



HAL
open science

Ingénierie métabolique de la levure *Yarrowia lipolytica* pour la production d'acides dicarboxyliques à partir d'huiles végétales

France Thévenieau

► **To cite this version:**

France Thévenieau. Ingénierie métabolique de la levure *Yarrowia lipolytica* pour la production d'acides dicarboxyliques à partir d'huiles végétales. Biochimie [q-bio.BM]. Institut national agronomique paris-grignon - INA P-G, 2006. Français. NNT : 2006INAP0022 . tel-00126675

HAL Id: tel-00126675

<https://pastel.hal.science/tel-00126675>

Submitted on 25 Jan 2007

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.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
École Doctorale ABIES

THÈSE

En vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
PARIS-GRIGNON

Discipline : **Biotechnologie**
présentée et soutenue publiquement
par

France THEVENIEAU

Le 1^{er} décembre 2006

Titre :

INGENIERIE METABOLIQUE DE LA LEVURE
YARROWIA LIPOLYTICA POUR LA PRODUCTION D'ACIDES
DICARBOXYLIQUES A PARTIR D'HUILES VEGETALES

Directeur de thèse : Dr Jean-Marc NICAUD
Codirecteur de thèse : Dr Rémy MARCHAL

JURY :

<i>Président du jury</i>	Pr Claude GAILLARDIN, INA-Paris-Grignon.
<i>Rapporteur</i>	Pr André GOFFEAU, Université Catholique de Louvain.
<i>Rapporteur</i>	Pr Michel AIGLE, Université Lyon I.
<i>Examineur</i>	Dr Georges PIGNEDE, R&D Lesaffre International.
<i>Examineur</i>	Dr Rémy MARCHAL, R&D Institut Français du Pétrole.
<i>Examineur</i>	Dr Jean-Marc NICAUD, Directeur de recherche CNRS, Grignon.

A ma famille,

Remerciements

A l'épilogue de ces trois années de travail, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut être la tâche la plus ardue de ces années de thèse : trouver les mots justes pour remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées durant la réalisation de cette thèse.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire (INA P-G UMR-INRA1238 UMR-CNRS2585) à Thiverval-Grignon dirigé successivement par Joseph Deutscher et Jean-Marie Beckerich ainsi qu'au sein du département « Chimie de la biomasse et Biotechnologie » de l'IFP à Rueil-Malmaison dirigé par Frédéric Monot dans le cadre d'une convention CIFRE.

La première personne que je tiens à remercier est Jean-Marc Nicaud, mon directeur de thèse, qui a su être omniprésent au cours de cette thèse, tout en me laissant la liberté nécessaire à la mise en place de mes idées. Son enthousiasme pour de nouveaux domaines ou de nouvelles techniques a été également une source de motivation. J'espère que cette thèse sera le reflet du soutien et de la confiance sans cesse renouvelés dont il a fait preuve à mon égard. Plus qu'un directeur, il représente un manager tant il a su m'impliquer dans les projets présents et futurs de son équipe.

Mes remerciements vont ensuite à Rémy Marchal, mon promoteur IFP, pour les aides apportées par ses conseils avisés, son expérience, son soutien et sa bonne humeur.

Je remercie les Professeurs André Goffeau (Université catholique de Louvain, Institut des Sciences de la Vie, Louvain-La-Neuve, Belgique) et Michel Aigle (Université Lyon1, UMR CNRS 5122, Villeurbanne) de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'éprouve un profond respect pour leur travail et leur parcours, ainsi que pour leurs qualités humaines. Le regard critique, juste et avisé qu'ils ont porté sur mes travaux ne peut que m'encourager à être encore plus perspicace et engagée dans mes recherches.

Merci au Professeur Claude Gaillardin (Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon) d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et d'avoir pris de son temps précieux pour discuter et critiquer de manière constructive mes travaux.

Merci au Docteur Georges Pignède (LESAFFRE INTERNATIONAL, Marcq en Baroeul) d'avoir examiner et apporter son regard industriel sur cette thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe GM27 qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail. Je tiens à remercier particulièrement LeFUF Tonton Franck pour son soutien, sa générosité et ses facéties, Cindy qui a participé activement à ce travail, PH et Marie-Thérèse, la p'tite Flo pour sa gentillesse et son humour, Safira, et tous ceux que j'oublie.

Un grand merci aux membres de mon « Comité Action Rédaction » présidé par LeMaze : Jo, Cécile, Franck, Jérôme, Colin et Danielle. Vous avez pris le temps de lire et relire mon « volumineux » ou « dense et pertinent » manuscrit issu d'un domaine qui vous été parfois étranger... Votre participation a permis de le rendre plus ouvert, plus accessible et plus riche.

J'adresse également ma reconnaissance aux personnes qui ont apporté leur grain de sel à ce travail : Jean-marie Beckerich qui a su me transmettre une partie de son savoir en immunolocalisation et pour son humanité ; Sandrine Poncet pour m'avoir aidé de par ses conseils quand « rien ne marchait ».

Je tiens également à remercier la p'tite blonde d'en haut, la Clochepartoche, pour le café (même si nous attendions souvent), pour la solidarité qui nous unissait contre les p'tits et pour son écoute, la Blivette pour sa gentillesse, son aide et son grain de folie, Brigitte pour m'avoir initié à l'art des dictons et pour ne pas avoir oublié de me parler du Sud dès qu'elle était de retour...grrrrh, Greg (Allez Gueugnon !), le grand Serge (le spécialiste de l'OlivePastisEau Pétanque), Valérie, ainsi que l'ensemble du personnel scientifique ou administratif du laboratoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du département Biotechnologie de l'IFP pour leur disponibilité, leur aide et leur bonne humeur : Frédéric (TheBigBoss), Bernard (le Mac Gyver des fermenteurs), Véro (mon assistante Borwing), les docteurs Nico et Tonio, Hugues (le 9³), Françoise (les 2, la shoeswoman et la runwoman), Sandrine (l'Excelwoman), Polo (le chef mécano), Agnès et Soph (celles qui m'ont montré la voie), Marcel, Senta, Alain, Yves, Laurent, Céline Elodie, Nadia, Martine,...

Je remercie également le laboratoire de Chimie Biologique de Thiverval-Grignon pour sa collaboration.

Une pensée également pour celles et ceux de mon ancien labo Marseillais (IRD, UMR 180 Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds) qui m'ont guidé vers le chemin de la thèse (parisienne...): mes copines ex-chefs toujours présentes Cathy (MaDoc) et Laurie (MaDJLC) et Bernardef, Marie-Laure, Carine, PapaAurélien (Tchou), Fred, Sylvaine, Adelka, Pipo, Malick,...

«Faire une thèse» est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où l'on se pose et l'on regarde en arrière.

Un grand merci à la confrérie des potes de Grignon : GuillOM : mon poteau, mon copain; LeMaze : la tête de mule, ne lâche rien mais toujours présent quand besoin est; l'ingénieur Moun : le spécialiste du « oh c'est dommage, j'étais motivé moi.... », Mister LJ pour m'avoir initié à ses traditions. Je n'oublie pas le clan des rieuses « IN » : Pauline, Adeline et Clémentine, ainsi que la p'tite Flo et Daphne.

Un grand merci au ND : Kam, Flo, Idou, Brigitte, Ouad, Juju, Soph, Barth, Eugénie, Joseph et Carine. Que de chemin parcouru depuis notre première rencontre. 2006 aura été une grande année marquée par des premières : premier mariage du ND, première soutenance. Je suis impatiente de voir la suite... Merci pour votre présence, votre soutien constant et votre amitié.

Un grand merci à la Tata Brigitte qui a su m'accueillir et m'initier aux rites étranges des parisiens.

Un grand merci à la « Alessio corporation » : Amélie, Ludo, Emie et Pablo, ma p'tite famille du Luberon, qui me montre et me rappelle ce qui est essentiel dans la vie. Je compte sur toi, MaNine, pour me donner les clés de ta réussite.

Un grand merci au p'tit gard de St Lambert, Yves: j'espère qu'on ne se perdra plus de vue maintenant.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien et leur amour.
Je dédie ce travail :

A ma grande et belle fraterie : Lolo, Nane, Olive et Tom. Je n'oublie pas Emilia, premier bébé d'une grande lignée, je l'espère, les PR qui ont l'honneur et la joie d'appartenir à ce clan et en particulier le PR3 dont les derniers mois ont du paraître bien longs mais qui néanmoins a fait preuve d'une gestion incroyable... Merci à tous d'avoir été présent dans les moments heureux et ceux plus difficiles.

A mon père qui m'a transmis le goût de l'effort, qui a accepté mes choix et m'a donné l'opportunité de faire de longues études.

A ma mamie, modèle de courage, de travail et de dynamisme.

A ma maman qui m'a transmis le goût du savoir, sa volonté et sa force, qui a toujours cru en moi ; toujours présente dans les moments de doute. Merci pour ton amour et ton soutien sans faille.

Merci !!!

Liste des Abréviations

ABC : Cassette de liaison à l'ATP
ADN : Acide désoxyribonucléique
Aox: Acyl-CoA oxydase
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
Cx : Alcane dont la longueur de chaîne comporte x atomes de carbone
DCA : Acide dicarboxylique
DCx:y : Acide dicarboxylique dont la longueur de chaîne comporte x unités carbone et y insaturations
DO : Densité optique
FADH : Alcool déshydrogénase
FALDH : Aldéhyde déshydrogénase
FAH : ω -hydroxylase
FAOD : Alcool oxydase
LCFA : Acides gras à longue chaîne carbonée (14-16-18 unités carbone)
MCx :y Acides gras dont la longueur de chaîne comporte x unités carbone et x insaturations
MCFA : Acides gras à longueur de chaîne carbonée moyenne (12-14 unités carbone)
MFS : Superfamille des facilitateurs
MDR : Sous-famille de protéines liées à la résistance multiple aux drogues
MTBE : Méthyl tert-butyl ether
NBD : Domaine de fixation aux nucléotides
ORE : Élément de réponse à l'oléate
pb : Paire de bases
PDR : Résistance pleiotropique aux drogues
RE: reticulum endoplasmique
SE : Esters de stérol
TAG : Triacylglycérols
TMS : Segments transmembranaires
VCFA : Acides gras à très longue chaîne carbonée (>18 unités carbone)

AVANT-PROPOS

Chapitre I - INTRODUCTION.....	3
A. Les acides dicarboxyliques.....	3
A.1. Intérêts industriels des acides dicarboxyliques.....	3
A.2. Production d'acides dicarboxyliques par synthèse chimique.....	5
A.3. Production d'acides dicarboxyliques par voie biotechnologique.....	5
A.4. Substrats de bioconversion.....	6
A.5. Applications des acides dicarboxyliques à longue chaîne carbonée.....	6
B. <i>Yarrowia lipolytica</i>.....	8
B.1. Taxonomie.....	8
B.2. Caractéristiques physiologiques.....	8
B.3. Caractéristiques génomiques.....	9
B.4. Outils génétiques.....	10
B.4.1. Les souches de <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
B.4.2. Les marqueurs de sélection.....	11
B.4.3. Les promoteurs.....	11
B.4.4. Les séquences de sécrétion.....	12
B.4.5. Les systèmes d'amplification.....	13
B.4.6. Le système <i>Cre lox</i> recombinase.....	14
B.5. Collections de mutants.....	15
B.6. Applications industrielles de <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
B.6.1. Sécrétion de protéines.....	16
B.6.2. Bioconversion.....	17
B.6.3. Production de métabolites intermédiaires.....	17
C. Transport des substrats hydrophobes.....	18
C.1. Hydrolyse des triglycérides.....	18
C.2. Interaction cellules/substrat.....	18
C.3. Transport et activation des acides gras.....	20
C.4. Transport <i>via</i> les ABC transporteurs et peroxysomes.....	24
C.4.1. Architecture moléculaire des protéines ABC chez les levures.....	26
C.4.2. Fonctions des ABC transporteurs chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
C.4.3. Distribution cellulaire des ABC transporteurs.....	28
C.4.4. Régulation de l'expression des gènes ABC chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
C.4.5. Le rôle physiologique des protéines ABC chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
D. Métabolisme des substrats hydrophobes chez les levures.....	41
D.1. Oxydation monoterminale des alcanes et voie de l' ω -oxydation.....	43
D.1.1. Première étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation.....	44
D.1.2. Deuxième étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation.....	48
D.1.3. Troisième étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation.....	49
D.2. Oxydation des acides gras.....	50
D.2.1. Oxydation des acides gras saturés.....	51
D.2.2. Oxydation des acides gras insaturés.....	53
D.3. Induction de l'expression de gènes par les acides gras.....	55
D.3.1. Régulation <i>via</i> des éléments de réponse oléate.....	56
D.4. Biosynthèse d'acides gras.....	57
D.4.1. Biosynthèse d'acides gras saturés.....	59

D.4.2. Désaturation des acides gras.....	60
D.4.3. Elongation des acides gras.....	61
D.5. Accumulation des lipides dans les corps lipidiques.....	62
E. Production d'acides dicarboxyliques par les levures.....	67
Chapitre II - MATERIEL ET METHODES.....	70
A. Matériel.....	70
A.1. Souches.....	70
A.2. Vecteurs.....	70
A.2.1. Plasmides.....	70
A.2.2. Vecteurs d'expression.....	71
A.3. Milieux de culture.....	74
A.3.1. Milieux de culture complet pour <i>Escherichia coli</i>	74
A.3.2. Milieux de sélection des transformants d' <i>Escherichia coli</i>	74
A.3.3. Milieux de culture pour <i>Yarrowia lipolytica</i>	74
A.3.4. Milieux de sélection des transformants de <i>Yarrowia lipolytica</i>	75
A.3.5. Milieux utilisés lors des tests en gouttes.....	75
A.3.6. Milieux de production des acides dicarboxyliques.....	76
A.4. Fermentation.....	77
A.4.1. Matériel.....	77
A.4.2. Conditions de production.....	79
B. Méthodes.....	79
B.1. Techniques de préparation des acides nucléiques.....	79
B.1.1. Méthodes de préparation de l'ADN.....	79
B.1.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	80
B.1.3. Purification de fragments d'ADN.....	81
B.2. Technique d'analyses des acides nucléiques.....	81
B.2.1. Hydrolyse par des endonucléases de restriction.....	81
B.2.2. Déphosphorylation de l'ADN.....	81
B.2.3. Ligature de l'ADN.....	82
B.2.4. Analyse par séparation électrophorétique.....	82
B.3. Techniques de transformation.....	82
B.3.1. Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	82
B.3.2. Transformation de la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	83
B.4. Construction de souches disruptées.....	84
B.4.1. Construction des cassettes de disruption.....	84
B.4.2. Expression de la recombinase <i>Cre</i> et marqueur d'excision.....	86
B.4.3. Vérification de la disruption et de l'excision.....	86
B.4.4. Hybridation des acides nucléiques.....	86
B.5. Assimilation d'alcanes radioactifs.....	87
B.6. Localisation cellulaire des protéines par immunofluorescence.....	88
B.7. Techniques analytiques.....	89
B.7.1. Dosage du glucose résiduel.....	89
B.7.2. Dosage des acides dicarboxyliques.....	89
B.7.3. Estimation de la biomasse.....	91
B.7.4. Données de fermentation.....	92

Chapitre III - RESULTATS ET DISCUSSION.....	93
A. Blocage de la voie de la β-oxydation.....	94
A.1. Méthodes de dosage des acides dicarboxyliques.....	94
A.2. Procédé de production des acides dicarboxyliques.....	94
A.2.1. Influence du substrat de bioconversion.....	96
A.2.2. Influence de la composition du milieu de culture.....	96
A.2.3. Production en fermenteur sur milieu riche.....	99
A.2.4. Influence du cosubstrat énergétique.....	100
A.3. Construction et analyse de mutants de la voie de la β -oxydation.....	112
A.3.1. Analyse génomique des gènes <i>POX</i>	112
A.3.2. Construction d'une souche génétiquement manipulable.....	116
A.3.3. Construction de mutants de la voie de la β -oxydation.....	117
A.3.4. Essais de production d'acides dicarboxyliques.....	118
A.3.5. Construction d'un mutant Δpox	118
A.3.6. Tests de production d'acides dicarboxyliques.....	119
A.4. Origine des acides dicarboxyliques.....	120
A.5. Blocage de la voie de la β -oxydation : Bilan.....	124
B. Surexpression de la voie de l'ω-oxydation.....	126
B.1. Analyse phylogénétique des cytochromes P450.....	126
B.2. Effet de la surexpression du gène <i>CPR</i>	130
B.2.1. Construction des vecteurs d'expression et des mutants.....	130
B.2.2. Tests de production d'acides dicarboxyliques.....	130
B.3. Effet de la surexpression des gènes <i>ALK</i>	136
B.3.1. Construction des vecteurs d'expression et des mutants.....	136
B.3.2. Tests de production d'acides dicarboxyliques.....	137
B.3.3. Surexpression du système P450 : Bilan.....	139
C. Identification de facteurs limitants la production de DCA.....	142
C.1. Influence du cosubstrat et de l'apport d'azote.....	143
C.2. Etude fonctionnelle des gènes impliqués dans le stockage des lipides.....	145
C.2.1. Construction des mutants.....	146
C.2.2. Test de production d'acides dicarboxyliques.....	147
D. Identification et étude fonctionnelle d'une famille d'ABC transporteur.....	149
D.1. Localisation des DCA produits.....	149
D.2. Collection de mutants.....	150
D.2.1. <i>ANT1</i> est requis pour l'utilisation des alcanes à chaîne courte.....	151
D.2.2. <i>ABC1</i> est requis pour l'utilisation des alcanes à chaîne longue.....	152
D.3. Analyse génomique d'une famille d'ABC transporteur.....	153
D.4. Analyse phénotypique d'une famille d'ABC transporteur.....	166
D.4.1. Construction des souches mono et multidisruptées.....	166
D.4.2. Phénotypes de croissance.....	166
D.4.3. Bilan.....	170
D.5. Fonction du transporteur <i>Abc1p</i>	171
D.6. Localisation du transporteur <i>Abc1p</i>	174
D.7. Sensibilité aux azoles.....	176
D.8. Bilan.....	178

Chapitre IV - CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....179

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Annexe 1 :

Publication : Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*.
Thevenieau, F., Nicaud, J.M., Gaillardin, C.

