vient juste après elle dans le cycle de Krebs. Cette isoenzyme joue un rôle clé dans le cycle du TCA et dans la navette malate/aspartate qui se déroule dans la membrane de la mitochondrie (McAlister-Henn et Thompson, 1987). La navette malate/aspartate comporte encore deux protéines de transport dans la membrane interne de la mitochondrie. L'une des protéines est chargée de l'échange réversible à travers la membrane d'un malate contre une molécule d' α -cétooglutarate. La deuxième protéine est chargée de l'échange d'un ion aspartate contre une molécule de glutamate. Lorsque les ratios NADH/NAD^+ dans le cytoplasme et l'espace inter-membranaire augmentent à travers l'activité des déshydrogénases à NAD cytoplasmiques, la malate déshydrogénase cytoplasmique réduit l'oxaloacétate en malate. Le malate diffuse à travers la membrane mitochondriale et va être échangé par le transporteur de la membrane interne contre un α -cétooglutarate qui est exporté de la mitochondrie. In vitro, la Mdh1p purifiée, forme un complexe physique stable avec le citrate synthase (Datta et al., 1985) ou avec l'aspartate aminotransférase (Birktoft et al., 1983), une association qui montre son rôle dans le fonctionnement de la navette malate/aspartate. Le gène *MDH1* de *S. cerevisiae* a été cloné (Thompson et al., 1988), et l'analyse de la séquence d'acides aminés a montré que cette isoenzyme mitochondriale tout comme celles de *E. coli* et des mammifères (McAlister-Henn

et *al.*, 1987) comme le porc (Birktoft et *al.*, 1982; Roderick et Banaszak, 1986), est une enzyme d'un poids moléculaire d'environ 33.5 kDa (Banaszak et *al.*, 1975).

Les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* dans lesquelles le gène de la malate déshydrogénase mitochondriale *MDH1* a été délété, n'ont pas d'auxotrophie pour l'aspartate ou le glutamate supposant une compensation soit par l'isoenzyme cytoplasmique, soit par l'aspartate aminotransférase ou les deux.

Chez *S. cerevisiae* les souches disruptées de *MDH1* sont incapables de pousser sur acétate montrant le rôle important que joue la Mdh1p dans la production d'énergie (cycle du TCA) dans ces conditions de croissance. C'est donc une enzyme qui joue un rôle important dans le métabolisme chez les levures et de façon plus générale chez les eucaryotes.

C.2. La malate déshydrogénase cytoplasmique

Chez les eucaryotes et notamment chez la levure, il existe une deuxième isoenzyme non mitochondriale, qui est l'isoenzyme cytoplasmique codée par *MDH2*. L'isoenzyme Mdh2p est une enzyme de la néoglucogénèse et est requise pour la croissance sur milieu minimum ayant pour source de carbone l'acétate ou l'éthanol (Minard et McAlister-Henn, 1991). Elle catalyse une étape de la néoglucogénèse à partir du pyruvate. En effet dans la mitochondrie l'oxaloacétate issu du cycle de Krebs ou encore de la décarboxylation du pyruvate ne peut pas franchir la membrane mitochondriale. Il est alors transformé en malate par la malate déshydrogénase mitochondriale (*MDH1*) avec comme cofacteur le NADH (réaction inverse de celle du TCA). Le malate ainsi formé peut traverser la membrane de la mitochondrie et être transporté dans le cytosol (navette malate/aspartate). Au niveau du cytoplasme le malate est retransformé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase cytosolique (*MDH2*) avec le NAD^+ comme cofacteur. L'oxaloacétate va être ensuite transformé en Phosphoénol-pyruvate (PEP) par la PEP carboxykinase et rentrer dans la voie de la néoglucogénèse.

L'isoenzyme malate déshydrogénase codée par *MDH2* est une protéine d'environ 42 kDa qui est une sous unité du dimère qu'elle forme avec l'isoenzyme mitochondriale (34 kDa). Malgré les différences de poids moléculaire, l'alignement de ces deux protéines a montré qu'elles présentent 49% de similarité. Sur la base de comparaisons des structures tridimensionnelles des malate déshydrogénases du porc, Roderick et Banaszak (1986) ont révélé des régions présentant une forte homologie entre ces deux isoenzymes et la présence de résidus acides aminés jouant un rôle important dans le choix du cofacteur NADH ou NAD^+ (Birktoft et *al.*,

1989). Chez *S. cerevisiae* la protéine Mdh1p se différencie de la Mdh2p par une séquence de 17 acides aminés en N-terminal qui permet son adressage à la mitochondrie et qui est probablement clivée après l'importation dans la mitochondrie (Thompson et McAlister-Henn, 1989; Thompson *et al.*, 1988). L'enzyme Mdh2p de *S. cerevisiae* possède une séquence de 12 acides aminés en N-terminal, qui la distingue de la Mdh1p et de la Mdh3p. Néanmoins cette séquence d'acides aminés n'existe pas chez la malate déshydrogénase cytosolique des mammifères (Joh *et al.*, 1987). Il a été montré que la suppression de cette séquence de 12 acides aminés n'a pas d'effet sur le taux de Mdh2p dans la cellule (Minard et McAlister-Henn, 1991) mais supprime son rôle dans la néoglucogenèse (Gibson et McAlister-Henn, 2003). Cette séquence d'acides aminés jouerait un rôle dans le choix du cofacteur.

C.3. La malate déshydrogénase peroxysomale

Dans des mutants où les gènes *MDH1* et *MDH2* ont été disruptés, Minard et McAlister-Henn (1991) ont montré qu'il y avait toujours une activité malate déshydrogénase ce qui a laissé supposer l'existence d'un troisième gène codant une malate déshydrogénase. En effet, les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* disruptées de ces deux gènes avaient toujours une activité malate déshydrogénase et pouvaient croître sur des substrats non fermentescibles. Des études postérieures ont permis d'isoler et de caractériser le gène *MDH3* qui présente 50% de similarité avec *MDH1* et 43% de similarité avec *MDH2* (Steffan et McAlister-Henn, 1992). L'enzyme Mdh3p de *S. cerevisiae* est une enzyme de 37 kDa qui a une séquence carboxy-terminale constituée du tripeptide Ser-Lys-Leu qui est une séquence d'adressage aux peroxysomes comme chez d'autres protéines (Purdue et Lazarow 1994). La disruption de *MDH3* entraîne une incapacité de croissance sur l'oléate comme seule source de carbone (Van Roermund *et al.*, 1995) montrant ainsi que cette enzyme est impliquée dans le cycle du glyoxylate. Une Mdh3p dépourvue de sa séquence terminale SKL conserve toute son activité malate déshydrogénase mais n'est pas adressée dans les peroxysomes. Cette enzyme tronquée a permis de restaurer l'activité malate déshydrogénase cytoplasmique Mdh2p dans les souches où le gène *MDH2* a été disrupté (McAlister-Henn *et al.*, 1995).

C.4. Les enzymes malate déshydrogénase chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Chez *Yarrowia lipolytica* seulement deux gènes ont été identifiés contrairement à *S. cerevisiae* et à la majorité des eucaryotes. Le gène YALI0D16753g de *Y. lipolytica* est l'orthologue du gène YKL085w (*MDH1*) de *S. cerevisiae* et code une protéine de 338 acides

aminés qui présente une séquence d'adressage à la mitochondrie avec une probabilité de 99% (MITOPROT). Le deuxième gène, YALI0E14190g de *Yarrowia lipolytica* est l'orthologue du gène YOL126c (*MDH2*) de *S. cerevisiae*, qui code normalement une malate déshydrogénase cytoplasmique, et code chez *Y. lipolytica* une protéine de 331 acides aminés. L'absence d'un troisième gène malate déshydrogénase (peroxysomale) et l'analyse de la séquence prédite de la protéine codée par *MDH2* nous amènent à vouloir comprendre le fonctionnement ce gène *MDH2*.

D. *Yarrowia lipolytica*

La levure *Yarrowia lipolytica* se retrouve dans les milieux naturels riches en protéine et en lipides car des souches de *Yarrowia lipolytica* ont été isolées dans des produits à base de lait, de soja et des aliments contenant de la viande et des crevettes. Elle est l'une des levures non conventionnelles les plus utilisées pour les études sur la sécrétion des protéines, la biogénèse des peroxysomes et le dimorphisme. C'est également un modèle eucaryote pour les études sur la dégradation des substrats hydrophobes.

D.1. Taxonomie

La levure *Yarrowia lipolytica* a subi de nombreux changements dans sa classification taxonomique. La souche originale a d'abord été décrite et classifiée comme une *Candida lipolytica*. La forme parfaite de cette levure isolée dans les années 60 par Wickerham dans le Northern Regional Research Laboratory à Peoria dans l'Illinois, a été renommée *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham et al., 1970) puis *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) et porte finalement le nom *Yarrowia lipolytica* (van der Walt et von Arx, 1980).

Cette levure hémiascomycète a toujours été considérée comme très divergente des autres levures. Ceci a été validé par les analyses des séquences rDNA (Kurtzman et Robnett, 1998). Récemment des espèces proches de *Y. lipolytica* ont été décrites comme appartenant au même clade (Kurtzman, 2005).

D.2. Physiologie de la levure

Yarrowia lipolytica est une levure capable d'utiliser comme seule source les substrats hydrophobes tels que les alcanes (Nyns *et al.*, 1967) polyméthylés ou chlorés (Murphy *et al.*, 1984), les huiles et les acides gras.

Les alcanes dans la cellule vont être pris en compte dans le système du cytochrome P-450 qui a été détecté dans de nombreuses souches de *Yarrowia lipolytica* (Delaisse *et al.*, 1981). De nombreuses études ont montré que le système cytochrome P-450 est induit lors de la croissance sur les alcanes et non au cours de la croissance sur glucose, éthanol ou acétate et que ce système est localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Ces hypothèses ont été confirmées par des analyses par fractionnement cellulaire sur des souches de *Y. lipolytica* cultivées sur milieu alcane (Mauersberger *et al.*, 2001).

La capacité de *Y. lipolytica* à utiliser les acides gras comme source de carbone, à les dégrader et à les synthétiser a été montrée par Kamyro *et al.* (1977) et dans cette optique *Yarrowia lipolytica* a été utilisée pour la conversion de longues chaînes d'acides gras en gamma-lactone (Ercoli *et al.*, 1992). Pour le métabolisme des acides gras en général et l'incorporation des acides gras du milieu de culture à l'intérieur des cellules, cette levure fait appel à des enzymes telles que l'acyl-CoA synthétase I, que l'on retrouve dans les peroxysomes, la mitochondrie et le cytoplasme. Il existe également une acyl-CoA synthétase II, qui se retrouve seulement dans les peroxysomes. Cette enzyme est requise dans le mécanisme de la β -oxydation qui implique les acyl-CoA oxydases, au nombre de six chez cette levure, ainsi que les enzymes que codent les gènes *MFE* et *POT1* et qui jouent des rôles très importants dans le mécanisme de la β -oxydation. La disruption de ces gènes entraîne des perturbations dans l'assimilation des acides gras en général. Il a été montré par exemple que la disruption du gène *POT1* inhibe l'utilisation de l'oléate comme source de carbone (Berninger *et al.*, 1993).

La levure *Y. lipolytica* n'est pas capable de produire de l'éthanol mais elle est capable d'utiliser l'éthanol comme source de carbone à des concentrations inférieures à 3%. Au delà de cette concentration l'éthanol commence à être toxique pour cette levure. De nombreuses souches de *Y. lipolytica* peuvent utiliser uniquement l'acétate comme source de carbone. Mais la croissance sur acétate doit se faire à des concentrations allant de 1 à 4 %. Les concentrations élevées d'acétate limitent la croissance. A des concentrations inférieures à 1% la croissance est inhibée. La levure *Y. lipolytica* a d'énormes potentialités pour la production de protéines, de composés organiques, divers métabolites et également de grandes quantités

d'enzymes. Toutes ces caractéristiques donnent à cette levure de nombreuses possibilités d'utilisation en biotechnologie (Gaillardin et Heslot 1988 ; Fickers *et al.*, 2005).

La souche sauvage ATCC20114 peut sécréter du citrate et de l'isocitrate quand elle est cultivée sur un milieu ayant pour source de carbone des *n*-paraffines. Le taux de métabolites (citrate/isocitrate) sécrété peut atteindre 130% (Akiyama *et al.*, 1973) avec un ratio de 60:40. Le ratio citrate/isocitrate de ces deux métabolites sécrétés par la levure dans le milieu de culture est de 92:8 lorsque les cellules sont cultivées sur glucose ou glycérol, contre 67:33 lorsqu'elles sont cultivées sur *n*-paraffine. Néanmoins la quantité extracellulaire de ces deux métabolites reste inchangée quelle que soit la source de carbone (Tréton et Heslot, 1978).

La levure *Y. lipolytica* cultivée sur un milieu avec comme source de carbone du *n*-alcane complémenté par de la thiamine produit de grandes quantités de α -cétoglutarate, et il a été également montré que des souches cultivées sur du glucose sont capables de produire des acides organiques tels que les acides 2-hydroxyglutarique et 2-cétoglutarique (Oogaki *et al.*, 1983).

La levure *Y. lipolytica* est capable de synthétiser de la lysine. De nombreuses recherches ont été menées sur la voie de synthèse de la lysine et ont montré que chez cette levure la première étape de biosynthèse est sous le contrôle du gène *LYS1* qui code une homocitrate synthase (Gaillardin *et al.*, 1979). Le gène *LYS1* serait régulé par *LYS11*. Les réactions suivant la première étape de la biosynthèse de la lysine sont catalysées par les gènes *LYS* (*LYS2-10*). Les deux dernières étapes de la formation de la lysine sont sous le contrôle respectif des gènes *LYS4* et *LYS5* (Xuan *et al.*, 1990).

Y. lipolytica utilise à la fois la lysine comme source d'azote et de carbone par la voie de synthèse du N-6-acétyl-lysine-5 aminovalérate comme *Hansenula saturnus* (Gaillardin *et al.*, 1976). Le gène *LYC1* code le N-6-lysine acétyl transférase, qui catalyse la première étape de la voie du N-6-acétyl-lysine-5 aminovalérate. Le clonage de *LYC1* et son séquençage ont montré que ce gène est induit par la lysine (Beckerich *et al.*, 1994).

Y. lipolytica cultivée sur milieu riche sécrète de grandes quantités de protéases extracellulaires alcalines et acides. Parmi ces protéases, il y a la protéase alcaline extracellulaire nommée AEP (Ogrydziak, 1988; Ogrydziak, 1993) qui a été largement étudiée. Sims et Ogrydziak (1981) ont montré que cette protéase est codée par le gène *XPR2*. Le gène *XPR2* a été cloné et séquencé dans de nombreuses souches (Davidow *et al.*, 1987; Nicaud *et al.*, 1989). Ces recherches ont montré que AEP est une enzyme de 32 kDa issue du clivage d'une protéine intracellulaire glycosylée (Matoba *et al.*, 1988).

La levure *Y. lipolytica* a la capacité de produire également des phosphatases et des lipases extracellulaires. Les lipases de cette levure ont fait l'objet de nombreuses études et ont été largement utilisées en biotechnologie (Alloué *et al.*, 2008). Le gène *LIP2* a été isolé et caractérisé et code la lipase extracellulaire Lip2p qui est un polypeptide glycosylé de 301 acides aminés ayant une activité catalytique optimale à pH 7 et 37 ° C (Pignède *et al.*, 2000). Les gènes *LIP7* et *LIP8* codant deux autres lipases extracellulaires ont été caractérisés par Fickers et ses collaborateurs (2005) quand ils ont constaté que le mutant $\Delta lip2$ continuait à croître sur les triglycérides.

D.3. Génomique de la levure

Une première approche de la génomique de *Y. lipolytica* a été réalisée en séquençant partiellement le génome de la souche W29 (Casaregola *et al.*, 2000). Puis le génome nucléaire de la souche E150 de *Y. lipolytica* a été séquencé entièrement (Dujon *et al.*, 2004). Il est composé de six chromosomes totalisant environ 20 Mb avec un pourcentage en bases G + C de 49%. Il n'y a pas de plasmide extra-chromosomique dans la levure *Yarrowia lipolytica* et la séquence de l'ADN mitochondrial de la souche W29 est connue (Kerscher *et al.*, 2001). Le génome de *Y. lipolytica* contient 6449 gènes et 137 pseudogènes soit environ 900 gènes de plus que *S. cerevisiae*. Plusieurs gènes présentent plus de similarité avec des gènes de champignons filamenteux qu'avec ceux de *S. cerevisiae*. Environ 15% des gènes de *Y. lipolytica* contiennent au moins un intron et jusqu'à 5 introns par gène (Mekouar *et al.*, 2010).

Du polymorphisme chromosomique a été observé en visualisant les caryotypes par gel d'électrophorèse en champ pulsé de plusieurs souches de *Y. lipolytica* (Naumova *et al.*, 1993 ; Casaregola *et al.*, 1997).

D.4. Etude génétique de la levure

De nombreux mutants ont été construits à partir de la souche sauvage W29 et toutes ces manipulations génétiques classiques à savoir la surexpression, le remplacement ou encore la suppression totale de gènes, qui ont aidé à la construction de ces souches ont été rendues possibles grâce au développement de nombreux outils génétiques. Cette levure a été utilisée à travers de nombreuses mutations comme modèle pour l'étude de la sécrétion de protéines, du métabolisme du carbone, de l'utilisation des substrats hydrophobes, de la biogenèse des peroxysomes, de la biogenèse du complexe mitochondriale I, du contrôle de la morphogenèse, de la régulation de la sécrétion de protéases (Barth et Gaillardin, 1997; Barth *et al.*, 2003).

D.4.1. Les différentes souches de *Yarrowia lipolytica*

De nombreuses souches ont été obtenues à partir des trois souches sauvages : W29, CBS 6124 et H222 (Tableau 1). Des mutants ont été construits ou isolés après mutagenèse en fonction du besoin en un acide aminé particulier (adénine, uracile,) et des vitamines telles que la biotine, la riboflavine et la thiamine (Bassel et *al.*, 1971; Gaillardin et *al.*, 1973; Heslot, 1990). Certains mutants ont été isolés en fonction de la couleur des colonies qui pouvait être verte, rouge ou brune (Bassel et Mortimer., 1973; Barth et Weber, 1983). Des souches résistantes à des substances antifongiques et à différents analogues d'acides aminés et sources de carbones ont également été isolées (Gaillardin et *al.*, 1979; Morzycka et *al.*, 1976; Gaillardin et *al.*, 1979).

Tableau 1: Tableau des principales souches utilisées de *Yarrowia lipolytica*

Souche	Origine	Génotype	Auteur	Lieu
W29	Egouts de Paris	MatA		Paris
Po1d	W29	MatA leu2-270, ura3-302, xpr2-322	Gaillardin	Grignon
Po1a	W29	MatA leu2-270, ura3-302	Gaillardin	Grignon
CBS 6124	Usine de maïs	Diploïde		Etats unis
CBS 6124-1	CBS 6124	MatA		Etats unis
CBS 6124-2	CBS 6124	MatB		Etats unis
B204-12C	CBS 6124	MatA met6-1 spo1-1	Barth	Bale/Dresden
B204-12D	CBS 6124	MatB leu3-4 spo1-1		
E150	W29+ CBS 6124	MatB his-1 ura3-302 leu2-270 xpr2±322	Gaillardin	Grignon
E129	W29+ CBS 6124	MatA lys11-23 ura3-302 leu2-270 xpr2±322	Gaillardin	Grignon
H222				Allemagne

D.4.2. Les outils génétiques

Parmi les outils génétiques qui ont été développés chez *Y. lipolytica* il y a les vecteurs qui sont soit réplcatifs soit intégratifs (Gaillardin et Heslot, 1988).

Les vecteurs intégratifs sont des vecteurs d'*E. coli* de type pBR322 contenant un marqueur de sélection de la levure. Ces vecteurs ne contiennent pas d'origine de réplication chez la levure et ne peuvent pas se maintenir dans les cellules à moins de s'intégrer dans le génome de la levure. La transformation des souches de levure par les vecteurs intégratifs se fait par la méthode à l'acétate de lithium ou par électroporation. L'intégration du vecteur dans le génome de la levure, va se faire par recombinaison homologue et cette intégration est favorisée par la linéarisation du vecteur. Cette méthode est celle utilisée pour effectuer la disruption d'un gène par double crossing over, avec une cassette de disruption constituée du marqueur de sélection avec de part et d'autre une zone d'homologie de 500 à 1000 pb avec les régions promotrice et terminatrice du gène (Maftahi et al., 1996 ; Fickers et al., 2003). Ces vecteurs intégratifs permettent d'effectuer des intégrations qui sont soit monocopie ou multicopie.

Les vecteurs réplcatifs sont utilisés pour l'étude des gènes essentiels et la transformation de la levure par les vecteurs réplcatifs se fait également par la méthode à l'acétate de lithium ou par électroporation. Les vecteurs réplcatif ARS (autonomously Replicating Sequence) sont des plasmides centromériques qui contiennent un marqueur de sélection de levure, une origine de réplication (ORI) chromosomique et un centromère chromosomique.

Pour la sélection des différents transformants construits, les marqueurs d'auxotrophie *LEU2* qui code l'isopropyle malate déshydrogénase et *URA3* qui code l'orotidine -5-phosphate décarboxylase ont été développés et sont les plus utilisés chez la levure *Y. lipolytica*.

E. Compartimentation et signaux d'adressage chez *Yarrowia lipolytica*

La compartimentation cellulaire chez les eucaryotes et notamment chez les levures est indispensable au fonctionnement correct de leur métabolisme complexe. La quasi-totalité des protéines est synthétisée dans le cytoplasme. Néanmoins ces protéines doivent être adressées aux différents compartiments tels que la membrane plasmique, le noyau, la mitochondrie et les autres organites qui baignent dans le cytoplasme. Les protéines ne peuvent

exercer leurs activités respectives selon des processus précis que lorsqu'elles sont dans leur compartiment, où toutes les conditions sont réunies pour leur fonctionnement.

Chez les eucaryotes en général tout comme chez *Y. lipolytica* les compartiments cellulaires fonctionnels sont divisés en 3 catégories. La première catégorie de compartiments est constituée par le noyau et le cytosol. La deuxième regroupe l'ensemble des organites impliqués dans les voies endo-cellulaires et sécrétoires tels que le réticulum endoplasmique, les peroxysomes, l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes. La troisième catégorie de compartiments est attribuée aux organites d'origine endosymbiotique (la mitochondrie et le chloroplaste). La protéine une fois la synthèse terminée peut être adressée à son compartiment par deux types de signaux. Le premier signal d'adressage est effectué par le biais d'un polypeptide de 3 à environ 60 acides aminés. Cette séquence polypeptidique appelée peptide signal est ajoutée à la protéine qui est normalement active avec ou sans cette séquence (McAlister-Henn et *al.*, 1995) et va permettre d'adresser de manière très spécifique la protéine vers un des compartiments cellulaires. Le deuxième type de signal se fait par un repliement de la protéine qui génère éventuellement une modification spécifique qui va favoriser son passage d'un compartiment cellulaire à l'autre.

E.1. Signaux d'adressage aux peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites qui se retrouvent chez la quasi-totalité des cellules eucaryotes, où ils constituent le foyer de plusieurs processus biochimiques tels que la β -oxydation des acides gras. Ils jouent un rôle fondamental dans toutes les réactions de détoxification des organismes aérobies, à travers la dégradation du peroxyde d'hydrogène. Chez certaines levures comme *Y. lipolytica*, les peroxysomes gouvernent également la biosynthèse de la lysine et le métabolisme des alcanes et des dérivés d'amines (Brown et Baker, 2008). La majorité des enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate a été retrouvée dans les peroxysomes confirmant le déroulement de ce cycle dans ces organites.

Contrairement aux mitochondries, les peroxysomes sont des organites qui ne possèdent pas de matériel génétique propres. Par conséquent la totalité des protéines qui interviennent dans les réactions chimiques qui y sont effectuées sont importées du cytosol, après leur synthèse. Le transport des enzymes oxydatives dans les peroxysomes se fait par le biais des séquences d'adressage qui sont des peptides signaux associées à ces enzymes. Il existe en générale deux systèmes PTS (Séquence d'Adressage au Peroxysome) chez les eucaryotes.

Le premier système, PTS 1 situé au niveau C-terminal de la protéine est composé du tri-peptide Sérine-Lysine-Leucine (SKL). Gould et ses collaborateurs (1990) ont proposé comme séquence d'adressage aux peroxysomes la séquence consensus (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M). Cette séquence consensus a évolué au fil des années. Le signal d'adressage SKL serait reconnu par la peroxyne 5 (Carvalho et *al.*, 2007), un récepteur cytoplasmique appartenant à la famille des peroxyne.

Les peroxyne sont codées par les gènes *PEXn* qui ont été identifiés chez de nombreux organismes (Kiel et *al.*, 2006), chez les levures telles que *S. cerevisiae* (Erdmann et *al.*, 1992; Lazarow, 1993), *Y. lipolytica* (Nuttley et *al.*, 1993); chez le hamster chinois (Fujiki, 2000) et récemment chez *A. thaliana* (Zolman et *al.*, 2000). Les gènes *PEXn* sont requis pour la translocation des protéines dans la matrice des peroxysomes à travers leur membrane, pour la biogénèse de la membrane des peroxysomes et pour la prolifération de ces organites (Fujiki et *al.*, 2006; Van Ael et Fransen, 2006).

Le deuxième système d'adressage PTS 2, est situé au niveau N-terminal et il est constitué de 9 acides aminés et est caractérisé par la séquence consensus (R/K)-(L/V/I)-XXXXX (H/Q)-(L/A) (Rachubinski et Subramani, 1995; Lazarow, 2006). Le premier acide aminé est soit l'Arginine, soit la Lysine et le second est constitué principalement de la Leucine, mais peut être remplacé par la Valine ou l'Isoleucine. Viennent ensuite 5 acides aminés non spécifiés et les deux derniers qui peuvent être l'Histidine ou la Glutamine pour l'avant dernier, soit la Leucine ou de l'Alanine pour le dernier. Cette séquence est donc constituée principalement par des acides aminés basiques ou apolaires est un peptide signal qui est reconnu par le récepteur peroxyne 7 (Zhang et Lazarow, 1995; Marzioch et *al.*, 1994). Il a été montré que Pex18p et Pex21p chez *S. cerevisiae* (Purdue et *al.*, 1998) et Pex20p chez *Y. lipolytica* (Einwachter et *al.*, 2001; Otzen et *al.*, 2005) sont impliqués dans la translocation des protéines à PTS2 à travers la membrane des peroxysomes. Ces deux séquences sont mutuellement exclusives, c'est-à-dire qu'une protéine contiendra soit PTS1 soit PTS2 et jamais les deux. Il existe une très faible proportion de protéines de la matrice qui contiennent PTS2, chez les levures, contrairement aux protéines dans les plantes (Reumann et *al.*, 2004) qui possèdent dans leur majorité, le système PTS2. Néanmoins PTS1 est la séquence d'adressage la plus souvent retrouvée.

Il y a des protéines dépourvues de séquence d'adressage de type PTS1 et PTS2 mais qui peuvent cependant être transportées à l'intérieur des peroxysomes en s'associant à d'autres protéines qui possèdent ces séquences d'adressage aux peroxysomes ou en formant des complexes hétéromériques avec les isoformes. Nous avons le cas des cinq isoformes de

l'acyl-CoA oxydase (AOX), qui forment un complexe hétéropentamerique de 443 kD contenant une chaîne polypeptidique de chaque isoforme avant d'être transporté dans la matrice des peroxysomes de la levure *Yarrowia lipolytica*. La formation du complexe Aox se fait dans le cytosol avant son importation dans les peroxysomes et aucun élément du complexe peut pénétrer dans la matrice des peroxysomes en tant que monomère (Titorenko et al., 2002).

E.2. Signaux d'adressage à la mitochondrie

Plus de 98% des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire et par conséquent synthétisées par les polysomes dans le cytosol. Elles sont ensuite adressées à la surface de la mitochondrie, et transportées soit dans l'espace inter membranaire soit dirigées vers la membrane externe ou interne, ou véhiculées à travers la double membrane pour être ainsi importées dans la matrice de la mitochondrie (Lill et Neupert, 1996 ; Schatz et Dobberstein, 1996).

Les protéines mitochondriales sont adressées vers ces organites, grâce à une séquence signal, située en N-terminal et composée de 10 à 70 acides aminés basiques et hydrophobes (Préprotéines) dont le transport à travers la membrane mitochondriale requiert de l'énergie. A ce jour de nombreuses théories ont montré l'existence d'un modèle de transport des protéines qui est gouverné par un complexe composé de séquences peptidiques qui ont des sites de reconnaissance sur les surfaces externe (cis) et interne (trans) de la mitochondrie (Bolliger et al., 1997)

Les protéines, après synthèse dans le cytosol, sont associées à des molécules chaperons du genre hsp70 dont la fonction consiste au contrôle de leur conformation tridimensionnelle. Un complexe de plusieurs sous-unités protéiques qui a été nommé translocase de la membrane externe mitochondriale (Tom), est composé de plusieurs protéines réceptrices Tom70-Tom37 et Tom20-Tom22 qui reconnaissent les préprotéines localisées dans le cytosol c'est-à-dire du côté cis de la membrane mitochondriale (Schatz, 1997). Le récepteur Tom 22 est la protéine réceptrice centrale du complexe de réception de la membrane externe (Moczko et al., 1997). Les chaperons vont capturer la protéine dans le cytosol et la maintenir "déroulée" pour aider son passage à travers les récepteurs membranaires au travers de la double membrane.

Par la suite, les préprotéines sont transférées par le biais des translocases de la membrane interne (Tim) à la surface des membranes internes de la mitochondrie (Pfanner et *al.*, 1994).

A l'intérieur de la mitochondrie le peptide signal est éliminé par une "signal peptidase", et un autre signal l'acheminera vers sa destination finale au sein de l'organite. La protéine sera prise en charge par un autre chaperon qui va l'aider à acquérir sa conformation finale et la rendre fonctionnelle. Les enzymes impliquées dans les processus métaboliques qui se déroulent dans la mitochondrie telles que le cycle du TCA et la β -oxydation mitochondriale sont importées par ce modèle complexe de translocation.

E.3. Les signaux d'adressage au cytoplasme

La quasi-totalité des protéines est synthétisée dans le cytosol via les organites spécialisés sous la commande nucléaire. Les protéines destinées à rester dans le cytosol n'ont pas de séquence d'adressage particulière et donc rentrent en activité dans les processus métaboliques propres aux fonctions cytoplasmiques. Le transport des protéines cytosoliques fait appel donc à des processus divers et complexes. Certaines de ces protéines peuvent transiter du cytoplasme vers le noyau via les pores nucléaires. Les protéines destinées au noyau portent un signal de localisation nucléaire qui est reconnu par des protéines cytosoliques qui s'associent à elles et les guident vers les pores nucléaires. La reconnaissance du signal déclenche alors l'ouverture du pore nucléaire. Le noyau et le cytoplasme ne forment qu'un compartiment physique lors de la division chez les eucaryotes supérieurs.

Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux points fondamentaux. Dans la première partie j'ai commencé l'étude des enzymes de la voie de synthèse des triglycérides à travers leur localisation chez *Yarrowia lipolytica*. Dans la deuxième partie je me suis focalisée sur l'étude des enzymes malate déshydrogénases chez *Yarrowia lipolytica* car contrairement à la plupart des levures hémiascomycètes qui possèdent trois gènes codant la malate déshydrogénase, seulement deux gènes malate déshydrogénases ont été identifiés chez cette levure. Les résultats obtenus ont orienté ma thèse sur le deuxième volet de cette partie qui est l'étude des autres enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate et la localisation de ces différentes enzymes dans la cellule et les compartiments dans lesquels ont lieu les différentes étapes du cycle glyoxylate.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel

A.1. Les souches

A.1.1. Les souches de levure : *Yarrowia lipolytica*

Plusieurs souches de levures ont été utilisées parmi lesquelles, la souche **Po1d** : Mat A, *leu2-270*, *ura302*, *xpr2-322* (Barth et Gaillardin, 1996) et les autres mutants de cette souche qui est proche de la souche sauvage W29. Cette souche a été utilisée surtout pour la construction des mutants du cycle du glyoxylate.

D'autres souches vont être utilisées pour la localisation des gènes de la voie de synthèse des triglycérides *LRO1* et *DGA1*. Ce sont des souches mutantes de **Po1d** et qui proviennent du laboratoire de Jean-Marc Nicaud (LMGM, Thiverval-Grignon). Il s'agit des souches **JMY 1346** (*JMY 1202 Po1d Δgut2 Ura⁻Leu⁻*), **JMY 1367** (*Δpox 1-6 Δgut2 Ura⁻Leu⁻*), **JMY 1215** (*Δlro1 Ura⁻Leu⁻*) et **JMY 1330** (*Δdga1 Ura⁻Leu⁻*).

A.1.2. Les souches de bactérie : *Escherichia coli*

Nous avons utilisé principalement la souche **Mach1-T1** (*F⁻mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mrcBC) Δ80lacZΔM15ΔlacX74recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG Mach1-T1*) pour le clonage de toutes cassettes d'expression ou de disruption. La quasi-totalité des cellules compétentes pour les manipulations génétiques sont obtenues à partir de cette souche d'*Escherichia coli*.

A.2 Les vecteurs

A.2.1. Les vecteurs d'expression

JMP62-URA3ex : c'est un vecteur qui sert de navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur intégratif qui contient le promoteur *POX2*, le marqueur d'auxotrophie *URA3* et les séquences ZETA (Figure 12).

JMP62-LEU2ex : c'est également un vecteur qui est utilisé comme navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de répllication ColE1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif qui contient le promoteur *POX2*, les séquences ZETA et le marqueur d'auxotrophie *LEU2* (Figure 12).

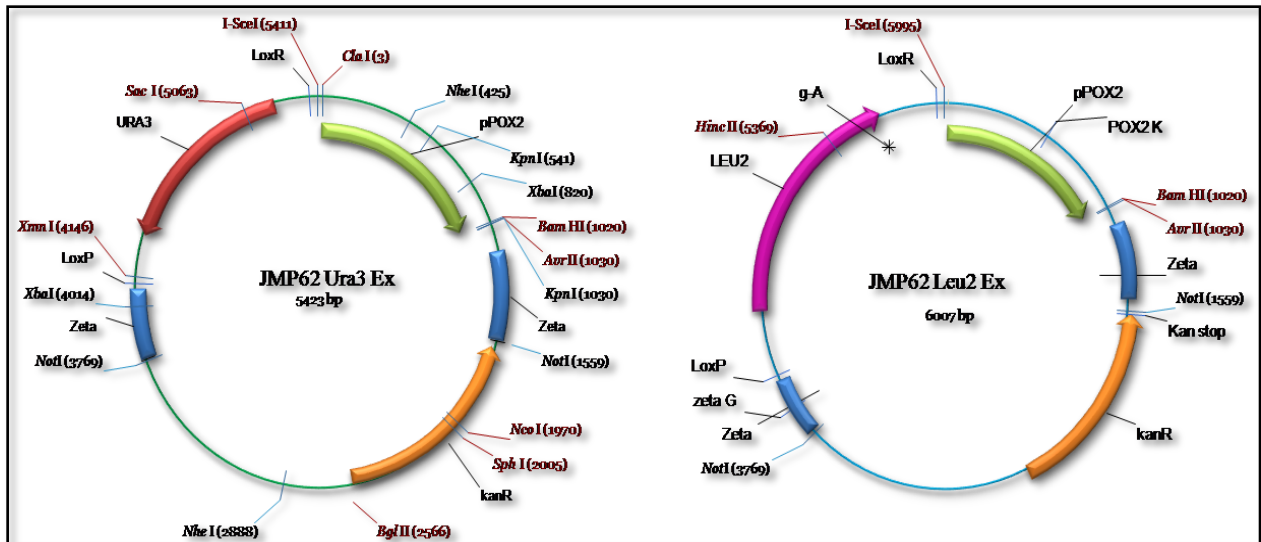


Figure 12 : Schéma de la carte des vecteurs d'expression JMP62-URA3ex et JMP62 LEU2ex

A.2.2. Les vecteurs pour la production de protéines

Pour la production des protéines de fusion dans *E. coli*, le plasmide pMAL c2X a été utilisé. En effet la construction a consisté à fusionner le gène d'intérêt avec le gène de la MBP pour permettre sa purification une fois produite dans la bactérie.

Le vecteur pMAL c2X a été conçu pour permettre l'expression et la purification d'une protéine produite à partir d'un gène ou un cadre ouvert de lecture. Le gène est inséré en aval du gène *malE* qui code la protéine Maltose Binding Protein (MBP), permettant l'expression d'une protéine de fusion MBP. La MBP dans ces vecteurs a été introduite pour permettre une liaison à l'amylose. Le vecteur contient le promoteur fort *tac* et la séquence signal de l'initiation de la traduction du *malE* pour permettre une forte expression des gènes clonés et une étape de purification de la protéine de fusion au moyen d'affinité MBP pour le maltose.