Annexe 2 :

Brevet : Production d'acides dicarboxyliques par des souches mutantes améliorées
de *Yarrowia lipolytica* (WO 2006/064131 A1).
Nicaud, J.M., Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Marchal, R.

Annexe 3 :

Publication: Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in
hydrophobic substrate utilization.
Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Nthangeni, B.N., Mauersberger, S., Marchal, R.
Nicaud, J.M.

AVANT-PROPOS

La biotechnologie blanche se démarque de la biotechnologie rouge (axée sur les soins de santé) et de la biotechnologie verte (amélioration des plantes). Elle constitue le troisième pilier de la biotechnologie et est actuellement en forte progression. La biotechnologie blanche utilise les systèmes biologiques pour produire des substances chimiques utiles. Il s'agit d'une technologie essentiellement fondée sur la catalyse biologique (utilisation d'enzymes pour catalyser des réactions chimiques) et la technologie de la fermentation (utilisation orientée des microorganismes), alliées aux récentes avancées dans les domaines de la génétique moléculaire et du génie métabolique.

Cette nouvelle technologie contribue considérablement à la chimie verte, qui vise à convertir des matières premières renouvelables -notamment des sucres ou des huiles végétales- en une gamme de substances chimiques: produits de la chimie fine, produits pharmaceutiques, additifs olfactifs, solvants, plastiques biologiques, vitamines, additifs alimentaire et biopesticides.

Les applications de la biotechnologie blanche présentent d'importants avantages. L'utilisation préférentielle de matières premières renouvelables de provenance agricole permet à la fois de constituer une alternative à l'énergie d'origine fossile et de fabriquer la plupart des produits actuellement issus du pétrole. En outre la biotechnologie blanche offre des avantages techniques par rapport à la chimie conventionnelle tel qu'un meilleur rendement de conversion et une réduction de la consommation d'énergie. L'ensemble de ces facteurs explique la forte évolution de la biotechnologie blanche dans tous les secteurs de l'industrie chimique, particulièrement dans le domaine des produits de chimie fine, mais également des produits chimique en vrac tels que les carburants et les polymères.

Les acides dicarboxyliques aliphatiques (DCA) sont des composés de base dans la chimie des polymères. Ils sont également utilisés dans la préparation de plastiques, lubrifiants, antibiotiques et parfums. Bien que de grand intérêt, les DCA qui comportent une chaîne aliphatique supérieure à douze atomes de carbone sont difficilement synthétisables par la voie chimique.

La voie biotechnologique devient alors une méthode de production particulièrement intéressante et présente en outre l'intérêt d'être applicable à des substrats ayant des longueurs de chaîne variées.

Ce travail de thèse, réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le Département « Biotechnologie et Chimie de la Biomasse » de l'Institut Français du Pétrole (I.F.P.) à Rueil-Malmaison et le Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire de l'INRA-CNRS-INA-P-G à Thiverval-Grignon, porte sur la « production d'acides dicarboxyliques à longue chaîne carbonée par *Yarrowia lipolytica* à partir d'huiles végétales ».

Y. lipolytica est considérée comme un organisme modèle pour l'étude du métabolisme des substrats hydrophobes tels que les alcanes, les acides gras et les triglycérides de par sa capacité à utiliser de manière très efficace ces substrats comme seule source de carbone. Cette levure non conventionnelle fait l'objet de développements d'outils génétiques facilitant l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique et récemment la séquence entière de son génome a été déterminée.

Les souches sauvages de levures accumulent de faibles quantités de DCA. La production de DCA et son amélioration passent par la connaissance puis la manipulation des voies métaboliques cellulaires impliquées dans la conversion biochimique de l'acide gras précurseur en métabolites d'intérêt. Or, ce métabolisme est complexe impliquant de nombreuses voies localisées dans différents compartiments cellulaires. De plus, certaines étapes cellulaires, qui pourraient s'avérer limitantes lors du procédé, demeurent peu connues comme le stockage des acides gras dans la cellule ou le transport des substrats hydrophobes à travers la membrane plasmique. L'ensemble de ces points feront l'objet de la présente étude : à terme, une meilleure connaissance des différentes étapes de ce métabolisme devrait permettre de développer un procédé de production de DCA par des souches améliorées de *Y. lipolytica* à partir d'huiles végétales.

Chapitre I - INTRODUCTION

Chapitre I - INTRODUCTION

A. Les acides dicarboxyliques

A.1. Intérêts industriels des acides dicarboxyliques

Les **acides dicarboxyliques** aliphatiques (DCA ou diacides) présentent une structure générale du type :



Selon la nomenclature officielle actuelle, les acides dicarboxyliques sont dénommés en ajoutant le suffixe "dioïque" au nom de l'hydrocarbure, qui dépend du nombre d'atome de carbone. On parle ainsi d'acide octadécanedioïque pour l'acide saturé à dix-huit atomes de carbone noté DC18:0 dans cette étude. Cependant, les noms usuels sont encore couramment utilisés (Tableau 1).

Les DCA sont des composés de base dans la préparation d'une grande variété de produits tels que les nylons et autres polyamides et polyesters, les résines, les adhésifs, les agents anti-corrosion, les parfums, les lubrifiants, les plastifiants et certains antibiotiques (Morgan, 1979; Cornils et Lappe, 1987; Tableau 1). Par exemple, les polyamides sont préparés à partir d'un DCA et d'une diamine ou d'un aminoacide. Selon la longueur des chaînes, on obtient différents types de polyamides. C'est la première matière plastique dite "technique" à avoir été créée (1938). Il existe de très nombreux types de polyamides (PA6,6 - Nylon®, PA11 -Rilsan®, PA12, PA46) impliqués dans diverses applications (pièces techniques pour l'industrie et l'automobile, canalisations, textiles, revêtements résistant à la corrosion).

Les DCA à longue chaîne carbonée (plus de douze atomes de carbone) présentent des intérêts spécifiques, par rapport à leurs homologues à chaîne courte. Par exemple, lors de la préparation de polyamides, les DCA à longue chaîne carbonée permettent d'ajuster les propriétés des polymères puisque, de façon générale, le point de fusion des polymères augmente en même temps que le rapport entre le nombre de groupements COHN et celui des unités CH₂ dans la chaîne polymérique. C'est pourquoi, ces produits sont très demandés par de nombreuses industries.

Tableau 1. Structure chimique et applications industrielles des acides dicarboxyliques.

Nbre de C	Structure chimique	Nom des diacides		Intérêts industriels
		Systématique	Usuel	
2	HO ₂ CCO ₂ H	ethanedioïque	oxalique	Agent réducteur ou acidifiant industriel
3	HO ₂ C(CH ₂) ₁ CO ₂ H	propanedioïque	malonique	Fabrication des barbiturates
4	HO ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ H	butanedioïque	succinique	Fabrication des laques, colorants, parfums
4	<i>cis</i> -HO ₂ CCH=CHCO ₂ H	<i>cis</i> -butènedioïque	maléique	Résines artificielles
4	<i>trans</i> -HO ₂ CCH=CHCO ₂ H	<i>trans</i> -butènedioïque	fumarique	Biocide, photographie (aldéhyde)
5	HO ₂ C(CH ₂) ₃ CO ₂ H	pentanedioïque	glutarique	Précurseur de l'acide maléique
6	HO ₂ C(CH ₂) ₄ CO ₂ H	hexanedioïque	adipique	Plastifiants, Agent gélifiant, Additif dans la fabrication du nylon, Polyuréthane, Uréthane, Acidulant alimentaire
7	HO ₂ C(CH ₂) ₅ CO ₂ H	heptanedioïque	pimélique	Polyamides, Polyesters
8	HO ₂ C(CH ₂) ₆ CO ₂ H	octanedioïque	subérique	Résines d'alkyles, Synthèse des polyamides (nylon).
9	HO ₂ C(CH ₂) ₇ CO ₂ H	nonanedioïque	azélaïque	Plastifiant, Lubrifiant, Mélanges anti-gel, Antibiotique (bactériostatique et bactéricide)
10	HO ₂ C(CH ₂) ₈ CO ₂ H	décanedioïque	sébacique	Plastifiants, Lubrifiants, Bougies, etc... Synthèse des polyamides (nylon).
11	HO ₂ C(CH ₂) ₉ CO ₂ H	undécanedioïque		Pesticides et *
12	HO ₂ C(CH ₂) ₁₀ CO ₂ H	dodécanedioïque		Polyamides (Qiana), Adjuvant de salaison pour la résine époxyde et acrylique, Améliorant la plasticité, la longévité et la résistance contre des effets de temps.
13	HO ₂ C(CH ₂) ₁₁ CO ₂ H	tridécanedioïque	brassilique	Parfumerie, Polyamides, Polyesters, Agents anti-corrosif
14	HO ₂ C(CH ₂) ₁₂ CO ₂ H	tétradécanedioïque		Modificateur de polyesters, Plastiques, Pharmacologie et *
15	HO ₂ C(CH ₂) ₁₃ CO ₂ H	pentadécanedioïque		*
16	HO ₂ C(CH ₂) ₁₄ CO ₂ H	hexadécanedioïque	thapsique	Production de peptides, Lipides, Polyamines et *
17	HO ₂ C(CH ₂) ₁₅ CO ₂ H	heptadécanedioïque		*
18	HO ₂ C(CH ₂) ₁₆ CO ₂ H	octadécanedioïque		*
19	HO ₂ C(CH ₂) ₁₇ CO ₂ H	nonadécanedioïque		*
20	HO ₂ C(CH ₂) ₁₈ CO ₂ H	eicosanedioïque		*
21	HO ₂ C(CH ₂) ₁₉ CO ₂ H	heneicosanedioïque	japanique	Plastifiant pour PVC
22	HO ₂ C(CH ₂) ₂₀ CO ₂ H	docosanedioïque		*

* correspond à : Polymères, Lustrants, Parfumerie Agents anti-corrosif, Lubrifiants et Solvants biodégradables, Plastiques, Pharmacologie.

A.2. Production d'acides dicarboxyliques par synthèse chimique

Les DCA, dont la longueur de chaîne n'excède pas douze atomes de carbone, sont généralement produits par synthèse chimique. Chaque type de production nécessite toutefois la mise en œuvre d'un procédé et l'utilisation de réactifs particuliers. Ainsi, l'acide azélaïque (DC9:0) est obtenu par l'oxydation chimique de l'acide oléique, comportant dix-huit atomes de carbone et une double liaison (MC18:1), par l'ozone. L'acide sébacique (DC10:0) est produit par oxydation alcaline de l'acide ricinoléique et l'acide dodécanedioïque (C12:0) est synthétisé à partir du 1,4-butadiène. Les principaux DCA industriels disponibles actuellement sont l'acide maléique (DC4:1), l'acide adipique (DC6:0), l'acide azélaïque (DC9:0), l'acide sébacique (DC10:0) et l'acide dodécanedioïque (DC12:0) (Tableau 1).

La synthèse chimique des DCA dont la longueur de chaîne est supérieure à douze atomes de carbone n'est pas adaptée car les rendements sont d'autant plus faibles que la chaîne carbonée est longue. De plus, les précurseurs sont coûteux et les sous-produits de réaction importants.

A.3. Production d'acides dicarboxyliques par voie biotechnologique

Le procédé biotechnologique par fermentation est une méthode de production particulièrement intéressante pour les DCA à longue chaîne carbonée, notamment sur le plan du prix de revient et de la pureté des produits (Uemura, 1985). La voie biotechnologique présente en outre, l'intérêt d'être applicable à des substrats ayant des longueurs de chaînes variées.

Plusieurs levures sécrètent des quantités relativement faibles de DCA quand elles se développent sur des substrats hydrophobes *via* la voie de l' ω -oxydation (Shiio et Uchio, 1971). Ainsi, la production de DCA par des levures nécessite l'obtention de souches modifiées (Chan *et al.*, 1991). Le phénomène d'accumulation de DCA a été mis en évidence dans des souches mutantes, obtenues par génétique classique ou mutagenèse dirigée, de *Candida cloacae*, *Candida tropicalis* et *Yarrowia lipolytica* (Shiio et Uchio, 1971; Uemura, 1985; Smit *et al.*, 2005). Les principales stratégies de mutagenèse dirigée ont pour cible les enzymes de la voie de dégradation des substrats hydrophobes, la β -oxydation, et la voie conduisant à la formation de DCA, l' ω -oxydation. Ces études seront détaillées après la présentation des différentes voies métaboliques impliquées, en fin d'introduction.

A.4. Substrats de bioconversion

Initialement, les études sur la production de DCA à longue chaîne carbonée par voie biotechnologique privilégiaient les substrats de bioconversion issus de la pétrochimie tels que les *n*-paraffines (Uemura, 1985). Cependant, le contexte géopolitique actuel concernant les ressources énergétiques, rend l'utilisation des huiles végétales très attractive en tant que substrats de bioconversion. De plus, elles présentent l'avantage d'être renouvelables et leur utilisation constituerait un développement vers la pétrochimie verte.

L'huile de tournesol oléique (ou ses diesters utilisés actuellement comme biocarburant), représente un substrat de bioconversion potentiellement intéressant. Il est composé majoritairement d'acide oléique (monoacide MC18:1). Ce substrat est donc susceptible de conduire à la production de l'acide octadécènedioïque (DC18:1) de façon suffisamment pure pour limiter les étapes de purification.

A.5. Applications des acides dicarboxyliques à longue chaîne carbonée

La disponibilité et l'utilisation des DCA à longue chaîne carbonée devraient permettre le développement de nouveaux matériaux. En particulier, l'acide octadécènedioïque est susceptible d'intervenir dans la production de nouveaux adhésifs et polymères tels que les polyamides, les polyesters et également, le nylon technique (Tableau 1). Parmi les polymères, on peut citer les thermoplastiques comme les polymères Hotmelt. Les adhésifs Hotmelt sont solides à température ambiante. Avant d'être appliqués, ils sont chauffés pour être transformés en fluides visqueux. Ils se solidifient rapidement par contact. Ils n'utilisent donc aucun solvant et correspondent aux exigences des productions à haut débit.

L'utilisation de ce DCA pourrait améliorer la flexibilité, l'élasticité et l'hydrophobicité des polymères et élargir la gamme des polymères hautement demandée, par exemple, dans les secteurs du textile et de l'automobile.

Par ailleurs, la présence d'une double liaison dans l'unité monomère DC18:1 est une caractéristique particulièrement intéressante puisqu'elle rend possible la post-réticulation, c'est-à-dire la création d'un réseau tridimensionnel en introduisant de nouvelles liaisons covalentes C-C entre les macromolécules de polymères. On transforme ainsi les matières thermoplastiques en thermodurcissables.

Cette transformation de thermoplastiques vers les thermodurs entraîne également, pour ces matériaux, l'amélioration de certaines propriétés, comme l'élasticité, la résistance, la stabilité lors de variations de température, la résistance au feu, aux solvants et à l'eau. Ces matériaux peuvent être utilisés dans : le secteur automobile (connectique, surmoulage, composites pour l'habillage intérieur), le secteur électronique (circuits imprimés, surmoulage) ou les filtres (collages de médias filtrants pour hautes températures).

Enfin, les polyesters insaturés pourraient être copolymérisés avec des composés insaturés pour donner des alcools polyfonctionnels et des acides carboxyliques insaturés polyfonctionnels.

La production de DCA à longue chaîne carbonée, à partir d'huiles végétales, nécessite l'utilisation d'un microorganisme capable de se développer efficacement sur des substrats hydrophobes tels que les acides gras. *Y. lipolytica* est une des « levures non conventionnelles » les plus étudiées à l'heure actuelle. Elle est considérée comme un organisme modèle pour l'étude du métabolisme des alcanes et des acides gras (Mauersberger *et al.*, 2001), de la biogenèse des peroxysomes (Titorenko *et al.*, 2000; Titorenko et Rachubinski, 2001) et pour l'étude de la voie de sécrétion (Beckerich *et al.*, 1998).

B. *Yarrowia lipolytica*

La levure *Yarrowia lipolytica* est une levure non pathogène qui se développe à l'état naturel dans les sols et les effluents. Elle peut être également isolée à partir de matières riches en lipides et en protéines tels que les yaourts, les fromages et la charcuterie.

B.1. Taxonomie

Y. lipolytica est un ascomycète de la famille des Saccharomycetaceae (sous famille des Saccharomycetoideae). Aucun stade sexué n'ayant été observé, elle fut dans un premier temps, classée dans le genre *Candida* jusqu'à l'identification d'une forme parfaite à la fin des années 60 (Wickerham *et al.*, 1970). Selon les conditions de croissance, les cellules sont capables de former des asques, contenant de 1 à 4 ascospores haploïdes, à l'extrémité des hyphes. Parmi ces ascospores, deux types cellulaires, dénommés A et B sont différenciés.

La fusion entre deux cellules haploïdes de type opposé, aboutit à la formation d'un zygote diploïde se développant sous forme de mycélium et aboutissant à la formation d'ascospores. Cette découverte d'une reproduction sexuée a conduit à renommer la levure en *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1970), puis en *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) et finalement en *Yarrowia lipolytica* (van der Walt et von Arx, 1980). La reproduction de *Y. lipolytica* peut être également asexuée. Dans ce cas, elle consiste en un bourgeonnement bipolaire (Kreger van Rij, 1984).