Le vecteur contient également un site de clonage multiple et est porteur du peptide signal d'adressage des pré-protéines de fusion MBP dans le cytoplasme porteurs et d'une séquence codante pour le site de reconnaissance d'une protéase spécifique, qui va permettre le clivage de la protéine d'intérêt après purification.

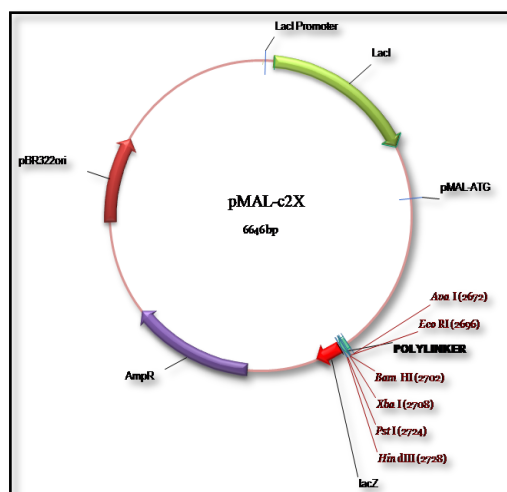


Figure 13 : Carte du plasmide pMAL c2X pour la production des protéines dans *E. coli*

A.2.3. Les vecteurs pour le clonage des cassettes de disruption

Les vecteurs pBluescript II KS (+/-) et pBluescript II SK (+/-) : Pour le clonage des cassettes de disruption, nous avons utilisé le plasmide pBluescript II KS (+/-) ou le pBluescript II SK (+/-). Ces deux séries de vecteur représentent deux orientations du MCS (multiple cloning site) présent dans le gène *lacZ* codant pour le fragment alpha N terminal de la bêta-galactosidase (KS représente l'orientation du MCS avec lequel la transcription de *lacZ* se fait de KpnI à SacI au lieu de SacI à KpnI en ce qui concerne SK).

Les symboles + et - du pBluescript indiquent l'orientation de la région inter génique (IG). Les deux vecteurs contiennent le promoteur inductible *plac* en amont de la région *lacZ* qui complétement avec la région *E. coli lacZ* permet la sélection de colonies blanches contre les colonies de couleur bleue lorsqu'il n'y a pas d'insertion de fragment d'ADN dans le MCS. Ils contiennent également une origine de replication ColE1 ori et le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des transformants.

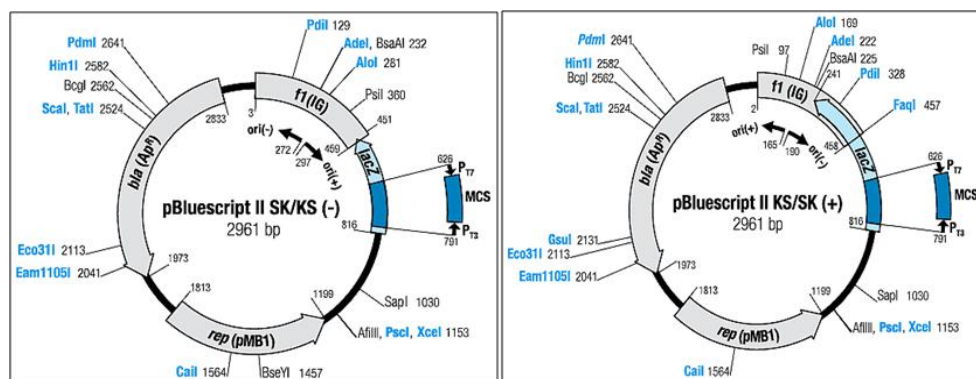


Figure 14 : Carte des vecteurs de clonage pBluescript II KS (+/-) et pBluescript II SK (+/-)

A.3. Les milieux de culture

A.3.1. Les milieux pour *Yarrowia lipolytica*

A.3.1.1. Les milieux de culture classique pour *Yarrowia 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 YNBNO**

- YNB W/O (Yeast Nitrogen Base; w/o acides aminés , sulfate d'ammonium) 0.67%
- NH₄Cl 0.5%
- Tampon phosphate (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) pH6.8, 50 mM
- Glucose 1%

A.3.1.2. Les milieux de culture pour la croissance des mutants *Yarrowia lipolytica*

- **Milieu minimum YNB Casa : sélection des mutants Ura⁺ ; Leu⁻**

- YNB W/O (Yeast Nitrogen Base ; w/o acides aminés , sulfate d'ammonium) 0.67%
- NH₄Cl 0.5%
- Tampon phosphate (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) pH6.8, 50 Mm
- Glucose 1%
- Casaminoacids 0.2%

- **Milieu minimum YNB Ura : sélection des mutants Ura⁻ ; Leu⁺**

- YNB W/O (Yeast Nitrogen Base ; w/o acides aminés , sulfate d'ammonium) 0.67%
- NH₄Cl 0.5%
- Tampon phosphate (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) pH6.8, 50 mM
- Glucose 1%
- Uracile 0.05g/l

A.3.1.3. Le milieu d'induction pour l'accumulation des triglycérides

Nous avons utilisé le milieu préparé selon le tableau 1, surtout pour l'analyse des corps lipidiques dans les souches dans lesquelles nous avons fusionné les gènes *DGA1* et *LRO1* avec la *YFP*.

Tableau 2 : Composition du milieu d'induction pour l'accumulation des triglycérides

Solution stock	Stérilisation	500 ml	Concentration finale.
YNB W/O 50 g/l	Filtration 0.22 µm	17 ml	0.17%
NH ₄ Cl 250 g/l	121° 20 min	10 ml	0.5%
Tampon PO ₄ NaK pH6.8 500 mM	121° 20 min	50 ml	50 mM
YE (100g/l)	Filtration 0.22 µm	7.5 ml	1.5 g/l
Emulsion d'acide oléique 20%	Sonication	50 ml	2%

A.3.1.4. Les milieux pour les analyses phénotypiques : tests en goutte

Pour la réalisation des tests en gouttes pour l'analyse phénotypique, nous avons utilisé plusieurs milieux à partir du milieu minimum de culture de *Yarrowia lipolytica* complémenté par différentes sources de carbone (Tableau 3). La composition du milieu dépend du test de croissance que nous voulons réaliser. Nous avons utilisé dans la plupart des cas une émulsion d'acide oléique, de tributyrine, de trioléine comme source de carbone avec des contrôles sur glucose milieu minimum ou milieu riche. Les milieux sont quelque fois complémentés par l'uracile, les casamino acides ou la leucine pour les souches auxotrophes.

Tableau 3 : Composition du milieu pour les analyses phénotypiques : tests en goutte.

Solution stock	Stérilisation	500 ml	Concentration finale.
AGAR 2%	121° 20 min		1.6%
YNB W/O 50 g/l	Filtration 0.22 µm	17 ml	0.17%
NH ₄ Cl 250 g/l	121° 20 min	10 ml	0.5%
PO ₄ NaK pH6.8 0.5 mM	121° 20 min	50 ml	50 mM
Emulsion 20%	Sonication	50 ml	2%

A.3.2. Les milieux pour *Escherichia coli*

A.3.2.1. Le milieu de culture complet : Luria-Bertani broth (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.3.2.2. Le milieu de culture pour la sélection des transformants

Pour la sélection des transformants d'*E. coli* le milieu de culture complet est utilisé additionné d'un antibiotique selon le gène de résistance contenu dans le plasmide utilisé. La Kanamycine (50 à 100 µg/mL) a été utilisée dans la majorité des clonages avec les vecteurs JMP62-URA3ex ou JMP62-LEU2ex et l'ampicilline (50 à 100 µg/mL) pour les vecteurs pMAL-c2X et pBluescript.

A.3.2.3. Le milieu de culture pour la production des protéines de fusion

- 10 g tryptone
- 5 g yeast extract
- 5 g NaCl
- 2 g glucose
- IPTG (concentration 0.5 mM)

B. Méthodes

B.1. Méthodes liées aux acides nucléiques

B.1.1. Techniques de préparation de l'ADN

B.1.1.1. Extraction d'ADN plasmidique de bactéries

➤ Extraction d'ADN plasmidique au STET

1,5 ml de culture de la souche *E. coli* est centrifugé pendant 5 min, et après élimination du surnageant le culot est repris dans 300 µl de STET et ensuite 12,5 µl de lysozyme (10 mg/ml) sont ajoutés à ce mélange.

Cette préparation est incubée à 100°C pendant 1 min et est ensuite centrifugée pendant 30 min à température ambiante. Le culot est éliminé et 210 µl d'isopropanol sont

ajoutés au surnageant qui est ensuite incubé pendant 5 min à température ambiante. Après cette incubation la préparation est centrifugée pendant 10 min à température ambiante.

Le culot d'ADN est ensuite lavé avec 300 µl d'éthanol 70% par centrifugation, séché et résuspendu dans 30 µl TE avec RNase A à 100 µg/ml.

➤ **Extraction avec le kit QIAGEN**

Le kit QIAGEN permet d'extraire un ADN plasmidique de meilleure qualité selon le protocole établi dans le guide du kit

B.1.1.2. Extraction d'ADN génomique de levures

➤ **Extraction d'ADNg au phénol/chloroforme**

Une culture en tube dans 5 ml YPD est effectuée à partir d'une colonie isolée et l'incubation est effectuée à 28°C sous agitation 180 rpm pendant 48 heures. Ensuite 2 ml de culture d'environ 20 de DO₆₀₀ sont prélevés et centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'eau. Un volume de 200 µl de tampon de lyse est ajouté au culot cellulaire et ensuite 300 µl de phénol/chloroforme (pH7) est ajouté suivi de l'ajout d'environ 0,3 g de bille en verre (acid-washed, 45 µm). Le contenu du tube est vortexé à la vitesse maximum pendant 5 min. Un volume de 300 µl de TE est ensuite ajouté et mélangé de nouveau pendant 10 secondes. La totalité de ce mélange est centrifugée pendant 5 min à 13000 rpm.

La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et mélangée à 400 µl de chloroforme/alcool isoamylique pendant 10 secondes. Ce mélange est centrifugé pendant 3 min à 13000 rpm et la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et mélangée par retournement. Après l'ajout de 1 ml d'éthanol absolu l'ADN est précipité. Une autre centrifugation est effectuée pendant 10 min à 13000 rpm, et le surnageant est éliminé. Un volume de 400 µl de TE/Rnase A 100 µg/ml est ajouté suivi d'une incubation à 37°C pendant 15 min. Ensuite 10 µl d'acétate d'ammonium 4 M et 1 ml d'éthanol absolu est ajouté à la préparation précédente et le tout est mélangé par retournement, centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 500 µl éthanol 70%, puis centrifugé pendant 2 min à 13000 rpm et le surnageant éliminé. Le séchage du culot est ensuite réalisé au speed vac ou dans une étuve à 37°C. L'ADNg est à la fin repris dans 50 à 100 µl d'eau.

➤ Extraction d'ADNg avec la Zymolyase

Une culture liquide avec 5 ml YPD pendant 40 à 48 heures à 28°C est effectuée à partir d'une colonie isolée de la souche d'intérêt. Un échantillon de 1,5 à 3 ml de culture est centrifugé à 13000 pendant 5 min. Le culot est ensuite re-suspendu dans 500 µl de tampon Sorbitol (1M, Tris-HCl 0,1 M pH 8-EDTA 0,1M). 50 µl de zymolyase (3 mg/ml), puis 50 µl de β-mercaptoéthanol (0,28 M) sont ajoutés à la suspension qui est par la suite incubée pendant 1 h à 37°C.

La préparation est ensuite centrifugée et remise en suspension dans 500 µl de TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA) additionnée ensuite de 50 µl de SDS 10%. Le tout est incubé à 65°C pendant 20 min. Une quantité de 200 µl de solution d'acétate de potassium 5 M est par la suite ajoutée et incubée pendant 30 min dans la glace.

Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min le surnageant est mélangé à 700 µl d'isopropanol, incubé à température ambiante pendant 10 min. Le tout est centrifugé et le culot est repris dans 500 µl éthanol à 70°C, centrifugé à nouveau et le culot est repris dans 400 µl de TE-Rnase A (TE + 100 µg/ml de RNase A) et incubé à 37°C pendant 15 min à 1 h.

L'ADN est précipité par ajout de 40 µl acétate de Na 2,5 M pH 5,2 et de 1 ml d'éthanol 100%. Cette préparation d'ADN est centrifugée, lavée avec 700 µl d'éthanol 70%. Après centrifugation le culot d'ADN est repris dans 100 µl d'eau.

B.1.2. Technique d'amplification de l'ADN (PCR)

L'amplification des fragments d'ADN est réalisée par réaction de polymérisation nommée PCR (Polymerase Chain Reaction) dans un appareil 2720 Thermal Cycler, AB Applied Biosciences (CA, USA).

Il s'agit d'une amplification enzymatique *in vitro* à l'aide d'une polymérase qui dans notre cas est soit une Taq polymérase (New England Biolabs) soit la Pyrobest (TaKaRa) ou la GoTaq pour les PCR de vérification. Elle est mise en œuvre par l'enzyme et deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent alors, le fragment d'ADN à amplifier.

La PCR s'est généralement effectuée en 30 cycles d'amplification successifs et 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 pendant 30 Sec entre 45 et 60 °C
- une étape d'élongation de la copie d'ADN à 72°C (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 réactions de PCR sont réalisées dans des microtubes de 0,3 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 $MgCl_2$, 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.

B.1.3. Analyses et utilisation de l'ADN

B.1.3.1. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

Pour toutes les manipulations génétiques on a eu recours dans la plupart des cas à une digestion des ADN plasmidiques, génomiques et des fragments de PCR pour réaliser une transformation une ligation ou d'autres manipulations géniques. A cet effet les endonucléases de restriction (New England Biolabs) sont utilisées à raison de 1 à 5 unités par μ g d'ADN. La réaction s'effectue pendant 1 à 2 heures ou plus longtemps en fonctions des conditions d'incubation données par le fournisseur. En général la température d'incubation est de 37°C pour la majorité des enzymes de restriction.

B.1.3.2. Déphosphorylation de l'ADN

La déphosphorylation des extrémités 5' du vecteur a été effectuée dans certains cas après la linéarisation du vecteur (plasmide digéré par les enzymes de restriction) pour éviter sa recircularisation pendant la ligation. La phosphatase antartica isolée à partir d'une source recombinante est utilisée à raison de 1 unité de Phosphatase Antarctica par réaction dans son tampon aussi à 1 X et incubée à 37 ° C. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui déphosphoryle 1 mg d'ADN vecteur pUC19 coupé par HindIII 30 minutes à 37 °C.

La phosphatase antartica permet une déphosphorylation qui entraine une inhibition de la recircularisation > 95% dans une réaction d'auto-ligation. La réaction est arrêtée par une inactivation thermique de l'enzyme pendant 5 minutes à 65 °C.

B.1.3.3. Méthodes de séparation par électrophorèse et purification de l'ADN

Pour l'analyse de la présence et de la taille des fragments des acides nucléiques, on réalise la séparation et la purification des fragments d'ADN contenus dans les différentes préparations par une électrophorèse sur gel d'agarose.

Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium (BET), un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN. Dans le cas d'une préparation d'ADN plasmidique, on observe sous UV une ou plusieurs bandes colorées bien définies dans le gel, correspondant à l'ADN du plasmide. Dans le cas d'ADN génomique, on observe plusieurs bandes souvent continues formant un smear correspondant aux fragments d'ADN issus de la coupure statistique du chromosome résultant des traitements mécaniques lors de l'extraction.

B.1.3.4. Ligature de l'ADN

La ligase du phage T4 est utilisée pour rassembler 2 fragments d'ADN par une liaison ester entre le fragment 5' phosphate et le fragment 3' OH. Les conditions de ligature varient suivant la nature des extrémités de l'ADN. En général, la ligature de l'ADN est effectuée pendant une période de temps allant de 1 à plusieurs heures, dans un volume final de 20 µl, dans les conditions de la réaction sont données par le fournisseur. La plupart des ligatures sont réalisées à 18 °C sur la nuit.

B.1.4. Southern blot

B.1.4.1. Préparation et digestion de l'ADNg

Pour la réalisation du Southern blot l'ADN est préparé dans notre cas par la méthode d'extraction au phénol pour avoir une quantité suffisante pour nos expériences. L'ADN est digéré par une enzyme appropriée pour la suite de notre analyse. Pour cela la quantité d'ADNg requise, est digérée par l'enzyme requise généralement sur la nuit dans les conditions données par le fournisseur.

B.1.4.2. Migration sur gel et transfert sur membrane

Une concentration fixe pour chaque échantillon digéré est mélangée à 6 µl de tampon de charge 6X. Le mélange est chargé sur un gel d'agarose (0.8% dans la majorité des cas). La migration est effectuée soit à 200 V pendant 4 heures ou à 50 V sur la nuit. Après migration, le gel est traité par une solution 0,2 N HCL pendant 20 min puis par une solution 0,4 N NaOH

pendant 20 min. Le transfert est effectué pendant une nuit par capillarité avec 0,4 N NaOH sur une membrane de Nylon chargée positivement.

B.1.4.3. Sonde, hybridation et révélation

Après le transfert, la membrane est rincée en tampon SSC 2X puis séchée à l'air ambiant. La sonde est marquée au γ -P32 dCTP selon le protocole du kit Megaprime DNA Labelling Systems d'Amersham. La membrane est ensuite pré hybridée à 60°C dans un volume minimum (50 à 100 ml) de tampon d'hybridation (5X SSC ; 5X Denhart ; 25 mM tampon phosphate de sodium (pH 6,8) ; 0,1% SDS). Un volume d'ADN de sperme de poisson (200 μ g/ml d'ADN) préalablement dénaturé est ajouté et le tout est incubé pendant 30 min à 1 heure à 60°C.

L'hybridation est ensuite effectuée avec la sonde préalablement dénaturée dans la même solution que la préhybridation pendant 3 heures à 60°C et la membrane est ensuite rincée (2X SSC, 0,1% SDS 5 min à température ambiante ; 2X SSC, 0,1% SDS 10 min à 65°C ; 2X SSC, 0,1% SDS 10 min à 65°C ; 0,1X SSC, 0,1% SDS 20 min à 65°C ; 0,1X SSC, 0,1% SDS 20 min à 65°C). La membrane est exposée 24 heures et plus si nécessaire avec des films autoradiographiques à -80°C.

B.2. Méthodes de préparation des protéines

B.2.1. Préparation des extraits cellulaires pour l'analyse des protéines

Un prélèvement de 1 ml d'une culture de la souche d'intérêt est centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm. Ensuite deux lavages sont effectués avec 1 ml de tampon phosphate 100 mM pH 6,8 froid.

Après ce lavage un volume de 250 μ l de tampon phosphate 100 mM froid complété d'un cocktail antiprotéase (complete lysis-B 2x EDTA free ; Roche) est ajouté au culot ainsi que 250 à 500 μ l. Cette préparation est broyée à l'aide du FastPrep 3 fois 1 min à la vitesse 6,5.

B.2.2. Analyse sur gel d'électrophorèse des protéines intracellulaires

Un volume de l'extrait cellulaire correspondant à 20 de DO est complété à 55 μ l par du tampon phosphate 100 mM pH 6,8 froid complété par un cocktail anti-protéase. Ensuite il est ajouté à cette préparation 25 μ l de tampon de charge LDS [NuPAGE® LDS

(Lithium dodecyl sulfate] Sample Buffer ; Invitrogen) et 10 µl de DTT 10 X (500 mM). Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à 70°C.

Cette préparation est chargée sur un gel de polyacrylamide [NuPAGE® MOPS SDS (sodium dodecyl sulfate) Running Buffer ; Invitrogen] et le volume par puits est caractéristique du gel utilisé. La migration se fait au début à 100-120 mA pendant environ 20 min et ensuite à 60-80 jusqu'à la fin de la migration.

B.2.3. Western blot

B.2.3.1. Transfert des protéines sur membrane

Le transfert se fait généralement dans un champ électrique qui fait migrer la protéine du gel vers la membrane et le tout dans un tampon de transfert [(Trizma base ; glycine ; SDS) ; méthanol ; eau]. Le gel est placé entre 2 éponges, 4 feuilles de papier filtre, et la membrane sur laquelle va être transférée les protéines. La membrane toujours du côté de l'anode et le transfert est effectué 4 heures à 150 mA ou sur la nuit à 50 mA.

B.2.3.2. Hybridation et révélation

Pour l'analyse des protéines transférées, une première révélation peut être effectuée au rouge Ponceau pour confirmer l'efficacité du transfert. Sinon pour conduire le process normal du western la membrane est saturée par une incubation pendant 1 heure dans 60 ml de PBS (Phosphate-Buffered Saline ; Invitrogen) 1X. Cette saturation est suivie de l'incubation avec le premier anticorps dirigé contre la protéine cible. La membrane est ensuite lavée deux fois dans du PBS 1X suivie de l'incubation avec l'anticorps révélateur couplé à la peroxydase. La membrane est encore lavée 4 fois dans du PBS 1X et la révélation est effectuée avec le kit ECL Plus Western Blotting Detection System de GE Healthcare.

B.3. Méthodes de transformation

B.3.1. Transformation d'*Escherichia coli*

B.3.1.1. Technique de préparation des cellules compétentes

La souche *E. coli* Mach1-T1 est ré-isolée sur milieu solide LB complémenté de MgCl₂ 10 mM. Cette culture est incubée une nuit à 37°C. Le milieu SOB est préchauffé sur la nuit à 37°C. Le lendemain 10 ml de milieu SOB estensemencé avec quelques colonies et incubé à 37°C à 200 rpm jusqu'à ce que la culture atteigne une DO (600 nm) de l'ordre de 0,3.

Ensuite une fiole contenant 50 ml de milieu SOB estensemencée au 1/20 (soit 0,015 de DO final). Cette culture est Incubée à 37°C à 200 rpm jusqu'à ce que la culture atteigne une DO (600 nm) de l'ordre de 0,4 à 0,8 (2 à 4 heures suivant les souches). Il est conseillé de ne pas dépasser les 0,8 de DO. (A partir de cette étape la manipulation est effectuée sur glace et avec des tampons froids).

La totalité de la culture est centrifugée 10 min à 5000 rpm dans une centrifugeuse à +4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est résuspendu doucement dans 3 ml de tampon 1 (30 mM acétate de K ; 100 mM RbCl₂ ; 10 mM CaCl₂ ; 50 mM MnCl₂ ; 5 % glycérol ; eau UP) froid. Après ré-suspension, 13 ml de tampon 1 froid est ajouté et le tout est doucement mélangé. Le tout est incubé 5 min à +4°C et est par la suite centrifugé 10 min à 5000 rpm à +4°C. Le culot de cellules est ensuite repris dans 4 ml de tampon 2 (10 mM PIPES; 10 mM RbCl₂ ; 75 mM CaCl₂ ; 15 % glycérol ; eau) froid. Après une incubation 15 min à +4°C, les cellules compétentes sont aliquotées (100 ou 200 µl) et conservées à -80°C.

B.3.1.2. Clonage

Généralement il s'agit de la transformation d'un produit de ligation. Les cellules compétentes d'*E. coli* sont mises à décongeler en même temps que les tubes contenant la ligation dans la glace pendant le temps de décongélation des compétentes. Après la décongélation 50 à 100 µl de cellules compétentes d'*E. coli* sont directement ajoutés dans les tubes contenant la ligation.

Après une incubation de 30 min dans la glace, un choc thermique est effectué à 42°C pendant environ 1 min. La préparation est ensuite incubée dans la glace pendant 5 minutes. Ensuite une quantité de 250 µl de milieu SOC est ajouté à la préparation et le tout est incubé à 37°C. Le temps d'incubation est fonction du marqueur de sélection (1 heure pour une sélection kanamycine ; 15 min à 1 heure pour une sélection ampicilline).

Une fois l'incubation terminée 20 à 150 µl de transformation est étalé sur boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif. Les cultures sont incubées à 37°C.

B.3.1.3. Vérification des clones

➤ Rapid screen

Pour l'analyse des clones après la transformation des plasmides dans *E. coli* une des premières méthodes est le "rapid screening" qui consisté à piquer avec une pointe jaune une colonie et la reprendre dans 16 µl de tampon de lyse [9 vol GLD (25% ficoll 400 0,25% Bleu de bromophénol) 10X ; 40 vol alcaline SDS (sodium dodecyl sulfate) ; RNaseA 10 mg/ml ; 11 vol eau].

Les cellules sont laissées 10 min dans le tampon de lyse à température ambiante. Ensuite il faut ajouter 3 µl d'Acétate de K (5 M acétate de K ; Acide acétique glacial ; Eau) et centrifuger le tout pendant 4 min à 13500 rpm et charger 16 µl de surnageant sur un gel d'agarose de 0,8 %. Et laisser migrer: 2 à 4 cm 100 V max soit environ 30 à 45 min.

➤ PCR sur colonies de bactéries

Pour effectuer la PCR sur les colonies de bactéries une petite pointe de cellule est prélevée et reprise dans 20 µl d'H₂O avec un cône. Le mélange est vortexé et mélangé à 30 µl de mix (2 µl de primer à 100 µM; 3 µl dNTP 2.5 mM. 5 µl tampon 10 X ; .3 µl de Taq ; qsp 30 µl H₂O). L'amplification se fait par la suite comme une PCR classique.

➤ Extraction de plasmide et restriction

L'extraction d'ADN plasmidique est effectuée par la méthode au STET ou par la méthode avec le kit QIAGEN. Pour la vérification des clones, 1 à 5 µl de mini prep est nécessaire pour la digestion et la restriction est effectuée avec des enzymes appropriées donnant un profil bien déterminé.

B.3.2. Transformation de *Yarrowia lipolytica*

B.3.2.1. Préparation de compétentes

➤ Préparation de compétentes à partir de culture sur milieu solide

La souche à transformer est étalée sur boîte YPD et incubée à 28°C pendant 16 à 24 H. A partir de cette culture une anse de cellules est prélevée et reprise dans 1ml TE dans un tube Eppendorf stérile. Le tout est centrifugé à 10 000 rpm et le surnageant éliminé.

Le culot est ensuite repris dans 600 μ l d'acétate de lithium 0,1 M pH 6,0. Cette préparation est incubée 1 heure à 28°C dans un bain marie sans agitation. Elle est ensuite centrifugée pendant 2 min à 3000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules reprises dans 60 μ l d'acétate de lithium 0, 1 M pH 6,0. Ces cellules compétentes sont conservées à 4°C ou dans la glace.

➤ **Préparation de compétentes à partir de culture en milieu liquide**

Une préculture de la souche d'intérêt est effectuée le matin dans 10 ml de milieu YPD/tampon citrate à partir d'une boîte fraîchement repiquée de la souche sur YPD solide. Le soir les cellules sont comptées sur cellule de Malassez, 2 erlens de 500 ml contenant chacun 20 ml de YPD/buffer citrate sontensemencées à $5 \cdot 10^5$ cellules/ml et à 10^5 cellules/ml. Les cultures sont incubées à 28°C sous agitation (180 rpm). Les cellules sont comptées le lendemain et la culture se situant entre $8 \cdot 10^7$ et $1,5 \cdot 10^8$ cellules/ml est centrifugée à 4000 rpm dans un tube falcon de 50 ml pendant 10 min. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 10 ml de TE et le culot est repris dans 20 ml de solution LiAc, placé et incubé 1h à 28°C dans un bain-marie sans agitation.

La préparation est ensuite centrifugée 2 min à 2000 rpm et le culot est resuspendu dans du LiAc pour obtenir $5 \cdot 10^8$ cellules/ml et les cellules sont stockées à +4°C en attendant leur utilisation.

B.3.2.2. Transformation de cellules compétentes

Pour la transformation nous ajoutons successivement 5 μ l d'ADN entraîneur (ADN de poisson), 1 à 10 μ l d'ADN à transformer puis 50 à 100 μ l de cellules compétentes.

Cette préparation est mélangée délicatement dans un tube par retournement et est incubée pendant 15 min au bain-marie à 28°C sans agitation. Ensuite 700 μ l de solution de PEG et le tout est incubé à 28°C pendant 1 h à 200 rpm (NB : pour une intégration multicopie (défectif, Ura3d4) ajouter 80 μ L de DMSO (pour augmenter le taux de transformant de 2 à 7 fois). Après cette incubation un choc thermique est effectué à 39°C pendant 10 mn dans un bain marie. 1,2 ml de solution LiAc 0, 1 M pH 6,0 est ensuite ajouté à la préparation et le mélange est étalé immédiatement et délicatement avec des billes sur des boîtes de milieu minimum YNB avec la sélection adéquate à raison de 200 μ l par boîte. Les cultures sont incubées à 28°C. Les transformants monocopies apparaissent entre 3 et 5 jours d'incubation.

B.3.2.3. Vérification des transformants

➤ PCR sur colonies de levures

Une colonie est prélevée avec un cône et resuspendue dans 10 µl de NaOH 0,02 N dans un tube eppendorf 1,5 ml. Pour des grandes séries, les tubes sont vortexés avant l'incubation pour resuspendre efficacement les cellules qui sédimentent. Elles sont incubées pendant 5 min à 100°C et mis immédiatement sur la glace après l'incubation. Les tubes sont ensuite centrifugés dans la centrifugeuse type « bulle » brièvement pour faire retomber les gouttes de condensation.

Les cellules sont resuspendues à l'aide du cône et 2 µl de chaque tube sont transférés dans un tube à PCR préincubé dans la glace. Un volume de 48 µl de mix (5 µl de tampon PCR 10X, 5 µl de dNTPs 2.5 mM, 0,5 µl de chaque oligo à 100 µM, 0,5 µl de Taq 48 µl H₂O) pour la réaction de PCR est mis dans chaque tube. La PCR est effectuée dans des conditions d'amplification standard.

➤ Extraction d'ADNg et PCR de vérification

L'analyse des transformants par PCR sur l'ADNg est effectuée avec l'ADNg extrait au phénol et le protocole de PCR est effectué en fonction de la taille du fragment à amplifier et la température d'hybridation des oligos utilisés.

B.4. Méthodes de disruption

B.4.1. Mutation au locus par simple crossing over

La méthode de construction des cassettes pour la mutation par simple crossing over au locus est réalisée par une étape d'amplification PCR de la région d'intérêt, suivie du clonage de ce fragment dans un plasmide. Pour réaliser cette méthode, dans un premier temps un couple d'amorces est dessiné avec l'objectif d'introduire la mutation souhaitée. Puis on réalise l'amplification du fragment et le fragment est par la suite cloné dans un plasmide. Le plasmide est digéré par une enzyme de restriction qui coupe dans le fragment permettant l'intégration par simple crossing over du plasmide dans le génome de la levure permettant la reconstitution d'un gène muté et d'une copie du gène deleté.

B.4.2. Mutation par double crossing over

B.4.2.1. Construction de cassette de disruption par clonage

Selon la méthode SEP (**Maftahi et al., 1996**) les cassettes de disruption sont généralement générées par deux étapes d'amplification PCR. La première étape consiste à la construction d'une cassette P-T (promoteur-terminateur). La partie promotrice nommée P est la partie en amont du gène et la partie terminatrice (T) la région en aval du gène d'intérêt. Cette méthode a été adaptée pour *Y. lipolytica* (**Fickers et al, 2003**).

Ces deux régions d'environ 1kb, sont amplifiées à partir de l'ADN génomique de la souche sauvage de *Y. lipolytica*, W29 par les paires d'oligonucléotides P1/P2 (pour la partie promotrice) et T1/T2 (pour la partie terminatrice).

Une séquence de l'enzyme I-SceI est ajoutée à la fin de l'amorce P2 et au début de T1 ce qui va permettre d'obtenir après amplification les fragments PCR, P-I-SceI et I-SceI-T qui sont ensuite mélangés et utilisés comme matrice pour la deuxième amplification PCR effectuée avec les amorces P1 et T2 pour obtenir la cassette P-I-SceI-T.

Cette cassette est ensuite clonée dans le plasmide pBluescript. 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 ligation entre celui-ci et le marqueur de sélection (*LEU2* ou *URA3*), est réalisée. Les plasmides résultant présentant les modules P-*URA3*-T, P-*LEU2*-T sont analysés par restriction enzymatique pour vérification.

Les cassettes de disruption PUT et PLT 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.

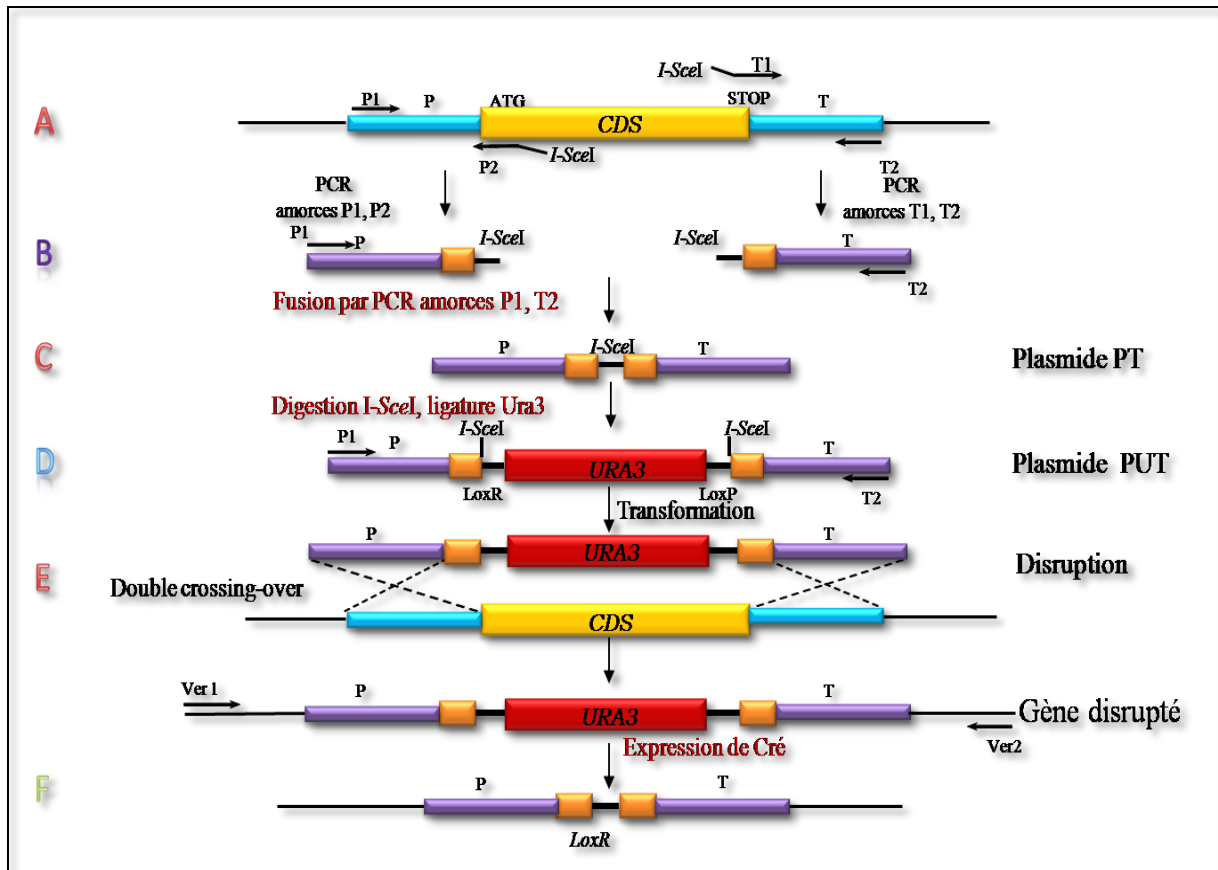


Figure 15 : Représentation schématique de la disruption d'un gène par double crossing over

- Représentation schématique du gène d'intérêt (jaune) avec la partie promotrice P et la partie terminatrice T (bleu) et les oligos qui vont servir à les amplifier.
- Représentation schématique des parties P et T amplifiées (violet) avec le site I-SceI
- Représentation de la Fusion par PCR de P et T et clonage du fragment P-T dans le plasmide
- Représentation schématique de l'insertion du marqueur *URA3* (rouge) dans le fragment P-T pour obtenir la cassette de disruption P-U-T
- Représentation schématique de la disruption par double crossing over (transformation de la levure par la cassette de disruption).
- Excision du marqueur (facultatif)

B.4.2.2. Construction de cassette par PCR 3 voies

La méthode de construction des cassettes de disruption par la méthode de PCR 3 voies est également réalisée en deux étapes d'amplification PCR. Pour réaliser cette méthode d'abord 3 couples d'amorces sont dessinées comme suit.

Le premier couple d'amorces constitué de P1 et P2 est destiné à l'amplification de la partie promotrice nommée P qui est la partie en amont du gène. L'amorce P2 ayant la fin constituée d'une séquence nucléotidique complémentaire au début de l'amorce A du marqueur.