B.2. Caractéristiques physiologiques

Y. lipolytica présente un métabolisme aérobie strict. C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30°C et qui n'est pas capable de croître à 37°C (Kreger van Rij, 1984). Elle est reconnue comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par le FDA (« American Food and Drug Administration »). Ceci permet de l'utiliser dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques. C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction du milieu de culture.

Elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats carbonés tels que des sucres comme le glucose, le galactose et le mannitol (Kreger van Rij, 1984). Cependant, elle ne peut pas assimiler le saccharose car elle ne possède pas d'invertase.

Une des particularité de cette levure est sa capacité à métaboliser à la fois (i) des hydrocarbures tels que les alcanes (hexadécane, décane) et les 1-alcènes (Klug et Markovetz, 1967) et (ii) des lipides tels que des acides gras (acide palmitique, acide ricinoléique, acide laurique) et des triglycérides (trioléine, tripalmitine) (Kreger van Rij, 1984). Elle peut également assimiler de l'éthanol dans la mesure où sa concentration ne dépasse pas 3% grâce à l'action d'alcool déshydrogénases NAD(P) dépendante (Barth et Kunkel, 1979). Enfin, *Y. lipolytica* peut utiliser de l'acétate comme seule source de carbone (Barth et Kunkel, 1979).

B.3. Caractéristiques génomiques

Récemment, la séquence du génome entier de la souche E150 de *Y. lipolytica* a été déterminée par le consortium Génolevures (Casaregola *et al.*, 2000; Dujon *et al.*, 2004). *Y. lipolytica* présente un génome de 20,5 Mb composé de six chromosomes. Cette levure diverge considérablement des autres levures ascomycètes de par (i) son contenu en G+C (environ 50%), (ii) sa densité de gènes (un pour 3,3 kb pour *Y. lipolytica* contre un pour 2 kb pour *S. cerevisiae*) (iii) sa haute fréquence en introns (13% des gènes ont au moins un intron), parfois d'une taille relativement grande (Bon *et al.*, 2003), (iv) la répartition de son ADNr dans 7 loci situés dans les régions subtélomériques du génome (un seul locus chez *Saccharomyces cerevisiae*), (v) le faible niveau de similarité de ses gènes avec les autres levures, (vi) son contenu en éléments transposables (Neuveglise *et al.*, 2002; Neuveglise *et al.* 2005). *Y. lipolytica* est considérée comme une **levure ascomycète atypique** à la frontière entre les levures hémiascomycètes et les champignons filamenteux ascomycètes.

Une autre caractéristique importante révélée par la séquence de *Y. lipolytica* est l'expansion significative des familles protéiques contenant des gènes paralogues impliqués dans l'utilisation des substrats hydrophobes (De Hertogh *et al.*, 2006 ; Thevenieau *et al.*, Annexe 1). Le nombre important de gènes constituant plusieurs familles multigéniques par rapport à d'autres levures est en corrélation avec la capacité de *Y. lipolytica* à utiliser les substrats hydrophobes. Ceci est confirmé par une étude génomique réalisée sur l'évolution des transporteurs dans le phylum des Hemiascomycètes à partir de cinq séquences génomiques complètes : *S. cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* et *Y. lipolytica* (De Hertogh *et al.*, 2006). Elle révèle un nombre particulièrement important de transporteurs peroxysomaux et d'acides gras. De plus, *Y. lipolytica* avec *D. hansenii* sont les espèces qui présentent le plus de transporteurs espèce-spécifiques ou uniques.

Cette caractéristique suggère que *Y. lipolytica* a développé des stratégies d'évolution de spécialisation fonctionnelle par rapport à son environnement. L'existence de nombreux événements de duplication de gènes, suivis d'une évolution différentielle d'une des deux copies est le mécanisme principal permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique et une spécialisation (Dujon *et al.*, 2004; De Hertogh *et al.*, 2006). La spécialisation fonctionnelle au sein d'une même famille multigénique est confirmée par l'étude de plusieurs d'entre elles, comme par exemple, les lipases (paragraphe C.1), les cytochromes P450 (Paragraphe D.1) ou les acyl-CoA oxydases (Paragraphe D.2) (Thevenieau *et al.*, Annexe 1). Cependant, des événements au cours de l'évolution restent pour l'instant inexplicés. C'est le cas chez *Y. lipolytica*, en ce qui concerne le gain spécifique d'un ABC transporteur de la sous-famille ABCA1 dont les membres n'ont été découverts jusqu'à présent, que chez les cellules de mammifères, et dont la présence serait due probablement à un mécanisme de spéciation (De Hertogh *et al.*, 2006).

B.4. Outils génétiques

Y. lipolytica a fait l'objet de développements d'**outils génétiques adaptés et performants**. Ainsi, un système de transformation (Davidow *et al.*, 1987; Gaillardin *et al.*, 1985), un système de disruption (Fickers *et al.*, 2003), des vecteurs de type répliatif (Fournier *et al.*, 1991) et intégratif (Gaillardin et Ribet, 1987), un système d'amplification de gènes (Le Dall *et al.*, 1994) et la caractérisation de promoteurs fortement régulés ou constitutifs (Barth et Scheuber, 1993; Blanchin-Roland *et al.*, 1994) facilitent l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique.

B.4.1. Les souches de *Y. lipolytica*

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

B.4.2. Les marqueurs de sélection

Peu de marqueurs de sélection sont disponibles chez *Y. lipolytica*. En effet, cette levure est insensible à la plupart des antibiotiques à l'exception de ceux du groupe bléomycine/phléomycine ainsi qu'à l'hygromycine-B (Cordero et Gaillardin, 1996). L'avantage de ces marqueurs de sélection est qu'ils peuvent être employés dans des souches de *Y. lipolytica* ne portant aucune auxotrophie. Cependant, l'apparition de résistances spontanées est observée (Barth et Gaillardin, 1997).

Chez *Y. lipolytica*, l'utilisation de marqueurs d'auxotrophie est la méthode de sélection la plus courante. Les deux marqueurs les plus employés sont conçus à partir du gène *LEU2* codant l'isopropyl malate déhydrogénase et du gène *URA3* codant l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase. Le marqueur *leu2-270* présente une délétion d'une partie du gène *LEU2* et confère une auxotrophie à la leucine. La délétion du gène *URA3* (remplacement du gène *URA3* par *pXPR2-SUC2*, marqueur *Ura3-302*) confère une auxotrophie à l'uracile.

Deux délétions différentes du promoteur du gène *URA3* ont permis d'obtenir l'allèle *ura3d1* et l'allèle *ura3d4*. L'allèle *ura3d1* conserve 41 pb de la séquence promotrice avant l'ATG du gène *URA3*. L'allèle *ura3d1* permet de conférer un phénotype Ura^+ avec une seule copie intégrée. Cependant, pour l'allèle *ura3d4*, il est nécessaire d'avoir plusieurs intégrations pour obtenir le phénotype Ura^+ . Cet allèle ne conserve que seulement 6 pb de la séquence promotrice avant l'ATG (Le Dall *et al.*, 1994). Ceci permet d'obtenir des transformants contenant plusieurs copies du gène d'intérêt en une seule étape.

B.4.3. Les promoteurs

Le premier promoteur développé et utilisé est celui du gène *XPR2* codant la protéase alcaline AEP (Nicaud *et al.*, 1989). Cependant, ce promoteur présente une régulation complexe : il est induit à un pH supérieur à 6,0 et dans un milieu dépourvu de source de carbone et d'azote. De plus, son induction est maximale si la concentration en peptone est élevée (Ogrydziak *et al.*, 1977). Aussi, l'utilisation d'un tel promoteur n'est pas adéquate dans des conditions de production industrielle.

D'autres promoteurs inductibles, présentant une régulation moins complexe ont été utilisés avec succès : (i) le promoteur du gène *POX2* codant l'acyl-CoA oxydase 2, (ii) le promoteur du gène *POT1* codant la 3-oxo-acyl-CoA thiolase et (iii) le promoteur du gène *ICL1* codant l'isocitrate lyase (Juretzek *et al.*, 2001). Ces trois promoteurs sont fortement **induits par les alcanes, les acides gras ou les triglycérides** et sont réprimés en présence de glucose ou de glycérol. Cependant, l'expression du promoteur *pICL1* n'est pas totalement réprimée, il est exprimé à un niveau basal en présence de glucose ou de glycérol. Par ailleurs, le promoteur *pICL1* est aussi fortement exprimé en présence d'éthanol ou d'acétate.

Des promoteurs constitutifs ont été développés. Les promoteurs des gènes *TEF* et *RPS7* ont été isolés chez *Y. lipolytica* et utilisés pour l'expression de protéines hétérologues (Muller *et al.*, 1998). Dès le début de la phase de croissance, ces promoteurs sont fortement induits.

Enfin, un promoteur hybride nommé hp4d (Hybrid Promoter Four Direct repeat) a été développé au laboratoire (Madzak *et al.*, 2000). Ce promoteur a été construit par l'insertion de quatre répétitions de la séquence UAS1 du gène *XPR2* en amont du promoteur minimum du gène *LEU2* contenant la boîte TATA. Ce promoteur est constitutif car son expression ne dépend ni des conditions ni de la composition du milieu de culture. Cependant, pour des raisons encore inconnues, l'expression de protéines recombinantes sous son contrôle n'a lieu qu'à partir de la fin de la phase exponentielle de croissance (Nicaud *et al.*, 2002). Cette caractéristique présente un avantage dans le cas d'expression de protéines toxiques pour la cellule.

B.4.4. Les séquences de sécrétion

La séquence Pré Pro du gène *XPR2* est souvent utilisée pour obtenir la sécrétion de protéines recombinantes. Plusieurs études ont montré que la région Pré seule, était suffisante pour la sécrétion et surtout que la production de protéines hétérologues était améliorée (Park *et al.*, 1997; Swennen *et al.*, 2002). Dans le cas de protéines extracellulaires d'origine fongique, la séquence d'adressage native de la protéine à exprimer est souvent reconnue par *Y. lipolytica* (Muller *et al.*, 1998).

B.4.5. Les systèmes d'amplification

Des vecteurs réplcatifs ont été construits et utilisés chez *Y. lipolytica*. Cependant, les transformants obtenus, possèdent un faible nombre de copies du vecteur (1 à 3 copies par cellule) et il est nécessaire de maintenir la pression de sélection du vecteur pour conserver les copies (Vernis *et al.*, 1997).

Des **vecteurs intégratifs** ont été conçus pour une insertion de la cassette d'expression dans le génome de *Y. lipolytica*. Ces vecteurs présentent des éléments d'origine bactérienne en plus des éléments nécessaires à l'expression du gène d'intérêt dans *Y. lipolytica*. Après linéarisation du vecteur au locus cible (le plus souvent dans le marqueur de sélection) la cassette d'expression s'intègre dans le génome de l'hôte, de façon stable, par simple crossing-over (Barth et Gaillardin, 1996). Cependant, la présence de cet ADN bactérien dans la souche de levure est un inconvénient pour les applications commerciales. C'est pourquoi, des vecteurs d'expression «auto-clonants» dont la partie bactérienne peut être éliminée avant la transformation ont été développés (Pignede *et al.*, 2000). Néanmoins l'utilisation des ces vecteurs « auto-clonants » amène à une intégration au hasard dans le génome.

Des **systèmes d'intégration multicopie** ont été développés (Le Dall *et al.*, 1994). Ces vecteurs sont le plus souvent conçus à partir de marqueurs d'auxotrophie défectifs tels que l'allèle *ura3d4*. Dans un premier temps, les vecteurs construits utilisent une stratégie décrite à l'origine chez *S. cerevisiae*. Celle-ci consiste à utiliser une séquence d'ADNr qui permet de cibler, dans le génome, le site d'intégration de la cassette d'expression afin d'obtenir des souches stables (Lopes *et al.*, 1989). Chez *Y. lipolytica*, suivant le gène intégré, le nombre de copies varie de 10 à 60 copies situées en général en tandem répété sur un ou deux loci d'ADNr. Cependant, ces copies sont instables et leur nombre se stabilise autour d'une dizaine après plusieurs générations (Le Dall *et al.*, 1994).

Dans un deuxième temps, un rétrotransposon, Ylt1, a été mis en évidence chez *Y. lipolytica* (Schmid-Berger *et al.*, 1994). Ce rétrotransposon est caractérisé par la présence de séquences Long Terminal Repeat (LTR) de 714 pb nommées "Zeta". Au moins 35 copies de l'élément Ylt1 et plus de 30 copies de l'élément Zeta solo par génome ont été décelées (Schmid-Berger *et al.*, 1994).

Une des particularités de ce rétrotransposon est de ne pas être présent dans toutes les souches sauvages de *Y. lipolytica*. Les séquences Zeta ont donc été utilisées comme site alternatif d'intégration homologue et non-homologue.

Dans des souches possédant le rétrotransposon, l'intégration est homologue aux sites Zeta et les transformants obtenus intègrent en moyenne de 4 à 30 copies de la cassette d'expression organisées en tandem dans le génome. Leur stabilité est comparable à celle des transformants obtenus par la méthode précédente (Juretzek *et al.*, 2001).

Dans des souches sans rétrotransposon, l'intégration est non-homologue et le taux de transformants obtenus est très faible (de l'ordre de 10 transformants par μg d'ADN). Par comparaison, le taux de transformants par intégration homologue est de l'ordre de 10^2 à 10^4 transformants par μg d'ADN. Cette intégration non-homologue permet d'obtenir des insertions dispersées sans organisation en tandem de la cassette d'expression. La stabilité génomique des cassettes d'expression intégrées est meilleure que dans les souches possédant Ylt1 (Pignede *et al.*, 2000).

B.4.6. Le système *Cre lox* recombinase

L'analyse fonctionnelle de familles multigéniques nécessite souvent la disruption séquentielle des gènes qui composent cette famille. Chez *Y. lipolytica*, peu de méthodes sont disponibles pour la disruption de gènes et les méthodes classiques sont laborieuses. Certains problèmes ont été résolus en employant le système *Cre lox* et différents marqueurs de sélection d'auxotrophie homologues tels que *y1URA3*, *y1LEU2* et le marqueur de résistance hétérologue *hph* codant la résistance à l'hygromycine B (Fickers *et al.*, 2003). L'avantage majeur du marqueur *hph* est que la disruption de gène par cette cassette permet l'intégration au locus correct (à une fréquence d'environ 45%) grâce à son absence d'homologie avec les gènes de levure.

Le système *Cre lox* de *Y. lipolytica* est une fusion entre la méthode SEP (Sticky-End Polymerase chain reaction) et le système de recombinaison *Cre lox* (Sauer, 1987; Maftahi *et al.*, 1996). Cette méthode consiste à synthétiser une large région promotrice et terminatrice du gène d'intérêt séparée par une séquence de 16 pb contenant un site de restriction rare. Ce fragment d'ADN est cloné puis digéré par l'enzyme de restriction spécifique.

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

La technologie *Cre lox*, appliquée en combinaison avec la méthode SEP permet de générer des disruptions rapides de gènes. Dans la mesure où *Y. lipolytica* présente un nombre limité de gènes marqueurs, cette méthode représente un moyen efficace de réutiliser le marqueur. De par l'expression de la recombinaise *Cre*, le marqueur est excisé à une fréquence de 98% par recombinaison des deux sites *lox*. Par conséquent, cette technologie est un **outil puissant** pour l'analyse fonctionnelle de familles de gènes et la création de larges collections de mutants.

B.5. Collections de mutants

Afin d'étudier le métabolisme des substrats hydrophobes, des méthodes de génétique classique et inverse, ont été utilisées chez *Y. lipolytica*. Les premières tentatives d'identification des gènes impliqués dans l'utilisation des substrats hydrophobes par isolement de mutants affectés dans l'utilisation des alcanes, ont débutées dans les années 70 par les groupes de Mortimer, Numa, Barth et Mauersberger (Barth et Gaillardin, 1996; Barth *et al.*, 2003). Plus tard, des mutants affectés dans l'utilisation de l'acide oléique ont été isolés par le groupe de Rachubinsky afin d'étudier plus spécifiquement les peroxysomes et leur biogenèse (Titorenko et Rachubinski, 2001). Le groupe de Takagi et d'Ohta étudia des mutants incapables de se développer sur alcanes de longueur de chaîne carbonée donnée (Iida *et al.*, 1998; Sumita *et al.*, 2002). Récemment, de nouveaux mutants « étiquetés » affectés dans l'utilisation des substrats hydrophobes, ont été isolés après l'insertion de transposons (Neuveglise *et al.*, 1998) ou par une simple insertion de cassette de mutagenèse *URA3* (Mauersberger et Nicaud, 2003; Mauersberger *et al.*, 2001). Ainsi, de nouveaux gènes impliqués dans ces voies ont été caractérisés. La génétique inverse a été également utilisée pour la caractérisation de gènes appartenant à plusieurs familles dont les cytochromes P450 (Iida *et al.*, 1998), les lipases (Pignede *et al.*, 2000) et les acyl-CoA oxydases (Wang *et al.*, 1999).

B.6. Applications industrielles de *Yarrowia lipolytica*

En raison des propriétés spécifiques de *Y. lipolytica*, telles que l'utilisation très efficace des substrats hydrophobes et sa capacité élevée de sécrétion de métabolites et de protéines, plusieurs projets impliquant cette levure ont rapidement été développés, principalement, dans des procédés de bioconversion pour les industries alimentaires et chimiques. Cette partie est détaillée en annexe 1.

Dans les années 60, la capacité de *Y. lipolytica* à stocker des lipides dans les corps lipidiques, qui peuvent représenter jusqu'à 70% de la teneur totale en lipides de la cellule, a permis le développement de procédés de production de lipides appelés « Single Cell Oil » (Annexe 1).