Le deuxième couple d'amorce est constitué de T1 et T2 dessinés pour l'amplification de la partite terminatrice nommée T, sachant que T1 a le début de sa séquence nucléotidique complémentaire au début de l'amorce B du marqueur.

Nous avons enfin le couple d'amorce A et B destiné à amplifier le marqueur. Les fragments P, T et le marqueur ont été amplifiés séparément dans un premier temps, avec leurs amorces correspondante P et T à partir de l'ADN génomique de la souche sauvage de *Y. lipolytica*, W29, et le Marqueur à partir d'un plasmide.

Dans un second temps les trois fragments ont été mis ensemble dans des proportions bien déterminées et ont été amplifiés par les amorces P1 et T2 permettant ainsi la fusion par PCR des 3 fragments et donnant la cassette de disruption P-M-T qui est ensuite utilisée pour la disruption du gène d'intérêt par transformation de *Y. lipolytica* par la méthode à l'acétate de lithium (Figure 16).

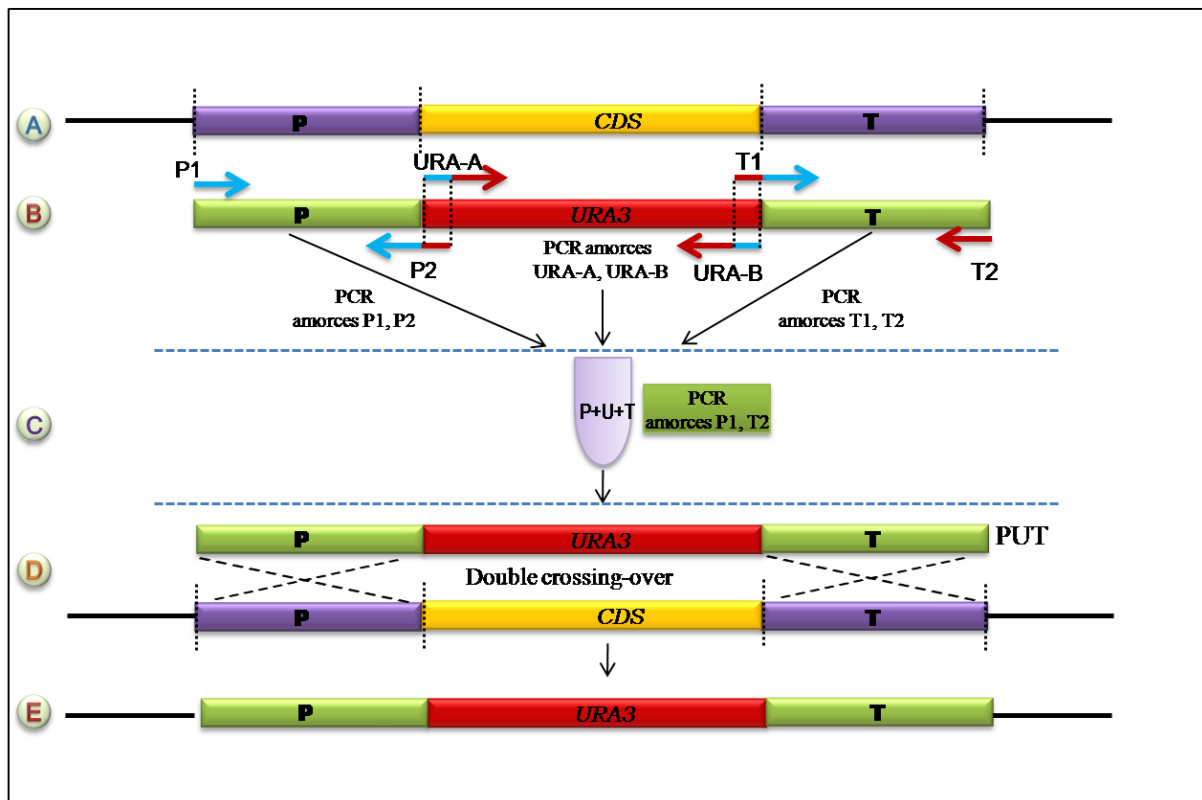


Figure 16 : Représentation schématique de la construction de la disruption par PCR 3 voies

- Représentation schématique du gène d'intérêt (jaune) avec la partie promotrice P et la partie terminatrice T (violet).
- Représentation schématique de l'amplification des parties P et T amplifiées (vert) et du marqueur URA3 (rouge)
- Représentation de la fusion par PCR 3 voies de P, T et du marqueur URA3 pour obtenir la cassette de disruption P-U-T
- Représentation schématique de la disruption par double "crossing over" (transformation de la levure par la cassette de disruption).

B.5. Production et purification de protéines hétérologues

B.5.1. Conditions de culture et de production de protéines de fusion avec la MBP

Pour la production de protéines dans *E. coli*, les cellules sont au préalable cultivées dans du LB plus ampicilline pendant une nuit à 37°C. Le matin, 80 ml de milieu riche (LB + glucose + ampicilline) sont inoculés avec 0,8 ml de la préculture. Les cellules sont cultivées à 37 °C avec une bonne aération jusqu'à atteindre au maximum 2×10^8 cellules / ml (soit une DO à A_{600} d'environ 0.5). Pour une meilleure production de protéine la DO_{600} doit être comprise entre 3 et 5. Une fois la DO requise atteinte, on ajoute l'inducteur IPTG (isopropylthiogalactoside) à une concentration finale de 0,3 mM (par exemple 0,24 ml d'une solution stock à 0,1 M dans H₂O). La culture est tout de suite remise à incuber à 37 °C pendant 3 heures. La culture est transférée à 4 °C pendant une nuit. Les cellules sont récupérées le lendemain par centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 4000g. Les surnageants sont éliminés et les culots sont repris dans le tampon de lyse (20 mM Tris-HCl 200 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM azide de sodium ; 10 mM β - mercaptoéthanol ou 1 mM DTT). Les suspensions cellulaires sont stockées à -80°C.

B.5.2. Extraction de protéines

Les cellules obtenues après la culture et stockées à -80°C sont mises à décongeler sur la glace ce qui va constituer une longue étape de décongélation. Une fois décongelées, les cellules vont subir 8 étapes de sonication comme suit : 30 secondes de sonication et 30 secondes sur la glace en alternance. Les broyats cellulaires sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 9000g et à 4 °C. Nous avons conservé 3 fractions par broyat cellulaire : le broyat entier (E), le surnageant (S) et le culot (C).

B.5.3. Purification des protéines sur colonne

Pour la purification des protéines il faut d'abord préparer la résine qui va servir pour la purification. Une seringue contenant un volume de 2 ml de résine préparé et rincé avec 8 fois le volume de résine. Ce lavage de la résine est répété 3 fois. Les extraits cellulaires sont dialysés, récupérés puis centrifugés à 4000g pendant 5 mn à 4°C, et 2 ml d'extrait protéique sont déposés sur la colonne. Les extraits cellulaires sont passés sur la colonne. Après plusieurs lavages avec le tampon colonne. Les protéines sont éluées avec une solution de maltose (tampon d'élution)

B.6. Localisation par immunofluorescence

B.6.1. Préparation des cellules

Les cellules sont cultivées en YPD et lorsque la DO atteint 1 ou 2, une quantité de 6,7 ml de formaldéhyde à 37% est ajoutée à 50 ml de culture. Le mélange est incubé 30 minutes avec agitation dans les mêmes conditions de culture. Les 50 ml de culture sont ensuite centrifugés pendant 5 mn à 3000 rpm. Le culot est ensuite repris dans 50 ml de tampon K₁K₂ (50 mM pH 6,5 +MgCl₂ + 6,7 ml de formaldéhyde) et le tout est incubé à température ambiante sans agitation pendant 2 à 4 heures. Après cette incubation, les cellules sont centrifugées et le culot est lavé dans 50 ml de tampon K₁K₂ 100 mM pH 7,5).

Une fois que les cellules sont ainsi préparées, elles sont prêtes pour la phase de perméabilisation. Les cellules sont lavées dans 20 ml de tampon K₁K₂ 100 mM pH 7,5, additionné de sorbitol 1.5 M et de β -mercaptoéthanol 25 mM. Le culot est repris et incubé dans 10 ml de tampon K₁K₂ 100 mM pH 7,5 additionné de sorbitol 1,2 M et de β -mercaptoéthanol 25 mM, 10 mg de zymolyase 20T, 20 mg de cytohélécasse pendant 40 minutes à 37°C.

Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées dans 20 ml de tampon K₁K₂ 100 mM pH7.5 additionné de sorbitol 1.2 M. Les cellules sont centrifugées et lavées deux fois dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline) et peuvent être conservées à 4°C jusqu'à 10 jours.

Les lames spéciales sont lavées au liquinox dilué 10 fois et séchées à l'air comprimé et sont ensuite encollées avec de la polylysine (1 mg/ml par puits) et incubées pendant 10 min. Elles sont ensuite rincées à l'eau et séchées rapidement en chambre froide. 10 μ l de suspension cellulaire concentrée sont déposés dans chaque puits. Et les lames sont conservées dans des boîtiers en chambre humide pour éviter la dessiccation des cellules.

B.6.2. Hybridation avec les anticorps

Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS et ensuite 10 ml de tampon de blocage (PBS+0.5% BSA + 0.05% NP40) sont déposés sur la préparation et le tout est incubé pendant 15 min. Le tampon de blocage est ensuite retiré avec une micropipette et le premier anticorps est ajouté à une dilution finale de 1/300 dans le tampon de blocage (10 μ l par puits). La préparation est incubée pendant 1 heure dans une chambre humide.

Le deuxième anticorps marqué au FITC et dilué 1/300 fois dans du tampon de blocage est ajouté à la préparation et le tout est incubé pendant 30 mn dans une chambre humide et dans l'obscurité. La préparation est ensuite lavée deux fois dans du PBS.

B.6.3. Coloration et visualisation au microscope

Un volume de 10 μ l d'une solution diluée de DAPI est ajouté à la préparation et rincé 2 fois immédiatement dans de l'eau et séché avec du papier kleenex par capillarité. Déposer une goutte de liquide de montage (100 mg de p-phénylènediamine dissous dans 10 ml de PBS ajusté à pH 9 + 90 ml de glycérol). Les lamelles sont montées, l'excès de liquide est éliminé et les contours des lamelles sont fermés avec du vernis à ongles. La préparation est ensuite stockée à -20°C.

RESULTATS

RESULTATS

A. Etude de la voie de synthèse des lipides

L'identification de la localisation des composants cellulaires et des protéines synthétisées à partir des gènes ainsi que l'observation de leur dynamique moléculaire dans la cellule est essentielle pour la compréhension de leur fonction. Pour comprendre le fonctionnement des mécanismes et réactions qui sont impliqués dans la voie de synthèse, dans l'accumulation et dans la mobilisation des lipides chez la levure *Y. lipolytica*, nous avons opté pour la localisation des protéines (enzymes) impliquées dans ces voies.

Dans un premier temps nous avons procédé à la localisation des protéines Dga1p et Lro1p, des protéines de la famille des DAGAT (diacyglycérol acyle transférase) qui catalysent la dernière étape de la formation des triglycérides. Ces deux enzymes utilisent des donneurs d'acyles différents.

A.1. Localisation de *Lro1p* et de *Dga1p*

Les protéines Dga1p et Lro1p sont codées respectivement par les gènes *LRO1* (YALI0E16797g) et *DGA1* (YALI0E32769g). La localisation de Dga1p et de Lro1p a été réalisée par fusion de chaque gène avec *YFP* (codant la Yellow fluorescent protein). La fusion avec *YFP* constitue un outil précieux pour l'étude de la localisation intracellulaire et la dynamique des produits des gènes dans les cellules vivantes.

A.1.1. Construction et clonage des vecteurs de fusion *DGA1* et *LRO1* avec *YFP* dans *E. coli*

Un fragment codant la protéine fluorescente Yfp (Yellow fluorescent protein) a été inséré à l'extrémité C-terminale des deux gènes.

Ces deux protéines n'ayant pas de séquence signal d'adressage particulier en C-terminal, nous avons donc fusionné le gène *YFP* avec la région 3' des gènes d'intérêt. Afin d'analyser la localisation des protéines synthétisées à partir des gènes *DGA1* et *LRO1* chez *Yarrowia lipolytica*, nous avons effectué la fusion de ces deux gènes avec la *YFP* sous le contrôle d'un promoteur fort chez cette levure. Nous avons donc construit deux vecteurs exprimant les protéines de fusion Dga1p-Yfp et Lro1p-Yfp. Ces deux vecteurs sont schématisés dans la Figure 17.

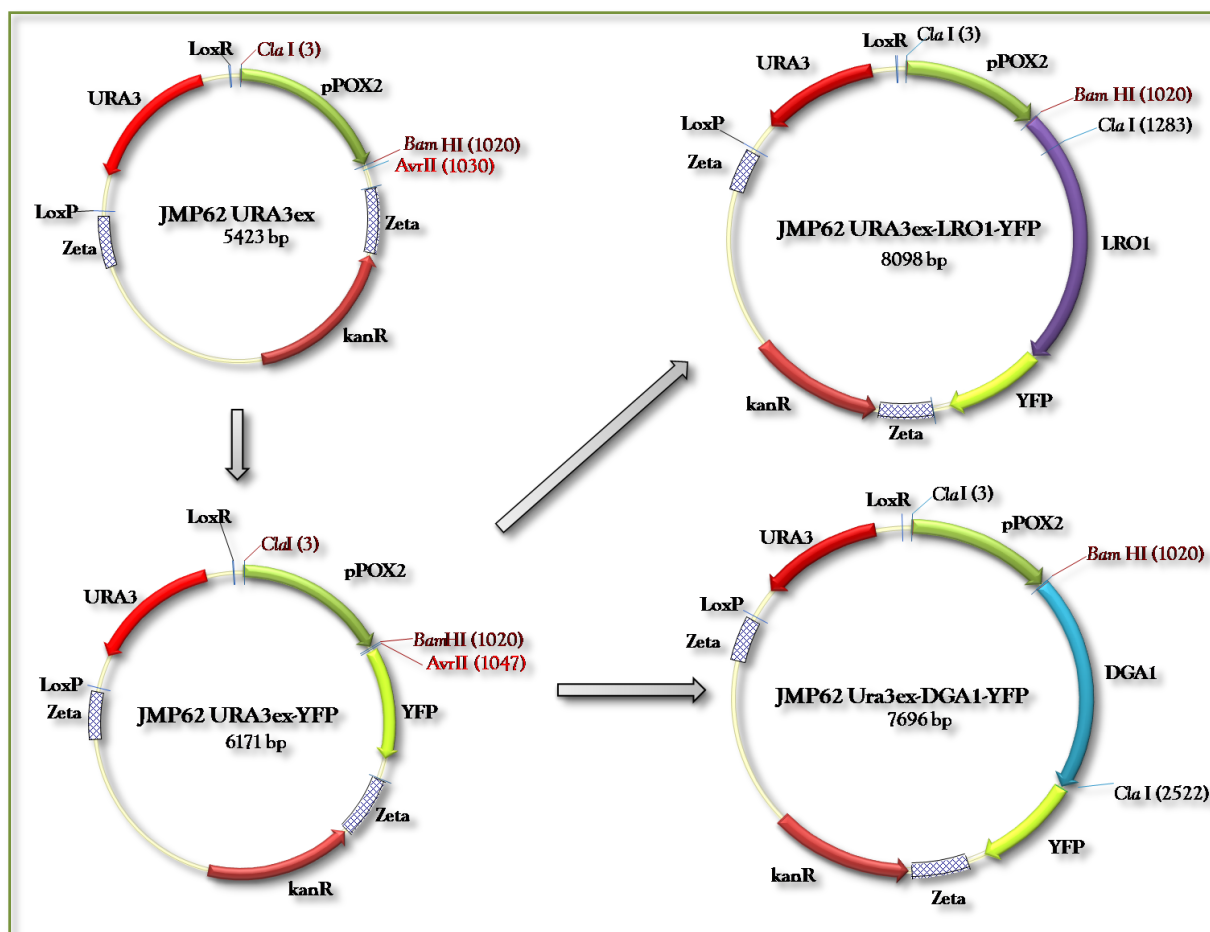


Figure 17: Représentation schématique des vecteurs de fusion avec la protéine fluorescente Yfp construits *in silico* à partir du vecteur JMP62 URA3ex-YFP. Les protéines de fusion sont sous le contrôle du promoteur POX2 en vert. Le Tag YFP en jaune fluo est inséré en C-terminal du gène *LRO1* (en violet) et du gène *DGA1* (en bleu). Tous les plasmides ont un gène de résistance à la Kanamycine (kanR) et *URA3* comme marqueur de sélection pour les levures.

La construction de ces cassettes de fusion a été réalisée en deux étapes (Figure 18). La première étape consiste au clonage de *YFP* dans le vecteur JMP62 *URA3ex*. Le fragment *YFP* a été obtenu par amplification PCR avec les oligos Eyfp-start et Eyfp-stop à partir du vecteur JME604. Ce fragment de PCR a été purifié sur gel d'agarose (0.8% p/v). Le fragment *YFP* est digéré par les enzymes de restriction BamH1 et SpeI. Il est ensuite purifié et inséré par ligature dans le vecteur JMP62 *URA3ex* qui lui, a été digéré par les enzymes de restriction BamH1 et AvrII. *E. coli* est transformée avec le produit de ligation JMP62 *URA3ex*-YFP.

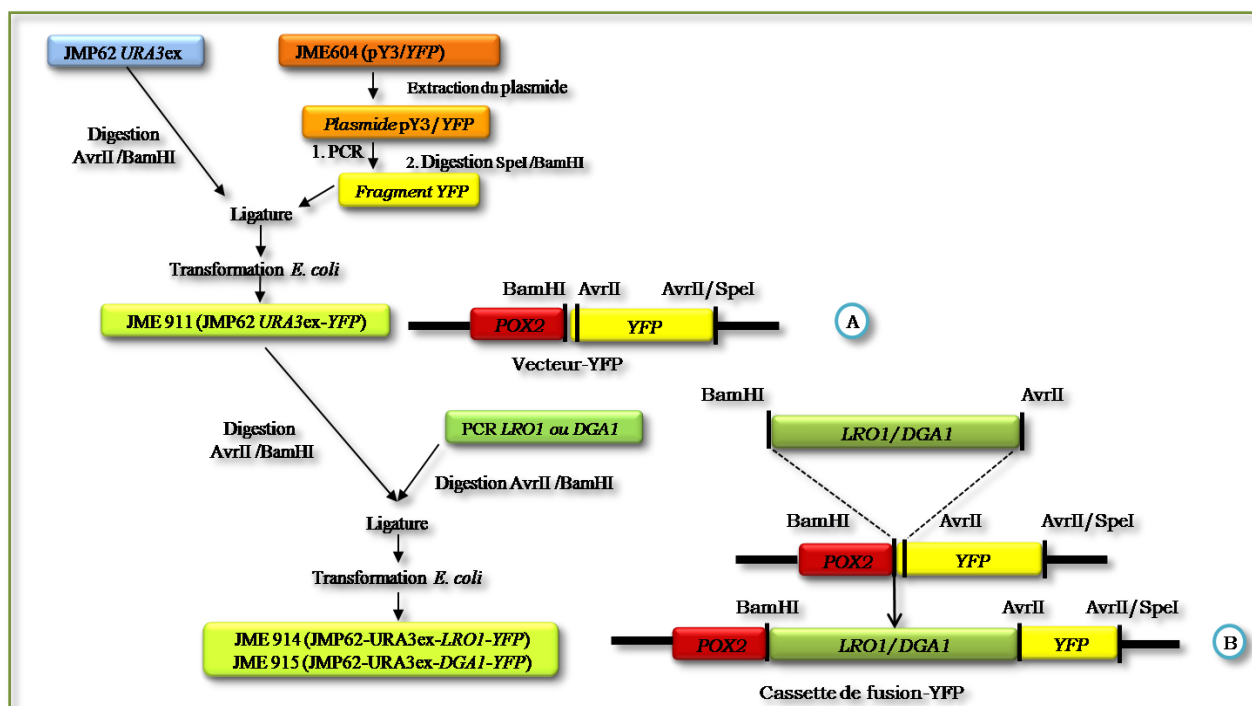


Figure 18: Représentation schématique de la construction et du clonage des cassettes de fusion.

A: Transformation 1 de *E. coli* avec le plasmide issu de l'insertion du fragment *YFP* dans le vecteur *jmp62 URA3ex*

B: Transformation 2 de *E. coli* avec le plasmide comportant la fusion du gène d'intérêt avec *YFP*

La deuxième étape va permettre l'insertion de gènes dans le nouveau vecteur construit à partir *JMP62 URA3ex* et le fragment *YFP*. Les deux gènes *DGA1* et *LRO1* sont récupérés par PCR à partir de deux vecteurs *JMP62 URA3ex-LRO1* et *JMP62 URA3ex-DGA1* construits au laboratoire pour la surexpression de ces deux gènes. Les produits d'amplification sont ensuite digérés par les enzymes de restriction *BamH1* et *AvrII*. Le vecteur *JMP62 URA3ex-YFP* que nous avons construit est également digéré par les enzymes de restriction *BamH1* et *AvrII*. Une ligature est effectuée entre le vecteur *JMP62 URA3ex-YFP* et soit le fragment *LRO1*, soit le fragment *DGA1*. Ces deux vecteurs *JMP62 URA3ex-DGA1-YFP* et *JMP62 URA3ex-LRO1-YFP* expriment les protéines de fusions *Lro1-Yfp* et *Dga1-Yfp* sous le promoteur *POX2* (Figure 18).

A.1.2. Transformation des cassettes d'expression dans *Yarrowia lipolytica*

Les deux gènes de fusion ont été récupérés par digestion avec l'enzyme de restriction *NotI*. Ces fragments ont été insérés dans différents contextes génétiques par la méthode de transformation classique à l'acétate de lithium. Les souches JMY1367 [Δ pox 1-6 ; Δ gut2], JMY1215 [Δ lro1], JMY1233 [Δ dga1] ont été utilisées. Ces différentes transformations sont schématisées dans la Figure 19.

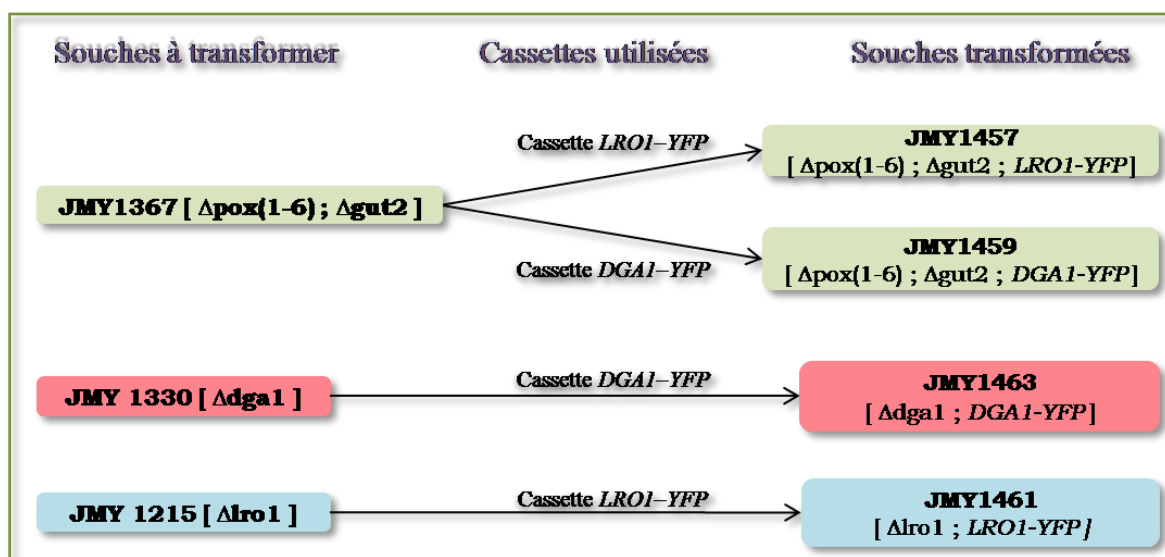


Figure 19 : Représentation schématique des différentes transformations avec les cassettes de fusion dans la levure. Quatre nouvelles souches exprimant la protéine de fusion ont été construites à partir de 3 souches de levure de départ. La souche JMY1367 a été transformée par les deux cassettes de fusion.

Les différentes souches construites ont été cultivées en milieu YNB + glucose et YNB + acide oléique et la croissance a été suivie pendant 48 heures (Figure 20). La croissance des souches JMY1457 et JMY1459 est la même que la souche de départ JMY1367. Les souches JMY1330 et JMY1215 sont des souches disruptées respectivement pour *DGA1* et *LRO1* et ont été retransformées par les gènes de fusion *DGA1-YFP* et *LRO1-YFP*. L'analyse de la croissance sur acide oléique et sur glucose ne montre pas de différence significative entre les transformants et les souches de départ.

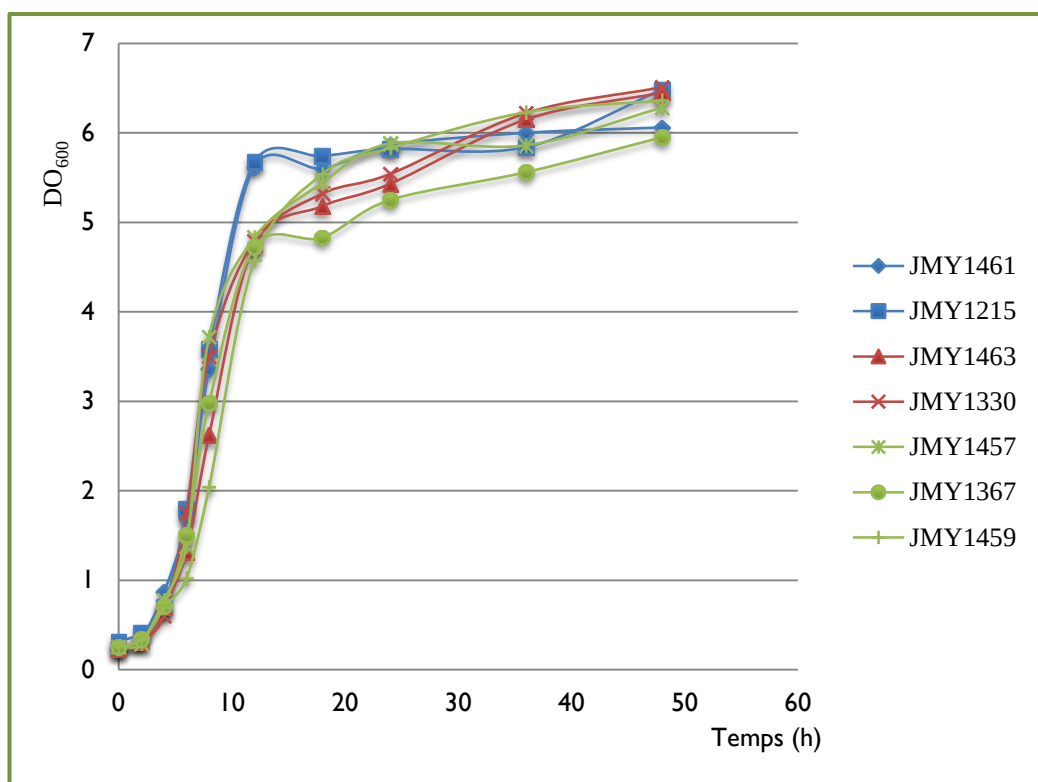


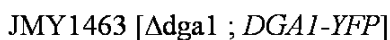
Figure 20 : Courbe de croissance des mutants de fusion YFP sur acide oléique. Les souches transformées sont représentées de la même couleur que les souches de départ.

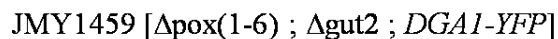
A.1.3. Localisation *in vivo* par visualisation au microscope optique

Pour la localisation par microscopie optique, les cellules des différentes souches ont été mises en préculture dans du YPD pendant environ 16 heures. Elles ont ensuite été cultivées dans du YNB + acide oléique, milieu permettant l'accumulation des lipides et la formation des corps lipidiques. Les cellules ont été ensuite lavées 3 fois avec de la BSA (0,5%) puis dans du NaCl (0,9%) pour éliminer efficacement l'acide oléique utilisé pour la culture. Les cellules sont ensuite visualisées au microscope optique.

Au niveau de la souche JMY1463 [$\Delta dga1$ *DGA1-YFP*], on note la présence de corps lipidiques et la fluorescence se situe au niveau de ces corps lipidiques. La taille des corps lipidiques diminue au cours du temps car cette souche possède les gènes *POX* 1-6 et la β -oxydation est donc active pour dégrader les triglycérides en acides gras pour le métabolisme de la levure (Figure 21).

Cette souche a le gène *DGA1* surexprimé en fusion avec la protéine de fluorescence. Et la fluorescence est marquée uniquement dans les corps lipidiques. Ce qui nous permet d'affirmer que Dga1p est localisée dans les corps lipidiques.





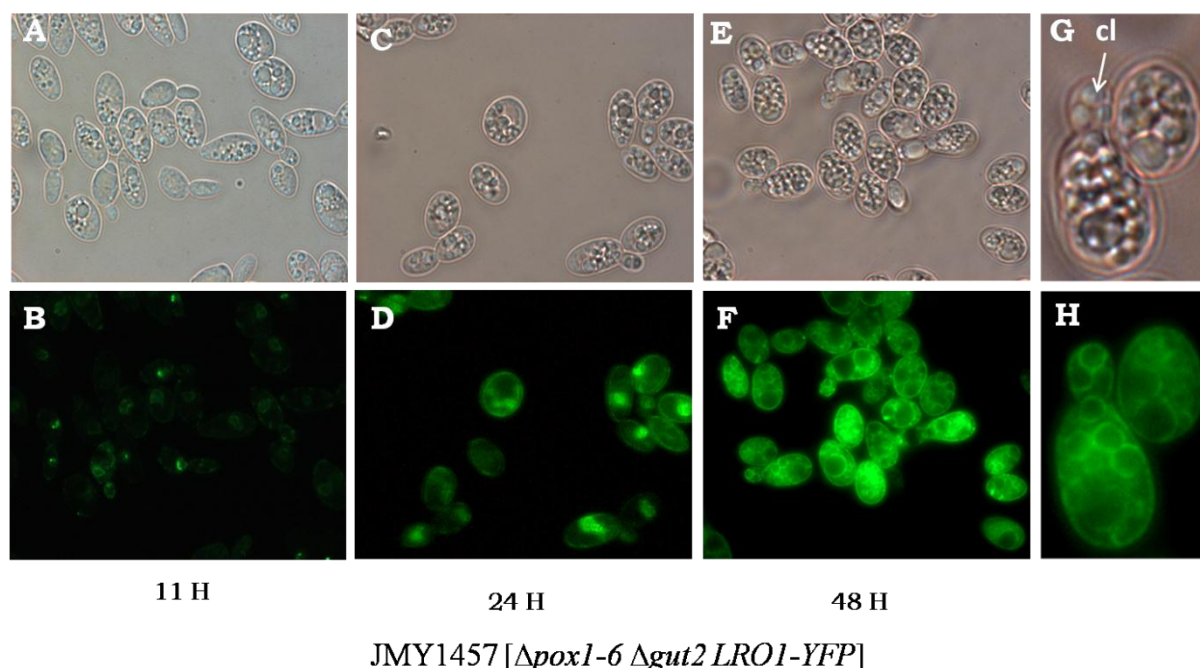


Figure 23: Localisation de Lro1p dans la souche JMY1457 [$\Delta pox1-6 \Delta gut2$ LRO1-YFP]. Dans cette souche la fluorescence est marquée dans les membranes (du cytoplasme et du réticulum endoplasmique) et dans la périphérie des corps lipidiques. **A** : à 11 h l'accumulation des lipides étant moins importante, la fluorescence est moins marquée et diffuse (**B**). **C** et **E** : la taille et le nombre de corps lipidique augmente dans les cellules au cours du temps (24 h et 48 h). On note également un accroissement de l'intensité de la fluorescence (**D** et **F**). **G** et **H** : agrandissement de cellules issues des photos **E** et **F**.

A.2. Construction de vecteurs d'expression des gènes de la voie de synthèse des lipides dans *E. coli*

La deuxième partie de la localisation des enzymes impliquées dans la voie de synthèse, d'accumulation et de mobilisation des lipides a consisté en la production de ces protéines dans *E. coli* en vue de la production des anticorps spécifiques de ces protéines. Les anticorps vont permettre la localisation de ces protéines par différentes techniques (immunolocalisation, western blot). Nous avons deux catégories de gènes impliqués dans ces différents mécanismes. Les gènes *SCT1* (YALI0C00209g), *SLC1* (YALI0E18964g), *DGA1* (YALI0E32769g) et *LRO1* (YALI0E16797g) codent des acyles transférases qui catalysent différentes étapes de la synthèse des triglycérides, tandis que les gènes *TGL1* (YALI0E32035g), *TGL3* (YALI0D17534g) et *TGL4* (YALI0F10010g) interviennent dans la mobilisation des lipides neutres.

A.2.1. Stratégie de construction de vecteurs d'expression : fusion des gènes avec la Maltose binding protein (MBP).

Pour la construction des vecteurs pour la production des protéines de la voie d'accumulation des lipides de *Y. lipolytica*, chez *E. coli*, nous avons utilisé le plasmide pMAL c2X. Ce plasmide pMALc2X a été digéré par les enzymes de restriction BamH1 et Xba1. Les sites de restriction insérés au début et à la fin des gènes en vue de leur clonage dans le vecteur pMAL c2X ont été choisis en fonction de BamH1 et Xba1 (Figure 24). Des oligos ont été dessinés et ont servi à l'amplification de ces différents gènes chez *Y. lipolytica* (Tableau 4). Une ligation a été effectuée entre les différents fragments obtenus par amplification PCR et le plasmide pMAL c2X digéré par BamH1 et Xba1, suivie d'un clonage dans *E. coli*. Les transformants ont été sélectionnés sur le milieu LB + kanamycine complémenté du Xgal pour le criblage "blanc-bleu".

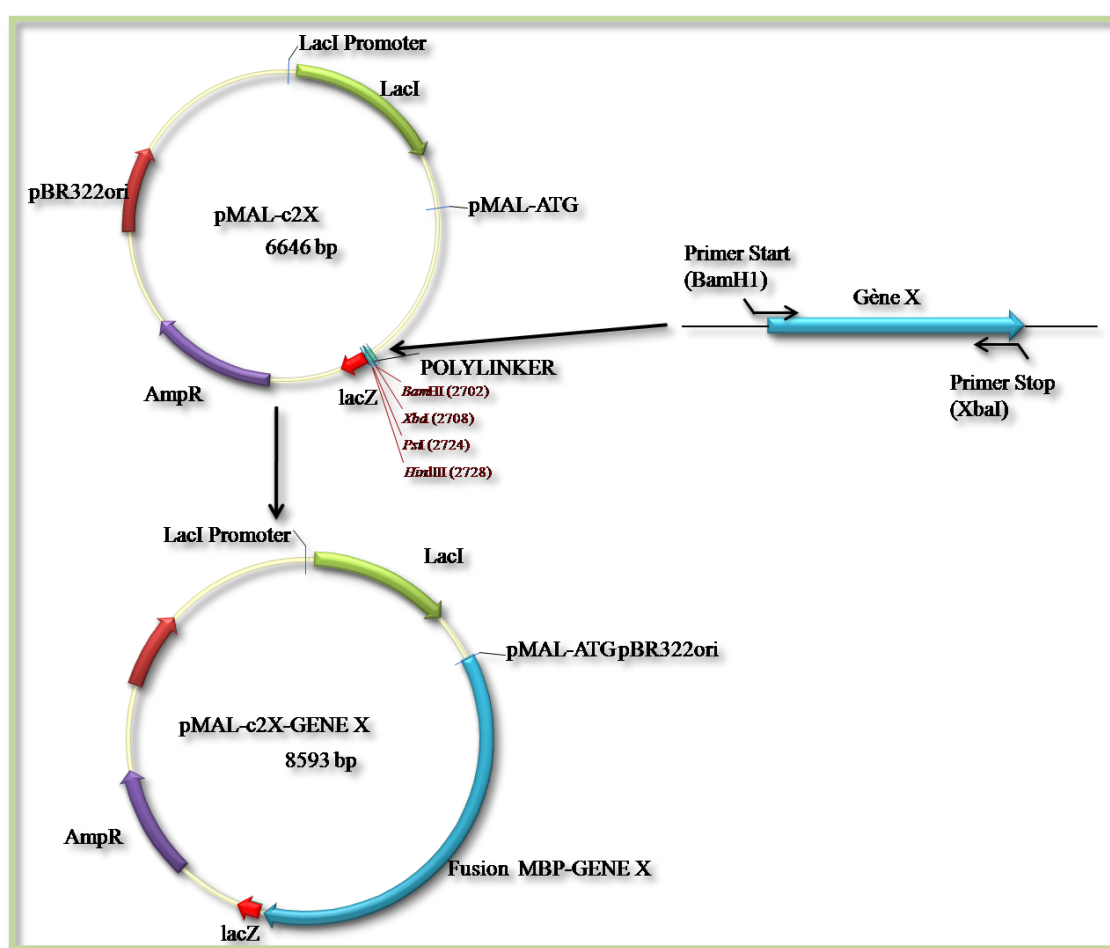


Figure 24 : Schéma de la stratégie de construction des vecteurs d'expression des gènes de fusion de la MBP avec les différents gènes de la voie de synthèse des triglycérides.