B.6.1. Sécrétion de protéines

Y. lipolytica représente une alternative reconnue à *S. cerevisiae*, pour la production de protéines hétérologues (Davidow *et al.*, 1987). Elle se distingue par sa capacité à sécréter de façon naturelle diverses protéines avec un rendement élevé, y compris des protéases, lipases, RNases, et chacune dans des conditions spécifiques (Thevenieau *et al.*, Annexe 1). Suivant le pH du milieu de culture, elle sécrète deux protéases (Barth et Gaillardin, 1997). La protéase alcaline (AEP) est codée par le gène *XPR2*. Celui-ci est induit en présence de peptone et à partir de pH 6. La protéase acide (AXP) est sécrétée lorsque le pH du milieu de culture est inférieur à 4,5. Cette protéase est sécrétée sous trois formes qui diffèrent dans leur glycosylation et par la quantité de glycane. *Y. lipolytica* sécrète, entre autres, une RNase, une estérase, des phosphatases et plusieurs lipases (Barth et Gaillardin, 1997).

De plus, chez *Y. lipolytica*, le mécanisme prédominant de sécrétion est un processus de translocation co-translationnelle comme chez les eucaryotes supérieurs (Boisrame *et al.*, 1998). En raison de ces caractéristiques et du développement d'outils génétiques performants, des procédés de production de protéines hétérologues se développent.

A l'image de l'intérêt croissant pour *Y. lipolytica*, un kit d'expression a depuis peu été commercialisé par la Yeastern Company (Taiwan) contenant les souches et les vecteurs nécessaires à l'expression et à la sécrétion de protéines chez *Y. lipolytica*.

B.6.2. Bioconversion

Le besoin industriel croissant d'obtenir des molécules énantiomériquement pures, en particulier dans l'industrie pharmaceutique, comme l'exige la législation, a conduit au développement de procédés pour résoudre les mélanges racémiques en utilisant *Y. lipolytica*. Des cellules ou des enzymes de *Y. lipolytica* sont impliquées dans la réduction prochirale des groupements carbonyles et dans la résolution énantiosélective des esters et des époxydes. Ainsi, des procédés de résolution de cétones, d'alcools, d'esters, et d'époxydes ont été développés (Thevenieau *et al.*, Annexe 1).

B.6.3. Production de métabolites intermédiaires

Des procédés de production de métabolites secondaires, tels que l'acide citrique ou isocitrique, ont été développés (Finogenova *et al.*, 2002; Kruse *et al.*, 2004; Marchal *et al.*, 1977). L'utilisation de *Y. lipolytica* permet également de produire des arômes tels que la γ - ou la δ -lactones. Ces lactones montrent des notes fruitées et huileuses, qui sont naturellement présentes dans les fruits et dans certains produits alimentaires fermentés, et sont intéressantes en tant qu'additifs (Thevenieau *et al.*, Annexe 1).

De par ses caractéristiques physiologiques, son utilisation dans de nombreuses études et les outils génétiques disponibles, *Y. lipolytica* apparaît comme un microorganisme de choix pour la production d'acides dicarboxyliques à longue chaîne à partir d'huiles végétales impliquant le métabolisme des substrats hydrophobes.

C. Transport des substrats hydrophobes

C.1. Hydrolyse des triglycérides

Y. lipolytica est capable d'assimiler les triglycérides comme source de carbone. La première étape de ce catabolisme implique l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et en glycérol par les enzymes lipolytiques (lipases), identifiées par Peters et Nelson en 1948. *Y. lipolytica* est capable de produire plusieurs **lipases** (activité extracellulaire, membranaire et intracellulaire) et l'activité lipolytique dépend des conditions environnementales (Guerzoni *et al.*, 2001; Fickers *et al.*, 2003). Une activité lipase extracellulaire et deux lipases membranaires ont été décrites (Barth et Gaillardin, 1996). Le gène *LIP2* code une lipase extracellulaire, *Lip2p* (Pignede *et al.*, 2000), qui hydrolyse préférentiellement, les triglycérides à longues chaînes des résidus oléiques (Barth et Gaillardin, 1996). Deux gènes, *LIP7* et *LIP8*, codent des lipases membranaires qui semblent être spécifiques, respectivement du caproate (MC6:0) et du caprate (MC10:0) (Fickers *et al.*, 2005). *LIP1*, *LIP3* et *LIP6* codent des carboxylestérases (Dominguez *et al.*, 2003). Une récente analyse du génome de *Y. lipolytica* a révélé un gène supplémentaire codant une carboxylestérase/lipase similaire à *LIP1* et treize gènes supplémentaires appartenant à la famille des triacylglycérol/lipases, similaires à *LIP2* (Thevenieau *et al.*, Annexe 1).

C.2. Interaction cellules/substrat

Les alcanes, les acides gras ou les triglycérides sont peu solubles dans l'eau. *Y. lipolytica* possède plusieurs mécanismes indépendants et simultanés pour modifier leur solubilité ou remodeler sa propre surface cellulaire.

Au cours du premier mécanisme, appelé « transfert assisté par biosurfactants », la cellule sécrète des **biosurfactants** permettant l'émulsion et la pseudo solubilisation des composés hydrophobes. Cela se traduit par la formation de micelles permettant un contact efficace du substrat avec les microorganismes (Figure 1).

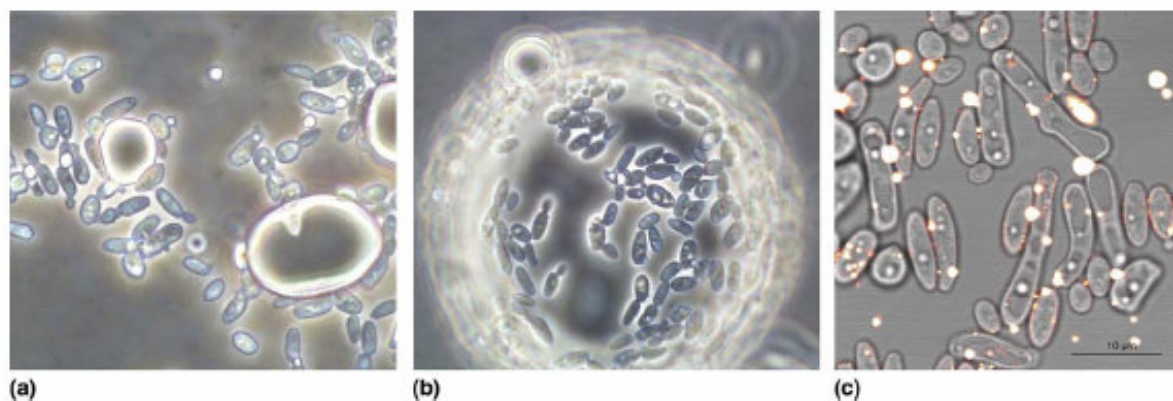


Figure 1. Interactions entre les cellules de *Y. lipolytica* et les substrats hydrophobes. Adhérence des cellules aux gouttelettes d'hexadécane pendant la croissance de la souche H222 de *Y. lipolytica*. Les cellules sont incubées 5 heures sur un milieu minimum en présence de 1 % d'hexadécane comme unique source de carbone. Les cellules absorbent des petites (a) puis de larges (b) gouttelettes d'alcane. (c) Adhérence des cellules de la souche W29 de *Y. lipolytica* aux gouttelettes d'acide ricinoleïque utilisé comme substrat. *Y. lipolytica* est capable de fixer des mini-gouttelettes d'acides gras émulsifiées à sa surface (Fickers *et al.*, 2005).

Y. lipolytica sécrète un émulsifiant extracellulaire, le liposan, une glycolipoprotéine de 27 kDa, composée de 5% de protéines, de 20% de glucides et de 75% de lipides (Cirigliano et Carman, 1984; Sarubbo *et al.*, 2001; Zinjarde et Pant, 2002). Sa sécrétion est induite en présence de triglycérides et d'hydrocarbures mais elle est réprimée en présence de glucose. De plus, une corrélation entre l'induction de l'adhérence cellule substrat et l'augmentation des propriétés apolaires de la surface cellulaire a été démontrée (Kim *et al.*, 2000; Aguedo *et al.*, 2003).

Plus récemment, la production de différents surfactants a été publiée. Ils sont composés de 43 à 54,3 % de protéines, de 40 à 35,5 % de glucides et de 16 à 8,4 % de lipides (Vance-Harrop *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2006).

Le second mécanisme, dénommé accession interfaciale directe (« *direct interfacial accession* ») implique un contact direct entre les cellules et les gouttelettes lipidiques. Lors de la croissance de *Y. lipolytica* sur acide oléique, on observe plusieurs modifications physiologiques, notamment l'apparition de **protubérances** (Figure 2). Celles-ci semblent intervenir dans les mécanismes d'adhérence des gouttelettes lipidiques aux parois cellulaires (Aguedo *et al.*, 2003; Mlickova *et al.*, 2004).

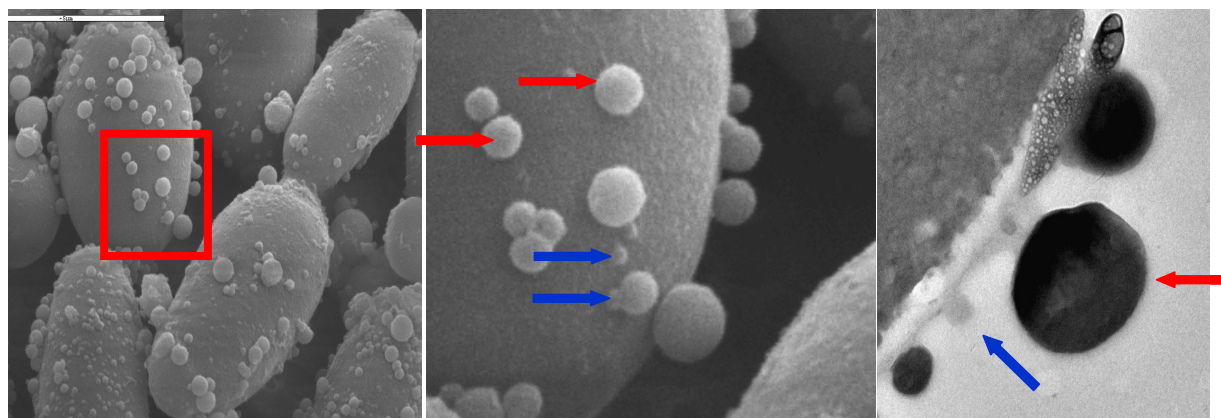


Figure 2 : Analyse de la surface cellulaire de *Y. lipolytica* en présence d'acide oléique. Photographies en microscopie électronique de cellules de *Y. lipolytica* en culture sur milieu minimum en présence d'acide oléique. Des gouttelettes lipidiques (flèche rouge) et des protubérances (flèches bleues) sont observées (Mlickova *et al.*, 2004).

Les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire semblent également être importantes dans ce processus. En effet, Aguedo et collaborateurs ont démontré que l'adsorption des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire résultait en partie d'interactions de type acide-base de Lewis, et pas uniquement d'interactions hydrophobe-hydrophile comme cela était précédemment admis (Aguedo *et al.*, 2003).

C.3. Transport et activation des acides gras

Bien que les levures synthétisent *de novo* tous les acides gras dont elles ont besoin (Daum *et al.*, 1998), leur capacité à utiliser les acides gras ou des dérivés présents dans l'environnement est vitale, dans le cas où des nutriments alternatifs ne sont pas disponibles. Même en présence de sources de carbone plus favorables, leur capacité à importer des acides gras peut constituer un avantage. Elles peuvent ainsi utiliser les molécules existantes nécessaire à la biosynthèse des acides gras sans dépense d'énergie supplémentaire.

Par ailleurs, les acides gras sont des molécules toxiques pour les cellules. Pour cette raison, dès leur apparition dans le cytoplasme, ils sont activés en thioester de Coenzyme-A par des acyl-CoA synthétases (Ratledge, 1994).

Le **mécanisme de transport des acides gras** extracellulaires à travers la membrane plasmique est très **controversé** chez les levures. La majorité des études sur ce sujet, ont été réalisées sur *S. cerevisiae*. La fixation et le transport des acides gras à travers la membrane plasmique sont des processus rapides, particulièrement pour les acides gras non chargés (Kamp *et al.*, 1995). Des études *in vitro* ont démontré que les acides gras libres pouvaient traverser rapidement une bicouche lipidique synthétique à pH physiologique (Hamilton, 1998). Un modèle propose ainsi que l'import des acides gras soit uniquement réalisé par diffusion à travers la membrane cellulaire (Doody *et al.*, 1980; Hamilton, 1998; Kleinfeld et Storch, 1993).

Cependant, si la diffusion représentait la principale force impliquée dans ce processus, la vitesse de transport des acides gras devrait être uniforme dans tous les types cellulaires. Or, d'abondantes données scientifiques relatent des vitesses de transport des acides gras différentes selon les types cellulaires (Abumrad *et al.*, 1991; Trotter *et al.*, 1996; Abumrad *et al.*, 1999). De plus, le transport des acides gras, notamment pour des acides à longue chaîne, est un processus saturable. Ceci a conduit à la proposition un deuxième modèle « protéine-dépendant » basé sur le modèle procaryote, où un transporteur lié à la membrane serait responsable du transport des acides gras exogènes. Par exemple, chez *Escherichia coli*, l'importation des acides gras dépend de deux protéines : le transporteur associé à la membrane externe, FadL, et la synthétase cytosolique des acyl-CoA, FadD. Dans ce deuxième modèle, l'importation et l'activation pourraient être intimement liées. L'activation de l'acide gras importé assurerait sa conservation dans la cellule (Black, 1990; Faergeman *et al.*, 2001).

Un troisième modèle, combinant le modèle de diffusion passive avec l'import protéine-dépendant des acides gras, a été proposé chez *S. cerevisiae* (Faergeman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002). Ce troisième modèle présente la diffusion passive *via* un « flip-flop » des acides gras non chargés de l'extérieur vers l'intérieur des cellules, comme un phénomène probable et l'import des autres acides gras par l'intermédiaire de protéines, comme jouant également un rôle important.

Enfin, lors de cultures de *Y. lipolytica* en présence de substrats hydrophobes, plusieurs modifications de la structure cellulaire se produisent : apparition de protubérances à la surface cellulaire, amincissement de la paroi cellulaire, augmentation du volume de l'espace périplasmique, et apparition d'invaginations dans la membrane et de pores associés aux structures du réticulum endoplasmique connectant les protubérances extramembranaires à l'intérieur de la cellule (Osumi *et al.*, 1975; Kim *et al.*, 2000; Mlickova *et al.*, 2004) (Figure 2). Ces observations ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les alcanes liés aux protubérances pourraient traverser la membrane plasmique *via* les pores jusqu'au réticulum endoplasmique, site de l'hydroxylation par le système monooxygénase P450 (Tanaka et Fukui, 1989). De plus, Kohlwein et Paltauf ont mis en évidence l'existence d'au moins deux systèmes de transport des acides gras chez *Y. lipolytica* sans pour autant les identifier : l'un spécifique des acides gras en C12 et C14, l'autre nécessaire à l'entrée des acides gras en C16 et C18 (Kohlwein et Paltauf, 1984). Les structures ressemblant à des pores traversant la membrane, précédemment décrites, pourraient jouer ce rôle.

Chez *S. cerevisiae*, la protéine Fat1p et les acyl-CoA synthétases, Faa1p et Faa4p, semblent être les principaux acteurs de l'importation protéine-dépendant et de l'activation des acides gras (Faergeman *et al.*, 2001). Fat1p fut identifié comme étant un homologue (similitude de 54%) de la protéine FATP responsable du transport des acides gras dans les adipocytes (Schaffer et Lodish, 1994; Faergeman *et al.*, 2001). En effet, la famille des protéines FATP est fortement conservée chez les eucaryotes. La FATP de souris complémentaire, le phénotype déficient du transport d'acides gras d'une souche de levure dont le gène *FAT1* est disrupté.

Cette protéine semble avoir deux fonctions ; la première est associée à l'importation des acides gras, alors que la seconde est associée à l'activité acyl-CoA synthétase spécifique des substrats à très longue chaîne. Quand des cellules de levure se développent sur un milieu contenant de la céruléine, un inhibiteur de la synthétase des acides gras, la croissance peut être restaurée en ajoutant de l'acide oléique exogène. Cette restauration de phénotype est dépendante de la présence de Fat1p, qui vraisemblablement, est requise pour l'import des acides gras.

La fonction primaire de Fat1p, dans le transport des acides gras est incertaine. Tout d'abord, elle semble être localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane peroxysomale et non pas au niveau de la membrane plasmique (Watkins *et al.*, 1998).

D'ailleurs, Fat1p est principalement impliquée dans l'homéostasie des **acides gras à très longue chaîne** (« Very Long-Chain Fatty Acids », **VLCFA**, > 18 atomes de carbone), et l'effet de la délétion de *FAT1* sur l'import des acides gras est attribué uniquement à des conséquences indirectes de l'absence du gène (Choi et Martin, 1999; Watkins *et al.*, 2000). Une étude par mutagenèse dirigée, démontre que l'activité synthétase des VLCFA de Fat1p pourrait être distincte de sa fonction dans l'importation des acides gras (Zou *et al.*, 2002).

Une protéine chez *S. cerevisiae*, Fat2p/Pcs60p, présente une similitude élevée avec Fat1p et est exclusivement localisée du côté de la lumière de la membrane peroxysomale (Blobel et Erdmann, 1996). Cette protéine pourrait également être impliquée dans le transport des acides gras dans les peroxysomes plutôt que dans le cytosol. Sa fonction n'est pas clairement déterminée, puisqu'une souche délétée du gène *FAT2* ne présente aucun phénotype de croissance sur acide oléique. L'introduction de la délétion *fat2* dans une souche $\Delta fat1$ ne cause pas de perte additionnelle d'activité acyl-CoA synthétase (Blobel et Erdmann, 1996; Choi et Martin, 1999).