A la première transformation nous n'avons pu cloner que quatre gènes en entier dans le plasmide pMAL c2X. Il s'agit de *SCT1*, *SLC1*, *DGA1* et *TGL1* car il y avait très peu de clones blancs et la vérification par digestion du plasmide avec les enzymes de restrictions a donné des fragments de la taille attendue uniquement avec ces quatre gènes. Il n'y a pas eu de clones positifs (clones blancs) avec les trois autres gènes *LRO1*, *TGL3* et *TGL4*. Après plusieurs essais n'ayant pas permis d'obtenir des clones positifs avec ces trois gènes, nous avons émis l'hypothèse d'une quelconque toxicité de la protéine pour la bactérie. Nous avons donc décidé de ne cloner qu'une partie des gènes (séquences codantes en phase). Avec les gènes tronqués nous avons pu avoir des clones positifs avec le criblage "blanc-bleu".

Tableau 4 : Liste des gènes impliqués dans l'accumulation des lipides et les différents oligos ayant servi pour leur amplification en vue du clonage dans le plasmide pMAL c2X. Les nucléotides correspondant aux sites de coupure des enzymes sont en couleur : rouge pour BamH1, jaune pour Xba1 et vert pour AvrII.

Gènes		Séquence des oligos
<i>SLC1</i>	SLC1-Sens	CGCGGATCCACAATGTCCGTTGCATCCAAGCTCGTCTT
	SLC1-Rev	CGCTCTAGACCTAGGCTGAGTCTTCTGGCCAGCGTAGCCAATCT
<i>SCT1</i>	SCT1-Sens	CGCGGATCCACAATGTCCGAAACCGACCATCTGCT
	SCT1-Rev	CGCTCTAGACCTAGGTTTCCTCATCCTGCTCTCGTCG
<i>DGA1</i>	DGA1-Sens	CGCGGATCCACAATGACTATCGACTCACAATACTACAAGTCGC
	DGA1-Rev	CGCTCTAGACCTAGGCTCAATCATTCCGGAACCTCTGGG
<i>LRO1</i>	LRO1-Sens	CGCGGATCCACAATGACACAACCTGTGAATCGGAAGGC
	LRO1-Rev	CGCTCTAGACCTAGGATTGCTGCCGAGATCAATCTTCCA
<i>TGL1</i>	TGL1-Sens	CGCGGATCCACAATGCACGTCCCCGTTCTAGGACG
	TGL1-Rev	CGCTCTAGACCTAGGAGGGTTGAGAGTGCCACTCACTGG
<i>TGL3</i>	TGL3-Sens	CGCAGATCTCACAATGAAAAGCCGCGTGGCCGTT
	TGL3-Rev	CGCTCTAGACCTAGGGTTTGTGCGCTTGGTCTGGTTGTACATGT
<i>TGL4</i>	TGL4-Sens	CGCTGATCACACAATGTTACCTCCAGAGTTTCCGAAGC
	TGL4-Rev	CGCTCTAGACCTAGGGCACGAGTCAGAACAGTTCTCGTCCC

A.2.2. Première étape de purification des protéines sur colonne d'amylose

Suite au clonage et à la vérification des clones, les bactéries ont été cultivées sur milieu LB + ampicilline et glucose jusqu'à une DO comprise entre 0,3 et 0,5. L'induction des protéines est ensuite effectuée après ajout de l'IPTG. Les cellules sont recueillies et broyées. L'extrait brut ainsi que le surnageant et le culot de centrifugation sont déposés sur gel d'acrylamide (Figure 25). Pour tous les gènes testés les protéines sont concentrées dans le culot mais parfois à des concentrations faibles ne nous permettant pas de poursuivre la production. Pour les protéines Slc1p et Dga1p, nous avons obtenu une concentration suffisante pour envisager leur purification. Pour solubiliser les protéines du culot, nous avons effectué une dialyse.

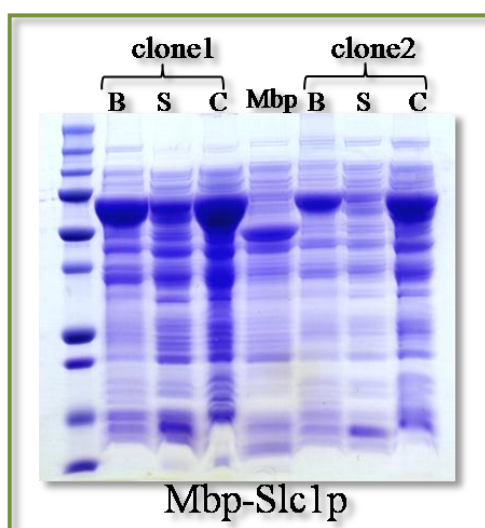


Figure 25 : Migration sur gel d'acrylamide des extraits bruts de la fusion Mbp-Slc1p pour deux clones différents (B=extrait brut ; S=surnageant ; C=culot)

Une première étape de purification est effectuée avec les différents extraits cellulaires sur une colonne d'amylose comme expliqué dans les matériels et méthodes. L'élution est faite à raison de 2 ml et 9 à 14 fractions sont récupérées pour chaque protéine. Les différents éluats sont dosés avec la méthode BCA (voir matériels et méthodes ; Figure 26A-B). Les mêmes éluats sont dénaturés et déposés sur gel d'acrylamide (Figure 26C-D).

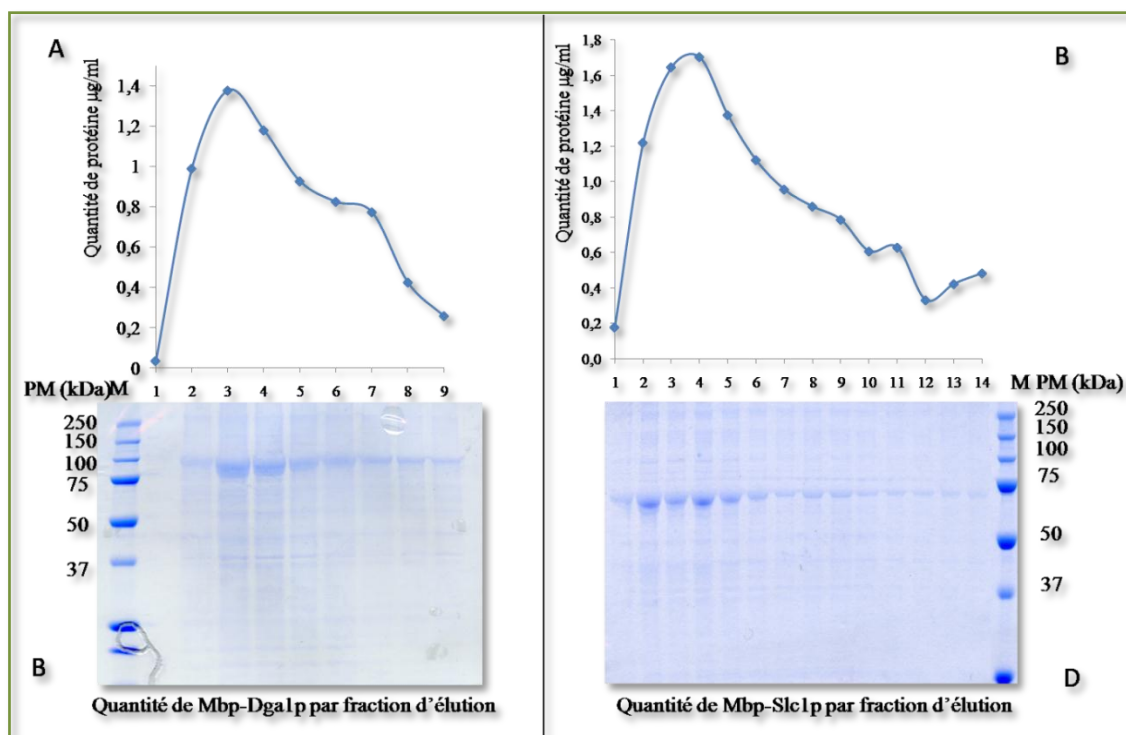


Figure 26 : Gel montrant la quantité de protéine de fusion Mbp-Slc1p et Mbp-Dga1p contenu dans les différentes fractions de l'élution à partir de la colonne.

La première fraction éluée de la colonne d'amylose contient très peu de protéine et la plus grande partie de la protéine est concentrée dans les fractions 2 à 6. A la suite de cette première étape de purification sur colonne d'amylose nous avons constaté la présence de nombreuses protéines contaminantes en plus de la protéine d'intérêt. Pour obtenir une protéine plus pure, il faudrait affiner la technique. Il est possible qu'on ait saturé la colonne d'amylose. Il faudra recommencer en dosant la quantité de protéines de l'extrait brut avant de tester une autre technique de purification si nécessaire.

B. La malate déshydrogénase et les gènes du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction la malate déshydrogénase est impliquée dans les cycles du TCA et du glyoxylate. Cette réaction enzymatique est importante pour l'utilisation de tout substrat notamment des substrats hydrophobes. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des gènes codant les protéines assurant cette activité enzymatique.

B.1. Etude de la malate déshydrogénase (MDH) chez *Yarrowia lipolytica*

B.1.1. Analyse in silico des gènes de malate déshydrogénases

B.1.1.1. Comparaison des gènes chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*.

Pour comprendre le fonctionnement de la malate déshydrogénase chez la levure *Y. lipolytica*, une analyse comparative des gènes codant la malate déshydrogénase chez *S. cerevisiae* et chez *Y. lipolytica* a été réalisée. L'alignement a été effectué avec le logiciel Vector NTI. Comme nous l'avons dit plus haut, la malate déshydrogénase est une protéine de la famille des oxydoréductases catalysant des réactions d'oxydoréduction. Chez *S. cerevisiae* trois gènes codant la malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37) ont été identifiés. Le gène YKL085w code une malate déshydrogénase (Mdh1p) qui est localisée dans les mitochondries. C'est une protéine de 334 acides aminés avec un poids moléculaire de 34 kDa. Le gène YOL126c code une malate déshydrogénase (Mdh2p) localisée dans le cytoplasme. Il s'agit d'une séquence polypeptidique de 377 acides aminés d'un poids moléculaire de 42 kDa qui ne présente pas de séquence d'adressage. Le troisième gène, YDL378c, code une malate déshydrogénase (Mdh3p) de 343 acides aminés et 37.2 kDa, qui présente une séquence C-terminale S-K-L caractéristique des séquences d'adressage aux peroxysomes de type PTS1 (Figure 27).

		1		50
YALI0D16753p	(1)	MFRTRVTGSTLRSFSTSAARQH	KVVVLGANGGIGQPLSLLLK	LNKNVTD-
YALI0E14190p	(1)	-----MV	KAVVAGAAGGIGQPLSLLLK	LSPYVTE-
Mdh1p	(1)	----MLSRVAKRAFSSTVANPY	KVTVLGAGGGIGQPLSLLLK	LNHKVTD-
Mdh2p	(1)	-----MPHSVTPSIEQDSL	KIATILGAAGGIGQSLSLLLK	AAQLQYQLK
Mdh3p	(1)	-----MV	KVAILGASGGVGQPLSLLLK	LSPYVSE-
		51		100
YALI0D16753p	(50)	-----LGLYD	LRGA--PGVAADVSHIPTNSTVAGYSFDN-N	GIAE
YALI0E14190p	(30)	-----LALYD	VVNS--PGVAADLSHISTKAKVTGYLPKD-D	GLKN
Mdh1p	(46)	-----LRLYD	LKGA--KGVATDLSHIPTNSVVKGFTPEEPD	GLNN
Mdh2p	(43)	ESNRSVTHIH	LALYDVNQEAINGVTADLSHIDTPISVSSH	SFAG--GIEN
Mdh3p	(30)	-----LALYD	IRAA--EGIGKDLSHINTNS	SCVGYDKDS--IEN
		101		150
YALI0D16753p	(87)	ALKGAKL	VLIPAGVPRKPGMTRDDLF	NTNASIVRDLAKAVGEHAPD--AF
YALI0E14190p	(67)	ALTGANI	VVIPAGIPRKPGMTRDDLF	KINAGIVRDLVTGVAQYAPD--AF
Mdh1p	(84)	ALKD	TDMLIPAGVPRKPGMTRDDLF	AINASIVRDLAAATAESAPN--AA
Mdh2p	(91)	CLHN	ASIVVIPAGVPRKPGMTRDDLF	NVNAGIISQLGDSIAECDSLKV
Mdh3p	(65)	TL	SNAQVVLIPAGVPRKPGITRDDLF	KMNAGIVKSLVTAVGKFAFN--AR
		151		200
YALI0D16753p	(135)	VGVI	IANPVNSTVPIVAEVLKSKGKYD----	PKKLFGVTTLDVIRAEFEV
YALI0E14190p	(115)	VL	IISNPVNSTVPIAAEVLKKNVFN----	PKKLFGVTTLDVVRAQTE
Mdh1p	(132)	IL	VISNPVNSTVPIVAQVLKKNKVYN----	PKKLFGVTTLDSIRAEFI
Mdh2p	(141)	VL	VISNPVNSLVPVMVSNILKNHPQSRNSGIER	RRIMGVTKLIDVRASTEL
Mdh3p	(113)	IL	VISNPVNSLVP	IAVETLKKMGKFK----FGNVMGVTNLLVRAETEL
		201		250
YALI0D16753p	(180)	SQLEHT-----	NPTKEYFFVVGGHSGVTIVPLVSQSD-HPDIAG	
YALI0E14190p	(160)	AAVVGES-----	DPTKLNIPVVGGHSGDTIVPLLSLT	KPKVEIPA
Mdh1p	(177)	SEVENT-----	DPTQERNVIGGHSGITIIPLISQTN-HKLM	SD
Mdh2p	(191)	REINIESG-----	LTPRVNSMPDVPVIGGHSGETIIP	LFSSQSNFLSRLNE
Mdh3p	(158)	VDYLMLKNPKIGQE	QDKTMMHRKVTVIGGHSGETIIP	ITIDKS-LVFQLD
		251		300
YALI0D16753p	(218)	EARDKL	VHRIQFGGDEVVKAKD	CAGSATLSMAQAAARFADSILRGVNGEK
YALI0E14190p	(200)	DKLDDL	VKRIQFGGDEVVQAKD	GLGSATLSMAQAGFFFAEAVLKGAAGEK
Mdh1p	(215)	DKRHE	LIHRIQFGGDEVVKAKN	CAGSATLSMAHAGAKFANAVLSGFKGER
Mdh2p	(236)	DQLKY	LIHRRVQYGGDEVVKAKN	GKSATLSMAHAGYKCVVQFVSLLLGNI
Mdh3p	(207)	KQYEH	FIHRRVQFGGDEIVKAKQ	CAGSATLSMAFAGAKFAEEVLRSSFHNEK
		301		350
YALI0D16753p	(268)	D--VVEPTFVDS	PLFKGE-----GIDFE	STKVTLGPN---G
YALI0E14190p	(250)	G--IIEPAYI	YLDGIDGTS-----DIKREV	GVAFFSVVVEFGPE--GA
Mdh1p	(265)	D--VIEPSFVDS	PLFKSE-----GIEFF	FASPVTLGPD---G
Mdh2p	(286)	EQ-IHGTY	YVPLKDANNFPIAPGADQLLPLVDGADY	FAIPLTITTKG-VS
Mdh3p	(257)	PETESLSAFVYLP	GLKNGKKAQ---QLVGDNS	IEVESLPITVLRNGSV-V
		351		394
YALI0D16753p	(299)	VEEIHPIGKVNEYEE	-KLIEAAKADIKKNIEKGVNEVVKQNP---	
YALI0E14190p	(289)	AKAYNILPEANDYEK	-KLLKVSIDGLYGNIAKGEETIVNPPPAN	
Mdh1p	(296)	IEKIHPIGELSSEEE	-EMIQCKETIKKNIEKGVNEVASK----	
Mdh2p	(334)	YVDYDIVNRMND	MERNQMLPICVSQKKNI	DKGLEFVASRSASS
Mdh3p	(302)	SIDTSVLEKLSPREE	-QLVNTAVKELRKNIEKGSFILDS	SKL-

Figure 27 : Alignement multiple des gènes codant les différentes Mdhp chez les levures *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*.

La couleur jaune montre les acides aminés identiques dans les cinq protéines. Le bleu représente les acides aminés identiques dans 3 et 4 protéines. Pour ces colonnes de résidus, les acides aminés fortement similaires sont colorés en vert et ceux faiblement similaires en gris. La séquence protéique codée par YDL078C de *S. cerevisiae* a une séquence terminale S-K-L d'adressage au peroxysome (en gras).

Chez les autres levures hémiascomycètes dont le génome est entièrement séquencé, on trouve majoritairement trois malate déshydrogénases (Figure 28). En revanche, chez la levure *Y. lipolytica* seulement deux gènes ont été identifiés. Le premier gène est YALI0D16753g et il est annoté comme étant l'homologue du gène *MDH1* de *Talaromyces emersonii* (uniprot Q8TG27) qui coderait une malate déshydrogénase mitochondriale. La protéine codée par YALI0D16753g fait 338 acides aminés. Nous avons vérifié avec MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) que la probabilité d'être adressé à la mitochondrie était significative et elle est effectivement de 0,9891.

Le second gène chez cette levure est YALI0E14190g. Il est annoté sur le site Génolevures comme étant l'homologue du gène YKL085w de *S. cerevisiae* (*MDH1*) codant également une protéine mitochondriale. Cependant, sa probabilité d'adressage à la mitochondrie est de 0,3528 selon Mitoprot. Donc, on peut penser que la séquence protéique de 331 acides aminés codée par ce gène n'a pas de séquence d'adressage à la mitochondrie. De plus, en regardant la partie C-terminale de la protéine, on ne trouve pas de séquences d'adressage aux peroxysomes. Ceci suggère que sa localisation est probablement dans le cytoplasme.

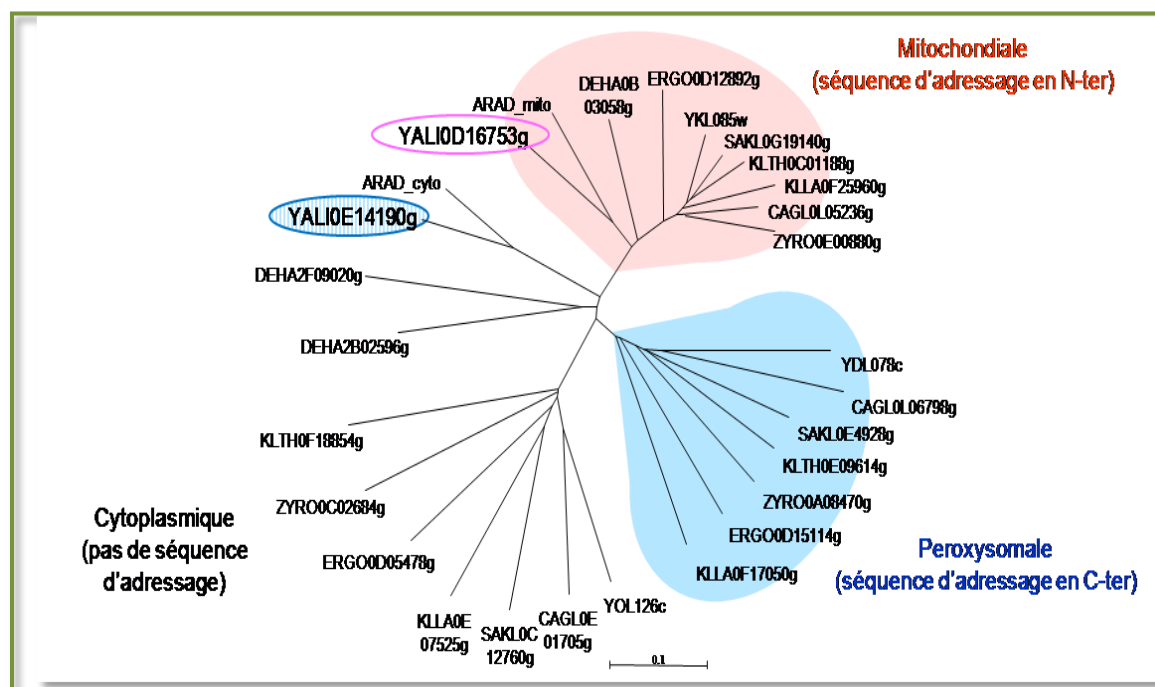


Figure 28 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des malate déshydrogénases chez les levures hémiascomycètes. Il existe les trois catégories de malate chez la majorité de ces levures : mitochondriale, peroxysomale et cytoplasmique.

L'alignement des protéines codées par les malate déshydrogénases de *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica* permet de quantifier les niveaux de conservation entre les protéines (Tableau 5). On observe 65% d'identité et 83% de similarité entre YALI0D16753p et Mdh1p ce qui est cohérent avec leur localisation commune dans la mitochondrie. Il y a seulement 54% d'identité et 70% de similarité entre les protéines Mdh1p et YALI0E14190p ce qui montre que ces deux protéines sont plus éloignées. Néanmoins Mdh1p reste le meilleur match pour YALI0E14190p. D'autre part, le tableau montre 56% d'identité et 71% de similarité entre YALI0D16753p et YALI0E14190p soit plus qu'entre ces deux gènes et Mdh2p ou Mdh3p. Ceci suggère que les deux gènes de *Y. lipolytica* et MDH1 ont une origine commune (Figure 29). Il serait intéressant de retracer l'origine et l'évolution des différentes malate déshydrogénases chez les levures hémiascomycètes.

Tableau 5 : Comparaison des séquences d'acides aminés montrant les pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines codées par les différents gènes chez les levures *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*.

	Mdh1p	Mdh2p	Mdh3p	YALI0D16753p	YALI0E14190p
<i>IDENTITE</i>					
Mdh1p		44	50	65	54
Mdh2p			42	40	43
Mdh3p				48	46
YALI0D16753p					56
YALI0E14190p					
<i>SIMILARITE</i>					
Mdh1p		61	66	83	70
Mdh2p			60	58	62
Mdh3p				66	66
YALI0D16753p					71
YALI0E14190p					

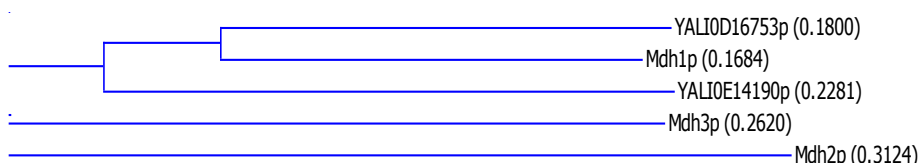


Figure 29: Arbre phylogénique issu de l'alignement des séquences d'acides aminés des différentes malate déshydrogénases chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*.

B.1.1.2. Modèle du gène YALI0E14190g

La différence du nombre de gènes codant la malate déshydrogénase chez *S. cerevisiae* (trois) et chez *Y. lipolytica* (deux) nous a amenés à nous pencher sur le fonctionnement de ces gènes chez *Y. lipolytica*. L'analyse des séquences d'ADN a montré que

le gène YALI0E14190g présente la particularité d'avoir deux introns (Figure 30A). Le premier intron est situé au début du gène, entre la base A et les bases TG du codon initiateur ATG. Le deuxième intron est situé en 3' du gène juste en amont du stop. L'analyse détaillée de cette région a révélé la présence d'un site d'épissage alternatif pour le 3' SS (3' splice site). Théoriquement, lorsque l'épissage se fait au niveau du premier TAG cela engendre une protéine avec une séquence C-terminale PAN (Figure 30B), n'ayant pas une particularité d'adressage à un compartiment cellulaire quelconque, donc considérée comme une malate déshydrogénase qui reste dans le cytoplasme.

En revanche, lorsque l'épissage se fait au niveau du deuxième TAG ceci donne une séquence C-terminale A-K-I qui est l'équivalent caractéristique d'une séquence d'adressage PTS1 (peroxysome targeting sequence). Ainsi le gène YALI0E14190g coderait à la fois une malate déshydrogénase cytoplasmique et une malate déshydrogénase peroxysomale. Ces deux formes de malate déshydrogénase dépendent de l'épissage du second intron. Ce constat au niveau du deuxième intron qui s'est révélé très original, nous a motivés pour poursuivre nos investigations sur ce deuxième gène YALI0E14190g pour mieux comprendre son fonctionnement.

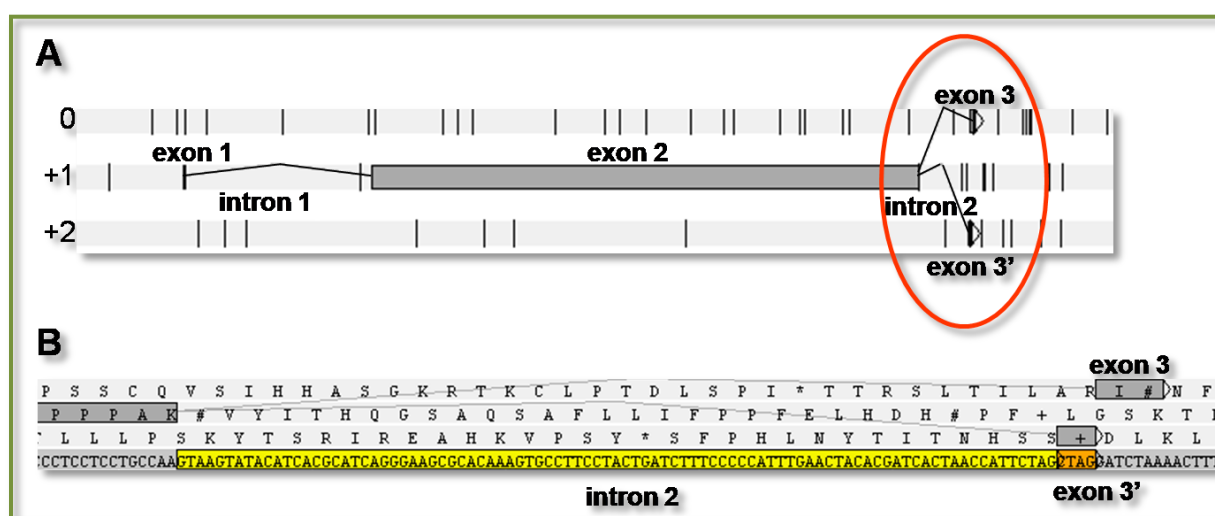


Figure 30 : Les deux modèles du gène YALI0E14190g, dépendant de l'épissage alternatif de l'intron 2.

A. Les modèles de gènes sont représentés dans les 3 phases afin de voir les changements de phase dus aux introns. La partie entourée de rouge est agrandie en B.

B. Détail des séquences d'épissage alternatif en 3' de l'intron 2 (en jaune intron 2 court, en orange, allongement de l'intron 2 long) et décalage de phase générant un motif PPPAKI avec intron 2 long et exon3 et PPPAN pour intron 2 court et exon 3'.

B.1.2. Construction des mutants du gène YALI0E14190g

B.1.2. 1. Stratégie de construction des mutants

La base de notre travail était de construire des mutants en fonction du consensus des séquences d'introns chez *Y. lipolytica* qui est représenté dans la Figure 32 extraite du site Genosplicing dédié aux introns spliceosomaux des levures hémiascomycètes (http://genome.jouy.inra.fr/genosplicing/Patterns/YALI_profil.html).

La séquence la plus fréquente du motif d'épissage en 3' chez *Y. lipolytica* est CAG (86.2%). Elle peut également être TAG, ce qui représente 10.2% des cas retrouvés chez cette levure, et très rarement les motifs AAG (3.6%) et GAG (0.6%).

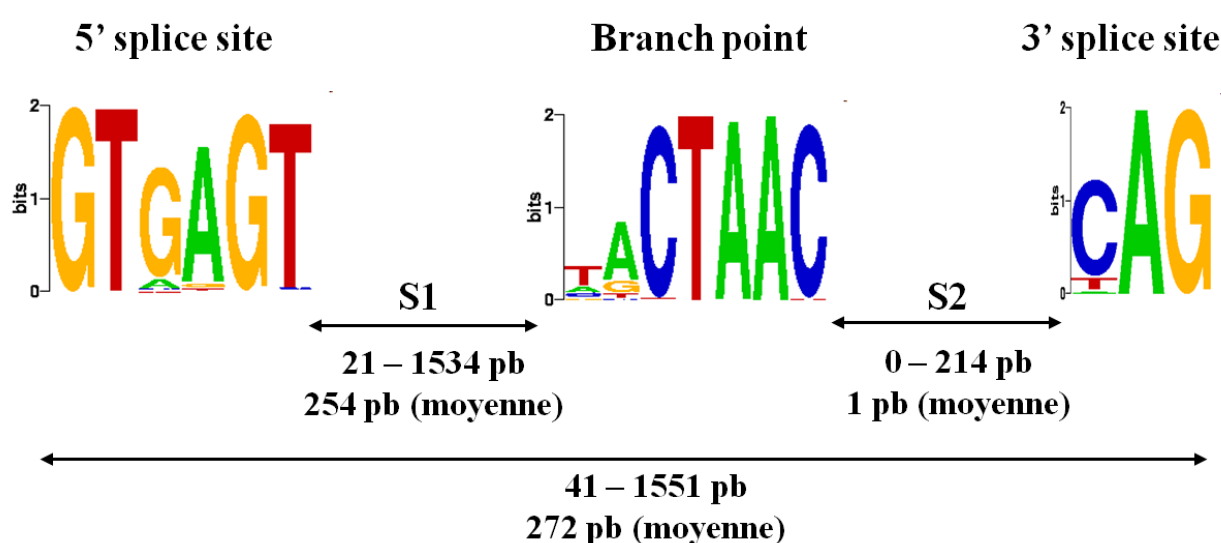


Figure 32: Caractéristique des introns et motifs des sites d'épissage chez *Y. lipolytica*

Pour influencer sur l'épissage de l'intron en 3' du gène YALI0E14190g, nous avons choisi d'introduire les différentes mutations décrites dans la Figure 33. Ces mutations vont permettre de modifier le rapport d'épissage 3'SSa (premier TAG générant une malate déshydrogénase cytoplasmique) et 3'SSb (deuxième TAG générant une malate déshydrogénase peroxysomale) ainsi que de créer des mutants avec un gène YALI0E14190g modifié, codant uniquement soit la Mdhp peroxysomale (mutant 9) soit la Mdhp cytoplasmique (mutant 4).

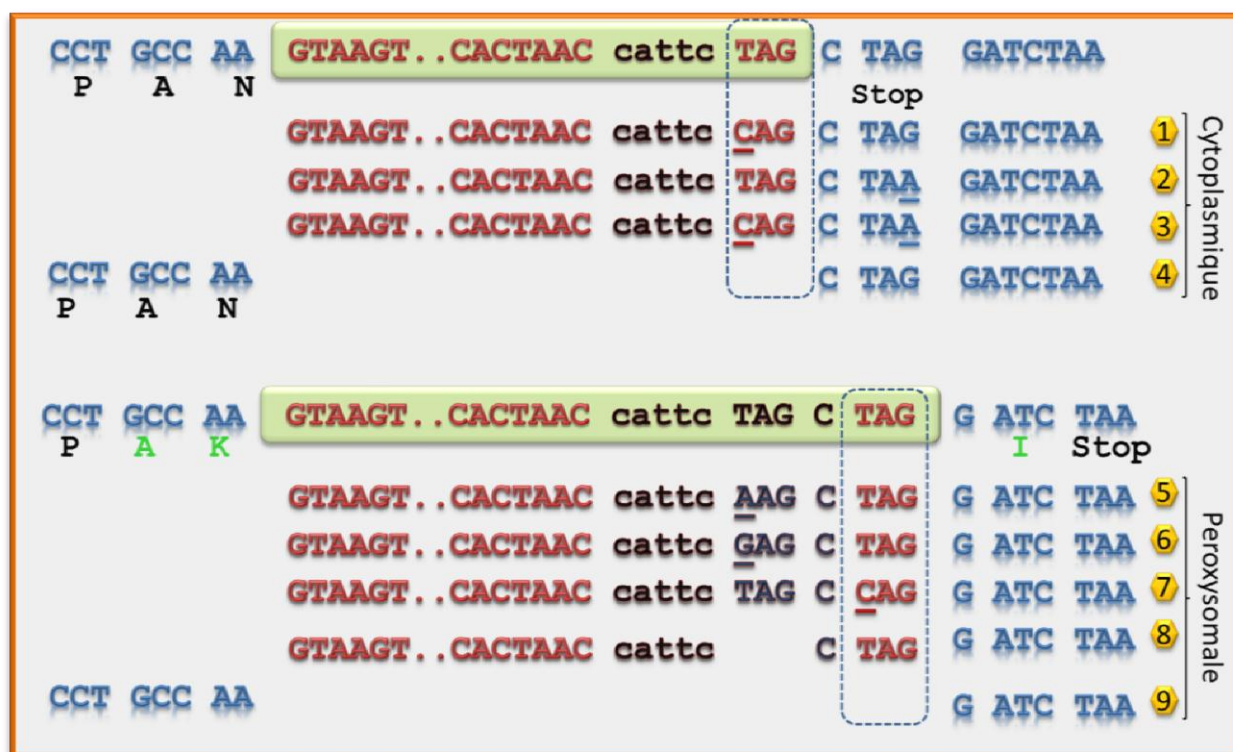


Figure 33 : Représentation schématique des différentes mutations introduites dans la séquence du gène YALI0E14190g. Les mutations 1 à 3 favoriseraient l'épissage au niveau du premier TAG et les mutations 5 à 8 favoriseraient l'épissage au niveau du deuxième TAG. Les mutants 4 et 9 sont dépourvus du second intron et génèrent respectivement une malate déshydrogénase cytoplasmique ou peroxisomale.

Pour effectuer ces mutations des oligos ont été déterminés en modifiant, soit une ou deux bases soit en déléant totalement l'intron pour les formes du gène épissé (mutants 4 et 9), codant uniquement une des malate déshydrogénases prédites par la séquence du gène YALI0E14190g.

Tableau 6 : Séquence d'oligos dessinés sur la base des différentes mutations introduites dans le gène YALI0E14190g

Oligo	Séquence de l'oligonucléotide
MDH1-Start	CAGATCGAT TAACTGACTAG GTTAAAGCTGTCGTTGCCGGAGC
MDH1-Sa	AGGCCTAGGTTT AGATCCTAGCTAG AATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-01	AGGCCTAGGTTT AGATCCTAGCTG AATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-02	AGGCCTAGGTTT AGATCTTAGCTAG AATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAA
MDH1-03	AGGCCTAGGTTT AGATCTTAGCTG AATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-04	AGGCCTAGGTTT AGATCCTAGTTGGC AGGAGGGTTAACAATG
MDH1-05	AGGCCTAGGTTT AGATCCTAGCTT GAATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-06	AGGCCTAGGTTT AGATCCTAGCTC GAATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-07	AGGCCTAGGTTT AGATCCTGGCTAG AATGGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAAT
MDH1-08	AGGGCTAGCTTT AGATCCTAGGAAT GGTTAGTGATCGTGTAGTTCAAATGG
MDH1-09	AGGCCTAGGTTT AGATCTTGGC AGGAGGGTTAACAATG

B.1.2.2. Vecteurs : clonage dans *E. coli*.

La stratégie a consisté en l'introduction par simple crossing-over du gène comportant l'une des mutations décrites au locus du gène sauvage pour avoir une copie sauvage tronquée et une copie mutée. Pour éviter la traduction de la forme tronquée du gène sauvage un stop a été introduit dans les 3 phases en amont. L'oligonucléotide MDH1-Start que nous avons utilisé comme "primer sens" pour tous les fragments, contient donc 3 stops qui vont empêcher la traduction en protéine du gène invalidé. Le plasmide JMP62 *URA3ex* a été utilisé pour le clonage des gènes mutés. Le plasmide JMP62 *URA3ex* a été digéré par *ClaI* et *AvrII* éliminant ainsi le promoteur pPOX2 et le gène *MDH* modifié a été inséré. En nous basant sur les différentes mutations que nous voulions introduire nous avons dessiné les oligos (Tableau 6) en insérant un site *AvrII* et *ClaI* pour le clonage futur dans le vecteur. Les fragments ont été alors amplifiés (Figure 34), digérés et clonés dans le vecteur JMP62 *URA3ex*. La sélection s'est effectuée sur LB+Kanamycine car le plasmide JMP62 *URA3ex* possède un gène de résistance à la kanamycine. Quatre clones de chaque transformation ont été sélectionnés, mis en culture et digérés par les enzymes *ClaI* et *HindIII* pour vérification. Ces clones ont été séquencés pour vérifier que la mutation a bien été introduite.