En plus de l'activité synthétase des VLCFA, l'importation des acides gras chez *S. cerevisiae* est également dépendante de deux synthétases des **acides gras à longue chaîne** (« Long-Chain Fatty Acids », **LCFA**, 16 à 18 atomes de carbone) codées par *FAA1* et *FAA4* (Faergeman *et al.*, 2001). Les protéines correspondant à ces deux gènes représentent ensemble 99% des activités cellulaires des myristoyl-CoA et palmitoyl-CoA synthétases (Knoll *et al.*, 1994; Knoll *et al.*, 1995). Une double délétion de ces gènes a comme conséquence l'altération du transport des acides gras (Faergeman *et al.*, 2001). Enfin, c'est la conversion des acides gras en acyl-CoA esters par Faa1p et Faa4p qui établit un gradient de concentration des acides gras à travers la membrane. Ce processus d'activation aide à extraire les acides gras de la membrane et à les transporter (Choi et Martin, 1999; Faergeman *et al.*, 2001).

Dans les cellules de mammifère, une famille de protéines liant les acides gras (« Fatty Acid-Binding Proteins », FABP), solubles et de faible poids moléculaire (14-15 kDa) est impliquée dans le métabolisme des acides gras libres. Bien que le rôle exact des FABP reste à établir, on pense qu'elles pourraient détourner les acides gras libres dans un pool, empêchant ainsi, par exemple, leur insertion incorrecte dans les membranes (Kunau *et al.*, 1995).

Chez *Y. lipolytica*, l'existence d'au moins une protéine FABP ainsi que son induction en présence de palmitate a été démontrée (Dell'Angelica *et al.*, 1992). Cette protéine appartient à la famille des gènes *SCP* impliquée dans le transport du stérol. Elle semble être importante pour l'utilisation efficace des acides gras par *Y. lipolytica*. Au cours de la même étude, aucune protéine de ce type n'a pu être mise en évidence chez *S. cerevisiae*.

Le transport cytosolique des acides gras activés et le pool d'acyl-CoA pourraient être régulés, au moins en partie, par les protéines liant les acyl-CoA (« Acyl-CoA Binding Proteins », ACBP). Les ACBP ont généralement une masse d'environ 10 kDa et constituent, chez les eucaryotes, une famille hautement conservée de protéines. Elles lient les acides gras activés d'une longueur de 14 à 22 atomes de carbone et jouent un rôle important dans la médiation du transport des acides gras activés entre les membranes (Faergeman et Knudsen, 1997). Chez *S. cerevisiae*, une ACBP est codée par le gène *ACBI* (Rose *et al.*, 1992; Knudsen *et al.*, 1994). Bien que les conséquences de l'absence d'Acb1p dans la β -oxydation n'aient pas été directement étudiées, il est supposé qu'elle n'ait qu'un effet indirect et ceci est dû à sa capacité à réguler les concentrations intracellulaires en acyl-CoA (Schjerling *et al.*, 1996; Faergeman et Knudsen, 1997; Trotter, 2001). Cependant, d'autres données suggèrent un rôle d'Acb1p plus spécifique, dans le transport des acyl-CoA jusqu'au système d'élongation des acides gras. Des expériences de déplétion d'Acb1p chez *S. cerevisiae* montrent des effets négatifs sévères sur la croissance cellulaire et l'organisation membranaire, probablement causés par l'altération de l'élongation des acides gras et de la synthèse des sphingolipides.

C.4. Transport via les ABC transporteurs et peroxysomes

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

Le génome de *S. cerevisiae* compte 30 gènes codant des protéines ABC. Plusieurs d'entre elles effectuent la translocation membranaire de centaines de xénobiotiques structurellement et fonctionnellement indépendants, et sont impliquées dans la détoxification cellulaire ou encore, confèrent la **résistance pléiotropique aux drogues** (« Pleiotropic Drug Resistance », **PDR**). Les xénobiotiques, en particulier les médicaments, sont des composés fréquemment hydrophobes. Chez l'homme, des systèmes de détoxification permettent la métabolisation de ces produits en composés plus hydrophiles pour pouvoir les éliminer dans l'urine ou la bile. Les protéines ABC sont généralement désignées sous le nom de pompes ABC d'efflux de drogues (Holland *et al.*, 2003).

Le PDR, chez les levures, est similaire au phénomène de **résistance multidrogue** (« MultiDrug Resistance » **MDR**) qui a lieu dans les cellules tumorales, chez les parasites, les champignons pathogènes ou même les bactéries (Dean et Annilo, 2005; Holland *et al.*, 2003). Les protéines ABC ne fonctionnent pas uniquement comme des transporteurs membranaires. Elles sont également impliquées dans le maintien de la fonction mitochondriale, la maturation de protéines cytosoliques Fe/S, la sécrétion de phéromones, la biogenèse des peroxysomes, la réponse au stress ainsi que l'homéostasie de la bicouche lipidique ou le transport lipidique (Holland *et al.*, 2003).

L'organisation structurale des protéines ABC est défini par la présence d'au moins un **domaine de fixation aux nucléotides** (« Nucleotide-Binding Domain », **NBD**). Les NBD présentent un motif de fixation à l'ATP hautement conservé ainsi que des motifs signatures. Les NBD, en hydrolysant l'ATP, sont requis pour le transport membranaire des substrats ou d'autres fonctions. De plus, les protéines ABC liées à la membrane contiennent généralement un nombre variable de **segments transmembranaires** (« TransMembrane-spanning Segments », **TMS**) qui peuvent déterminer des spécificités de substrat différentes selon les protéines ABC. Les TMS sont certainement des outils de l'architecture des pores de translocation du substrat, mais leur structure reste incertaine.

C.4.1. Architecture moléculaire des protéines ABC chez les levures

Chez les levures, les protéines ABC sont classées en cinq sous-familles : PDR, MRP (« Multidrug Resistance-related Protein ») / CFTR (« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »), MDR, ALDp, et la sous-famille YEF3/RLI (Taglicht et Michaelis, 1998). Le domaine NBD couvre approximativement 250 résidus et contient plusieurs sous-domaines conservés incluant les motifs Walker A et B, la région signature (aussi appelé motif LSGGQ ou région C) et les boucles D, H et Q. Une boucle A en aval du motif Walker A, essentielle à la fixation de l'ATP, a été récemment identifiée (Ambudkar *et al.*, 2006).

Contrairement à la haute conservation des domaines NBD, des variations considérables entre les différentes sous-familles d'ABC, sont présentes au niveau du nombre et des arrangements des TMS. Par exemple, alors que les membres des familles PDR contiennent six TMS prédits, les protéines YEF3/RLI ont perdu l'ensemble des TMS (Figure 3).

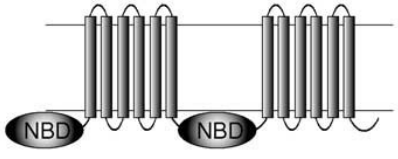
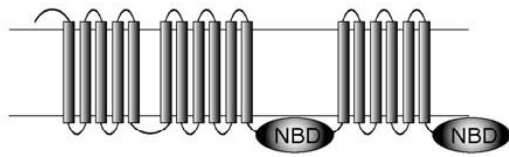
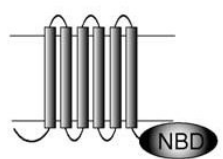

Sous-famille ABC	Topologie	Domaines
PDR		$(\text{NBD-TMS}_6)_2$
MRP/CFTR		$\text{NTE}(\text{TMS}_6\text{-NBD})_2$
MDR/ALDP (half-size)		$\text{TMS}_6\text{-NBD}$
YEF3/RLI		NBD_2

Figure 3. Topologie et organisation des sous-familles des ABC transporteurs chez les levures. Cette figure présente schématiquement la topologie membranaire prédite et l'organisation des domaines de toutes les sous-familles d'ABC transporteurs de levure. NBD, domaine de fixation aux nucléotides ; NTE, extension N-terminale ; TMS, segment transmembranaire (Jungwirth et Kuchler, 2006).

Généralement, un ABC transporteur fonctionnel est constitué d'une combinaison de deux domaines NBD et de deux domaines TMS. Les transporteurs entiers comportent l'ensemble de ces domaines sur une seule chaîne polypeptidique alors que les demi-transporteurs achèvent leur fonctionnalité en combinant deux unités NBD-TMS sous la forme d'un homo- ou d'un hétérodimère dans un complexe ABC transporteur lié à la membrane.

Les protéines ABC entières ont une organisation dupliquée en tandem, avec habituellement six hélices membranaires prédites dans chaque moitié, dans la configuration directe $(TMS_6-NBD)_2$ ou inversée $(NBD-TMS_6)_2$ (Figure 3). Les protéines MRP/CFTR présentent un TMS additionnel en N-terminal.

Le modèle du cycle catalytique des protéines ABC des levures a été originalement proposé à partir du modèle de la P-glycoprotéine chez les mammifères et n'a pas été expérimentalement vérifié (Senior et Gadsby, 1997). Les études structurales et biochimiques menées sur l'induction de l'hydrolyse de l'ATP par la fixation de haute affinité d'un substrat, ont démontré un changement conformationnel du complexe ABC transporteur. Cela induit un décalage du substrat sur un site de fixation de plus faible affinité. Le substrat transporté est alors déchargé dans l'espace cytoplasmique ou extracellulaire. L'hydrolyse de l'ATP au niveau du second site de fixation de l'ATP restaure la conformation originale de l'ABC transporteur qui est de nouveau prêt à fixer un autre substrat.

C.4.2. Fonctions des ABC transporteurs chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les cellules de levures peuvent rapidement surmonter les contraintes environnementales toxiques par des systèmes efficaces de **détoxification** tels que la machinerie PDR. Le PDR est réalisé par la surexpression des pompes de la membrane plasmique et des transporteurs vacuolaires (Tableau 2). Cependant, le PDR n'entraîne pas uniquement l'hypertolérance à de nombreuses drogues exogènes ou à des xénobiotiques. Il protège également les cellules contre des effets secondaires non désirés de métabolites toxiques endogènes. Ce second effet implique les membres de la superfamille des facilitateurs majeurs (« Major Facilitator Superfamily » MFS), et plusieurs pompes ABC présentes au niveau de la membrane cellulaire des compartiments (Nelissen *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 2002) (Figure 4). De plus, de nombreux ABC transporteurs sont étroitement régulés par des facteurs de transcription, dans le cadre du réseau PDR, dans des conditions physiologiques ou défavorables.

C.4.3. Distribution cellulaire des ABC transporteurs

◆ ABC transporteurs de la membrane plasmique : la première ligne de défense

Excepté pour Adp1p, tous les membres de la sous-famille PDR sont des protéines ABC présentant une configuration dupliquée inversée (NBD-TMS₆)₂ (Figure 3 et Tableau 2). Certains transporteurs PDR sont responsables de la translocation de drogues anticancéreuses, de phospholipides, de peptides, de stéroïdes et d'herbicides, et peuvent être donc considérés comme la première ligne de défense chez *S. cerevisiae* (Schuller *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Protéines ABC chez la levure *S. cerevisiae*.

Protéines ABC	Famille	Taille (aa)	Topologie	Fonction	Substrats
<i>Membrane plasmique</i>					
Pdr5p	PDR	1511	(NBD-TMS ₆) ₂	PDR, transport de lipides	Cycloheximide, azolés, mycotoxines
Snq2p	PDR	1501	(NBD-TMS ₆) ₂	PDR	Drogues, agents mutagènes
Pdr12p	PDR	1511	(NBD-TMS ₆) ₂	Réponse au stress acide faible	Acides organiques faibles
Pdr15p	PDR	1529	(NBD-TMS ₆) ₂	Réponse au stress général	Drogues, herbicides, 2,4-DCP
aus1p	PDR	1394	(NBD-TMS ₆) ₂	Import stérols	Stérols
Pdr11p	PDR	1411	(NBD-TMS ₆) ₂	Import stérols	Stérols
Yor1p	MRP/CFTR	1477	NTE(TMS ₆ -NBD) ₂	PDR, transport de lipides	Oligomycine, phospholipides
Ste6p	MDR	1290	(TMS ₆ -NBD) ₂	Transport de déterminants sexuels	Facteur a
<i>Vacuole</i>					
Ycf1p	MRP/CFTR	1515	NTE(TMS ₆ -R-NBD) ₂	Détoxification cellulaire	Conjugués GS, métaux lourds
Bpt1p	MRP/CFTR	1559	NTE(TMS ₆ -NBD) ₂	Détoxification cellulaire	Bilirubin, cadmium, arsenate
Ybt1p	MRP/CFTR	1661	NTE(TMS ₆ -NBD) ₂	Inconnue	Acides biliaires, taurocholate
<i>Mitochondrie</i>					
Atm1p	MDR	694	TMS ₆ -NBD	Translocation Fe(S)	Protéines Fe(S)
Mdl1p	MDR	696	TMS ₆ -NBD	Réponse au stress oxydatif	Peptides
Mdl2p	MDR	820	TMS ₆ -NBD	Inconnue	Inconnus
<i>Peroxisome</i>					
Pxa1p	ALDp	870	TMS ₆ -NBD	Transport des acides gras	LCFA
Pxa2p	ALDp	853	TMS ₆ -NBD	Transport des acides gras	LCFA

Abbreviations : NBD, domaine de fixation aux nucléotides ; NTE, extension N-terminale ; TMS, segment transmembranaire ; PDR, résistance pléiotrope aux drogues ; PL, phospholipides ; GS, S glutathione ; LCFA, acides gras à longue chaîne carbonée (Jungwirth et Kuchler, 2006).

Parmi les protéines ABC localisées à la membrane plasmique de la sous-famille PDR, les ABC transporteurs **Pdr5p** et **Snq2p** sont les mieux caractérisés (Bissinger et Kuchler, 1994; Servos *et al.*, 1993). L'exporteur multidrogue majeur chez *S. cerevisiae*, Pdr5p, présente des mécanismes de reconnaissance et de transport des substrats similaires au transporteur humain MDR1-Pgp et ceci en dépit d'une topologie de domaines transmembranaires et de fixation de l'ATP inversée. La surexpression de Pdr5p et de Snq2p amènent au phénomène de PDR, puisqu'ils expulsent des centaines de xénobiotiques structuralement et fonctionnellement indépendants à travers la membrane plasmique (Kolaczowski *et al.*, 1998; Servos *et al.*, 1993). De plus, les quantités de Pdr5p sont élevées pendant la phase de croissance logarithmique alors qu'elles diminuent significativement quand la cellule sort de la phase exponentielle (Mamnun *et al.*, 2004). Ainsi, Pdr5p, durant la phase exponentielle, est impliquée principalement dans la détoxification.

Une reconstruction tridimensionnelle de Pdr5p a révélé une organisation dimérique dans laquelle les NBD sont étroitement proches et asymétriques alors que leurs extrémités sont séparées (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003). Ces résultats s'opposent aux résultats génétiques obtenus précédemment, qui suggéraient que Pdr5p était active sous forme de monomère et supposent des mouvements de rotations significatifs des NBD durant le cycle catalytique (Egner *et al.*, 1998). La forme et la structure de Pdr5p déterminent à la fois la spécificité et la susceptibilité aux inhibiteurs aussi bien que le repliement approprié du transporteur (le TMS10 et la boucle extracellulaire voisine 6, peut-être en interagissant avec les autres TMS) (Egner *et al.*, 2000; Plemper *et al.*, 1998).

L'organisation structurale de Pdr5p apparaît bien établie. Toutefois, ce n'est pas le cas pour les autres membres de la famille PDR, incluant Pdr12p, Pdr15p et Pdr10p. Pdr12p ne transporte pas de drogues hydrophobes, mais confère la résistance aux acides organiques faibles. En effet, pdr12p, le plus proche homologue de Snq2p, entraîne l'expulsion énergie-dépendante des anions carboxylates solubles dans l'eau, tels que le benzoate, le sorbate ou le propionate (Piper *et al.*, 1998).

L'ABC transporteur Pdr15p est une autre protéine membranaire dont toutes les fonctions ne sont pas bien connues, bien qu'il confère la résistance aux chloramphénicol, au polyoxyéthylène-9-lauryléther et aux herbicides (Jungwirth et Kuchler, 2006; Wolfger *et al.*, 2004).

Enfin, deux ABC transporteurs additionnels, localisés au niveau de la membrane plasmique, Aus1p et Pdr11p, peuvent être impliqués dans le transport du stérol quand la biosynthèse du stérol endogène est altérée, par exemple, lors de la croissance anaérobie (Wilcox *et al.*, 2002). *AUS1* est également surexprimé en réponse aux traitements azolés, suggérant qu'il pourrait entraîner un efflux de drogue (Barker *et al.*, 2003).

Alternativement, Aus1p pourrait contrecarrer l'organisation aberrante des lipides membranaires causée par l'absence d'ergostérol, une conséquence directe du traitement azolé.

La sous-famille MRP/CFTR ne comporte qu'un seul transporteur localisé à la membrane plasmique : le transporteur d'oligomycine Yor1p. Le résidu phénylalanine en position 670 du NBD1 de Yor1p est déterminant pour sa fonction ; sa délétion entraîne une instabilité, sa retenue à la membrane du réticulum endoplasmique et son incapacité à conférer la résistance à l'oligomycine (Katzmann *et al.*, 1994). De plus, la mutagenèse des régions N- et C-terminal de Yor1p suggère l'existence de multiples signaux d'adressage (Epping et Moye-Rowley, 2002).

Enfin, la seule protéine ABC de la sous-famille MDR, Ste6p, qui fut le premier ABC transporteur identifié chez les levures, est responsable de l'export de la phéromone lipopeptide essentiel pour le croisement des cellules haploïdes de levure (Kuchler *et al.*, 1989).