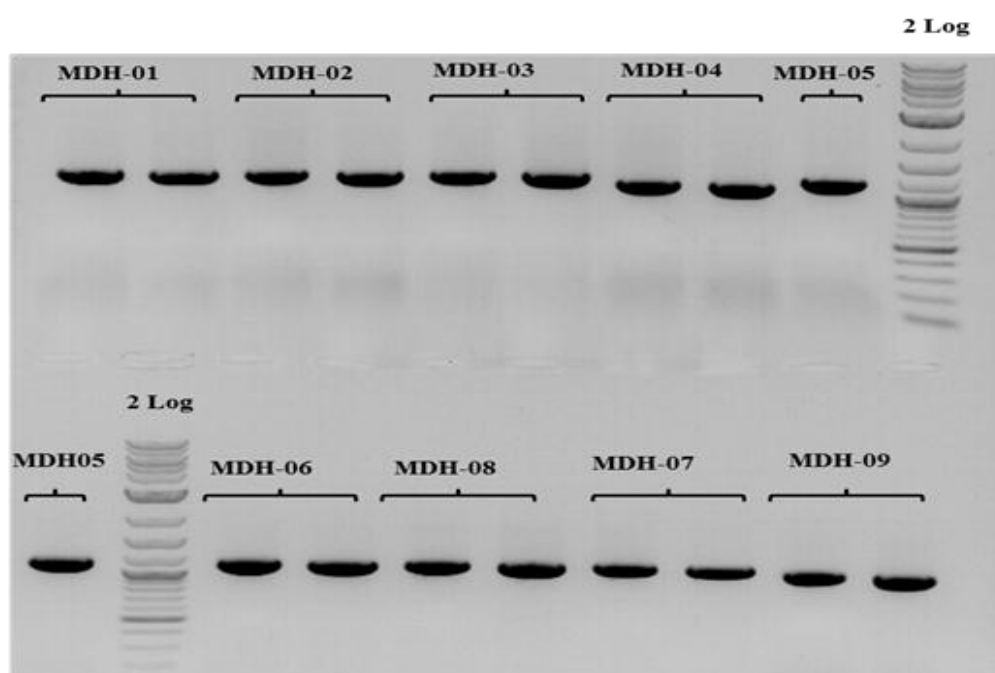


Figure 34 : Gel représentant les fragments d'amplification par PCR des 9 mutations introduites. On note la différence de poids moléculaire entre les fragments issus de l'amplification des fragments avec des mutations ponctuelles (MDH-01, MDH-02, MDH-03, MDH-05, MDH-06, MDH-07, MDH-08) et des fragments avec suppression totale de l'intron (MDH-04 et MDH-09)

B.1.2.3. Transformation de *Yarrowia lipolytica*.

Le Plasmide a été digéré dans l'insert par l'enzyme de restriction *Bam*HI en vue d'une intégration par simple crossing-over (Figure 35). Les neuf plasmides différents ont été intégrés dans la souche Po1d (Mat A, *leu2-270*, *ura302*, *xpr2-322*) de *Y. lipolytica* selon le protocole classique de transformation à l'acétate de lithium. Et comme nous l'avons expliqué plus haut cette intégration du gène muté avec un stop dans les 3 phases en amont va invalider le gène sauvage et ne permettre que l'expression du gène muté. Un témoin positif sans mutation au niveau de l'intron 2 a également été construit, il correspond au mutant MDH-10.

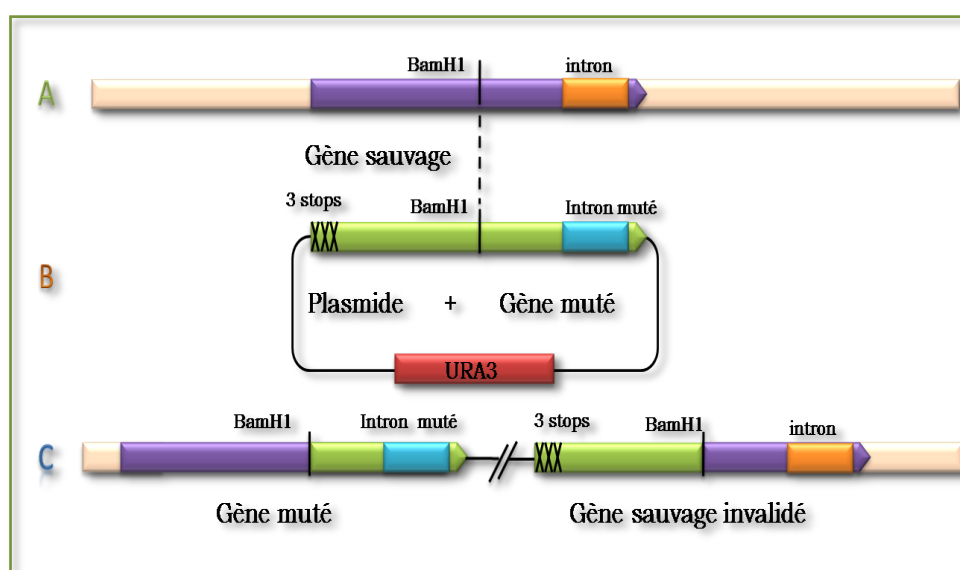


Figure 35 : Représentation schématique de l'introduction d'un gène muté par simple "crossing over"

- A. Représentation schématique du gène d'intérêt (violet) avec son intron (orange),
- B. Représentation schématique du plasmide de mutagenèse comprenant le fragment de PCR avec les 3 codons stops dans les 3 phases, le site BamHI unique pour la linéarisation du plasmide et l'intron muté (bleu),
- C. Représentation schématique du locus avec le gène muté (partie de gauche) et le gène invalidé (partie de droite).

B.1.2.4. Vérifications des mutants

Les différents mutants (4 mutants par transformation) ont d'abord été vérifiés par PCR avec un oligo choisi dans le gène de la malate et un autre choisi dans le plasmide. Il faut noter que la PCR de vérification a donné des bandes de la taille attendue avec une faible amplification pour certains clones et une très forte amplification pour d'autres. Un exemple est donné dans la Figure 36.

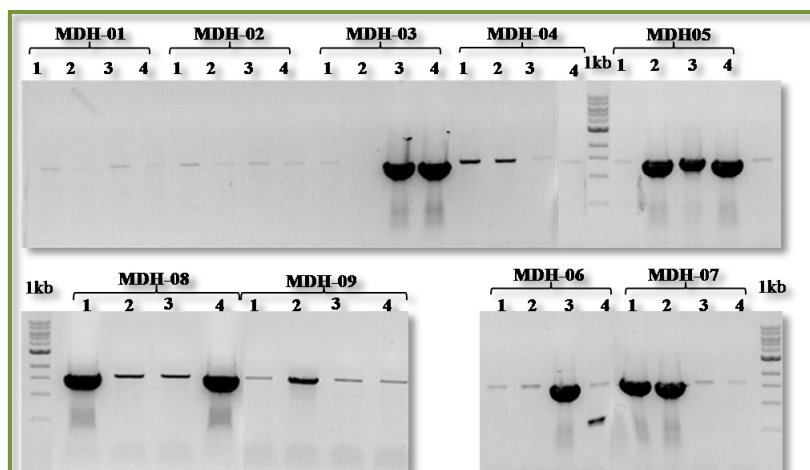


Figure 36 : Migration électrophorétique des produits de PCR sur colonies pour la vérification de quatre clones par mutation MDH

Suite à la vérification de 4 clones de levures pour chaque type de mutation, les clones avec lesquels nous avons obtenu un fragment de la taille attendue ont subi une deuxième vérification par Southern Blot dont la stratégie est basée sur le schéma de la Figure 37. Théoriquement, suite à la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme *EcoRV* et l'hybridation avec une sonde dans le gène de la malate déshydrogénase (zone hachurée en rouge sur la Figure 37), on devrait obtenir avec la souche Po1d une bande de 7216 pb. Avec le transformant positif dont l'intégration s'est effectuée au locus on s'attend à 2 bandes de 5264 pb et de 6452 pb. Pour le transformant dans lequel l'intégration s'est faite de façon aléatoire on s'attend à deux bandes de 7216 pb et d'une taille supérieure ou égale à 1520 pb.

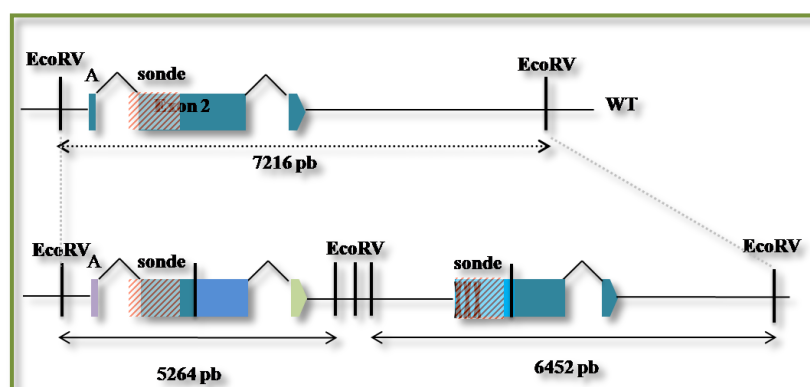
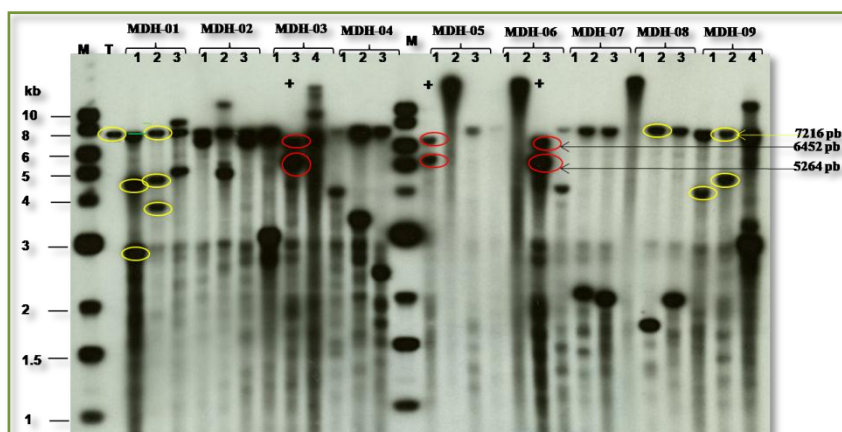


Figure 37 : Schéma de la stratégie de vérification par Southern blot montrant la taille des bandes correspondant aux régions d'hybridation de la sonde.

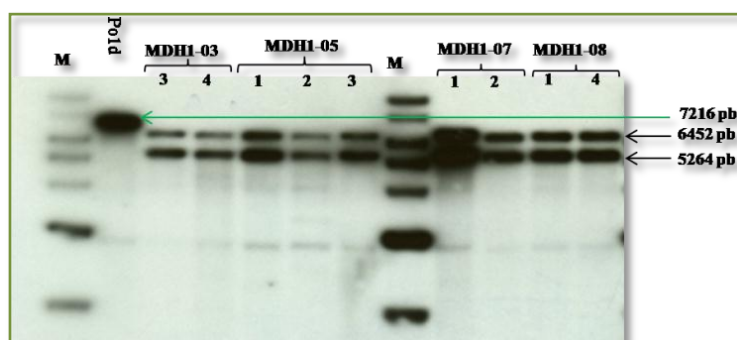
Trois clones de chaque mutation, vérifiés par PCR ont été utilisés pour une première vérification par Southern blot. Le résultat de l'hybridation de la première série de mutants est représenté dans la Figure 38.



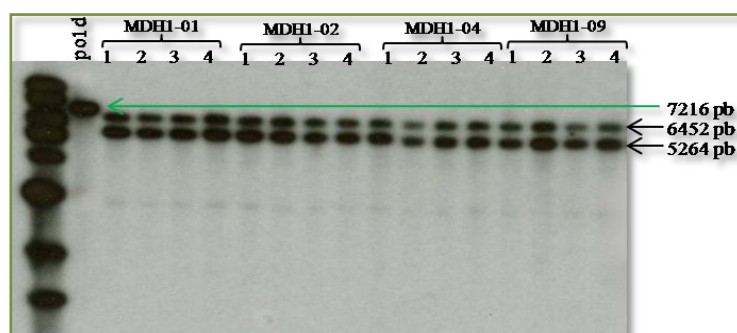
A

Figure 38 : Résultats des vérifications Southern blot de 3 clones de chaque mutation (MDH). Les deux bandes des mutants où l'insertion s'est effectuée au locus sont entourées en rouge. La souche Po1d représentée par T (témoin) a donné une seule bande de 7216 pb. Les autres mutants ont tous une bande de 7216 pb et au moins une autre bande de taille variable.

Une deuxième vérification a été effectuée uniquement avec une série de mutants qui ont donné une bonne amplification lors de la vérification par PCR (Figure 39A). La Figure 39B représente la vérification de 4 clones des mutants MDH-01, MDH-02, MDH-09 et MDH-10.



A



B

Figure 39 : Résultats des vérifications de l'insertion au locus des mutations du gène malate déshydrogénase

A : Résultats de l'hybridation par Southern blot des mutants MDH ayant donné une forte amplification par PCR. Tous les mutants sont positifs (2 bandes de 6452 pb et 5264pb)

B : Résultats de l'hybridation par Southern blot d'une deuxième série de 4 clones des mutants MDH-01, MDH-02, MDH-04 et MDH-09. La première vérification par PCR a donné une forte amplification. Tous les mutants sont positifs.

B.1.2.5. Analyses phénotypiques

Ces différentes mutations ont donné des souches auxotrophes (Tableau 7) pour la leucine car nous sommes partis de la souche Po1d (Ura⁻ Leu⁻) que nous avons transformée par une cassette comportant le marqueur de sélection *URA3*. La suite des expériences a été effectuée avec un clone par mutation.

Tableau 7 : Liste des mutants MDH auxotrophes analysés

JMY1685	MDH-10-1	Ura⁺ Leu⁻
JMY1689	MDH-01-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1693	MDH-02-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1697	MDH-03-3	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1699	MDH-04-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1703	MDH-05-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1706	MDH-06-4	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1707	MDH-07-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1709	MDH-08-1	Ura ⁺ Leu ⁻
JMY1711	MDH-09-1	Ura ⁺ Leu ⁻

➤ Courbes de croissance.

Les différents mutants MDH ont été cultivés en milieu glucose. Les mutants ont été mis en préculture pendant 16 heures en milieu riche YPD. Ils ont été ensuite ensemencés en milieu YNB+glucose additionné de leucine. La croissance a été suivie par la mesure de la DO, pendant plus de 48 heures de culture.

Les différents mutants ont une croissance similaire à celle de la MDH-10 qui est considérée comme la souche témoin. La DO maximale atteinte en phase stationnaire est d'environ 5 en milieu glucose minimum (Figure 40). Les différentes mutations n'ont pas affecté la croissance des souches en milieu glucose.

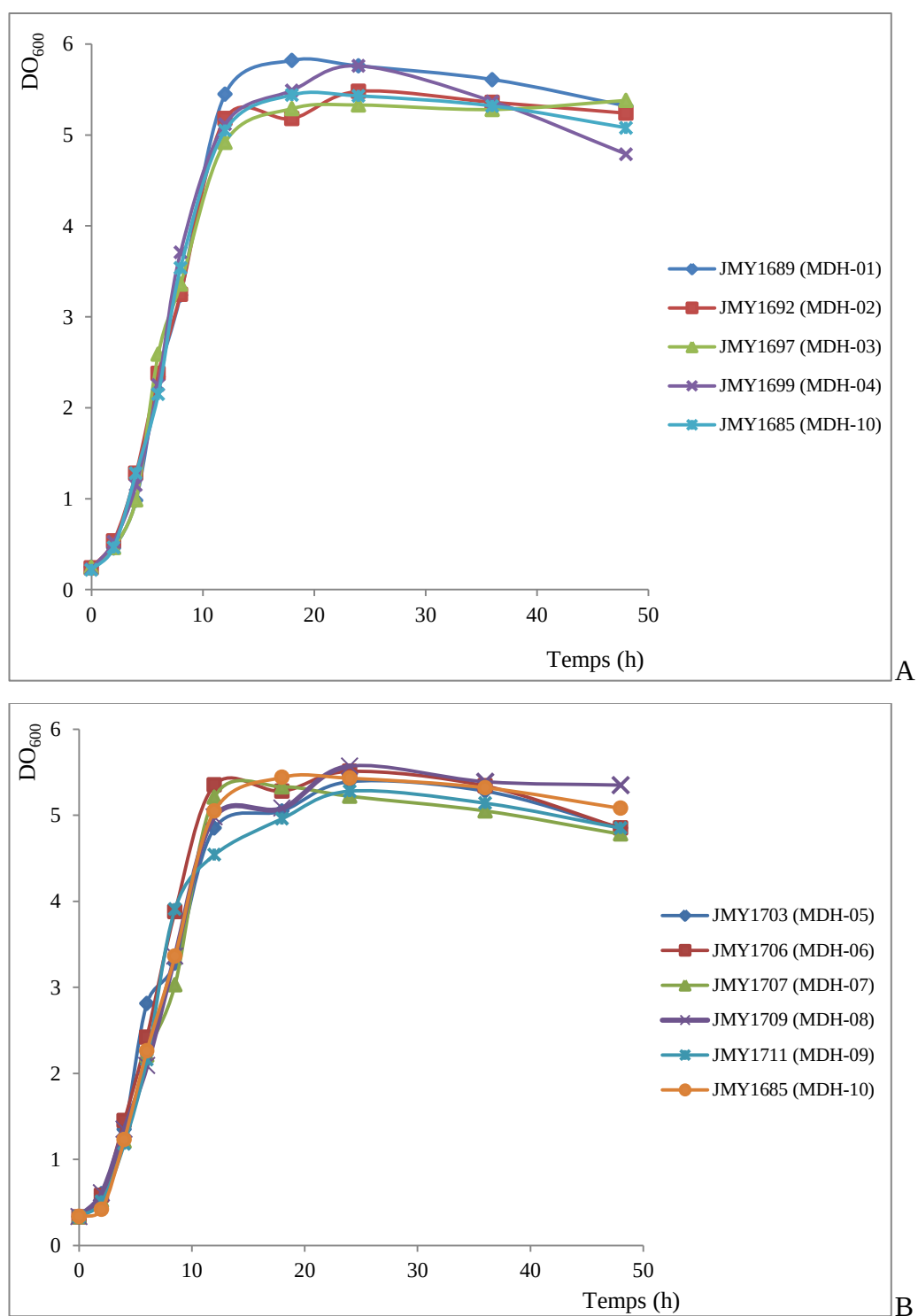


Figure 40 : Courbes de croissance sur milieu glucose des mutants MDH auxotrophes (Ura⁺ Leu⁻) pour la leucine. La DO maximale des mutants auxotrophes est d'environ 5 sur milieu YNBN0+leucine.

A : courbes de croissance des mutants pour lesquels la mutation introduite favoriserait l'épissage au premier TAG (cytoplasmique).

B : courbes de croissance des mutants ou la mutation introduite favoriserait un épissage au deuxième TAG (peroxysomale).

➤ Complémentation des souches auxotrophes

Chez *Y. lipolytica* l'auxotrophie pour la leucine n'est pas correctement complémentée par l'ajout de leucine dans le milieu de culture (**Mauersberger et al., 2001**). Les souches auxotrophes pour la leucine ont une DO maximale d'environ 5. Aussi nous avons décidé de rendre les mutants prototrophes par transformation avec le fragment *LEU2* en vue d'une augmentation de la DO en milieu minimum. Le fragment *LEU2* a été amplifié par PCR, purifié et a servi à la transformation des souches auxotrophes du Tableau 7 par la méthode classique à l'acétate de lithium. Il peut s'agir soit d'une intégration au locus par double crossing-over car le gène *LEU2* a subi une délétion interne de 681 nucléotides entre deux sites *StuI*, soit d'une intégration aléatoire du fragment pour rétablir la prototrophie des souches. Cette transformation a permis d'obtenir les mutants du Tableau 8.

Ces nouvelles souches prototrophes ont été cultivées en milieu YNB+glucose. La croissance est suivie par la mesure de la DO pendant 48 heures. Effectivement, la transformation des souches par *LEU2* a permis d'augmenter la DO des mutants qui est d'environ 10 en phase stationnaire (Figure 41).

Tableau 8 : Liste des mutants MDH prototrophes analysés

JMY2040	MDH-01-1	Ura+ Leu+
JMY2042	MDH-02-1	Ura+ Leu+
JMY2044	MDH-03-1	Ura+ Leu+
JMY2046	MDH-04-1	Ura+ Leu+
JMY2048	MDH-05-1	Ura+ Leu+
JMY2050	MDH-06-1	Ura+ Leu+
JMY2052	MDH-07-1	Ura+ Leu+
JMY2054	MDH-08-1	Ura+ Leu+
JMY2056	MDH-09-1	Ura+ Leu+
JMY2058	MDH-10-1	Ura+ Leu+

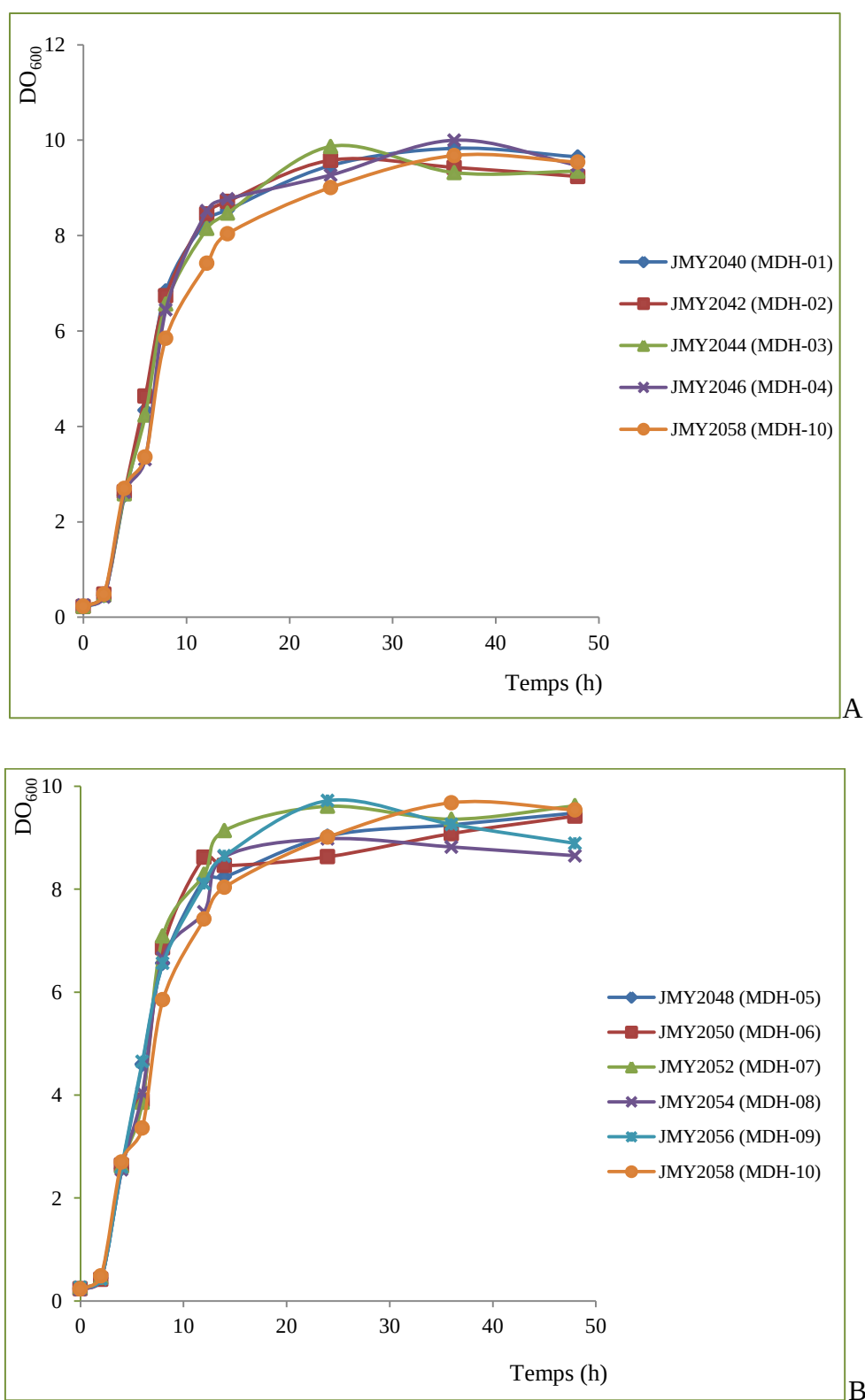


Figure 41 : Courbes de croissance sur milieu glucose des mutants MDH rendus phototrophes (Ura⁺ Leu⁺) après transformation avec *LEU2*. La DO maximale des mutants rendus prototrophes est d'environ 10. Tous les mutants ont une croissance similaire.

A : courbes de croissance des mutants dans lesquels la mutation introduite favoriserait l'épissage au premier TAG (cytoplasmique).

B : courbes de croissance des mutants où la mutation introduite favoriserait un épissage au deuxième TAG (peroxysomale).

➤ Tests en gouttes

Des tests en gouttes ont été effectués avec les différents mutants MDH sur plusieurs milieux (acide oléique, tributyrine, trioléine et glucose). Les milieux acide oléique et tributyrine sont composés de YNB additionné d'une émulsion d'acide oléique ou de tributyrine (concentration finale 2%). L'acide oléique ou la tributyrine constituent la seule source de carbone. Les cellules sont mises en préculture sur la nuit, dans du YPD. Elles sont centrifugées et resuspendues dans de l'eau à une DO_{600} de 1,5. Des dilutions à partir de cette suspension sont réalisées suivant cet ordre: $\rightarrow 1/10 \rightarrow 1/5 \rightarrow 1/5 \rightarrow 1/5 \rightarrow 1/5 \rightarrow 1/5$, et les cinq dernières dilutions sont déposées de la plus concentrée à la moins concentrée sur les boîtes de Pétri. Les cellules sont mises en culture à 28 °C et pendant au moins 48 h pour la culture sur glucose et au moins 72 heures pour la culture sur tributyrine, car les halos d'hydrolyse apparaissent à partir du 3^{ème} jour de culture. La croissance sur tributyrine n'a pas montré de différence significative entre les mutants MDH (Figure 42). La croissance des mutants est quasiment similaire lorsqu'ils sont comparés entre eux et à la souche de référence MDH-10. Tous les mutants MDH que nous avons construits à partir de la souche Po1d de *Y. lipolytica* poussent de la même façon sur milieu acide oléique (Figure 42), ce qui diffère de la croissance des mutants MDH chez *S. cerevisiae*.

En effet chez *S. cerevisiae* le mutant issu de la disruption du gène *MDH3* est incapable de croître sur acide oléique comme source de carbone. Singh et ses collaborateurs (1993) ont attribué cette incapacité de croissance à un dysfonctionnement de la β -oxydation peroxysomale. L'équivalent de ce mutant dans nos souches est le mutant MDH-4. Cette souche n'est capable de produire que la malate déshydrogénase cytosolique car la mutation introduite au niveau du gène YALI0E14190g est une délétion complète de l'intron jusqu'au premier des deux TAG servant de 3' SS.

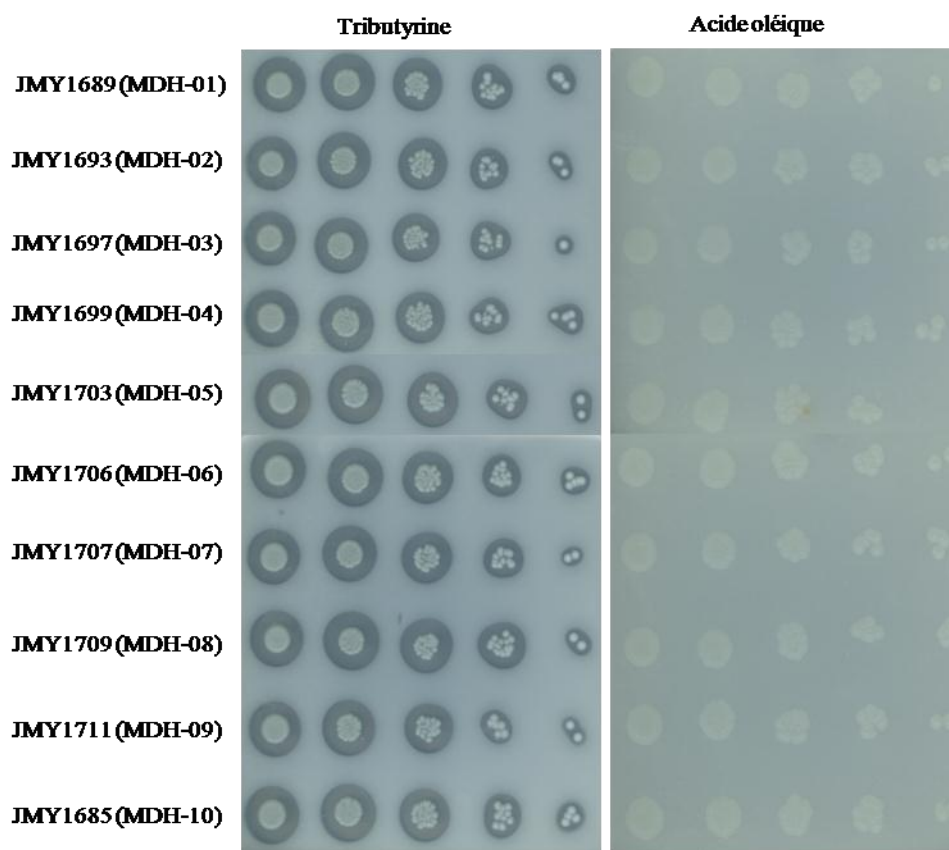


Figure 42: Résultats des tests en gouttes des mutants MDH, pour l'analyse phénotypique sur milieu YNB + Tributyrine ou YNB + acide oléique. Les différents mutants présentent le même phénotype. Les halos d'hydrolyse des différents mutants ont un aspect et une taille similaires.

Des tests en gouttes ont été également effectués sur milieu éthanol, glucose et acétate de sodium et d'ammonium avec seulement les souches JMY1699 (MDH-4) et JMY1711 (MDH-9). Les mutants ont une meilleure croissance sur glucose comparée à la croissance sur acétate ou éthanol. Ces deux mutants ont néanmoins une croissance similaire à celle de la souche contrôle MDH-10. Chez *S. cerevisiae*, la disruption de *MDH2* entraîne une incapacité de croissance sur acétate ou éthanol en milieu minimum. La souche MDH-9 est une souche dans laquelle l'intron 2 du gène YALI0E14190g a été supprimé au niveau du deuxième TAG servant de 3' SS, ce qui fait de ce mutant MDH-9, l'équivalent de la souche $\Delta mdh2$ de *S. cerevisiae*.

La mutation de MDH-9 chez *Y. lipolytica* n'a pas affecté sa croissance sur l'acétate ou sur l'éthanol comme unique source de carbone car ce mutant qui comparativement à son équivalent chez *S. cerevisiae*, ne devrait pas pousser à une croissance similaire à la souche contrôle MDH-10 (Figure 43).

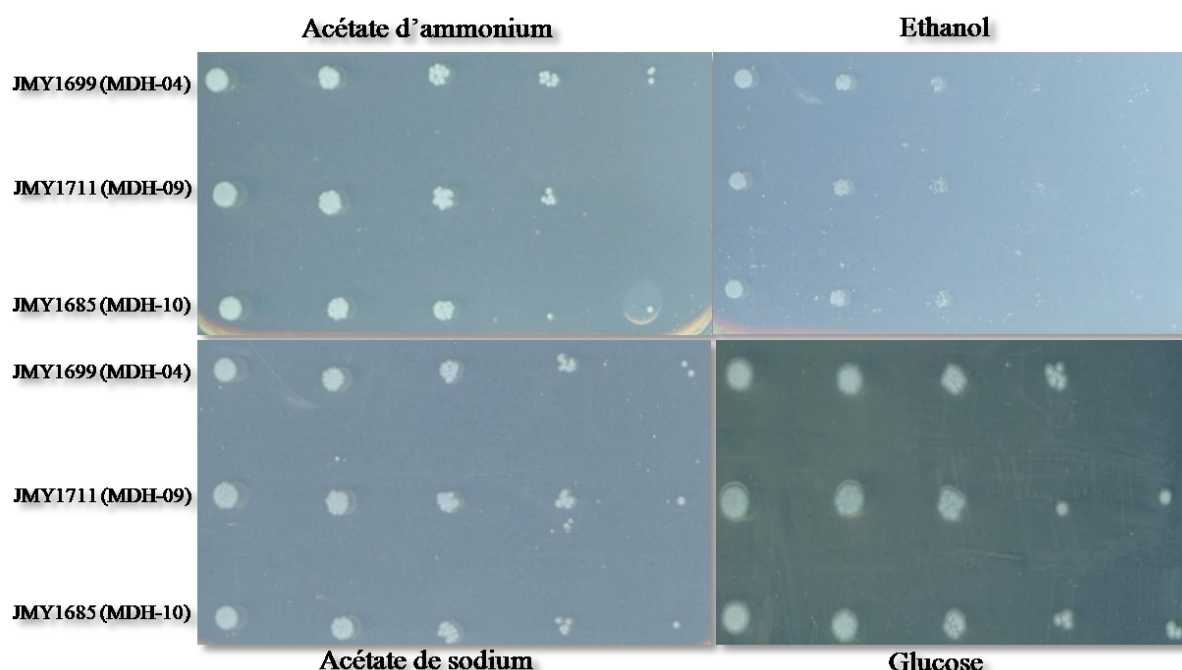


Figure 43 : Phénotypes de croissance des mutants JMY1699 (MDH-4), JMY1711 (MDH-9) et JMY1685 (MDH-10) sur milieu acétate, éthanol et glucose. Les deux mutants malate déshydrogénases poussent et ont un phénotype similaire à celui de la souche de référence sur acétate, éthanol et glucose, Néanmoins, les mutants, tout comme la souche JMY1685 (MDH-10) ont une meilleure croissance sur glucose par rapport à la croissance sur acétate ou éthanol.

B.1.3. Localisation de la malate déshydrogénase des mutants *MDH4* et *MDH9*

B.1.3.1. Stratégie de construction des mutants de fusion

Pour la validation de la localisation des protéines Mdh4p et Mdh9p qui en fonction de l'épissage du deuxième intron devraient respectivement être adressées dans le cytoplasme et les peroxysomes, nous avons décidé d'utiliser la protéine fluorescente Yfp pour une visualisation *in vivo* et le tag HA pour une immunolocalisation. Des vecteurs de fusion ont été construits avec les trois mutants. Le gène *YFP* et le tag ont été insérés en N-terminal car la séquence d'adressage est située en C-terminal. Avec les mutants MDH-4, MDH-9 et MDH-10, six nouvelles souches par étiquette ont été construites, car pour chaque mutant il y a deux cas de construction. Une première construction de fusion du gène modifié avec l'intron 1 et une deuxième construction de fusion du gène modifié sans l'intron 1, avec les deux étiquettes (Figure 44). Au final, 12 nouvelles souches ont été construites pour les deux étiquettes.

B.1.3.2. Constructions de vecteurs de fusion *MDH4* et *MDH9* avec le tag HA et *YFP*

Les plasmides de départ utilisés sont JMP62 *URA3ex*-YFP-N pour la fusion avec YFP en N-terminal et JMP62 *URA3ex*-HA-N pour la fusion avec le tag HA en N-terminal. Le plasmide JMP62 *URA3ex*-YFP-N est digéré par les enzymes de restriction BamH1 et AvrII alors que les fragments de gènes modifiés obtenus par amplification PCR sont digérés par BclI et AvrII. Une ligature a ensuite été réalisée entre les gènes et le vecteur. Le produit de ligature est cloné dans *E. coli*.

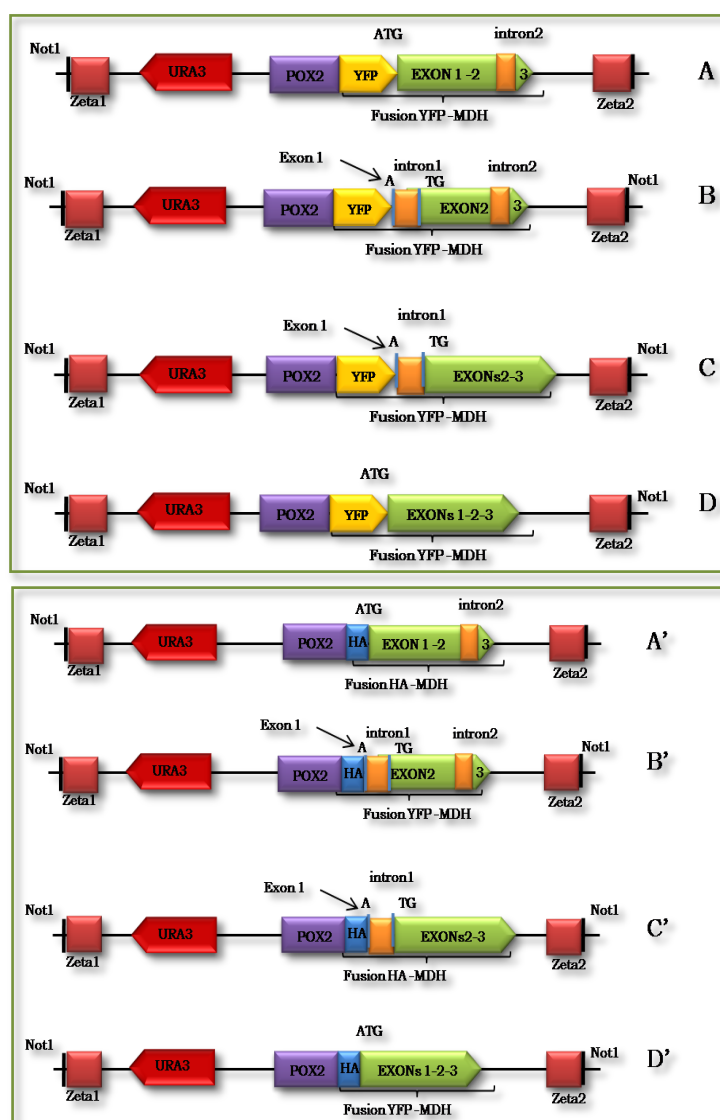


Figure 44: Représentation des différentes cassettes de fusion des mutants MDH-4 et MDH-9 et du mutant de référence MDH-10.

A: fusion YFP-MDH-10 sans intron 1; B: fusion YFP-MDH-10 avec intron 1; C: fusion YFP-MDH-4/MDH-9 avec intron; D: fusion YFP-MDH-4/MDH-9 sans intron
A': fusion HA-MDH-10 sans intron 1; B': fusion HA-MDH-10 avec intron 1; C': fusion HA-MDH-4/MDH-9 avec intron; D': fusion YFP-MDH-4/MDH-9 sans intron.

B.1.3.3. Transformation des vecteurs de fusion dans *Yarrowia lipolytica*

Après le clonage les différents plasmides sont extraits et les cassettes d'expression des protéines de fusion sont récupérées par digestion avec l'enzyme de restriction *NotI* (Figure 44)

La souche Po1d a été transformée par insertion aléatoire de ces 12 cassettes. Nous avons obtenu alors 12 séries de souches de levures exprimant soit les protéines de fusion avec Yfp, soit les protéines avec le tag HA. Pour chaque série nous avons récupéré 4 clones de chaque, correspondant à quatre insertions différentes dont deux sont données dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Liste des souches exprimant les protéines de fusion avec les tags Yfp et HA

Souches de <i>Y. lipolytica</i>	Cassettes	Caractéristiques
JMY2081/JMY2082	YFP ₁ -MDH-4	Po1d-YFP ₁ -MDH-4 (Ura+ ; Leu-)
JMY2087/JMY2088	YFP ₂ -MDH-4	Po1d-YFP ₂ -MDH-4 (Ura+ ; Leu-)
JMY2083/JMY2084	YFP ₁ -MDH-9	Po1d-YFP ₁ -MDH-9 (Ura+ ; Leu-)
JMY2089/JMY2090	YFP ₂ -MDH-9	Po1d-YFP ₂ -MDH-9 (Ura+ ; Leu-)
JMY2085/JMY2086	YFP ₁ -MDH-10	Po1d-YFP ₁ -MDH-10 (Ura+ ; Leu-)
JMY2091/JMY2092	YFP ₂ -MDH-10	Po1d-YFP ₂ -MDH-10 (Ura+ ; Leu-)
JMY2093/JMY2094	HA ₁ -MDH-4	Po1d-HA ₁ -MDH-4 (Ura+ ; Leu-)
JMY2099/JMY2100	HA ₂ -MDH-4	Po1d-HA ₂ -MDH-4 (Ura+ ; Leu-)
JMY2095/JMY2096	HA ₁ -MDH-9	Po1d-HA ₁ -MDH-9 (Ura+ ; Leu-)
JMY2101/JMY2102	HA ₂ -MDH-9	Po1d-HA ₂ -MDH-9 (Ura+ ; Leu-)
JMY2097/JMY2098	HA ₁ -MDH-10	Po1d-HA ₁ -MDH-10 (Ura+ ; Leu-)
JMY2103/JMY2104	HA ₂ -MDH-10	Po1d-HA ₂ -MDH-10 (Ura+ ; Leu-)

B.1.3.4. Analyse des mutants

➤ Vérification de la localisation par Western blot

Deux souches de chaque mutant de fusion avec le tag HA ont été cultivées en milieu YNB-glucose. Les cellules ont été récupérées après 12 h et 24 h de culture. Les extraits cellulaires ont été préparés comme décrit dans les matériels et méthodes, déposés sur gel d'acrylamide et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont hybridées avec les anticorps primaire (anti-HA de souris) et secondaire (anti-souris) et révélées avec le kit ECL (Amersham). Malgré le temps de révélation prolongé aucune bande n'a été détectée.

➤ Localisation par visualisation au microscope optique

Pour chaque mutant de fusion avec le tag Yfp deux souches ont été mises en culture en YNB-glucose. Après douze heures de culture les cellules ont été visualisées au microscope après induction de la fluorescence à une longueur d'onde de 514 nm. Aucune fluorescence n'a été détectée dans aucun des mutants.

Les mutants ont été ensuite cultivés sur milieu YNB+glucose+acide oléique une visualisation au microscope a été effectuée après 12 de culture.

Cette visualisation au microscope a révélé des points lumineux avec les mutants exprimant la MDH-9 (peroxysomale) en fusion avec la Yfp (Figure 45A). Nous avons également observé une fluorescence localisée avec les souches exprimant la MDH-10 (souche exprimant la malate déshydrogénase sauvage) en fusion avec la Yfp (Figure 45B). Nous n'avons pas observé de fluorescence avec les mutants exprimant la MDH-4 (cytoplasmique).

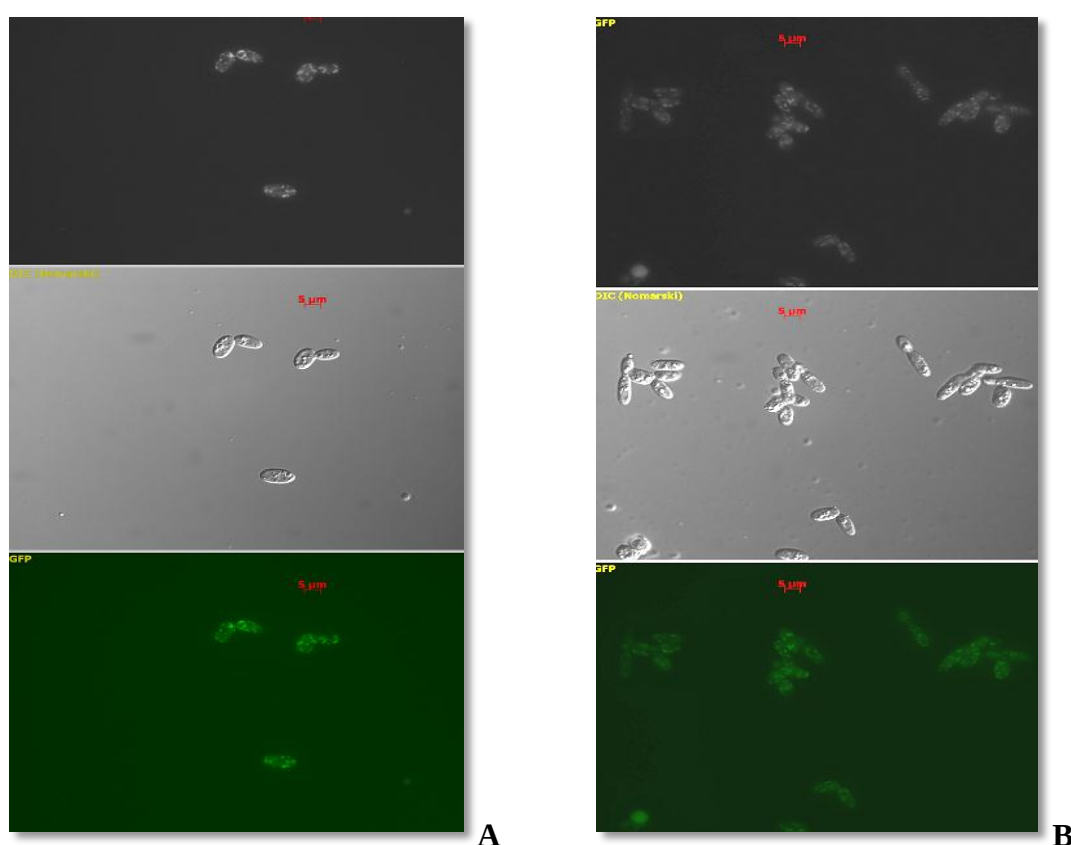


Figure 45 : Localisation des protéines de fusion dans la souche JMY2089 (A) exprimant la MDH-9 (peroxysomale) en fusion avec la Yfp et dans la souche JMY2085 (B) exprimant la malate déshydrogénase sauvage en fusion avec la Yfp. La fluorescence est localisée et forme des points lumineux correspondant aux peroxysomes dans les deux souches.

B.2. Etude des mutants du cycle du glyoxylate : disruption de *MLS1*, *ICL1* et *CIT2*

B.2.1. Voie du glyoxylate : Peroxysomes

L'analyse des mutants MDH n'a pas révélé de différence phénotypique significative entre eux. Notamment, nous n'avons pas observé de phénotypes pour les mutants de délétion de la forme peroxysomale comme attendu chez *S. cerevisiae* pour le gène *MDH3*. Nous nous sommes axés sur le fonctionnement du cycle du glyoxylate en délétant les autres gènes qui constituent ce cycle à savoir YALI0E15708g (*MLS1*), YALI0E02684g (*CIT1*) et YALI0C16885g (*ICL1*).

Ces trois gènes ont été choisis à la suite d'une analyse de la probabilité de l'adressage des protéines qu'ils codent à travers leur séquence C-terminale et les prédictions selon Mitoprot (Tableau 10).

Tableau 10 : Enzymes du cycle du glyoxylate et caractéristiques des protéines des familles correspondantes chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*.

	<i>S. cerevisiae</i>				<i>Y. lipolytica</i>			
	Gène	Longueur de la protéine	Mito-prot	PTS1	Gène	Longueur de la protéine	Mito-prot	PTS1
Isocitrate lyase	<i>ICL1</i>	558	0.0082	VKK	YALI0C16885g	541	0.1036	SKL
	<i>ICL2</i>	576	0.9148	TQF	YALI0F31999g	566	0.9865	NQL
Malate synthase	<i>MLS1</i>	555	0.0562	SKL	YALI0D19140g	532	0.5262	VEQ
	<i>MLS2</i>	555	0.0384	SKL	YALI0E15708g	548	0.1199	SKL
Malate déshydrogénase	<i>MDH1</i>	335	0.9873	ASK	YALI0D16753g	339	0.9891	QNP
	<i>MDH2</i>	378	0.0388	ASS	YALI0E14190g	331/332	0.3528	PAN/AKI
	<i>MDH3</i>	344	0.1746	SKL				
Citrate synthase	<i>CIT1</i>	480	0.9607	SKN	YALI0E00638g	460	0.9865	VAK
	<i>CIT2</i>	461	0.1919	SKL	YALI0E02684g	466	0.9824	LKL
	<i>CIT3</i>	487	0.9210	NKL				
Aconitase	<i>ACO1</i>	779	0.9950	EKK	YALI0D09361g	780	0.9935	SKK
	<i>ACO2</i>	790	0.9600	RNE	YALI0E14949g	791	0.9365	ANK

Il y a deux gènes de la malate synthase chez *Y. lipolytica* : YALI0D19140g et YALI0E15708g. Le gène YALI0D19140g code une protéine de 532 acides aminés n'ayant pas de séquence d'adressage aux peroxysomes. Il est annoté comme étant l'homologue de YNL117w (*MLS1*) de *S. cerevisiae* et sa probabilité d'adressage à la mitochondrie est de

0.5262 selon mitoprot. Le gène YALI0E15708g est annoté comme étant l'homologue du gène YIR031c (*MLS2-DAL7*) de *S. cerevisiae* et code une protéine ayant une séquence d'adressage C-terminale peroxysomale (S-K-L). C'est donc une malate synthase peroxysomale ; nous avons vérifié avec mitoprot que la probabilité d'être adressée à la mitochondrie de 0.1119. Le gène YALI0E15708g est celui que nous avons disrupté pour l'étude du fonctionnement du cycle du glyoxylate.

Le gène YALI0E02684g que nous avons choisi de disrupter est annoté comme étant l'homologue de YNR001c (*CIT1*) de *S. cerevisiae* et code une protéine qui a une probabilité d'être exportée à la mitochondrie de 0.9824. Néanmoins la protéine codée par ce gène a une séquence C-terminale L-K-L proche de la séquence d'adressage aux peroxysomes S-K-L donc serait probablement affectée également à ce compartiment. Des cas de double localisation existent, notamment chez *S. cerevisiae* (Petrova *et al.*, 2004). Le deuxième gène codant une citrate synthase chez *Y. lipolytica*, YALI0E00638g, est annoté comme homologue du gène de *E. nidulans* qui code une méthylcitrate synthase. Il serait donc l'homologue du gène *CIT3* de *S. cerevisiae* codant une méthylcitrate synthase mitochondriale.

Le gène YALI0C16885g code une isocitrate lyase de 541 acides aminés ayant une séquence d'adressage C-terminale peroxysomale (S-K-L) avec une très faible probabilité d'affectation à la mitochondrie qui est de 0.1036. L'isocitrate lyase codée par le gène YALI0C16885g de *Y. lipolytica* a une plus forte probabilité d'être adressée aux peroxysomes. Ce gène a donc été disrupté dans le but de comprendre son rôle dans le fonctionnement du cycle du glyoxylate, d'autant que chez *S. cerevisiae*, aucune citrate lyase n'a de séquence d'adressage aux peroxysomes. Il y a un deuxième gène YALI0F31999g annoté comme étant l'homologue du gène YPR006c (*ICL2*) de *S. cerevisiae* qui code une 2-méthylisocitrate lyase mitochondriale et catalyse la conversion du 2-méthylisocitrate en succinate et pyruvate. Ce gène chez *Y. lipolytica* code une protéine qui n'a pas de séquence d'adressage aux peroxysomes mais une séquence putative d'adressage à la mitochondrie.

B.2.2. Construction des vecteurs de disruption des gènes

Pour la disruption des gènes *MLS1* et *CIT2* nous avons utilisé la méthode SEP (Maftahi *et al.*, 1996) décrite dans le chapitre II.4.2.1 des matériels et méthodes, ce qui nous a permis d'obtenir les souches mutantes $\Delta mls1$ et $\Delta cit2$. Les cassettes de disruption ont été construites (ligature des fragments P-T par bout franc) à partir du vecteur pBluescript II KS(+/-) qui a servi pour le clonage dans *E. coli*. Les plasmides ont été ensuite digérés par I-

SceI pour l'insertion du marqueur de sélection URA, et ont été reclés dans *E. coli*. Les cassettes de disruption P-U-T ont été récupérées par amplification PCR à partir des plasmides.

La construction de la cassette de disruption P-U-T pour le gène *ICL1* n'ayant pas marché avec la méthode SEP nous avons opté pour la méthode de PCR 3 voies décrite au chapitre B.4.2.2. des matériels et méthodes et qui consiste en des amplifications PCR des fragments P, T et URA3 qui sont par la suite fusionnés par amplification PCR.

B.2.3. Constructions des mutants : transformations de *Yarrowia lipolytica*

La transformation de la souche Po1d avec ces trois cassettes de disruption a été réalisée, par la méthode classique à l'acétate de lithium, dans le but d'obtenir les trois mutants ayant les génotypes suivants : Po1d $\Delta mls1::URA3$; Po1d $\Delta cit2::URA3$; Po1d $\Delta icl1::URA3$. Les transformants ont été sélectionnés sur YNB +Casaminoacids. Une série de vérification par PCR, a permis d'obtenir trois clones Po1d $\Delta mls1::URA3$ positifs sur 24 clones testés et deux clones Po1d $\Delta cit2::URA3$ positifs sur 36 clones amplifiés. L'obtention de l'unique clone positif du mutant Po1d $\Delta icl1::URA3$ s'est révélée plus difficile car il a fallu tester 112 clones pour l'avoir. Lors du repiquage de l'unique clone positif deux colonies séparées ont été isolées (Tableau 11).

Tableau 11 : Liste des clones positifs des mutants du cycle du glyoxylate

JMY2060	$\Delta mls1-11$	Ura+ Leu-
JMY2061	$\Delta mls1-16$	Ura+ Leu-
JMY2062	$\Delta mls1-17$	Ura+ Leu-
JMY2063	$\Delta cit2-3$	Ura+ Leu-
JMY2064	$\Delta cit2-5$	Ura+ Leu-
JMY2065	$\Delta icl1-08$	Ura+ Leu-
JMY2066	$\Delta icl1-08'$	Ura+ Leu-

Ces clones positifs ont également été rendus prototrophes par transformation avec le fragment *LEU2* en vue d'éliminer l'auxotrophie pour la leucine (Tableau 12).

Tableau 12 : Liste des mutants du cycle du glyoxylate rendus prototrophes

JMY2060	JMY2067	$\Delta mls2-11-1$	Ura+ Leu+
	JMY2068	$\Delta mls2-11-2$	Ura+ Leu+
JMY2061	JMY2069	$\Delta mls2-16-1$	Ura+ Leu+
	JMY2070	$\Delta mls2-16-2$	Ura+ Leu+
JMY2062	JMY2071	$\Delta mls2-17-1$	Ura+ Leu+
	JMY2072	$\Delta mls2-17-2$	Ura+ Leu+
JMY2063	JMY2073	$\Delta cit2-3-1$	Ura+ Leu+
	JMY2074	$\Delta cit2-3-2$	Ura+ Leu+
JMY2064	JMY2075	$\Delta cit2-5-1$	Ura+ Leu+
	JMY2076	$\Delta cit2-5-2$	Ura+ Leu+
JMY2065	JMY2077	$\Delta icl1-08-1$	Ura+ Leu+
	JMY2078	$\Delta icl1-08-2$	Ura+ Leu+
JMY2066	JMY2079	$\Delta icl1-08'-1$	Ura+ Leu+
	JMY2080	$\Delta icl1-08'-2$	Ura+ Leu+

B.2.4. Analyses phénotypiques

B.2.4.1. Courbes de croissance des mutants

Une analyse de la croissance des mutants auxotrophes pour les trois gènes du cycle du glyoxylate a été réalisée. Une préculture en YPD a été réalisée avec les souches JMY2060 ($\Delta mls1-11$), JMY2062 ($\Delta cit2-3$), JMY2065 ($\Delta icl1-8$). Ces différents mutants ont ensuite été mis en culture dans le milieu YNB + Glucose et en milieu YNB + acide oléique. Les différents mutants ont une croissance normale en milieu YNB + Glucose à l'exception du mutant JMY2065 ($\Delta icl1-8$). En effet la croissance de cette souche dans le milieu YNB + Glucose complétement de leucine est quasiment nulle, ce qui était inattendu. En effet ce mutant a été sélectionné sur YNB + glucose + casaminoacids et ne présentait pas de défaut de croissance sur ce milieu. Nous avons donc supposé que ce défaut de croissance pourrait être dû à l'auxotrophie pour la leucine. C'est pourquoi nous avons construit les souches prototrophes par une transformation avec le marqueur *LEU2*.

Lorsque cette même souche est rendue prototrophe (JMY2077) elle croît toujours moins bien que les autres mutants du cycle du glyoxylate dans le milieu YNB + Glucose. La croissance de la souche $\Delta icl1-8$ est également nulle dans le milieu YNB + Acide oléique (Figure 46).

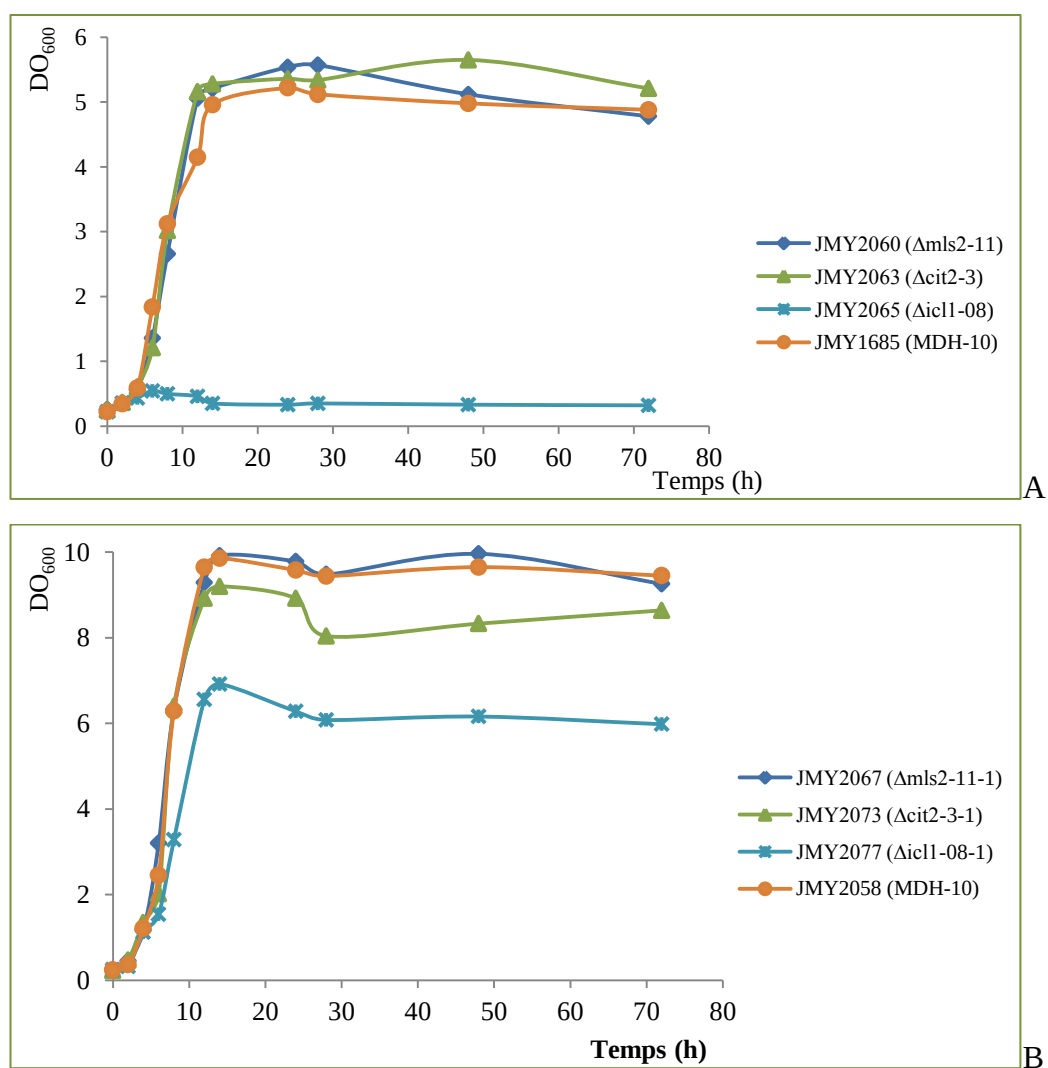


Figure 46 : Comparaison de la croissance des mutants du cycle du glyoxylate en milieu YNB+ glucose.

A : Croissance des mutants auxotrophes pour la leucine

B : Croissance des mutants prototrophes pour la leucine.

Le mutant JMY2065 (Δ icl1-8) auxotrophe pour la leucine est incapable de pousser dans un milieu YNB glucose + Leucine. La souche JMY2077 (Δ icl1-8) rendue prototrophe pour la leucine croît sur YNB glucose

B.2.4.2. Tests en gouttes

Des tests en goutte ont été réalisés sur différents milieux avec les mutants du cycle du glyoxylate. Les résultats montrent que les clones $\Delta icl1-8$ auxotrophes ou prototrophes pour la leucine sont incapables de croître sur milieu YNB + Acétate. Le résultat est le même avec l'acétate de potassium, l'acétate de sodium et l'acétate d'ammonium. Les souches délétées pour *CIT2* et de *MLS1* ont une croissance similaire à celle de la souche de référence MDH-10 (Figure 47).

La disruption du gène *ICL1* chez *Y. lipolytica* entraîne une incapacité de croissance sur milieu acétate, alors que celle de *CIT2* et *MLS1* n'affecte pas la croissance sur ce milieu.

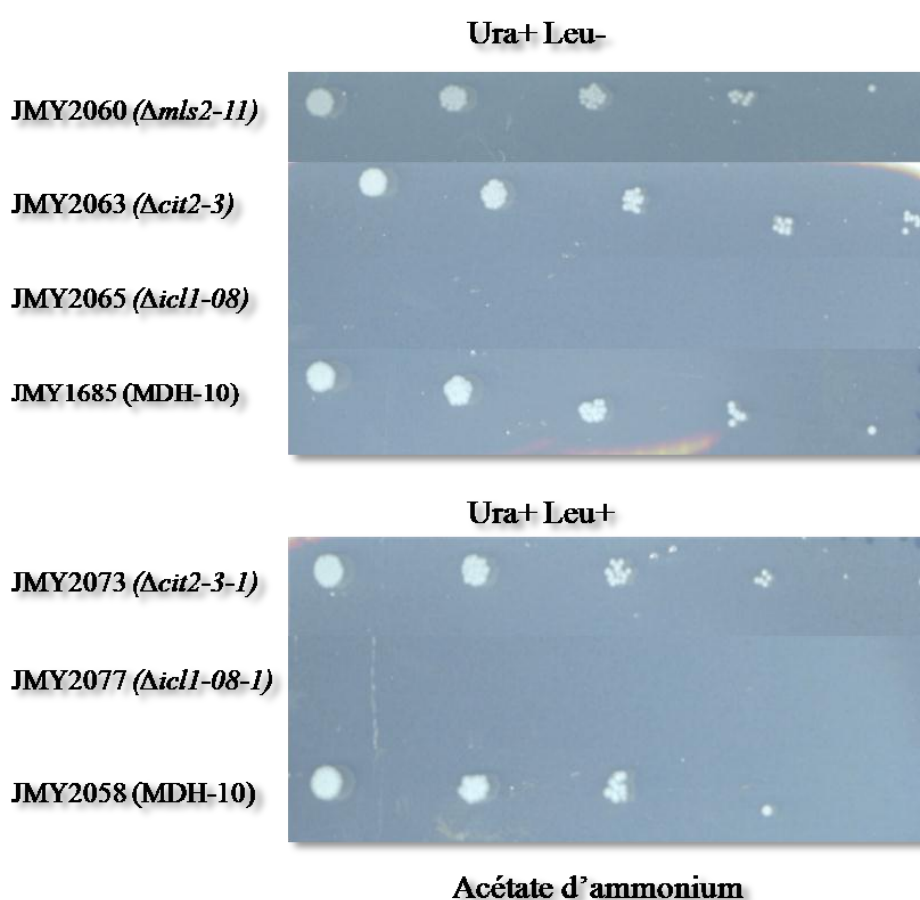


Figure 47 : Résultats de tests de croissance sur milieu acétate des souches $\Delta cit2$, Δicl , $\Delta mls1$ et *mdh-10*. Les milieux de culture pour les clones auxotrophes pour la leucine sont complétés avec la leucine. La base de tous ces milieux est YNB. Les souches $\Delta icl1$ ne peuvent pas croître sur acétate de sodium. La disruption du gène *ICL* entraîne une incapacité de croissance sur acétate chez *Y. lipolytica*. La délétion de *CIT2* ou de *MLS1* n'a pas d'effet sur la croissance de *Y. lipolytica* sur milieu acétate.

Les souches $\Delta mls1$, $\Delta cit2$, $\Delta icl1$ et MDH-10 ont été également cultivées sur éthanol. Les milieux sur lesquels sont cultivées les souches auxotrophes pour la leucine sont complémentées par la leucine. La seule source de carbone est l'éthanol qui est ajouté au milieu de base YNB. La souche $\Delta icl1$ auxotrophe ou prototrophe pour la leucine ne peut pas croître sur éthanol. La croissance est également fortement diminuée chez le mutant $\Delta cit2$ comparée à la souche MDH-10. La disruption du gène *CIT2* réduit la croissance sur éthanol (Figure 48).

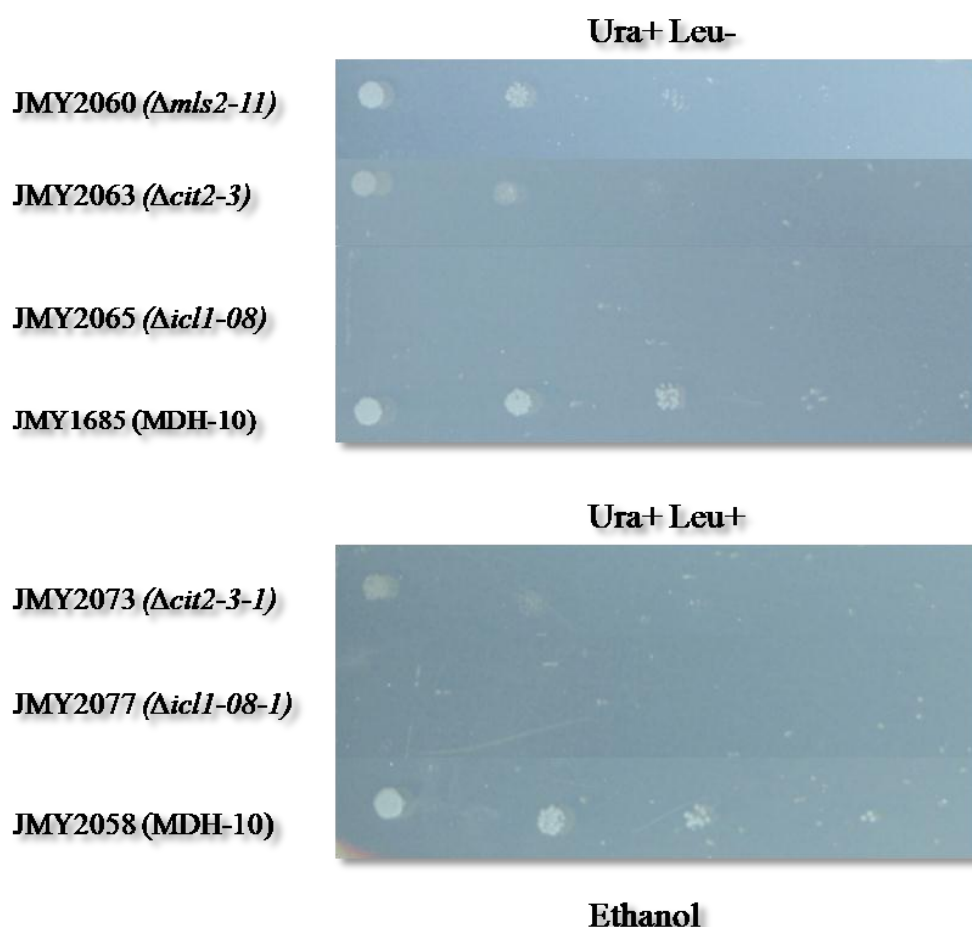


Figure 48 : Résultats de tests de croissance sur milieu éthanol des souches $\Delta cit1$ et $\Delta icl1$. La souche $\Delta icl1$ est incapable de croître sur éthanol lorsqu'elle est auxotrophe et prototrophe pour la leucine. La délétion de *CIT2* affecte légèrement la croissance de *Y. Lipolytica* sur éthanol.

Les tests de croissance ont été également réalisés avec les mutants $\Delta mls1$, $\Delta cit2$, $\Delta icl1$ et MDH-10. L'incapacité de croissance de la souche $\Delta icl1$ auxotrophe sur milieu glucose est rétablie après transformation avec *LEU2*. Néanmoins la délétion de *ICL1* affecte légèrement la croissance des mutants sur glucose (Figure 49).

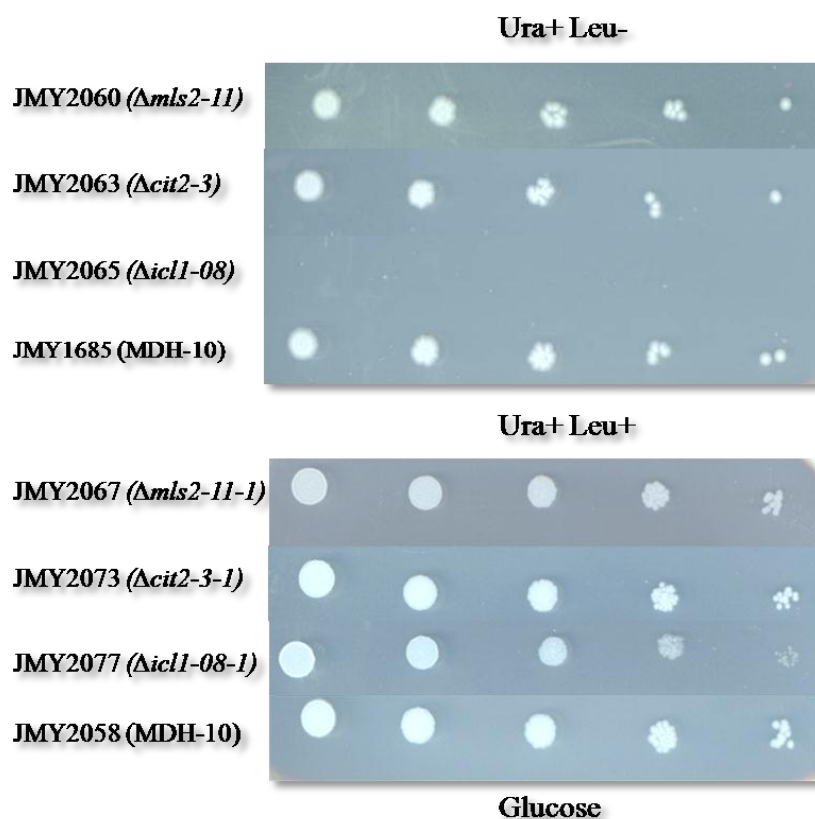


Figure 49 : Résultats de tests de croissance sur milieu glucose des souches $\Delta mls1$, $\Delta cit1$, $\Delta icl1$ et MDH-10 au bout de 3 jours de culture. La souche $\Delta icl1$ est incapable de croître sur glucose lorsqu'elle est auxotrophe pour la leucine. La délétion du gène *ICL1* affecte légèrement la croissance sur glucose lorsque la souche est prototrophe.

Les mutants du cycle du glyoxylate ont été également mis en culture sur milieu YNB + tributyrine. La souche disruptée pour le gène *ICL1* (auxotrophe et prototrophe pour la leucine) est incapable de croître sur tributyrine alors que celle disruptée du gène *MLS1* a une croissance similaire à celle de la souche de référence MDH-10 (Figure 50). La souche disruptée pour le gène *CIT2* croît normalement sur milieu tributyrine néanmoins le halo d'hydrolyse apparaît plus tardivement lorsqu'elle est comparée à la souche MDH-10.

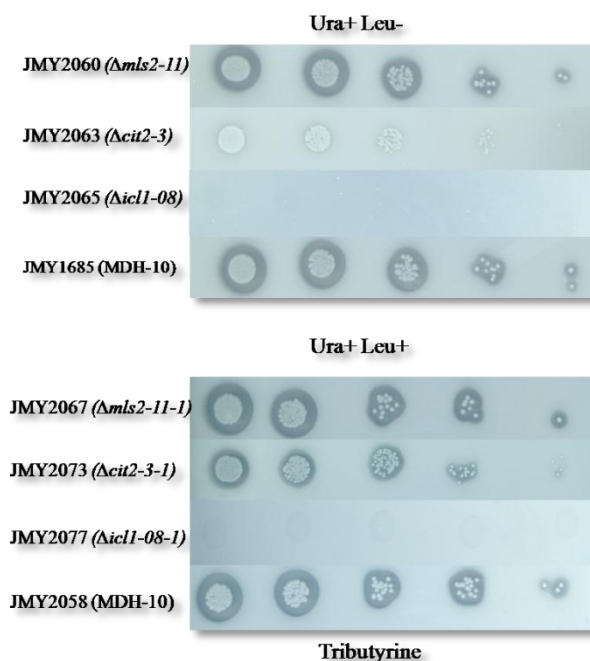


Figure 50 : Résultats de tests de croissance sur milieu tributyrine des mutants du cycle du glyoxylate auxotrophes pour la leucine.