◆ *ABC transporteurs vacuolaires : la ligne intracellulaire de défense*

La majorité des protéines MRP/CFTR chez les levures semble être responsable de la séquestration vacuolaire par l'intermédiaire du transport d'une variété de composés toxiques, une fonction tout à fait semblable aux orthologues de mammifères opérant dans la détoxification des xénobiotiques conjugués du foie (Holland *et al.*, 2003).

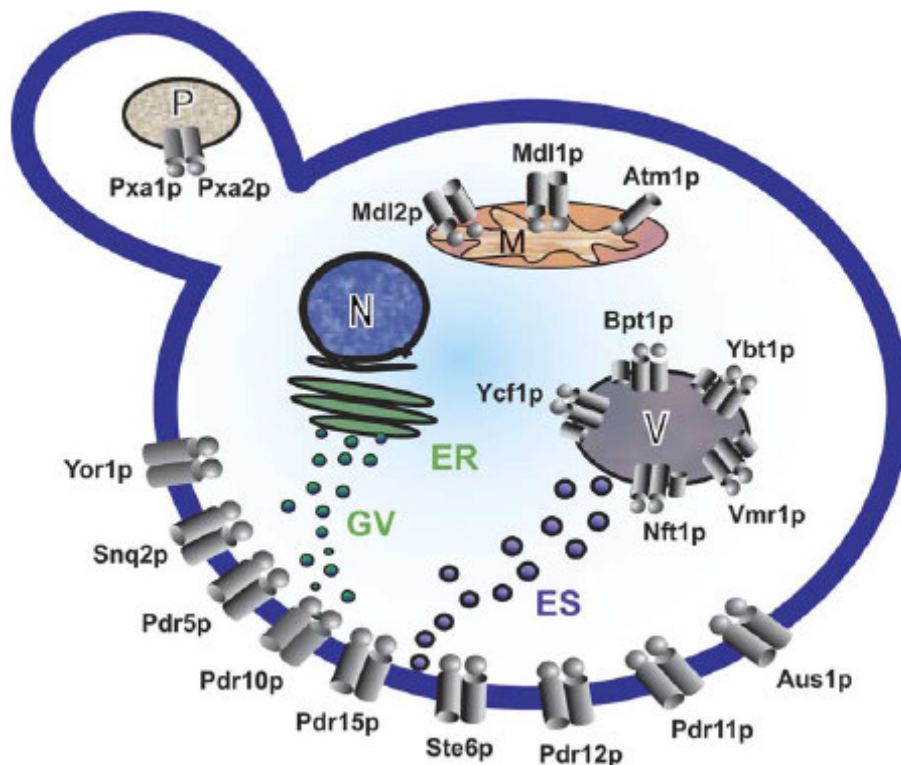


Figure 4. Localisation des ABC transporteurs membranaires chez les levures. Le schéma présente la localisation subcellulaire des ABC transporteurs membranaires à la surface cellulaire, dans la vacuole, dans les mitochondries et les peroxysomes. Seuls les ABC transporteurs dont la fonction a été étudiée sont représentés (voir le texte pour des détails). N, noyau ; V, vacuole ; ER, réticulum endoplasmique, GV, vésicule de Golgi ; ES, endosome. M, mitochondrie, P, peroxysome (Jungwirth et Kuchler, 2006).

Le facteur de cadmium de *S. cerevisiae* (Ycf1p) entraîne la détoxification vacuolaire des métaux lourds et des S-glutathion conjugués, et du colorant rouge s'accumulant dans les cellules du mutant *ade2* (Li *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2003). Ycf1p est un orthologue de levure des MRP de mammifère, impliqué dans des phénotypes de MDR des cellules tumorales et dans des défauts génétiques proéminents dans des processus de transport hépatobiliaire (Holland *et al.*, 2003).

Ycf1p présente également un domaine de régulation putatif (R-domaine), comme chez les membres de la sous-famille CFTR et dans l'extension N-terminal des membres de la sous-famille MRP (Riordan, 2005; Tusnady *et al.*, 1997). L'extension N-terminal semble nécessaire à la localisation membranaire de Ycf1p (Mason et Michaelis, 2002). La phosphorylation de deux résidus, Ser 908 et Thr 911, dans le domaine R putatif de Ycf1p, est essentielle pour la détoxification du cadmium (Eraso *et al.*, 2004). En outre, une région unique dans la boucle 6 du premier domaine transmembranaire de Ycf1p, nommée boucle 6 d'insertion, est nécessaire et suffisant pour le processus protéolytique, et de plus, semble être responsable de la spécificité de substrat (Mason *et al.*, 2003). Les études récentes suggèrent une contribution possible de Ycf1p dans les processus cellulaires de vieillissement. L'absence de *YCF1* entraîne une perte de viabilité pendant le vieillissement. Cet effet est dû à un phénomène d'apoptose accru, indiquant que Ycf1p pourrait jouer un rôle important dans la mort apoptotique des cellules chez *S. cerevisiae* (Jungwirth et Kuchler, 2006).

L'homologue de Ycf1p, Bpt1p, entraîne également la détoxification du cadmium, la résistance à l'acétaminophène, la pigmentation *ade2* et catalyse le transport des conjugués de glutathion, aussi bien que du glutathion libre (Petrovic *et al.*, 2000). Un autre ABC transporteur vacuolaire, Ybt1p/Bat1p, est responsable du transport ATP-dépendant d'acide biliaire (Klein *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002). La fonction de Ybt1p/Bat1p demeure inconnue. Cependant, il est probable que Ybt1p/Bat1p séquestre des molécules s'apparentant aux détergents pour prévenir l'altération des membranes des organites (Ortiz *et al.*, 1997).

◆ Fonction et transport vers les peroxysomes

Les peroxysomes représentent un compartiment subcellulaire particulièrement important chez les levures. Il est, en effet, l'unique siège de la voie de la **β -oxydation** car, contrairement aux cellules de mammifères, dans lesquelles la voie de la β -oxydation a lieu dans les mitochondries et dans les peroxysomes, les levures ont perdu les enzymes requises pour la β -oxydation mitochondriale (Kunau, 1998).

Les peroxysomes sont impliqués directement dans le métabolisme des substrats hydrophobes. En effet, le transfert de *Y. lipolytica* d'un milieu contenant du glucose à un milieu contenant de l'acide oléique comme seule source de carbone, s'accompagne d'une prolifération des peroxysomes et d'une augmentation de l'activité des enzymes de la β -oxydation (Figure 5).

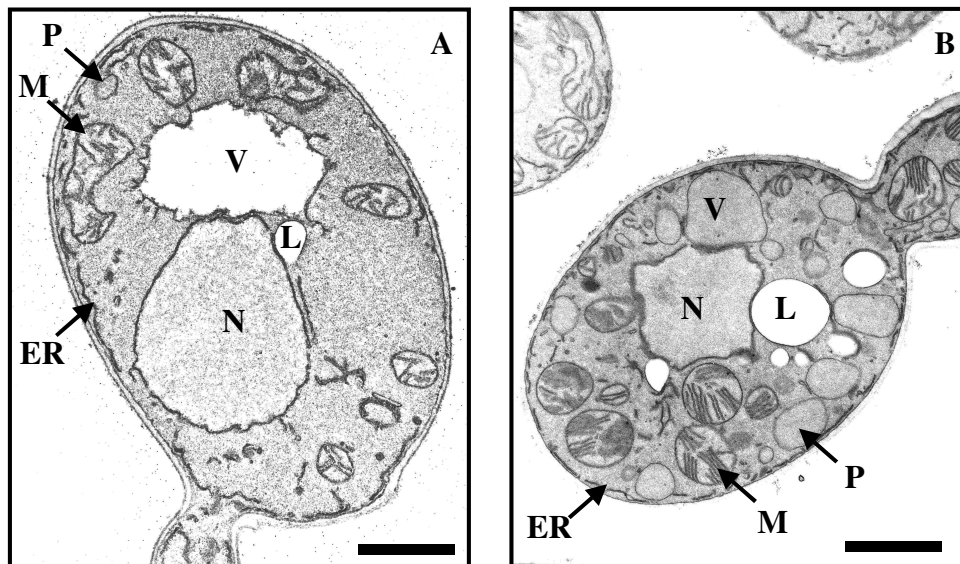


Figure 5. Prolifération des peroxysomes chez *Y. lipolytica* en présence d'acides gras. Des cellules de *Y. lipolytica* sont cultivées en présence de glucose (A) ou d'acide oléique (B). Une prolifération des peroxysomes est observée lorsque les cellules sont en présence d'acide oléique. Les symboles sont: P; peroxysome, M; mitochondrie, N; noyau, ER; réticulum endoplasmique; V, vacuole et L; particule lipidique (Rachubinski R.).

Ces phénomènes ont été également observés chez d'autres levures dont *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* et *Hansenula polymorpha*. L'analyse de mutants incapables de pousser sur acides gras ou alcanes comme seule source de carbone, a révélé une modification de la localisation des enzymes de la matrice peroxysomale (cytoplasme) et l'absence de peroxysomes. D'autres travaux de recherche sur la biogenèse des peroxysomes, l'adressage et le transport des protéines dans les peroxysomes ont permis d'identifier plus de 30 gènes impliqués dans ces processus, appelés gènes « *PEX* » pour peroxines.

L'adressage des protéines à la matrice peroxysomale est particulièrement bien décrit. Ces protéines présentent habituellement un signal d'adressage en C-terminal (PTS1) ou en N-terminal (PTS2) reconnu par des récepteurs PTS (« Peroxisome Target Signal ») de la membrane peroxysomale, notamment Pex5p. Le complexe récepteur-protéine traverse ensuite la membrane par un mécanisme qui requiert des protéines et est libéré sur la face cytosolique de la membrane peroxysomale.

La membrane peroxysomale est imperméable aux petits métabolites (van Roermund *et al.*, 1995). Cependant, si le flux de carbone à travers la β -oxydation est maintenu, les métabolites doivent continuellement traverser la membrane peroxysomale. Cette propriété membranaire a déclenché des études intensives sur le trafic des acides gras, de l'ATP, l'acétyl-CoA, le NADH, le NADPH, et d'autres métabolites, à travers la membrane. Jusqu'ici, seul un transporteur d'ATP peroxysomal, Ant1p (Palmieri *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 2001), a été fonctionnellement reconstitué tandis qu'une fonction de transporteur a été rapportée pour un complexe de protéine, Pxa1p-Pxa2p (Hetteema *et al.*, 1996; Shani et Valle, 1996). Les deux transporteurs fournissent des acides gras activés pour la β -oxydation peroxysomale.

Les **acides gras à longue chaîne** (« Long-Chain Fatty Acids », **LCFA**) sont principalement transportés sous leur forme activée dans la lumière peroxysomale par l'hétérodimère Pxa1p-Pxa2p (Figure 6). Tous deux sont des demi-transporteurs de la membrane peroxysomale, présentant une topologie TMS6-NBD. Chez les levures, Pxa1p/Pxa2p sont des orthologues du transporteur humain Pmp70 et des transporteurs peroxysomaux ALDp liés à la maladie mortelle neurodégénérative de l'adrénoleucodystrophie. Cette maladie est caractérisée par l'accumulation des **acides gras à très longue chaîne** activés (« Very Long-Chain Fatty Acids », **VCFA**) dans le sérum, due au blocage de leur dégradation (Gartner, 2000; Mosser *et al.*, 1993). Des mutations ont également été identifiées dans le gène *PMP70* chez deux patients présentant le syndrome de Zellweger (Gartner, 2000) qui se traduit par une altération de la biogenèse des peroxysomes.

Chez *S. cerevisiae*, la disruption des gènes codant **Pxa1p** ou **Pxa2p** affecte la croissance sur un milieu contenant des LCFA comme seule source de carbone. Les niveaux de β -oxydation du mutant sont seulement de 50% par rapport à ceux des cellules sauvages et ceci bien que la biogenèse et la fonction peroxysomale ne soient pas affectées (Bossier *et al.*, 1994; Hettema *et al.*, 1996; Swartzman *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données expérimentales a conduit à émettre l'hypothèse que, dans les cellules de mutants $\Delta pxa1$ ou $\Delta pxa2$, les LCFA ne peuvent pas entrer dans les peroxysomes, la β -oxydation n'étant pas affectée dans les lysats cellulaires de ces mutants. Puisque Pxa1p-Pxa2p sont uniquement exigés pour la β -oxydation des LCFA (activés dans le cytosol), les substrats candidats pour l'importation sont apparemment les LCFA activés (Hettema *et al.*, 1996). Cette hypothèse est confirmée, par le fait que le métabolisme des LCFA dépend complètement de Pxa1p-Pxa2p dans les cellules du mutant $\Delta faa2$ où l'activité acyl-CoA synthétase est nulle (Hettema *et al.*, 1996). Le mécanisme exacte par lequel Pxa1p-Pxa2p transfère son substrat à travers la membrane n'est pas encore élucidé, mais il est probable que le groupe polaire CoA de l'acide gras activé soit déplacé à travers la bicouche par Pxa1p-Pxa2p de façon ATP-dépendante (Hettema et Tabak, 2000).

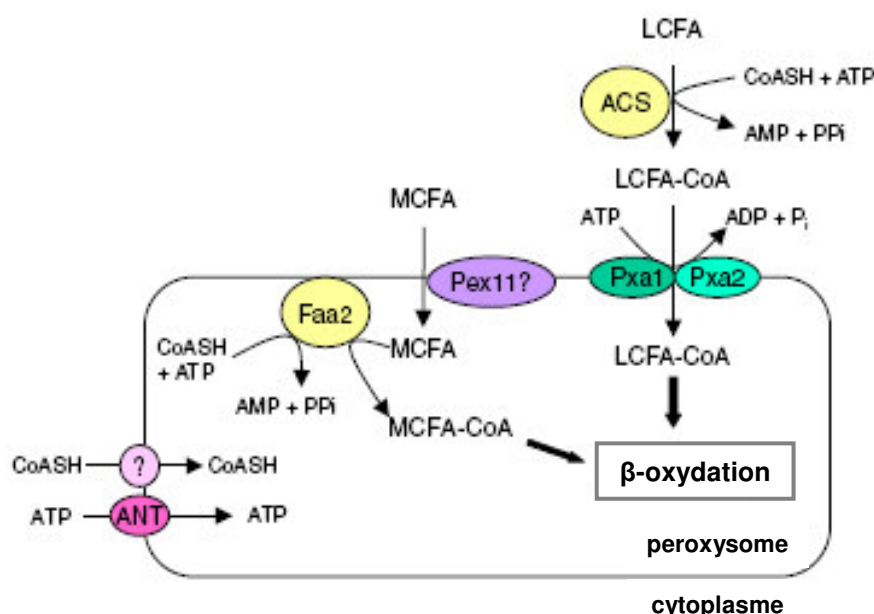


Figure 6. Import des acides gras dans les peroxysomes chez les levures. Les LCFA sont activés dans le cytoplasme par ACS. Des esters de LCFA-CoA sont importés dans le peroxysome par l'hétérodimère Pxa1p/Pxa2p. En revanche, les MCFA sont importés indépendamment de Pxa1p/Pxa2p et activés dans les peroxysomes par l'action de l'acyl-CoA synthétase, Faa2p. Faa2p exige un pool d'ATP et de CoA peroxysomal fourni par l'antp peroxysomal et un transporteur de CoA (?), respectivement. Pex11p, pourrait jouer un rôle dans l'importation des MCFA. LCFA, acides gras à longue chaîne carbonée ; MCFA, acides gras à moyenne chaîne carbonée (Theodoulou *et al.*, 2006).

Ces transporteurs pourraient former des homo- ou des hétérodimères pour permettre le transport des divers substrats qui, par analogie à la levure, pourraient également se révéler chez les mammifères, être des VLCFA activés. Cependant, la localisation intraperoxisomale de la VLCFA synthétase chez les mammifères (Smith *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 1999) présente d'autres spécificités de substrat pour la famille de transporteur ALDP.

Chez *S. cerevisiae*, les mutants $\Delta pxa1$ ou $\Delta pxa2$ sont capables de se développer sur des **acides gras à moyenne chaîne** (« Medium Chain Fatty Acids », **MCFA**, 10 à 14 atomes de carbone) comme l'acide laurique (MC12 :0)(Figure 6). De plus, l'acyl-CoA synthétase peroxyisomale, Faa2p, est requise pour l'oxydation des MCFA mais pas des LCFA. Ainsi, il apparaît que les MCFA entrent dans les peroxyisomes avant leur activation, expliquant ainsi leur indépendance vis-à-vis du transporteur Pxa1p-Pxa2p. La mauvaise localisation de Faa2p dans le cytosol, entraîne l'activation des MCFA à l'extérieur des peroxyisomes et leur oxydation devient entièrement dépendante de la présence de Pxa1p-Pxa2p. La réaction d'activation est catalysée par Faa2p relié au pool d'ATP peroxyisomal, qui est maintenu par le transporteur Ant1p (Palmieri *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 2001)(Figure 6). Ant1p appartient à la famille mitochondriale des transporteurs, dont les membres sont habituellement localisés à la membrane intérieure mitochondriale (Palmieri *et al.*, 2000). Cependant, des représentants peroxyisomiaux ont également été identifiés parmi cette famille de protéines dans la plupart des autres espèces, y compris Pmp47p chez *Candida boidinii* (Jank *et al.*, 1993) et PMP34p chez l'homme (Wysin *et al.*, 1998).