Une culture des mutants du cycle du glyoxylate a été également effectuée sur milieu YNB + acide oléique. La souche disruptée pour le gène *ICL1* est incapable de croître sur acide oléique (Figure 51) contrairement aux mutants $\Delta cit2$ et $\Delta mIs1$. Ces deux mutants ont une croissance normale sur acide oléique comme la souche contrôle MDH-10.



Figure 51 : Résultats de tests de croissance sur milieu acide oléique des mutants du cycle du lyoxylate auxotrophes et prototrophes pour la leucine.

DISCUSSION.

DISCUSSION

A. Localisation de Dga1p et Lro1p par la fluorescence

Cette première partie du travail a consisté en la localisation des protéines Dga1p et Lro1p en fusion avec la protéine de fluorescence Yfp. La fusion de ces protéines avec Yfp n'a pas eu d'impact sur la croissance en comparaison avec les souches exprimant les protéines non étiquetées. Les protéines de fusion joueraient a priori leur rôle normal quand bien même elles sont exprimées en fusion avec Yfp.

La visualisation au microscope des souches de levures exprimant les protéines de fusion a montré que la protéine de fusion Dga1p-Yfp est localisée dans les corps lipidiques et dans les microsomes. Ceci est en accord avec le modèle de **Czabany et al., (2006)**. Selon leur modèle la protéine Dga1p est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les corps lipidiques chez *S. cerevisiae*. Dga1p contribuerait donc non seulement à la formation des corps lipidiques mais aussi aiderait à l'augmentation de leur taille.

La protéine de fusion Lro1p-Yfp quant à elle a été retrouvée dans les corps lipidiques, les microsomes et la bicouche phospholipidique qui constitue la membrane cytoplasmique de la levure *Y. lipolytica*. Ceci diffère légèrement du modèle de *S. cerevisiae*. En effet, chez cette levure Lro1p serait localisée uniquement dans la membrane du réticulum endoplasmique. Chez *Y. lipolytica* on retrouve la protéine Lro1p dans la membrane plasmique. Cette enzyme qui utilise comme donneur d'acyl la phosphatidylcholine (phospholipide) qui est une composante de la membrane plasmique, pourrait bien se retrouver également à ce niveau.

Plusieurs perspectives s'ouvrent à la suite des résultats que nous avons obtenus. Les souches exprimant les protéines en fusion avec la Yfp pourraient être cultivées dans différents milieux de culture (glucose, acide oléique) et les cellules seraient récoltées à différents temps (phase exponentielle et phase stationnaire). Ces levures pourraient être broyées et le broyat pourrait être séparé en différentes fractions par le biais de procédés tels que la centrifugation ou l'électrophorèse. La localisation des protéines de fusion pourrait alors se faire par western blot sur les différentes fractions cellulaires.

Les gènes *DGA1* et *LRO1* pourraient être étiquetées par une autre étiquette telle que HA pour confirmer leur localisation par la protéine fluorescente Yfp. Avec les deux étiquettes (une étiquette pour chaque gène) nous pourrions mettre en évidence en même temps la localisation des deux protéines (colocalisation dans les corps lipidiques) dans la même souche de levure.

Ce travail sera incorporé dans l'étude sur les acyle transférase chez *Y. lipolytica*. En effet, les protéines de fusion pourraient être exprimées dans le quadruple mutant $\Delta dga1\Delta lro1\Delta are1\Delta are2$ pour mettre en évidence la complémentation ou non de l'activité de la protéine non étiquetée par la protéine de fusion. Récemment le gène *ARE2* impliqué dans la synthèse des lipides a été renommé *DGA2* car une analyse de ce gène a montré qu'il est plus proche de la famille des diacylglycérol acyle transférases (DGATs) que de celle des stérol acyle transférases (Beopoulos *et al.*, soumis).

B. La malate déshydrogénase et les gènes du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*

B.1. Etude de la malate déshydrogénase (MDH) chez *Yarrowia lipolytica*

B.1.1. Rappel sur les enzymes malate déshydrogénase

Les enzymes malate déshydrogénases (MDHs) catalysent l'interconversion de l'oxaloacétate et du malate. Cette interconversion est étroitement liée à l'oxydation ou la réduction des coenzymes NAD^+ et NADH , H^+ . L'oxaloacétate joue un rôle crucial dans de nombreuses voies métaboliques comme le fonctionnement du cycle de Krebs, le cycle du glyoxylate, la synthèse des acides aminés et la néoglucogenèse. L'oxaloacétate participe également au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction et à la facilitation de l'échange des métabolites entre le cytoplasme et des organites intracellulaires (Goward et Nicholls, 1994).

Il existe trois formes de malate déshydrogénases qui sont la malate déshydrogénase mitochondriale, la malate déshydrogénase cytoplasmique et la malate déshydrogénase peroxysomale. La levure *S. cerevisiae* possède ces trois formes de malate déshydrogénase codées par 3 gènes distincts qui sont *MDH1* (malate déshydrogénase mitochondriale), *MDH2* (malate déshydrogénase cytoplasmique) et *MDH3* (malate déshydrogénase peroxysomale) tout comme la majorité des levures hémiascomycètes.

Néanmoins il existe seulement deux gènes qui codent la malate déshydrogénase chez *Y. lipolytica*. Le premier gène YALI0D16753g est celui qui code la malate déshydrogénase mitochondriale et le second gène YALI0E14190g est celui auquel nous nous sommes intéressés dans notre étude. Ce second gène possède deux introns dont le deuxième en 3' du gène présente une particularité. En effet comme nous l'avons montré plus haut (Résultats), cet intron qui possède la séquence **TAGCTAG** en 3' peut être épissé de façon alternative au premier ou au deuxième TAG. Lorsque l'épissage se fait au premier TAG, la malate déshydrogénase a une séquence C-terminale P-A-N qui n'est pas une séquence d'adressage à un compartiment donné. Cette protéine reste donc dans le cytoplasme. En revanche lorsque

l'épissage se fait au deuxième TAG la malate déshydrogénase possède une séquence terminale A-K-I qui selon Aitchison *et al.* (1991) est une séquence d'adressage aux peroxysomes. Pour notre étude nous avons introduit au niveau du site d'épissage en 3' du gène YALI0E14190g, 9 différentes mutations dont deux correspondent à la suppression de l'intron de type peroxysomal ou cytoplasmique. Ces mutations ont été introduites pour comprendre le fonctionnement de ce gène chez *Y. lipolytica*. Ainsi le mutant JMY1699 (MDH-4) est celui dont la mutation introduite au niveau du gène YALI0E14190g supprime l'intron 2 jusqu'au premier TAG et par conséquent, celui qui produit une malate déshydrogénase cytoplasmique. Et le mutant JMY1711 (MDH-9) est celui qui supprime l'intron 2 jusqu'au deuxième TAG et qui produit donc une malate déshydrogénase peroxysomale.

B.1.2. Délétion de la malate déshydrogénase peroxysomale

B.1.2.1. Phénotype $\Delta mdh3$ chez *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, la délétion de *MDH3* (forme peroxysomale) entraîne une incapacité de croissance sur acide oléique (Roermund *et al.*, 1995). Puisque que pour l'utilisation des substrats hydrophobes comme l'acide oléique, la β -oxydation qui a lieu dans les peroxysomes est requise, les auteurs ont attribué cette absence de croissance à une perturbation de la β -oxydation. Cette perturbation serait due au fait que la malate déshydrogénase peroxysomale chez *S. cerevisiae* est impliquée dans la réoxydation du NADH intra peroxysomal en NAD^+ . Lorsque les cellules sont cultivées sur acide oléique, le mutant $\Delta mdh3$ qui ne produit plus de malate déshydrogénase peroxysomale est incapable de fournir du NAD^+ intra peroxysomal, nécessaire pour le fonctionnement de la β -oxydation. En l'absence de Mdh3p la réaction de conversion de l'oxaloacétate en malate (réaction réversible) ne peut plus se faire dans les peroxysomes alors que le NAD^+ est indispensable pour la β -oxydation. Si la délétion de *MDH3* entraîne une perturbation du déroulement normal de la β -oxydation cela montre clairement que Mdh3p est la seule enzyme peroxysomale chez *S. cerevisiae*. En revanche la croissance normale du mutant $\Delta mdh3$ sur les composés en C2 en milieu minimum signifie que le gène *MDH3* n'est pas impliqué dans le cycle du glyoxylate. Pour rappel, le cycle du glyoxylate est la voie métabolique qui est requise pour la croissance sur les composés en C2 (acétate et alcool). Le rôle majeur de Mdh3p est donc la régénération des cofacteurs NADH, pour la β -oxydation.

B.1.2.2. Phénotype de l'équivalent de $\Delta mdh3$ chez *Y. lipolytica*

Chez *Y. lipolytica*, le mutant JMY1699 (MDH-4), est celui dont la mutation introduite dans le gène YALI0E14190g correspond à un épissage au niveau du premier TAG qui générerait une protéine cytoplasmique. Il est donc l'équivalent du mutant $\Delta mdh3$ chez *S. cerevisiae*, celui qui ne possède plus d'activité malate déshydrogénase peroxysomale. Contrairement à son équivalent $\Delta mdh3$, le mutant JMY1699 (MDH-4), a une croissance normale lorsqu'il est cultivé en milieu acide oléique ce qui est en contradiction avec le phénotype auquel on s'attend. Nous avons aussi montré que le mutant JMY1699 (MDH-4) a une croissance normale sur les composés en C2 (acétate et éthanol) ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec son équivalent $\Delta mdh3$ chez *S. cerevisiae* (Van Roermund *et al.*, 1995).

Afin d'expliquer la croissance du mutant JMY1699 (MDH-4) sur l'acide oléique, nous avons émis deux hypothèses.

La première est que la malate déshydrogénase produite par ce mutant reste bien, comme prédit, dans le cytoplasme et qu'il existe dans ce cas une voie alternative qui fournirait du NAD⁺ pour le fonctionnement de la β -oxydation chez *Y. lipolytica* en cas de croissance sur acide oléique. Un argument en faveur de cette hypothèse est qu'aucun transcrit du gène YALI0E14190g n'a été trouvé dans la banque d'ADNc sur acide oléique alors que 10 et 20 ADNc ont été trouvés sur milieu riche respectivement en phase exponentielle et stationnaire (Mekouar *et al.*, 2010). Cela suggère que la forme peroxysomale de YALI0E14190p ne serait pas nécessaire pour la β -oxydation. S'il existe une activité enzymatique supplémentaire, nous ne la connaissons pas. Par contre des analyses transcriptomiques sur différents milieux pourront nous fournir des gènes candidats. Une première étude par séquençage de banques de cDNA a révélé de nombreux gènes fortement exprimés sur acide oléique qui ont une activité oxydoréductase. Ces gènes pourraient donc régénérer les cofacteurs.

La seconde hypothèse est que l'épissage du gène au niveau du premier TAG n'empêcherait pas l'importation de la malate déshydrogénase dans les peroxysomes. L'importation de cette malate déshydrogénase dans les peroxysomes pourrait s'expliquer par la présence au niveau de ce gène d'un autre signal d'adressage tel que PTS2 ou PTS3 (Brown et Baker, 2008). Les séquences PTS2 sont localisées en N-terminal de la protéine. Or la séquence N-terminale du gène YALI0E14190g ne correspond pas à la séquence consensus PTS2, R/K-L/V/I-XXXXX-H/Q-L/A (Lazarow, 2006). Donc ce serait plutôt un système

d'adressage de type PTS3 comme pour les gènes *POX1-6* pour lesquels aucune séquence d'adressage n'a été clairement définie (Brown et Baker, 2008).

On peut imaginer un autre système d'import qui ferait intervenir une protéine carrier portant un PTS1 ou un PTS2 qui formerait un complexe avec la protéine YALI0E14190p. Ce complexe pourrait permettre l'import de la protéine dépourvue de PTS. Il a été montré que la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) bactérienne dépourvue de sa séquence AKL d'adressage aux peroxysomes ne pouvait être importée dans les peroxysomes que lorsqu'elle forme un complexe homotrimérique avec des unités de chloramphénicol acétyltransférase portant un PTS1 (McNew et Goodman, 1994). Cela a été également montré pour le système PTS2. Un variant de la thiolase peroxysomale, tronqué en N-terminal donc dépourvu de PTS2 peut être transporté dans les peroxysomes si et seulement si il est coexprimé avec une thiolase complète avec son PTS2 (Glover *et al.* 1994). Dans notre cas il ne s'agirait pas d'un complexe homomérique mais hétéromérique. Pour tester cette hypothèse, on peut envisager deux approches. La première serait de faire un crible double hybride avec YALI0E14190g et la deuxième serait une coimmunoprécipitation après avoir tagué la protéine YALI0E14190p.

Si on s'arrête à la croissance du mutant JMY1699 (MDH-4) sur les composés en C2, l'étape du cycle du glyoxylate (conversion réversible du malate en oxaloacétate) catalysée par la malate déshydrogénase se passerait dans le cytoplasme mais pas dans les peroxysomes grâce à la malate déshydrogénase présente dans le cytoplasme (équivalent de Mdh2p). Ceci est normal car l'épissage a été effectué au premier TAG pour que le messenger produise une malate déshydrogénase qui reste dans le cytoplasme. Donc YALI0E14190g serait un gène du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*, comme chez *S. cerevisiae* et la présence de la malate déshydrogénase produite par ce gène dans les peroxysomes n'est pas requise pour sa croissance sur les composés en C2. Ainsi le mutant JMY1699 (MDH-4) utiliserait la malate déshydrogénase cytoplasmique pour sa croissance sur les composés en C2 et le malate produit par le cycle du glyoxylate serait donc transporté à l'extérieur du peroxysome pour sa conversion en oxaloacétate dans le cytoplasme.

La délétion de la forme peroxysomale ne suffit pas pour comprendre le fonctionnement de ce gène. Peut-être que la délétion de la forme cytoplasmique nous apportera plus d'informations.

B.1.3. Délétion de la malate déshydrogénase cytoplasmique

B.1.3. 1. Phénotype $\Delta mdh2$ chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae* la disruption de *MDH2* (codant la forme cytoplasmique de la malate déshydrogénase) entraîne une incapacité de croissance sur acétate ou éthanol en milieu minimum et la transformation d'une souche disruptée de *MDH2* par *MDH3 Δ SKL* permet de restaurer la croissance sur éthanol (McAlister-Henn et al, 1995). Cela montre que Mdh3p Δ SKL a la même fonction enzymatique que Mdh2p. Ces observations confirment que chez *S. cerevisiae* cette étape du cycle du glyoxylate ne se fait pas dans les peroxysomes et que Mdh2p est bien l'enzyme qui intervient dans le cycle du glyoxylate et non Mdh3p. L'étape de la conversion du malate en oxaloacétate du cycle du glyoxylate est une étape exclusivement cytoplasmique.

B.1.3.2. Phénotype $\Delta mdh2$ chez *Y. lipolytica*

La souche JMY1711 (MDH-9) de *Y. lipolytica* est celle dont la mutation correspond à un épissage de l'intron 2 du gène YALI0E14190g jusqu'au deuxième TAG donnant une séquence C-terminale AKI d'adressage aux peroxysomes. La souche JMY1711 (MDH-9) est donc l'équivalent du mutant $\Delta mdh2$ de *S. cerevisiae* c'est-à-dire dépourvue de malate déshydrogénase cytoplasmique. Nous avons montré que le mutant JMY1711 (MDH-9) a une croissance normale sur les composés en C2 contrairement au mutant $\Delta mdh2$. Ce deuxième phénotype vient confirmer le fait que le gène YALI0E14190g a un fonctionnement différent de celui de *MDH2* et *MDH3* de *S. cerevisiae*.

Si le mutant JMY1711 (MDH-9) a une croissance normale sur acétate ou éthanol cela peut s'expliquer par deux cas de figure.

Le premier cas serait que contrairement à ce qui se passe chez *S. cerevisiae* l'étape de la conversion du malate en oxaloacétate chez le mutant JMY1711 (MDH-9) serait une étape peroxysomale. Le malate issu du glyoxylate est transformé en oxaloacétate dans les peroxysomes par la malate déshydrogénase affectée à ce compartiment. Ce cas de figure va à l'encontre de la première hypothèse proposée ci-dessus.

Le deuxième cas serait que la malate déshydrogénase avec une séquence C-terminale A-K-I produite par le gène YALI0E14190g modifié est partiellement ou pas du tout adressée aux peroxysomes. Une explication serait que la localisation serait régulée par le milieu de culture. Ainsi, malgré sa séquence d'adressage peroxysomale cette protéine resterait dans le cytoplasme lorsqu'il est cultivé sur les composés en C2 et lorsque le mutant est cultivé sur

acide oléique, la protéine serait adressée aux peroxysomes pour répondre aux besoins de la cellule. En effet Kunze *et al.*, (2002) ont montré que la présence de Mls1p dans les compartiments cellulaires (cytoplasme et peroxysomes) était régulée ainsi par le milieu de culture. Le malate serait donc transporté à l'extérieur du peroxysome pour sa conversion en oxaloacétate dans le cytoplasme par la malate déshydrogénase restée dans le cytoplasme. Selon cette hypothèse cette étape du cycle du glyoxylate se ferait dans le cytoplasme.

A ce stade de notre travail nous ne pouvons pas trancher quant au fonctionnement de ce gène. Les mutations introduites dans le gène YALI0E14190g et les phénotypes que nous avons obtenus ne nous permettent pas de mesurer l'effet de l'absence de l'une des deux formes de malate déshydrogénases prédites, en fonction des substrats (acide oléique, acétate éthanol). On ne peut donc pas conclure que les mutations introduites influent effectivement sur l'adressage de la malate déshydrogénase produite par ce gène aux compartiments prédits. Des travaux complémentaires doivent être effectués pour mieux comprendre son fonctionnement.

Ce que nous proposons dans un premier temps c'est la délétion complète du gène YALI0E14190g, pour mesurer vraiment son influence dans la croissance sur différents milieux (acide oléique et substrats en C2). Si la délétion complète du gène empêche la croissance sur acide oléique cela nous permettrait d'écarter l'hypothèse selon laquelle il y aurait une alternative à la fourniture de NAD⁺ pour le fonctionnement de la β -oxydation dans les peroxysomes.

Pour comprendre la localisation, il faudrait poursuivre les investigations avec les souches MDH-4 (cytoplasmique), MDH-9 (peroxysomale) et MDH-10 (malate sauvage) dont les protéines ont été fusionnées avec les tags Yfp. Avec chaque souche, nous avons deux mutants donc au total six mutants qui sont YFP₁-MDH-4 et YFP₂-MDH-4, YFP₁-MDH-9, YFP₂-MDH-9 ainsi que les témoins YFP₁-MDH-10 et YFP₂-MDH-10 qui possèdent la malate déshydrogénase sauvage en fusion avec Yfp. Les mutants avec YFP1 sont ceux dont le gène YALI0E14190g possède l'intron1 et ceux avec YFP2 sont ceux dont le gène YALI0E14190g ne possède pas l'intron1.

On pourra cultiver ces mutants sur glucose, acide oléique, éthanol et acétate pour confirmer l'influence du milieu de culture sur la localisation de cette protéine. Avec les mutants YFP₁-MDH-10 et YFP₂-MDH-10 on pourra montrer si l'épissage se fait en fonction du milieu de culture ou non. Pour cela l'analyse des transcrits sera nécessaire. Avec les mutants YFP1-MDH-4 et YFP2-MDH-4 (malate déshydrogénase cytoplasmique) d'une part

et de l'autre les mutants YFP₁-MDH-9 et YFP₂-MDH-9, on pourra mesurer la relation entre l'épissage et la localisation effective des protéines.

B.2. Etude des mutants du cycle du glyoxylate : disruption de *MLS1*, *ICL1* et *CIT2*

Suite à l'étude de la malate déshydrogénase peroxysomale et cytoplasmique chez *Y. lipolytica*, nous avons constaté que le fonctionnement du cycle du glyoxylate et sa relation avec la β -oxydation étaient différents de ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*. Nous avons alors décidé d'étudier les phénotypes des mutants de délétion des autres gènes du cycle du glyoxylate.

B.2.1. Disruption de *ICL1*

L'isocitrate lyase est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'isocitrate en glyoxylate malate. Chez *S. cerevisiae* nous avons deux gènes *ICL1* et *ICL2* qui codent deux formes de cette enzyme. Aucune des deux isocitrate lyases n'a une séquence C-terminale d'adressage peroxysomale. Il a été montré que l'expression du gène *ICL1* est régulée par la source de carbone utilisée pour la croissance. Le gène *ICL1* est réprimé lors de la croissance sur glucose et fortement induit lors de la croissance sur les composés en C2. La délétion de *ICL1* chez *S. cerevisiae* entraîne une incapacité de croissance du mutant sur éthanol (Fernandez et al., 1991). Il a été également montré que le gène *ICL1* ne code pas une enzyme peroxysomale. En effet, dans des cellules cultivées sur acide oléique McCammon et al. (1990) n'ont pas détecté l'enzyme isocitrate lyase dans la fraction peroxysomale. Ceci signifie que ce gène n'est pas induit lors de la croissance sur acide oléique et est une enzyme cytoplasmique. Le gène *ICL2* code une 2-méthylisocitrate lyase impliquée dans le métabolisme du Propionyl-Coenzyme A (Luttik et al., 2000). Le 2-méthylisocitrate lyase intervient dans le cycle du méthyle citrate dans lequel le propionylCoA et l'oxaloacétate sont fusionnés pour donner le 2-méthylisocitrate. Le 2-méthylisocitrate lyase catalyse la conversion du 2-méthylisocitrate en succinate et pyruvate.

Chez *Y. lipolytica*, on retrouve également deux isocitrate lyases que codent les gènes YALI0C16885g et YALI0F31999g. Le gène YALI0C16885g est celui qui code une isocitrate lyase ayant une séquence d'adressage C-terminale peroxysomale (S-K-L) et qui a été disrupté dans notre étude.

La délétion du gène YALI0C16885g a entraîné une incapacité de croissance du mutant sur les composés en C2, comme montré par Barth et Scheuber (1993) mais également

sur acide oléique. L'absence de croissance du mutant sur éthanol et acétate montre bien que YALI0C16885g est un gène clé du cycle du glyoxylate comme chez *S. cerevisiae*. L'incapacité de croissance sur oléate montre que YALI0C16885g code une isocitrate lyase qui jouerait un rôle important dans la dégradation des acides gras. Sachant que YALI0C16885p est peroxysomale (motif SKL), elle interviendrait donc dans la β -oxydation ce qui n'est pas le cas chez *S. cerevisiae*. Ce rôle important est également montré par le fait que 106 transcrits du gène YALI0C16885g ont été trouvés dans la banque d'ADNc sur acide oléique contre 3 et 11 en milieu riche YPD respectivement en phase exponentielle et stationnaire (Mekouar *et al.*, 2010).

L'absence de croissance sur les deux catégories de milieux exclut l'implication du second gène, YALI0F31999g, dans la synthèse du glyoxylate et dans la β -oxydation. Le gène YALI0F31999g pourrait être l'équivalent de *ICL2* et coderait donc une 2-methylisocitrate lyase.

En ce qui concerne le gène YALI0C16885g, nous avons montré qu'il est indispensable pour la croissance sur acide oléique, acétate et éthanol mais des travaux complémentaires pourront être effectués pour analyser la régulation de ce gène. Nous proposons d'étiqueter cette protéine avec la Yfp pour suivre sa localisation en fonction des milieux de culture et pouvoir se faire une idée du déroulement global du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*.

B.2.2. Disruption de *MLS1*

La malate synthase est l'enzyme qui catalyse la conversion du glyoxylate en malate. Chez *S. cerevisiae* nous avons deux gènes qui codent la malate synthase qui sont *MLS1* et *MLS2* (DAL7). Les deux protéines Mls1p et Mls2p ont une séquence d'adressage peroxysomale S-K-L. Chez *Y. lipolytica* il existe également deux gènes qui sont YALI0D19140g et YALI0E15708g. Néanmoins seul le gène YALI0E15708g code une protéine qui a une séquence d'adressage aux peroxysomes et a donc été l'objet de notre étude.

Chez *S. cerevisiae* la disruption de *MLS1* entraîne une incapacité de croissance sur acide oléique et sur les composés en C2 (Kunze *et al.*, 2002). Ces auteurs ont montré que la localisation cellulaire de la malate synthase 1 (Mls1p) qui est une enzyme clé du cycle du glyoxylate dépend de la source de carbone utilisée pour la croissance des cellules. Lorsque les cellules sont cultivées en milieu acide oléique, la protéine Mls1p se retrouve dans les

peroxysomes alors que lorsqu'elles sont cultivées sur composés en C2, Mls1p se retrouve dans le cytoplasme.

Chez *Y. lipolytica* la disruption du gène YALI0E15708g n'a pas donné un phénotype particulier. Le mutant a une croissance normale sur acide oléique, acétate et éthanol. Cette observation nous montre que ce gène n'est pas indispensable au cycle du glyoxylate ni à la dégradation des acides gras. On peut donc supposer que le deuxième gène YALI0D19140g joue un rôle dans la croissance des mutants sur acide oléique et sur les composés en C2.

Si la réaction de conversion du glyoxylate en malate ne se fait pas dans les peroxysomes la cellule ne serait pas capable de fournir des CoA pour le fonctionnement de la β -oxydation. Il est donc indispensable que cette réaction se passe dans les peroxysomes lors de la croissance sur acide oléique. Mais comment expliquer que la protéine que code le gène YALI0D19140g, qui n'a pas de séquence d'adressage S-K-L puisse rentrer dans les peroxysomes ? Là encore, il pourrait y avoir un autre signal d'adressage aux peroxysomes qui permettrait à la protéine d'être importée dans ces compartiments cellulaires lors de la croissance sur acide oléique. Comme chez *S. cerevisiae*, l'implication de cette protéine dans le cycle du glyoxylate et dans la β -oxydation pourrait être régulée par le milieu de culture. Lorsque le mutant est cultivé sur acide oléique la malate synthase codée par le gène YALI0D19140g serait affectée aux peroxysomes. En revanche cette même protéine resterait dans le cytoplasme lors de la croissance sur les composés en C2.

Dans tous les cas la présence du deuxième gène YALI0D19140g ne nous permet pas de conclure sur l'implication du gène YALI0E15708g dans le cycle du glyoxylate. L'idéal serait de construire le mutant de délétion de YALI0D19140g et le double mutant en disruptant en même temps les gènes YALI0D19140g et YALI0D19140g pour avoir les informations claires et précises sur l'implication de la malate synthase dans le cycle du glyoxylate. On pourra aussi d'étiqueter les deux gènes pour montrer leur localisation cellulaire, en fonction des différents milieux de culture.

B.2.3. Disruption de *CIT2*

La citrate synthase est la protéine responsable de la conversion de l'oxaloacétate en citrate. Il existe 3 gènes *CIT1*, *CIT2* et *CIT3* qui codent cette enzyme chez *S. cerevisiae*. Chez cette levure seule le gène *CIT2* code une citrate synthase avec une séquence d'adressage aux peroxysomes (séquence S-K-L). Il a été montré que *CIT1* et *CIT3* codent des enzymes mitochondriales. Le gène *CIT1* code une citrate synthase mitochondriale alors que le gène *CIT3* code une 2-methylcitrate lyase.

Chez *Y. lipolytica* il y a deux gènes citrate synthase : YALI0E02684g et YALI0E00638g. Ces deux gènes ont été annotés comme les homologues des deux gènes mitochondriaux : le gène YALI0E02684g comme homologue de *CIT1* et le gène YALI0E00638g comme *CIT3*. Les annotations sont en accord avec les prédictions de localisation dans la mitochondrie par Mitoprot (Tableau 7 dans la partie resultats). A priori, chez cette levure il n'y aurait pas de citrate synthase peroxysomale sauf que l'une des protéines (YALI0E02684g) présente en plus du motif N-terminal d'adressage à la mitochondrie, un motif C-terminal LKL qui pourrait être un PTS1. Cette protéine pourrait avoir une double localisation mitochondriale et peroxysomale comme pour la catalase A (Cat1p) de *S. cerevisiae* (Petrova *et al.*, 2004). Nous avons donc choisi de disrupter ce gène.

Chez *S. cerevisiae* la disruption de *CIT1* inhibe la croissance sur acétate (Liao et butow, 1993) ce qui est normal car la délétion de tout gène du cycle du TCA entraine une perturbation de la croissance sur acétate (Vélot *et al.*, 1999). Contrairement à *CIT1*, la disruption de *CIT2* n'empêche ni la croissance sur acétate, ni la croissance sur acide oléique (Van Roermund *et al.*, 1995). La citrate synthase Cit2p n'est pas une enzyme indispensable pour le cycle du glyoxylate ni pour la β -oxydation chez cette levure.

Chez *Y. lipolytica*, nous avons montré à travers des tests en goutte, que la disruption du gène YALI0E02684g n'a pas d'effet sur la croissance en milieu glucose, ni sur acide oléique, ni sur acétate et éthanol. Le mutant a une croissance normale comparativement à la souche sauvage. Si le gène YALI0E02684g est annoté comme homologue de *CIT1* et que sa disruption n'a aucun effet sur la croissance sur les composés en C2 cela voudrait dire qu'il y ne serait pas le seul gène qui code une citrate synthase mitochondriale chez *Y. lipolytica*. La croissance de ce mutant sur les composés en C2 montre également que ce gène n'est pas impliqué dans le cycle du glyoxylate. La conversion de l'oxaloacétate en citrate pourrait donc être assurée par le deuxième gène YALI0E00638g. Le gène YALI0E02684g ne serait pas non plus indispensable pour la croissance sur acide oléique donc pas indispensable à la β -

oxydation. Il faudra disrupter le gène YALI0E00638g et si en absence de ce gène on observe toujours une croissance normale sur les composés en C2 et acide oléique, il faudra disrupter les deux gènes afin de comprendre leur implication dans le cycle du glyoxylate et dans la β -oxydation.

L'implication de la citrate synthase dans la β -oxydation est de fournir des CoA. Cependant, ce n'est pas la seule réaction enzymatique qui en fournit. Chez *S. cerevisiae* la malate synthase (Mls1p) et l'acétyl carnitine transférase (Cat2p) régénèrent aussi les acétyl-CoA dans les peroxysomes. Il faudrait observer chez *Y. lipolytica* le phénotype du double mutant $\Delta CAT2/\Delta CIT2$ qui chez *S. cerevisiae* ne pousse plus sur acide oléique (Van Roermund *et al.*, 1995). Sachant que la délétion de *MLS1* ne donne pas de phénotype chez *Y. lipolytica*, il faudrait également construire le triple mutant $\Delta CAT2/\Delta CIT2/\Delta MLS1$.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de la première partie de cette étude nous nous sommes attachés à la localisation des gènes de la voie de synthèse et de dégradation des triglycérides. Ce travail nous a permis de nous faire une idée de la localisation des protéines Lro1p et Dga1p dans la cellule. Les résultats partiels que nous avons obtenus sont en accord avec ceux prédits par la littérature. Les enzymes Lro1p et Dga1p qui interviennent dans la dernière étape de la synthèse des lipides sont bien localisées dans les corps lipidiques. Ce travail doit être complété avec l'étude des deux autres protéines Are1p et Dga2p. L'une des perspectives qu'offre cette partie du travail sur la localisation des protéines impliquées dans la voie de synthèse des lipides, est la possibilité d'identification des partenaires et leur fonctionnement.

Dans la deuxième partie nous nous sommes axés sur le fonctionnement du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*. Nous avons montré que le cycle du glyoxylate et la β -oxydation ne fonctionnent pas comme chez *S. cerevisiae*, la levure la plus étudiée pour les cycles de Krebs et du glyoxylate. Les gènes du cycle du glyoxylate que nous avons étudié n'ont pas toujours les fonctions attendues dans la cellule. La construction du mutant exprimant la malate déshydrogénase cytoplasmique n'a pas eu d'impact sur la β -oxydation et celle du mutant exprimant la malate déshydrogénase peroxysomale n'a pas eu d'influence sur la croissance sur les composés en C2. Ce travail doit être complété par de nombreuses expérimentations pour comprendre le fonctionnement de ce métabolisme. Notamment nous voulons comprendre pourquoi YALI0C16885g (équivalent de *ICL1*) est un gène essentiel pour la croissance sur les composés en C2 et sur acide oléique et constitue donc un gène clé du cycle du glyoxylate et un gène indispensable à la β -oxydation. Est-ce que le glyoxylate produit par *ICL1* est un intermédiaire indispensable pour d'autres activités enzymatiques qui permettraient de régénérer les cofacteurs ou fournir des Coenzymes A pour la β -oxydation ? Quels sont le rôle et l'activité des gènes YALI0E15708g (équivalent de *MLS1*) et YALI0E02684g (équivalent de *CIT1*) qui ne sont pas indispensables au cycle du glyoxylate et à la β -oxydation ? Les expériences complémentaires que nous avons proposées dans la discussion nous permettront de donner un schéma du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*.

Ce travail est le début d'une exploration des protéines impliquées dans la voie du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*. Elle nous a permis d'avoir une idée du fonctionnement de ce cycle.

L'une des perspectives serait une possibilité d'identification d'autres protéines qui pourraient réguler la β -oxydation et le cycle du glyoxylate. Elle pourrait consister à la

recherche des gènes dont la présence ne permet pas d'obtenir des phénotypes après la disruption des gènes impliqués dans le cycle du glyoxylate ou dans la β -oxydation. L'identification de ces protéines pourrait se faire par l'analyse des données des banques ADNc existantes et la construction d'autres banques ADNc dans d'autres conditions. Une alternative serait de procéder à la recherche des protéines dont la séquence pourrait présenter de fortes homologies avec les différentes protéines impliquées dans la voie du glyoxylate et de la β -oxydation.

Ce travail ouvre des perspectives sur l'étude du métabolisme central chez *Y. lipolytica* en relation avec la β -oxydation, et de façon plus large avec le métabolisme des lipides. La poursuite de ce travail renforcera *Y. lipolytica* comme modèle alternatif à *S. cerevisiae*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adham, A. R., Zolman, B. K., Millius, A. and Bartel, B. (2005)** Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in β -oxidation. *Plant J.* 41 : 859-874.
- Aitchison, J. D., Murray, W. W. and Rachubinski, R. A., (1991).** The Carboxyl-terminal Tripeptide Ala-Lys-Ile Is Essential for Targeting *Candida tropicalis* Trifunctional Enzyme to Yeast Peroxisomes. *J. Biol.Chem.* 266 : 23197-23203.
- Akiyama, S. I., Suzuki T., Sumino, Y., Nakao Y. and Fukada, H. (1973).** Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. *Agric Biol Chem* 37: 879-884.
- Alloue, W. A., Destain, J., El Medjoub, T., Ghalfi, H, Kabran, P. and Thonart P. (2008).** Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Appl Biochem Biotechnol.* 150:51-63.
- Athenstaedt, K. and Daum, G. (1997)** Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 7611-6.
- Athenstaedt, K. and Daum, G. (1999)** Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 266: 1-16.
- Athenstaedt, K., Daum, G., (2005).** Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J. Biol.Chem.* 280 37301–37309.
- Atkinson, K. D., Jensen, B., Kolat, A. I., Stmn, E. M., Henry, S. A. and Fogel, S. (1980).** Yeast mutants auxotrophic for choline or ethanolamine. *J Bacteriol.* 141: 558-64.
- Banaszak, L. J., and I. A. Bradshaw. 1975.** Malate dehydrogenases In P. D. Boyer (ed.), The enzymes, vol. 11A. *Academic Press, Inc.* 369-396.
- Barnes, L. D., Kuehn, G. D., Atkinson, D.E. (1971).** Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. Purification and some properties. *Biochemistry.* 10: 3939-44.
- Barth G. and Gaillardin, C. (1997).** Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev.* 19: 219-237.
- Barth, G and Weber, H. (1983).** Genetic studies on the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. Inactivation and mutagenesis. *Z Allg Mikrobiol.* 23 : 147-57.
- Barth, G., Beckerich, J.M., Dominguez, A., Kerscher, S., Ogrydziak, D., Titorenko, V., Gaillardin C. (2003)** Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. In Functional Genetics of industrial yeasts (de-Winde H., ed.); *Topics in Current Genetics* vol. 1: 227-271, Springer Verlag, Berlin, Germany.