Le transport spécifique d'ATP par **Ant1p** pourrait être sans équivoque démontré en reconstituant fonctionnellement des transporteurs purifiés dans les liposomes (Palmieri *et al.*, 2001). Ant1p échange de l'ATP pour de l'ADP, mais également pour de l'AMP, ce qui constitue une spécificité de substrat différente, par rapport à l'échangeur mitochondriale d'ADP/ATP (Klingenberg, 1979). Cette propriété est significative puisque l'AMP est généré par l'activation des MCFA, donc, il a été suggéré que la fonction principale d'Ant1p serait probablement d'échanger de l'AMP pour de l'ATP cytosolique, à travers la membrane peroxyisomale. Le phénotype de croissance d'une souche exempte de Ant1p, confirme une telle fonction, car un tel mutant peut se développer sur LCFA mais pas sur MCFA (Palmieri *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 2001). On observe un phénotype semblable pour la souche de *C. boidinii* exempte de Pmp47p (Nakagawa *et al.*, 2000), une protéine qui peut fonctionnellement remplacer Ant1p (Palmieri *et al.*, 2001).

Une protéine additionnelle, Pex11p, est également soupçonnée de jouer un rôle dans le transport de MCFA à travers la membrane peroxysomale. Pex11p est une protéine membranaire peroxysomale impliquée dans la division des peroxysomes (Erdmann et Blobel, 1995; Marshall *et al.*, 1995). Cependant, elle est également impliquée dans la β -oxydation (van Roermund *et al.*, 2000) en liant les acides gras par l'intermédiaire d'un domaine semblable au domaine de fixation au ligand d'un récepteur d'hormones (Barnett *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que Pex11p est directement impliquée dans la prolifération peroxysomale indépendamment du flux de carbone de la β -oxydation, puisque la surexpression de Pex11p induit la prolifération peroxysomale en absence d'acides gras dans le milieu de croissance ou d'un processus intact de β -oxydation (Li et Gould, 2002). Il a donc été suggéré que les effets observés par la délétion du gène *PEX11* sur le métabolisme des acides gras pouvaient être indirects. Il est cependant, probable que Pex11p soit une protéine multifonctionnelle, impliquée dans les deux processus, c'est-à-dire dans la prolifération et dans la β -oxydation peroxysomale.

◆ *ABC transporteurs des mitochondries*

Trois protéines ABC, Atm1p, Mdl1p et Mdl2p, sont localisées au niveau de la membrane interne mitochondriale. La protéine ABC Atm1p, exécute une fonction essentielle dans la génération des protéines fer soufre (Fe/S) cytosoliques, mais non mitochondriales, en exportant des précurseurs Fe/S des mitochondries (Kispal *et al.*, 1999; Leighton et Schatz, 1995). Atm1p agit sous forme d'homodimère. Des mutations, dans le NBD, affectent la stabilité du dimère, et les résidus conservés dans les motifs Walker A et B sont essentiels pour sa fonction (Chen et Cowan, 2003). La protéine ABC Mdl1p, forme un dimère et probablement des complexes hétéro-oligomères en présence d'ATP, en s'assemblant de manière nucléotide-dépendante avec la F1F0-ATP synthase monomérique (Galluhn et Langer, 2004). Mdl1p exporte les peptides mitochondriaux issus de la protéolyse des protéines de la membrane interne dans la matrice mitochondriale (Young *et al.*, 2001). D'ailleurs, Mdl1p peut également jouer un rôle dans la régulation de la résistance cellulaire au stress oxydatif (Chloupkova *et al.*, 2003). Mdl1p est l'homologue le plus proche du transporteur des mammifères lié à la présentation d'antigène (TAP), qui organise le transport des peptides antigéniques, dans la lumière du réticulum endoplasmique (Abele et Tampe, 2004). Le deuxième ABC transporteur mitochondriale qui présente une haute similarité de séquence avec TAP, Mdl2p, n'affecte pas le transport de peptide à travers la membrane interne et sa fonction reste inconnue jusqu'à présent.

C.4.4. Régulation de l'expression des gènes *ABC* chez *S. cerevisiae*

Les régulateurs à doigt de zinc $Zn(II)_2Cys_6$, **Pdr1p** et **Pdr3p**, sont parmi les régulateurs principaux du réseau PDR (Balzi *et al.*, 1987; Delaveau *et al.*, 1994)(Figure 6). Ils forment des homo- et des hétérodimères (Mamnun *et al.*, 2002). Ils régulent la transcription dans les promoteurs des gènes cibles du PDR à travers des éléments agissant en *cis*, connus sous le nom de PDRE (éléments pleiotropiques de résistance aux drogues) (Katzmann *et al.*, 1994; Mahe *et al.*, 1996; Wolfger *et al.*, 1997). La transcription de *PDR5*, *SNQ2*, *PDR10*, *PDR15* et *YOR1* est contrôlée par Pdr1p/Pdr3p (Figure 7). Yrr1p module l'expression de *SNQ2* et de *YOR1* (Cui *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). *PDR3* et *YRR1* s'autorégulent également par l'intermédiaire de PDRE présents dans leur propre promoteur (Delahodde *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1998)(Figure 7).

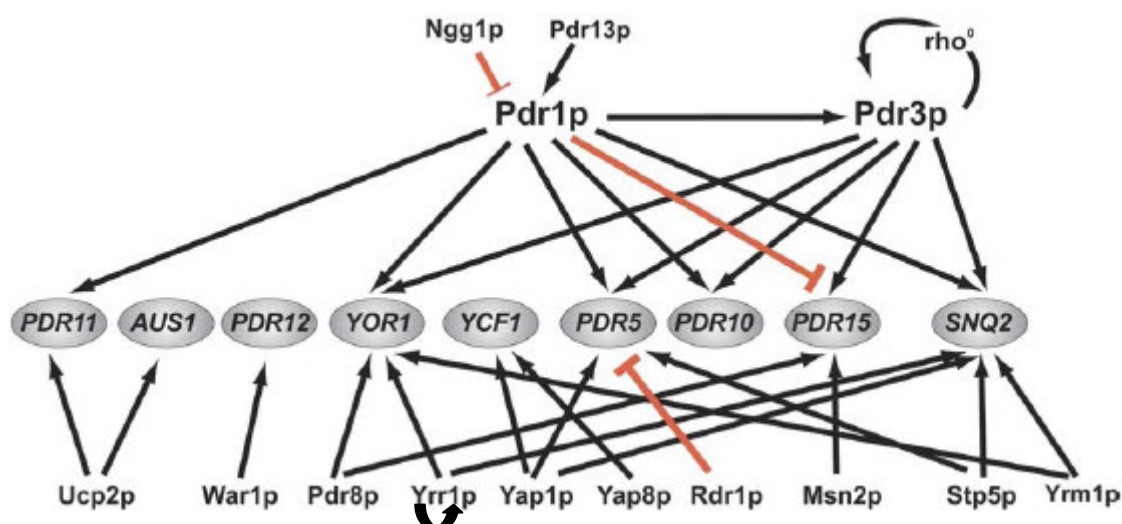


Figure 7. Le réseau PDR de la famille des gènes *ABC* chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les gènes de la ligne centrale représentent les gènes cibles des régulateurs transcriptionnels représentés au-dessus et au-dessous. Les lignes rouges indiquent une régulation négative, alors que les flèches noires indiquent une régulation positive (D'après Kolaczowska et Goffeau, 1999).

Pdr1p et Pdr3p peuvent positivement ou négativement réguler l'expression des gènes cibles, en impliquant pour cela des facteurs additionnels modulant leur activité (Martens *et al.*, 1996; Saleh *et al.*, 1997). Par exemple, le régulateur Rdr1p peut agir comme un répresseur de *PDR5* de façon PDRE-dépendante. En effet, les hétérodimères de Rdr1p avec Pdr1p ou Pdr3p concurrencent Pdr1p/Pdr3p pour se lier aux PDRE (Hellauer *et al.*, 2002).

Stb5p agit en formant un hétérodimère avec, principalement, Pdr1p. Yrr1p, est uniquement présent sous forme d'homodimère (Akache et Turcotte, 2002; Akache *et al.*, 2004).

Les approches génomiques ont permis de découvrir un autre régulateur à doigt de zinc, Pdr8p, impliqué dans le réseau de PDR (Hikkel *et al.*, 2003). Pdr8p est impliquée dans la résistance au kétoconazole et à l'oligomycine, fonctionnant principalement avec Yrr1p et ses gènes cibles respectifs. *YRMI* (modulateur de résistance de réveromycine de levure) code d'autres régulateurs $Zn(II)_2Cys_6$ agissant en tant qu'inhibiteur spécifique de Yrr1p. En l'absence de Yrr1p, Yrm1p active la transcription de la plupart des gènes régulés par Yrr1p (Lucau-Danila *et al.*, 2003).

Récemment, un autre régulateur à doigt de zinc, War1p, a été identifié comme le principal régulateur de l'adaptation au stress des acides faibles à travers le contrôle transcriptionnel de *PDR12* (Kren *et al.*, 2003). War1p contrôle un petit régulon et forme des homodimères (Schuller *et al.*, 2004). Il est activé par hyper-phosphorylation et agit spécifiquement sur le promoteur de *PDR12* (Jungwirth et Kuchler, 2006) (Figure 7).

L'ABC transporteur Pdr15p est induit par des stress divers, y compris le choc thermique, l'osmolarité élevée et le stress acides faibles de manière Msn2p-dépendante (Wolfger *et al.*, 2004)(Figure 7). La protéine à doigt de zinc Cys_2His_2 , Msn2p, principal régulateur de la voie de réponse au stress général, régule un ensemble de gènes, en réponse à une variété de stimuli environnementaux (Gasch *et al.*, 2000). Pdr15p et Pdr5p peuvent exécuter des fonctions dissociées, liées à la détoxification, dans différentes phases de croissance ou dans certaines conditions métaboliques.

Les facteurs de transcription basic-leucine zipper (b-ZIP) comme Yap1p, sont également impliqués dans la régulation des gènes ABC, bien que leur rôle précis, dans le PDR ou en réponse au stress, n'ait pas été défini jusqu'ici (Moye-Rowley, 2003; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Yap1p agit sur les promoteurs de *SNQ2* et de *YCF1* pour moduler leur expression (Wu *et al.*, 1993; Moye-Rowley *et al.*, 1989)(Figure 7). Un autre membre de la famille b-ZIP, Yap8p, participe aussi à la détoxification d'arsénite, en régulant l'expression de Ycf1p (Wemmie *et al.*, 1994; Bobrowicz *et al.*, 1997)(Figure 7).

Les études récentes ont montré un lien entre Yap1p et le processus de vieillissement, la surexpression de *YAPI* améliorant la survie pendant le vieillissement des cellules de levure, probablement à travers la régulation de l'expression de Ycf1p (Jungwirth et Kuchler, 2006). Ces exemples reflètent le niveau élevé de **complexité** des processus de régulation, contrôlant les phénotypes de résistance aux drogues, chez *S. cerevisiae*.

C.4.5. Le rôle physiologique des protéines ABC chez *S. cerevisiae*

Pour les ABC transporteurs tels que Ste6p, Atmp1p, et Pxa1p/Pxa2p, les substrats physiologiques ont été identifiés (Jungwirth et Kuchler, 2006). Quant aux transporteurs de type PDR, la détoxification reste la fonction physiologique la plus plausible, puisqu'ils éliminent des centaines de composés cytotoxiques, structurellement et fonctionnellement indépendants et des métabolites potentiellement toxiques (Kolaczowska et Goffeau, 1999). En outre, Ycf1p et Bpt1p conduisent la séquestration vacuolaire des métaux lourds et des S-glutathion conjugués (Jungwirth et Kuchler, 2006). Bien que la levure soit une organisation unicellulaire, la séquestration vacuolaire des ions de métaux lourds, plutôt que leur expulsion, pourrait s'expliquer par le bénéfice immédiat des cellules voisines. Les phospholipides membranaires et la sphingosine sont des substrats probables des ABC transporteurs de *S. cerevisiae* tels que Pdr5p (Kean *et al.*, 1997; Kihara et Igarashi, 2004).

En effet, des preuves s'accumulent en faveur d'un rôle des protéines ABC d'eucaryotes et de mammifères dans le transport des lipides membranaires (Pohl *et al.*, 2005). Certains ABC transporteurs de mammifères, comme Pdr5p, Yor1p, Pdr10p, Aus1p ou Pdr10p, peuvent transférer certains phospholipides membranaires ou même des stérols (Li et Prinz, 2004; Wilcox *et al.*, 2002). Par conséquent, certains ABC transporteurs pourraient avoir une fonction dans le contrôle ou la modulation de l'homéostasie des lipides membranaires, la régulation de la perméabilité membranaire et la distribution des phospholipides au niveau de la double couche lipidique. Les pompes ABC peuvent également éliminer les lipides oxydés ou endommagés de la membrane. En effet, les agents préjudiciables pour la membrane tels que les détergents et les lysophospholipides, qui exercent sur la membrane, un stress massif, induisent fortement Pdr15p (Jungwirth et Kuchler, 2006). Ainsi, en plus de la détoxification cellulaire, les pompes ABC pourraient jouer un rôle dans la régulation de la dynamique des **lipides membranaires** ou dans l'asymétrie de la bicouche lipidique.

D. Métabolisme des substrats hydrophobes chez les levures

Le métabolisme des substrats hydrophobes, tels que les alcanes, les acides gras et les triglycérides, est un métabolisme complexe impliquant plusieurs voies métaboliques réalisées dans différents compartiments subcellulaires (Figure 8). Le flux métabolique de carbone issu des alcanes ou des acides gras permet de synthétiser tous les composés cellulaires.

Selon Fukui et Tanaka, l'oxydation des alcanes chez les levures peut être monoterminale, biterminale, subterminale ou interne, selon la position où elle a lieu dans la chaîne carbonée (Fukui et Tanaka, 1981). Néanmoins, l'oxydation monoterminale semble être prédominante.

Les principales voies du métabolisme des substrats hydrophobes chez les levures sont les suivantes :

(i) **L'oxydation monoterminale** des alcanes a lieu dans le réticulum endoplasmique et dans les peroxysomes. Elle est initialisée dans le réticulum endoplasmique (RE) par le système cytochrome P450. Elle entraîne la formation d'acides gras de même longueur de chaîne.

(ii) **L' ω -oxydation** des acides gras conduit à la production d'acides dicarboxyliques de même longueur de chaîne.

(iii) **L'oxydation des acides gras**, *via* la voie de la β -oxydation, a lieu dans les peroxysomes. Elle entraîne la formation d'acétyl-CoA et de propionyl-CoA qui alimentent les cycles du glyoxylate, de l'acide citrique et du méthylcitrate.

(iv) En parallèle, une partie des acides gras dérivant des alcanes, de 14 à 18 atomes de carbone, sert aussi à la **synthèse de lipides**. Cette voie métabolique fait intervenir l'acyl-CoA synthétase I (ACS I dans le RE), la désaturation et l'élongation des acides gras, et la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GAT, gènes *GAT*) Elle entraîne la formation de phospholipides et de triglycérides.

(v) Ces derniers peuvent être également transformés sous forme de triacylglycérol ou d'ester de stérol et **stockés dans les corps lipidiques**.

D.1. Oxydation monoterminale des alcanes et voie de l' ω -oxydation

Chez les levures, la première étape de l'oxydation monoterminale des alcanes et de l' ω -oxydation des acides gras implique une hydroxylation qui entraîne la production d'alcool à partir d'alcanes ou d' ω -hydroxy acide gras à partir d'acide gras (Figure 8). Les systèmes impliqués, la cytochrome P450 monooxygénase ou l' ω -hydroxylase, sont constitués de **cytochromes P450** (codés par les gènes *ALK* appartenant à la famille *CYP52*) localisés dans le réticulum endoplasmique, et qui collaborent étroitement avec une **NADPH cytochrome P450 réductase** (CPR, gènes *NCP*) (Figure 9).

La deuxième étape est réalisée par des alcool déshydrogénases NAD^+ ou NADP^+ dépendante (FADH, gènes *ADH*) liées à la membrane ou par des alcool oxydases produisant du peroxyde d'hydrogène (FAOD, gènes *FAO*). Celles-ci convertissent les groupes hydroxy terminaux des 1-alcanols, des 1, ω -diols ou des ω -hydroxy acides gras en aldéhydes correspondants (Figures 8 et 9).

La troisième étape est l'oxydation des aldéhydes en acides gras libres. Elle est catalysée par des aldéhydes déshydrogénases NAD(P)^+ dépendante (FALDH, gènes *ALD(H)*) localisées dans le peroxysome ou le RE (Figures 8 et 9).

Ces étapes d'oxydation aboutissent finalement à la production d'acides gras à partir d'alcanes ou de DCA à partir d'acides gras (Figure 8).

D.1.1. Première étape de l'oxydation monoterninale et de l' ω -oxydation

L'hydroxylation terminale conduit à la production d'alcool à partir d'alcane ou d' ω -hydroxy acide gras à partir d'acide gras (Figures 8 et 9).

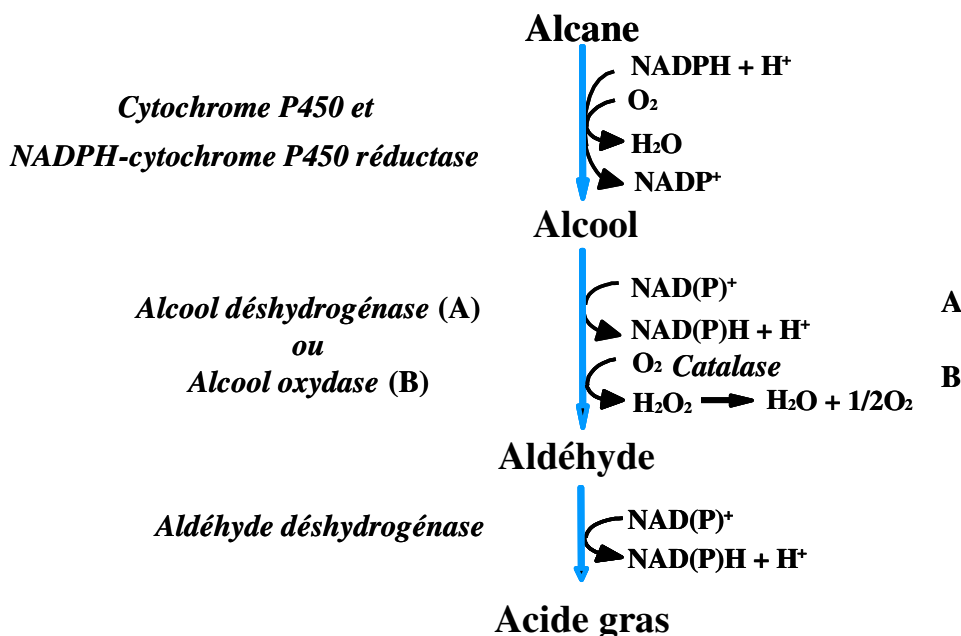


Figure 9. Oxydation monoterninale des alcanes chez les levures.