- Barth, G. and Scheuber, T. (1993).** Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol Gen Genet.* 241: 422-30.
- Bassel, J. and Mortimer, R. (1973)** Genetic analysis of mating type and alkane utilization in *Saccharomycopsis lipolytica*. *J Bacteriol.* 114. :894-6.
- Bassel, J., Warfel, J. and Mortimer, R. (1971).** Complementation and genetic recombination in *Candida lipolytica*. *J Bacteriol.* 108 : 609-11.
- Beckerich, J. M., Lambert, M. and Gaillardin, C. (1994).** LYC1 is the structural gene for lysine N-6-acetyl transferase in yeast. *Curr Genet.* 25: 24-9
- Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M. T, Hapala, I., Papanikolaou, S, Chardot, T. and Nicaud JM. (2008).** Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 74: 7779-89.
- Berninger, G., Schmidtchen, R., Casel, G., Knörr, A., Rautenstrauss, K., Kunau, W. H. and Schweizer E. (1993).** Structure and metabolic control of the *Yarrowia lipolytica* peroxisomal 3-oxoacyl-CoA-thiolase gene. *Eur J Biochem.* 216: 607-13.
- Birktoft, J. J., and Banaszak, L. J. (1983).** The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 258: 472-482.
- Birktoft, J. J., Fernley, R. T., Bradshaw, R. A. and Banaszak, L J.. (1982).** Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6166-6170.
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuveglise, C., Munsterkötter, M., Guldener, U., Mewes, H. W., Van Helden, J., Dujon, B. and Gaillardin C. (2003)** Molecular Evolution of Eukaryotic Genomes : Hemiascomycetous Yeast Spliceosomal Introns. *Nucl. Acids Res.* 31: 1121-1135.
- Brown, L. A. and Baker A. (2008).** Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Mol Membr Biol.* 25: 363-75.
- Carman, G. M. (1997).** Phosphatidate phosphatases and diacylglycerol pyrophosphate phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1348 : 45-55.
- Carman, G. M. and Han, G. S. (2006).** Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci.* 12: 694-9.

- Carman, G. M. and Henry, S. A. (1999).** Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. *Prog Lipid Res.* 38 : 361-99.
- Carman, G. M. and Henry, S. A. (2007).** Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 282 : 37293-7.
- Carman, G., M. and Zeimet, G. M. (1996).** Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . *J Biol Chem* 271: 13293-13296.
- Casaregola S., Neuvéglise, C., Bon, E., Gaillardin, C. (2002)** Ylli, a family of LTR-less retrotransposons in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 664-677.
- Casaregola, S., Neuvéglise, C., Lépling, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker P., Gaillardin C. (2000)** Genomic exploration of hemiascomycetous yeasts. - 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS letters* 487: 95-100.
- Cases, S., S. J. Smith, Y. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusi, 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. USA* 95: 13018–13023.
- Chang, C.C.Y., Huh, H.Y., Cadigan, K. M. and Chang, T.Y. (1993).** Molecular cloning and functional expression of human acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biol.Chem.* 268 20747–20755.
- Chang, Y. F., Carman, G. M. (2008).** CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res.* 47: 333-9.
- Christiansen, K. (1978).** Triacylglycerol synthesis in lipid particles from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim Biophys Acta.*; 530(1):78-90.
- Conder, M. J., Ko Y. and McFadden, B. A. (1988).** Purification of isocitrate lyase from *Escherichia coli* and watermelon using fast protein liquid chromatography. *Prep biochemistry* 18: 431-442.
- Contreras-Shannon, V., Lin, A. P., McCammon, M. T. and McAlister-Henn L. (2005).** Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem.* 280 : 4469-75.
- Cooper, T.G. (1982).** The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 39-99.
- Cruz, C. M., Martinez, C., Buchala, A., Metraux, J. P. and Leon, J. (2004).** Gene-specific involvement of β -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 85-94.

- Cui, Z. and Houweling, M. (2002).** Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1585: 87-96.
- Cupp, J. R., M and Alister-Henn, L. (1992).** Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 267: 16417-23.
- Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G. (2006).** Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast *Biochim Biophys Acta.* 1771: 299-309.
- Czarnecka H, Yokoyama S. (1993).** Regulation of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction by acyl acceptors and demonstration of its "idling" reaction. *J Biol Chem.* 268: 19334-40.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. and Stymne S. (2000).** Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6487–6492.
- Datta, A., Merz, J. M. and Spivey H. (1985).** Substrate channeling of oxalacetate in solid-state complexes of malate dehydrogenase and citrate synthase. *J. Biol. Chem.* 260: 15008-
- Daum G., Wagner A., Czabany T. and Athenstaedt K. (2006).** Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 89: 243-8.
- Daum, G. (1985).** Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 1-42.
- Daum, G., Tuller, G., Nemec, T., Hrastnik, C., Balliano, G., Cattel, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C. et al. (1999).** Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15: 601-614.
- Davidow LS, O'Donnell MM, Kaczmarek FS, Pereira DA, DeZeeuw JR, Franke AE. (1987).** Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 169:4621-9.
- Delaissé, J. M., Martin, P., Verheyen-Bouvy, M. F. and Nyns, E. J. (1981).** Subcellular distribution of enzymes in the yeast *saccharomycopsis lipolytica*, grown on n-hexadecane, with special reference to the omega-hydroxylase. *Biochim Biophys Acta.* 676: 77-90.
- Dennis, E. A., and Kennedy, E. P. (1972).** Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J. Lipid Res.* 13: 263-267.
- Dircks, L. and Sul, H.S. (1999).** Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 38: 461-79.
- Dircks, L. K. and Sul, H. S. (1997).** Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1348: 17-26.

- Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D. N. and Reue, K. (2007).** Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem.* 282:3450-7.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N, Frangeul, L., Aigle, M, Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S, Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Cauderon, B., Confanioleri, F., de Daruvar A., Despons, L, Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hennequin, C., Jauniaux, N, Joyet P., Kachouri, R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma L., Muller, H., Nicaud, JM., Nikolski, M., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. and Souciet, J. L., 2004.** Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35-44
- Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J.M., Atzpodien, W. and Holzer, H. (1969).** Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 10: 83-9.
- Eastmond, J.P. (2006).** Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds, *Plant Cell* 18: 665–675.
- Eastmond, P. J., Hooks, M. and Graham, I. A. (2000).** The Arabidopsis acyl-CoA oxidase gene family, *Biochem. Soc. Trans.* 28: 755-757.
- Ensign, S. A. (2006).** Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Mol Microbiol.* 61: 274-6.
- Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Frohlich, K. U. and Kunau, W. H. (1991).** Pas1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* 64: 499-510.
- Exton, J. H. (1994).** Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1212: 26-42.
- Fernandez, E., Moreno, F. and Rodicio, R. (1992)** The ICL1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J. Biochem* 204(3):983-90.
- Fernandez, E., Moreno, F. and Rodicio, R. (1992).** The ICL1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 204: 983-90
- Fickers P, Fudalej F, Nicaud JM, Destain J, Thonart P. (2005).** Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol.* 115:379-86.

- Fickers, P., Benetti, P-H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S. and Nicaud, J-M. (2005).** Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5: 527-543.
- Fraenkel, D.G. (1982).** The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1-37.
- Freestone, P., Grant, S., Toth, I. and Norris, V. (1995).** Identification of phosphoproteins in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 15: 573-580.
- Fujiki, Y. (2000).** Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* 476: 42-46.
- Gaillardin, C. and Heslot, H. (1988).** Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol* 28: 161-174.
- Gaillardin, C. M., Poirier, L., Ribet, A. M. and Heslot, H. (1979).** General and lysin specific control of saccharopine dehydrogenase levels in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochimie* 61 : 473-82.
- Gaillardin, C., Fournier, P., Sylvestre, G. and Heslot H. (1976).** *Mutants of Saccharomycopsis lipolytica* defective in lysine catabolism. *J Bacteriol.* 125: 48-57.
- Gainey, L. D., Connerton, I.F., Lewis, E. H., Turner, G. and Ballance, D. J. (1992).** Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of *Aspergillus nidulans* (acuD) and *Neurospora crassa* (acu-3). *Curr Genet.* 21: 43-7
- Gangar, A., Karande, A., and Rajasekharan, R. (2001).** Isolation and localization of a cytosolic 10S triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast. *J. Biol. Chem.* 276:10290-10298.
- Gangloff, S. P., Marguet, D. and Lauquin, G. J (1990).** Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol Cell Biol.* 10: 3551-61.
- Gardner, P. R. (1997).** Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci. Rep.* 17 : 33-42.
- Ghisla, S. and Thorpe, C. (2004).** Acyl-CoA dehydrogenases: a mechanistic overview. *Eur. J. Biochem.* 271: 494-508.
- Gibson, N. and McAlister-Henn, L. (2003).** Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem.* 278: 25628-36.
- Glover JR, Andrews DW, Subramani S, Rachubinski RA. (1994).** Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals

conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. *J Biol Chem.* 269:7558-63.

Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. and Subramani, S. (1990) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 108: 1657-64.

Graybill, E. R., Rouhier, M. F., Kirby, C. E. and Hawes J. W. (2007). Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 465: 26-37.

Grönke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Müller, G., Jäckle, H., Kühnlein, R.P., (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab.* 323-330.

Han, G. S., Siniosoglou, S. , Carman, G. M. (2007). The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity. *J Biol Chem.* 282: 37026-35.

Han, G. S., Wu, W. I. and Carman, G.M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem.* 281: 9210-8.

Han, G-S., Wu, W-I. and Carman, G. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 281: 9210–9218.

Hartig, A., Simon, M. M., Schuster, T., Daugherty, JR., Yoo, HS. and Cooper T.G. (1992). Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 20: 5677–5686.

Haselbeck, R. J. and McAlister-Henn, L. (1991). Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 266: 2339-45.

Henke, B., Girzalsky, W., Berteaux-Lecellier, V. and Erdmann, R. (1998). IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 273: 3702-11.

Hobbs, D. H., Lu, C. and Hills, M. J. (1999). Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Lett.* 452: 145–149.

Jain, S., Stanford, N., Bhagwat, N., Seiler, B., Costanzo, M., Boone, C. and P. Oelkers. (2007). Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282: 30562–30569.

Jandrositz, A., Petschnigg, J., Zimmermann, R., Natter, K., Scholze, H., Hermetter, A., Kohlwein, S.D. and Leber, R. (2005). The lipid droplet enzyme Tgl1p hydrolyzes both steryl

esters and triglycerides in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1735: 50-8.

Jenkins, T. M. and Weitzman, P. D. J. (1986). Distinct physiological roles of animal succinate thiokinases. Association of guanine nucleotide-linked succinate thiokinase with ketone body utilization, *FEBS Lett.* 205, 215-218.

Jenkins, T. M. and Weitzman, P. D. J. (1988). Physiological roles of animal succinate thiokinases. Specific association of the guanine-linked enzyme with haem biosynthesis, *FEBS Lett.* 230: 6-8.

Jia, Y. K., Bécam, A. M. and Herbert, C. J. (1997). The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase. *Mol Microbiol.* 24: 53-9.

Joh, T., Takeshima, H., Tsuzuki, T., Setoyama, C., Shimada, K., Tanase, S., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. and Morino, Y. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262: 15127-15131.

Johnson, B., S. J. Nelson, and Brown, C. M. (1972). Influence of glucose concentration on the physiology and lipid composition of some yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* 38:129–136.

Kamiryo, T., Mishina, M., Tashiro, S. I. and Numa, S. (1977). *Candida lipolytica* mutants defective in an acyl-coenzyme A synthetase: isolation and fatty acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 4947-50.

Kamisaka, Y., and Nakahara, T., (1994). Characterization of the diacylglycerol acyltransferase activity in the lipid body fraction from an oleaginous fungus. *J. Biochem.*

Kamisaka, Y., Mishra, S. and Nakahara, T. (1997). Purification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from the lipid body fraction of an oleaginous fungus. *J. Biochem. (Tokyo)* 121: 1107–1114.

Kamisaka, Y., N. Noda, T. Sakai, and K. Kawasaki. (1999). Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispota*. *Biochim. Biophys. Acta* 1438: 185–198.

Kavanaugh-Black, A., Connolly, D. M., Chugani, S. A. & Chakrabarty, A. M. (1994). Characterization of nucleoside-diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: complex formation with succinyl-CoA synthetase, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 5883-5887.

Kent, C., (1995). Eukaryotic phospholipid biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 64: 315–343.

Kerscher S, Durstewitz G, Casaregola S, Gaillardin C, Brandt U. (2001). The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genomics*.2:80-90

- Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C. and Brandt, U. (2001).** The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genom* 2: 80-90.
- Keys, D. A. and McAlister-Henn L. (1990).** Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 172: 4280-7.
- Kiel, J., Veenhuis, M., van der Klei, I. J. (2006).** PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* 7:1291-1303.
- Kim KS, Rosenkrantz, M. S. and Guarente, L. (1986).** *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional citrate synthase genes. *Mol Cell Biol.* 6: 1936–1942.
- Kim, J.J. and Miura, R. (2004).** Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. *Eur. J. Biochem.* 271: 483-493.
- Köffel, R., Tiwari, R., Falquet, L., Schneider, R. (2005).** The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for sterol ester hydrolysis. *Mol Cell Biol.* 25: 1655-68.
- Kostner, G.M. and Laggner, P. (1989).** Chemical and physical properties of lipoproteins, in: J.C. Fruchart, J. Sheperd (Eds.), *Clinical Biochemistry-Human Plasma Lipoproteins*, Walter de Gruyter, Berlin, , pp. 23–54.
- Kovac L, Gbelska I, Poliacova V, Subik J, Kovacova V. (1980)..** *Eur. J. Biochem.* 111: 491-501
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu Y. (1986).** Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. III. Genetic evidence for utilization of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine as precursors. *J. Biol. Chem.* 261: 5795-98.
- Kujau, M., Weber, H. and Barth, G. (1992).** Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase. *Yeast.* 8: 193-203.
- Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A. and Gurvitz, A. (2002)** Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur J Biochem* 269: 915–922.
- Kurtzman, C. P. (2005).** New species and a new combination in the *Hyphopichia* and *Yarrowia* yeast clades. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 88: 121-30.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998)** Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73: 331-71.

- Lardizabal, K. D., Hawkins, D. and Thompson, G. A. (2000).** Diacylglycerol acyltransferase proteins. U.S. patent WO0001713
- Lazarow, P. B. (1993).** Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends Cell Biol* 3: 89-93.
- Leber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F. and Daum, G., (1994).** Characterization of lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1421–1428.
- Lehner, R. and Kuksis, A. (1993).** Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2 (2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J. Biol. Chem.* 268: 8781–8786.
- Lehner, R. and Kuksis, A. (1996).** Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res.* 35: 169-201.
- Lewin, A. S., Hines, V. and Small, G. M. (1990).** Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Mol Cell Biol.* 10: 1399–1405.
- Li, G., S. Chen, M. N. Thompson, and Greenberg, M. L. (2007).** New insights into the regulation of cardiolipin biosynthesis in yeast: implications for Barth syndrome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 432–441.
- Liao, X. and Butow, R.A., (1993)** RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72: 61-71.
- Lill, R and Neupert, W. (1996).** Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* 6: 56-61.
- Lopez-Boado, Y., Herrero, P., Fernandez, M. T., Fernandez, R. and Moreno, F. (1988).** Purification of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 4: 41-46.
- Lorenz, M. C. and Fink, G. R. (2001)** The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 412: 83-6.
- Luo, Y. S., Nicaud, J. M., Van Veldhoven, P.P., Chardot, T. (2002).** The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. *Arch Biochem Biophys* 407: 32-8.
- Luo, Y. S., Wang, H. J., Gopalan, K. V., Srivastava, D. K., Nicaud, J. M., Chardot, T. (2000).** Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Arch Biochem Biophys.* 384: 1-8.
- Luo, Y., H. 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*. *Yarrowia lipolytica. Arch. Biochem. Biophys.* 384: 1-8.

- Luo, Y., Nicaud, J.-M., van Veldhoven, P. and T. Chardot. (2002).** The acyl-CoA oxidases from the yeast *Y. lipolytica*: characterization of Aox2p. *Arch. Biochem. Biophys.* 403: 32-38.
- Luttik, MA., Kötter, P., Salomons, FA., van der Klei, IJ., van Dijken, JP. and Pronk, JT. (2000).** The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol* 182: 7007-13.
- Madzak, C, Gaillardin, C, Beckerich, JM. (2004)** Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* **109**: 63-81.
- Mann, C. J., Mitchell, T. & Nishimura, J. S. (1991)** Phosphorylation and formation of hybrid enzyme species test the 'half of sites' reactivity of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase, *Biochem.* 30: 1497-1503.
- Matoba S, Fukayama J, Wing RA, Ogrydziak DM. (1988)** Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol.* 8:4904-16.
- Matsuoka, M., Ueda, Y. and Aiba, S. (1980).** Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*. *J.Bacteriol.* 144: 692-7.
- Mauersberger, S., Wang, H., Gaillardin, C., Barth, G. and Nicaud, J-M. (2001).** Insertional mutagenesis in the *mn*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *J. Bacteriol.* 183: 5102-5109.
- McAlister-Henn, L. and Thompson, L. M. (1987)** Isolation and expression of the gene encoding yeast mitochondrial malate dehydrogenase. *J Bacteriol.* 169: 5157-66.
- McLean, J., Fielding, C., Drayna, D., Dieplinger, Baer, H., B., Kohr, W., Henzel, W., Lawn, R., (1986).** Cloning and expression of human lecithin:cholesterol acyltransferase cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 2335–2339.
- McMaster, C. R. and Bell, R. M. (1994).** Phosphatidylcholine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* : Regulatory insights from studies employing null and chimeric sn-1, 2-diacylglycerol choline and ethanolamine phosphotransferases. *J Biol Chem* 269: 28010-28016.
- Mekouar M, Blanc-Lenfle I, Ozanne C, Da Silva C, Cruaud C, Wincker P, Gaillardin C, Neuveglise C. (2010).** Detection and analysis of alternative splicing in *Yarrowia lipolytica* reveal structural constraints facilitating nonsense-mediated decay of intron-retaining transcripts. *Genome Biol.* 11: R65.

- Minard, K. I. and McAlister-Henn L. (1991).** Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol Cell Biol.* 11: 370-80.
- Mlickova, K., Luo, Y., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot T. and Nicaud, J-M. (2004).** Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Envir.Microbiol.*70. 3918-3924.
- Moczko, M., Bömer, U., Kübrich, M., Zufall, N., Hönliger , A and Pfanner, N. (1997).** The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. *Mol Cell Biol.* 17: 6574-84.
- Montet, D., Ratomahenina, R., Galzy, P., Pina, M. and Graille,. J. (1985).** A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in *Candida lipolytica*Candida lipolytica diddens and lodder. *Biotechnol. Lett.* 7: 733-736.
- Morzycka E, Sawnor-Korszyńska D, Paszewski A, Grabski J, Raczyńska-Bojanowska K. (1976).** Methionine overproduction by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 32:125-30.
- Müllner, H. and Daum, G. (2004).** Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol.*; 51: 323-47.
- Murata, N. and Tasaka, Y. (1997).** Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1348: 10-6.
- Murphy, D. J. (2001).** The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40: 325-438.
- Murphy, G. L. and Perry, J. J. (1984).** Assimilation of chlorinated alkanes by hydrocarbon-utilizing fungi. *Bacteriol.* 160: 1171-4.
- Nadra, K., de Preux Charles, A. S., Médard, J. J., Hendriks, W. T., Han, G. S., Grès, S., Carman, G. M., Saulnier-Blache, J. S., Verheijen, M. H., Chrast, R. (2008).** Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice. *Genes Dev.* 22: 1647-61.
- Nanjundan, M, Possmayer, F. (2003).** Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L1-23.
- Naumova E, Naumov G, Fournier P, Nguyen HV, Gaillardin C. (1993).** Chromosomal polymorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica* and related species: electrophoretic karyotyping and hybridization with cloned genes. *Curr Genet.* 23:450-4.
- Neugenot, V., Moulin, G., Dubreucq, E. and Bigey, F. (2002).** The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 269: 1734–1745.

- Nicaud JM, Fabre E, Gaillardin C. (1989).** Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr Genet.* 16:253-60.
- Nicaud, J. M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, G., Duboc, P., Niederberger, P. and C. Gaillardin.** 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 2: 371-379.
- Nikawa, J-I, Yamashita S. (1981).** Characterization of phosphatidylserine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and a mutant defective in the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 665: 420-26
- Nishimura, J. S. (1986)** Succinyl-CoA synthetase structure-functionrelationships and other considerations, *Adv. Enzymol.* 58, 141-172.
- Nitsch, R. M., Blusztajn, J. K., Pittas, A. G., Slack, B. E., Growdon, J. H. and Wurtman, R. J. 1992.** Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1671-1675.
- Nuttley, W. M., Brade, A. M., Gaillardin, C., Eitzen, G. A., Glover, J.R., Aitchison, J. D. and Rachubinski, R. A. (1993).** Rapid identification and characterization of peroxisomal assembly mutants in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 9: 507-517.
- Nyns, E. J., Auquiere, J. P., Chiang, N and Wiaux, A. L. (1967).** Comparative growth of *Candida lipolytica* on glucose and n-hexadecane *Nature.* 215: 177-8.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheime, J.T. and Sturley, S.L. (2002).** The *DGA1* gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast, *J. Biol. Chem.* 277: 8877–8881.
- Oelkers, P., Tinkelenberg, A., Erdeniz, N., Cromley, D., Billheimer, J. T. and Sturley, S. L. (2000).** A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J. Biol. Chem.* 275:15609–15612.
- Ogrydziak DM. (1988)** Development of genetic maps of non-conventional yeasts. *J Basic Microbiol.* 28:185-96.
- Ogrydziak DM. (1993):**Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol.* 13: 1-55. Review.
- Oogaki, M., Nakahara, T., Uchiyama, H. and Tabuchi, T. (1983).** Extracellular production of D-(+)-2- hydroxyglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* from glucose under thiamine-deficient conditions. *Agric Biol Chem* 47 : 2619-2624.
- Papanikolaou, S., and G. Aggelis. (2002).** Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technol.* 82: 43-49.

- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. and Nicaud, J. M. (2001).** Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie Leeuwenhoek* 80: 215-224.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Nicaud, J-M. and Aggelis, G. (2002).** Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 308-312.
- Patton-Vogt, J. L., Griac, P., Sreenivas, A., Bruno, V., Dowd, S., Swede, M. J. and Henry, S. A. (1997).** Role of the yeast phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein (Sec14p) in phosphatidylcholine turnover and INO1 regulation. *J. Biol. Chem.* 272: 20873–20883.
- Péterfy, M., Phan, Jack., Xu, P , Reue, K. (2001)** Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Gen* 27, 121-124
- Pfanner, N., Craig, E. A. and Meijer, M. (1994).** The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem Sci.* 19: 368-72.
- Pignède G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM. (2000).** Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 182:2802-10.
- Pillai, M. G., Certik, M., Nakahara, T. and Kamisaka, Y. (1998).** Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Biochim. Biophys. Acta* 1393: 128–136.
- Przybyla-Zawislak, B., Dennis, R. A., Zakharkin, S. O. and McCammon, M. T. (1998).** Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 258: 736-43.
- Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. (1994.).** Peroxisomal biogenesis: multiple pathways of protein import. *J Biol Chem.* 269: 30065-8.
- Purdue, P. E., Yang, X. and Lazarow, P. B. (1998).** Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol.* 143: 1859-69.
- Rajakumari, S., Grillitsch, K. and Daum, G. (2008).** Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog. Lipid Res.* 47: 157–171.
- 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.
- Regev-Rudzki, N., Karniely, S., Ben-Haim, N. N. and Pines O. (2005).** Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol Biol Cell.* 16: 4163-71

- Rickey, T.M. and Lewin, A. S. (1986).** Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast. *Mol Cell Biol.* 6: 488–493.
- Riekhof, W. R. and Voelker, D. R (2006).** Uptake and utilization of lyso-phosphatidylethanolamine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* 281: 36588–36596.
- Riekhof, W. R., Wu, J., Jones, J. L. and Voelker, D. R. (2007).** Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282: 28344–28352.
- Roderick, S. L., and Banaszak, L. J. (1986).** The three-dimensional structure of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase at 3.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261: 9461-9464.
- Roermund, C. W., Drissen, R., van Den Berg, M., Ijlst, L., Hettema, E. H., Tabak, H. F., Waterham, H. R., Wanders, R. J., (2001).** Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-chain fatty acid beta-oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21: 4321-9.
- Rosenkrantz, M., Alam, T., Kim, K. S., Clark, B. J., Srere, P. A. and Guarente, L. P. (1986).** Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes. *Mol Cell Biol.* 6: 4509–4515.
- Routaboul, J., Benning, C., Bechtold, N., Caboche, M. and Lepiniec, L. (1999).** The *TAG1* locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 831–840.
- Rudge, S. A., Pettitt, T. R., Zhou, C., Wakelam, M. J., Engebrecht, J. A. (2001).** SPO14 separation-of-function mutations define unique roles for phospholipase D in secretion and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158: 1431-1444.
- Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandager, L, Gustavsson, MH., Stahl U., Dahlqvist, A., Wiberg E., Banas A., Lenman, M., Ronne, H. and Szymne, S. (2002).** Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J. Biol. Chem.* 277: 6478–6482.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996).** Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* 271: 1519-26.
- Schillmiller, A. L., Koo, A. J. and Howe, G.A. (2007).** Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action *Plant Physiol.* 143: 812-824.
- Settlage, S. B., Wilson, R. F. and Kwanyuen, P. (1995).** Localization of diacylglycerol acyltransferase to oil body associated endoplasmic reticulum. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 399–407.

- Simms PC, Ogrydziak DM. (1981).** Structural gene for the alkaline extracellular protease of *Saccharomycopsis lipolytica*. *J Bacteriol.* 145: 404-9.
- Smith, S. J., Cases, S., Jensen, D. R., Chen, H. C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D. A., J. Raber, Eckel, R. H., and Farese Jr., R. V. (1999).** Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat. Genet.* 25: 87–90.
- Sorger, D. and Daum, G. (2002).** Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A: diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 184: 519-24.
- Sorger, D. and Daum, G. (2003).** Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 289-299.
- Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C. and Daum, G. (2004).** A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *J Biol Chem.* 279: 31190-6.
- Steffan, J. S. and McAlister-Henn, L. (1992).** Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 267: 24708-15.
- Steffan, J. S., Minard, K. I. and McAlister-Henn, L. (1992).** Expression and function of heterologous forms of malate dehydrogenase in yeast. *Arch Biochem Biophys.* 293: 93-102.
- Sugimoto, T., Kanamasa, S., Kato T. and Park, E. Y. (2009).** Importance of malate synthase in the glyoxylate cycle of *Ashbya gossypii* for the efficient production of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83: 529-39.
- Suissa, M., Suda, K. and Schatz, G. (1984).** Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. *EMBO J.* 3: 1773-81.
- Taketani, S., Osumi, T. and Katsuki H. (1978).** Characterization of sterol-ester hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 525: 87-92.
- Thompson, L. M., Sutherland, P., Steffan, J. S. and McAlister-Henn, L. (1988).** Gene sequence and primary structure of mitochondrial malate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 27: 8393-8400.
- Thompson, L.M. and McAlister-Henn, L. (1989).** Dispensable presequence for cellular localization and function of mitochondrial malate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 264: 12091-6.
- Titorenko, V.I., Nicaud, J.M., Wang, H., Chan H., Rachubinski, R.A., (2002).** Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol.* 156(3):481-494.

- Trajkovic-Bodennec, S., Bodennec, J. and Futerman, A. H. (2004).** Phosphatidylcholine metabolism is altered in a monocytederived macrophage model of Gaucher disease but not in lymphocytes. *Blood Cells Mol Dis* 33:77-82.
- Treton, B. Y. et Heslot, H. (1978).** Etude de quelques propriétés de l'aconitase de la levure *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric Biol Chem* 42 : 1201-1206.
- Triki, S., Demandre, C. and Mazliak P. (1999).** Biosynthesis of triacylglycérols by developing sunflower seed microsomes. *Phytochemistry* 52: 55–62.
- Van der Walt J. P., von Arx, J. A. (1980).** The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 46: 517-21.
- Van Roermund C.W., Elgersma Y., Singh. N., Wanders, R.J., Tabak, H.F., (1995).** The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD (H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14(14):3480-3486.
- Van Roermund, C. W., Hettema, E. H., Kal, A. J., van den Berg, M., Tabak, H. F. and Wanders, R. J. (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.
- Vanni, P., Giachetti, E., Pinzauti, G. and McFadden, A. (1990).** Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. *Comp Biochem Physiol B.* 95: 431-58.
- Vernis, L., Poljak, L., Chasles, M., Uchida, K., Casarégola, S., Käs, E., Matsuoka, M., Gaillardin, C., Fournier P. (2001).** Only centromeres can supply the partition function required for ARS function in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Biol.* 305, 203-217
- Voelker, D. R. and Frazier J. L. (1986).** Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell line requiring ethanolamine or phosphatidylserine for growth and exhibiting defective phosphatidylserine synthase activity. *J Biol Chem.* 261: 1002-8.
- Voelker, D.R. (2000).** Interorganelle transport of aminoglycerophospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486: 97-107.
- Wagner, A., Daum, G. (2005).** Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans.* 33:1174-7.
- Wagner, A., Grillitsch, K., Leitner, E. and Daum. G. (2009)** Mobilization of steryl esters from lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 118-24.
- Wang, H., Le Clainche, A., Le Dall, M.-T., Waché, Y., Pagot, Y., Belin, J.-M., Gaillardin, C. and Nicaud, J.-M. (1998).** Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 15:1373-1386.

- Wang, H., Le Dall, M.-T., Waché, Y., Laroche, P., Belin, J.-M., Gaillardin, C. and Nicaud, J.-M. (1999).** Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell. Biochem. Biophys.* 31: 165-174.
- Wang, H.J., Le Dall, M.T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Gaillardin, C. and Nicaud, J.M. (1999).** Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 181: 5140– 5148.
- Wang, T., Luo, Y. and Small G. M. (1994).** The POX1 gene encoding peroxisomal acyl-CoA oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* is under the control of multiple regulatory elements. *J Biol Chem.* 269: 24480-5.
- Weller, P. F., and Dvorac, A. M. 1994.** Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. *Allergy Clin. Immunol.* 94: 1152-1156.
- Wickerham, L. J., Kurtzman, C. P. and Herman, A. I. (1970)** Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science.* 167: 1141.
- Wolodko, W. T., Fraser M. E., James, M. N. & Bridger, W. A. (1994)** The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 269: 10883-10890.
- Xuan, J. W., Fournier, P., Declerck, N., Chasles, M. and Gaillardin, C. (1990).** Overlapping reading frames at the LYS5 locus in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol.* 10:4795-806.
- Yang, H., Bard, M., Bruner, D.A., Gleeson, A., Deckelbaum, R.J., Aljinovic, G., Pohl, T.M., Rothstein, R. & Sturley, S.L. (1996).** Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science* 272: 1353-1356.
- Yarrow, D. (1972).** Four new combinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.*;38: 357-60.
- Yu, C., Kennedy, J., Chang, C.C.Y. & Rothblatt, J.A. (1996)** Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 271: 24157-24163.
- Zhang, Y. and Rock, C. O. (2008).** Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res.*49: 1867–1874.
- Zheng, Z., and Zou, J. (2001).** The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*276: 41710-6.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Grünberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter A. and Zechner, R.**

(2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triacylglyceride lipase, *Science* 306: 1383–1386.

Zinser, E., Paltauf, F. and Daum, G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol.* 175: 2853-8.

Zolman, B. K., Yoder, A. and Bartel, B. (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* 156:1323-1337.

Zou, J., Wei Y., Jako, C., Kumar, A., Selvaraj, G. and Taylor, D. C. (1999). The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J.* 19: 645–653.

Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **18**:101–120.

Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein. S. D., Daum, G. (2000). Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 470(1):83-87.

Zweytick, D., Leitner, E., Kohlwein, SD., Yu, C., Rothblatt, J, Daum, G. (2000). Contribution of Are1p and Are2p to sterol ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.*267: 1075-82

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Aox: Acyl-CoA oxydase

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CL : corps lipidique

DAG : Diacylglycérol

DHAP : Di-hydroxy-acetone phosphate

FADH : Alcool déshydrogénase

G-3-P : Glycérol-3-phosphate

MAG : Monoacylglycérol

RE: Réticulum endoplasmique

TAG : Triacylglycérols

CDP : Cytosine diphosphate

CDP-DAG : Cytosine diphosphate diacylglycérol

CTP : Cytosine triphosphate

DAGAT : Diacylglycérol acyltransférase

ES : Esters de stérol

PAP : 3-sn-phosphatidate phosphohydrolase

AGAT : 1-acyle-sn-glycérol-3-phosphate acyle-transférase

Résumé

Titre: Métabolisme lipidique et cycle du glyoxylate chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

Résumé : La levure *Yarrowia lipolytica* est une levure oléagineuse capable de croître sur les substrats hydrophobes et les composés en C2 comme seul source de carbone.

La première partie de notre étude a permis de déterminer la localisation des protéines Lro1p et Dga1p impliquées dans la dernière étape de la synthèse des triglycérides. Ces protéines en fusion C-terminale avec la protéine fluorescente Yfp sont localisées dans la membrane cytoplasmique et à la surface des corps lipidique pour Lro1p et à la surface des corps lipidiques pour dga1p.

La deuxième partie de cette étude a permis d'avoir une idée plus précise du fonctionnement du cycle du glyoxylate chez la levure *Y. lipolytica*. Le premier objectif de cette deuxième partie de notre étude était de comprendre le fonctionnement du gène de la malate déshydrogénase chez cette levure. Contrairement à la levure *S. cerevisiae* qui possède trois gènes codant pour une malate déshydrogénase (cytoplasmique, mitochondriale et peroxysomale), *Y. lipolytica* ne possède que deux gènes. Le premier gène YALI0D16753g code une malate deshydrogénase mitochondriale et le second gène YALI0E14190g présente une particularité d'épissage alternatif. En effet, le gène YALI0E14190g, en fonction de l'épissage, code une malate déshydrogénase cytoplasmique (séquence C-terminale PAN) ou une malate déshydrogénase adressée aux peroxysomes (séquence C-terminale AKI). Nous avons introduit de mutations au niveau du site d'épissage pour influencer l'adressage et comprendre le fonctionnement de cette protéine, notamment son implication dans le cycle du glyoxylate. Les différentes mutations introduites n'ont pas eu d'impact sur la croissance des mutants sur les composés en C2 et sur acide oléique.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés aux autres gènes du cycle du glyoxylate. La disruption du gène *ICL1* (YALI0C16885g) a entraîné une incapacité de croissance du mutant sur acide oléique et sur les composés en C2 (éthanol, acétate). Néanmoins la suppression des autres gènes du cycle du glyoxylate à savoir YALI0E15708g (équivalent de *MLS1*) et YALI0E02684g (équivalent de *CIT2*) n'a pas eu d'impact lors de la croissance sur les milieux nécessitant l'implication cycle du glyoxylate.

Ces travaux nous ont permis d'acquérir une meilleure connaissance des gènes impliqués dans le cycle du glyoxylate et une compréhension partielle du fonctionnement du cycle du glyoxylate chez *Y. lipolytica*.

Mots clés : *Yarrowia lipolytica*, localisation cellulaire, triglycérides, épissage alternatif, cycle du glyoxylate, composés en C2.

Abstract

Title: Lipid metabolism and glyoxylate cycle in the yeast *Yarrowia lipolytica*.

Abstract : The yeast *Yarrowia lipolytica* is an oleaginous yeast which is able to grow on hydrophobic substrates and C2 compounds as a sole carbon source.

The first part of this study deals with the localization of the two proteins Lro1p and Dga1p involved in the final step of triglycerides synthesis. These proteins fused at their C-terminus with the fluorescent protein Yfp were shown to be localized in the cytoplasmic membrane and at the surface of the lipid bodies for Lro1p and at the lipid bodies surface for Dga1p.

The second part of this study helps to decipher about the function of the glyoxylate cycle in yeast *Y. lipolytica*. The first objective was to understand the function of the malate dehydrogenase gene in the yeast *Y. lipolytica*. Unlike in the yeast *S. cerevisiae* which has three genes encoding a malate dehydrogenase (cytoplasmic, mitochondrial and peroxysomale), *Y. lipolytica* has only two genes. The first gene YALI0D16753g encodes the mitochondrial malate dehydrogenase and the second gene YALI0E14190g is subject to alternative splicing. Indeed, depends on the splicing of the intron at the 3' splicing site, the gene YALI0E14190g codes for a cytoplasmic malate dehydrogenase (C-terminal sequence PAN) or a malate dehydrogenase targeted into peroxisome (C-terminal sequence AKI). We introduced several mutations in this gene in order to modify the targeting and to understand the function of this protein, including its involvement in the glyoxylate cycle. The different mutations introduced had no impact on the growth of these mutants neither on oleic acid nor on C2 compounds.

In a third part, we analyzed the other genes of the glyoxylate cycle. The disruption of the gene *ICL1* gene (YALI0C16885g) results in the inability of the mutant to growth on oleic acid and C2 compounds (ethanol, acetate). However, the deletion of the others genes of the glyoxylate cycle namely YALI0E15708g (equivalent of *MLS1*) and YALI0E02684g (equivalent of *CIT2*) had no impact on growth on media requiring the involvement of the glyoxylate cycle.

This work provided us some knowledge about the genes involved in the glyoxylate cycle and a partial understanding of the functioning of the glyoxylate cycle in *Y. lipolytica*.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, triglycerides cellular, localization, alternative splicing, glyoxylate cycle, C2 compounds.