Trois étapes enzymatiques sont impliquées dans la bioconversion des *n*-alcanes en acides gras correspondant. Le système cytochrome P450 monooxygénase, localisé dans le réticulum endoplasmique, est constitué d'un cytochrome P450 (gènes *ALK*) (oxydase terminale) et d'une P450 réductase NADPH-dépendante (transfert d'électrons) et forme l'alcanol correspondant. Ce dernier est ensuite oxydé par des enzymes spécifiques de l'oxydation des alcools : (a) des alcool oxydases formant du peroxyde d'hydrogène dans le peroxydosome- FAOD- ou (b) des alcool déshydrogénase NAD(P)^+ -dépendante (FADH) dans le réticulum endoplasmique ou le cytosol. Enfin l'aldéhyde déshydrogénase (FALDH) présente dans le peroxydosome, le réticulum endoplasmique et le cytosol, permet la conversion en acide gras (Fickers *et al.*, 2005).

Les cytochromes P450 constituent une superfamille de protéines. Elles ont tous en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. Les cytochromes P450 catalysent la transformation de plusieurs xénobiotiques hydrophobes ou composés endogènes en composés plus hydrophiles en introduisant un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire (Iida *et al.*, 2000). Des membres de cette famille ont été identifiés chez les archaea, les bactéries, les champignons et les levures (Nelson *et al.*, 1996). Chez les procaryotes, les cytochromes P450 sont des protéines solubles contrairement à la plupart des cytochromes P450 eucaryotes qui sont liés au réticulum endoplasmique (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

Parmi les familles de cytochromes P450 présentes chez les microorganismes, la famille *CYP52* est unique, de par son ampleur, approchant certaines familles chez les mammifères impliquées dans le métabolisme des drogues. Chez les levures, les cytochromes P450 de cette famille agissent en synergie avec généralement une NADPH réductase à FAD/FMN (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

La réaction catalysée par le cytochrome P450 peut être décrite par un cycle réactionnel qui comporte les différents états d'oxydo-réduction successifs de la protéine. Il est pratique de schématiser ces états en désignant uniquement l'état du fer au centre de l'hème (Figure 10).

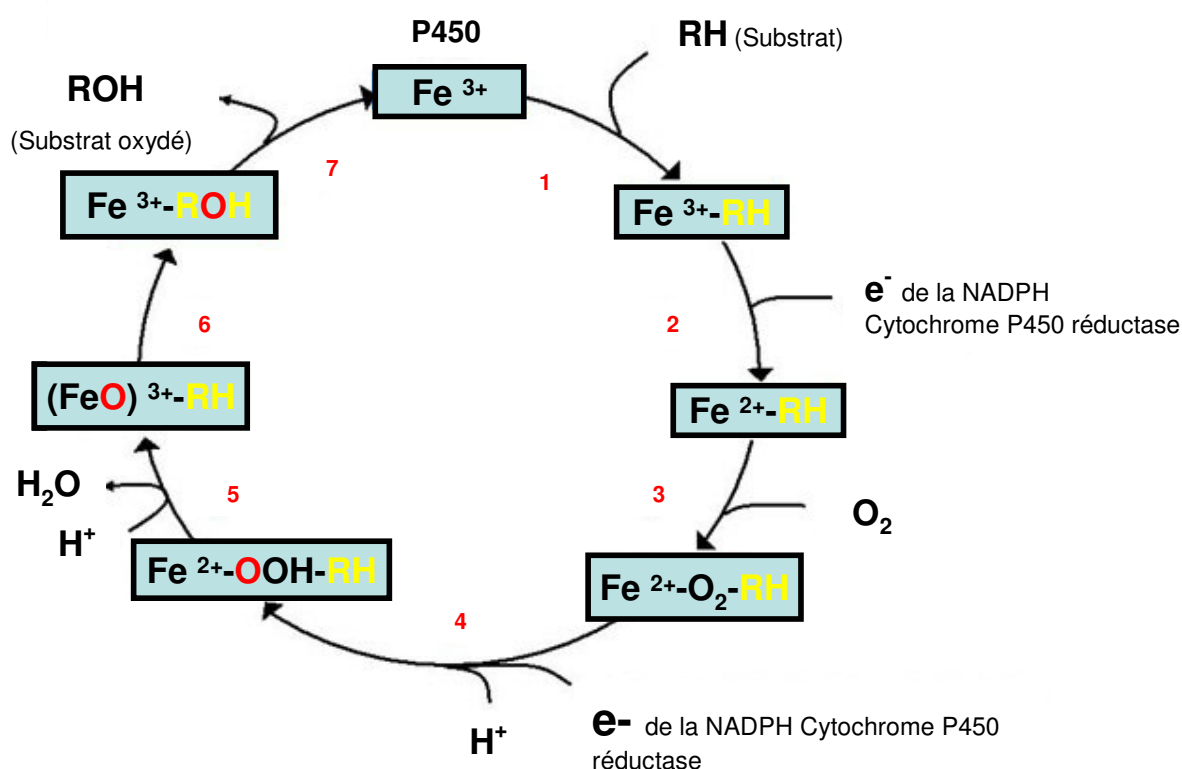


Figure 10. Cycle réactionnel des cytochromes P450.

A l'état normal, l'enzyme est ferrique (Fe^{3+}), spin bas. La fixation du substrat provoque un changement de spin vers le spin haut (1). Cette étape est réalisée rapidement. Le potentiel redox est ainsi suffisamment bas pour que l'enzyme puisse être réduite. On passe ainsi de la forme ferrique à la forme ferreuse par le transfert d'un électron à partir du NADPH *via* la cytochrome P450 réductase NADPH-dépendante (CPR) au cytochrome P450 (2). L'activation de l'oxygène est commune à l'ensemble des cytochromes P450. C'est seulement à cette étape que le fer peut fixer l'oxygène moléculaire (3). On obtient ainsi le complexe oxygène qui est probablement en équilibre entre deux formes isoélectroniques. Le complexe oxygène peut ensuite être réduit par un deuxième électron (4). C'est cette réaction qui initie l'étape catalytique et l'activation de l'oxygène. Après une forme peroxy, il y a un apport de protons (5), et la formation d'un radical p-cation de la porphyrine, avec le fer dans un état d'oxydo-réduction élevé (6). Ensuite, après libération du produit (7), on retrouve l'enzyme libre, ferrique, spin bas, de départ (Sakaki et Inouye, 2000, Urlacher *et al.*, 2004).

Des cytochromes P450 de la famille *CYP52* ont été identifiés chez plusieurs levures assimilant les *n*-alcanes, comme *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *D. hansenii* et *Y. lipolytica*. Ces levures présentent différents gènes homologues (nommés *ALK*). De nombreux gènes *ALK* sont organisés en tandem, suggérant que la famille *CYP52* a évolué à partir d'un gène ancestral par duplication de gène ou une évolution divergente (Ohkuma *et al.*, 1991). La majorité des gènes *ALK* sont induits par les hydrocarbures tels que les alcanes, les alcènes ou par les acides gras. Le degré d'induction varie d'un gène à l'autre et dépend de la structure chimique de l'inducteur (Scheller *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une spécialisation de fonction et/ou de substrat des cytochromes P450.

C. maltosa présente une famille multigénique *CYP52* de huit cytochromes P450. Zimmer *et al.* ont déterminé que le cytochrome P450 codé par *ALK1A* hydroxylait préférentiellement l'hexadécane et le dodécane et qu'il constituait le cytochrome P450 majoritaire pour l'hydroxylation monoternale des *n*-alcanes. Dans la même étude, il a été démontré que *alk5ap* est induit par les *n*-alcanes sans pouvoir les hydroxyler efficacement (Zimmer *et al.*, 1996).

Au moins **dix** gènes *CYP52* ont été isolés de la souche ATCC 20336 de *C. tropicalis*. *CYP52A12* est induit par les acides gras et les *n*-alcanes (Craft *et al.*, 2003). *CYP52A13* et *CYP52A17* sont fortement induits par l'acide oléique. Quand ces deux cytochromes P450 sont exprimés dans des cellules d'insecte en même temps que la cytochrome P450 réductase de *C. tropicalis*, *CYP52A13p* hydroxyle préférentiellement l'acide oléique à la différence du *CYP52A17p* qui ne présente pas de spécificité de substrat. Ces deux cytochromes sont capables d'oxyder des ω -hydroxy acides gras en générant des DCA (Craft *et al.*, 2003; Eschenfeldt *et al.*, 2003).

La synthèse des cytochromes P450 est induite durant la croissance de *Y. lipolytica* sur *n*-alcanes et acides gras (Mauersberger et Matiashova, 1980). Initialement, huit gènes codant des cytochromes P450, appartenant à la famille *CYP52* (*ALK1* à *ALK8*) et un gène *CPR* ont été identifiés dans la souche *CX161-1B* de *Y. lipolytica* (Iida *et al.*, 1998; Iida *et al.*, 2000). Une récente exploration du génome de la souche E150 de *Y. lipolytica* révèle **douze** gènes *ALK*. Quatre des huit nouveaux gènes, *ALK9* à *ALK12*, présentent une forte similarité avec les gènes *ALK1-ALK3* (Thevenieau *et al.*, Annexe 1).

ALK1 et *ALK2* semblent avoir des rôles prédominants dans l'assimilation des *n*-alcanes chez *Y. lipolytica*. Il a été démontré que six gènes *ALK* sont induits par le tétradécane. *ALK1* présente un fort niveau d'expression en présence de tétradécane, tandis que *ALK5* et *ALK6* sont plus faiblement induits. Le gène *ALK1* est également inductible par une limitation en oxygène et réprimé par le glycérol (Mauersberger et Matiashova, 1980). Sa délétion rend *Y. lipolytica* incapable de se développer en présence de décane. Cependant, la souche continue de croître sur hexadécane. Cette étude indique que le gène *ALK1* code un cytochrome P450 majoritaire, métabolisant les alcanes à chaîne courte (C10)(Iida *et al.*, 1998).

Les souches monodisruptées pour *ALK2*, *ALK3*, *ALK4* ou *ALK6* ne sont pas affectées dans leur croissance sur alcanes. Cependant, le double mutant $\Delta alk1\Delta alk2$ est incapable de pousser sur dodécane et hexadécane, indiquant que le produit de ces deux gènes fonctionne comme un système cytochrome P450 monooxygénase dans l'hydroxylation terminale des alcanes (Iida *et al.*, 2000) (Figure 9).

Récemment, sept gènes *ALK* de la souche ATTC-8661 de *Y. lipolytica* ont été exprimés dans la plante *Nicotiana benthamiana*. Cette étude a révélé que les gènes *ALK3*, *ALK5* et *ALK7* pourraient coder pour des ω -hydroxylases de l'acide laurique (*FAH*) alors qu'aucune activité ω -hydroxylase n'a été détectée pour les produits des gènes *ALK1*, *ALK2*, *ALK4* et *ALK6* (Hanley *et al.*, 2003).

De récentes études, sur les mécanismes d'induction du gène *ALK1* par le décane, ont permis d'identifier une région ADN, ARR1 (« Alkane-Responsive Region ») constituée de deux éléments de réponse (ARE1, ARE2, « Alkane Responsive Element ») aux alcanes, situés en *cis* du promoteur (Sumita *et al.*, 2002). D'autre part, il a été démontré, par la même équipe de recherche, que les produits des gènes *PEX10*, *PEX5* et *PEX6*, impliqués dans la biogénèse des peroxysomes, jouent un rôle répresseur sur l'expression du gène *ALK1* (Sumita *et al.*, 2002). En dernier lieu, un gène signal des alcanes, *YASI*, codant un facteur de transcription et essentiel pour l'induction de *ALK1* via ARE2, a également été identifié (Yamagami *et al.*, 2004).

Chez la levure *C. maltosa*, l'analyse de délétions du promoteur du gène *ALK2* a révélé deux éléments de réponse, ARE2 et CRE2 (« Clofibrate Responsive Element »). Le gène *ALK2* peut ainsi être activé par les *n*-alcanes et réprimé par le glucose via ARE2. Il peut également être activé via CRE2 qui répond à des stimuli différents tels que les acides gras insaturés, les hormones stéroïdes ou les proliférateurs de peroxysome.

Ces deux éléments peuvent répondre cependant aux acides gras. Ces deux éléments de réponse appartiennent probablement à deux voies d'induction distinctes (Kogure *et al.*, 2005).

D'autre part, l'équipe de Schunck a démontré *in vitro* qu'un seul cytochrome P450 issu de *C. maltosa*, pouvait efficacement catalyser non seulement l'hydroxylation terminale des *n*-alcanes à longue chaîne et l' ω -oxydation des acides gras mais, également, l'ensemble des différentes étapes de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation conduisant à la formation de DCA (Figure 8) (Scheller *et al.*, 1998). Ainsi, les alcanes seraient directement oxydés en acides gras ou en DCA. La fonction alternative des cytochromes P450 *in vivo* dans l' ω -oxydation des alcanes reste toutefois à confirmer.

D.1.2. Deuxième étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation

La deuxième étape, l'oxydation des 1-alcanols, des 1, ω -diols ou des ω -hydroxy acides gras en aldéhydes correspondants, est catalysée par une **alcool déshydrogénase** NAD⁺ ou NADP⁺ dépendante membranaire ou soluble (**FADH**) ou par une **alcool oxydase (FAOD)** (Figure 8 et 9).

L'oxydation des alcools à longue chaîne en aldéhydes serait catalysée majoritairement par une alcool oxydase (FAOD) liée à la membrane peroxysomale et inductible en présence d'alcanes, plutôt que par une alcool déshydrogénase NAD⁺ ou NADP⁺ dépendante (FADH) comme précédemment admis (Mauersberger *et al.*, 1992). La majorité des enzymes FAOD fonctionnent sous la forme d'un octamère sauf chez *C. tropicalis* où elle est dimérique. La spécificité de substrat de ces enzymes varie considérablement selon les espèces. Chez *C. tropicalis*, elle est plus active sur les alcools à chaîne longue alors que chez *C. boidinii*, elle est inactive sur des substrats dont le nombre de carbone dépasse cinq (Vanhanen *et al.*, 2000). Récemment, Eirich *et al.* ont identifié chez la souche ATCC 20336 de *C. tropicalis*, trois gènes codant des FAOD. Le gène *FAO1* est fortement induit sur acides gras et le produit de ce gène oxyde les ω -hydroxy acides gras (Wilson *et al.*, 2004). D'autre part, chez *C. tropicalis*, le mutant délété du gène *FAO1* est incapable de se développer sur octadécane. Cependant, il continue de se développer sur acide oléique, acide palmitique et des alcanes ou acides gras de plus faible longueur de chaîne suggérant qu'il existe différentes voies d'utilisation des substrats chez *C. tropicalis* (Cheng *et al.*, 2005).

Une activité FAOD, produisant du peroxyde et utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons, a été mise en évidence chez *Y. lipolytica* (Mauersberger *et al.*, 1992). En effet, une protéine FAOD de 70 kDa a été purifiée à partir de la souche H222 de *Y. lipolytica* se développant sur alcanes et des études de spécificité de substrat révèlent la présence probable de plusieurs enzymes FAOD. Cependant, aucun homologue aux séquences protéiques des FAOD de différentes levures du genre *Candida* n'a été détecté chez *Y. lipolytica* (Vanhanen *et al.*, 2000).

Au moins, quatre activités NAD(P)⁺/alcool déshydrogénases solubles (ADH ou FADH) spécifiques de l'éthanol ont été décrites (Barth et Kunkel, 1979). Plus récemment, trois gènes codant pour des ADH putatifs, spécifiques des chaînes courtes, ont été clonés (gènes *ADH1-3*) (Fickers *et al.*, 2005) et au moins un gène putatif FADH spécifique des substrats à longue chaîne carbonée (*ADH4*) a été détecté dans la séquence du génome de la souche E150 de *Y. lipolytica* (Fickers *et al.*, 2005). L'implication de ces (F)ADH solubles dans l'oxydation des alcools à longue chaîne n'a toutefois pas été démontrée.

D.1.3. Troisième étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation

La troisième étape, l'oxydation des aldéhydes en acides gras ou des ω -céto-acides gras en DCA, est catalysée par une NAD(P)⁺ **aldéhyde déshydrogénase (FALDH** : « Fatty ALdehyde DeHydrogenase », gènes *ALD(H)*) liée à la membrane du réticulum endoplasmique ou du peroxysome (Figure 8). Les aldéhydes déshydrogénases forment une superfamille d'enzymes NAD(P)⁺ dépendantes et oxydent une grande variété d'aldéhydes aromatiques et aliphatiques mais varient dans leur spécificité de substrat (Ratledge, 1994).

Des NAD(P)⁺ FALDH membranaires inductibles en présence d'alcanes ainsi que des activités (F)ALDH solubles ont été détectées chez plusieurs levures assimilant les alcanes notamment chez *Y. lipolytica* (Mauersberger *et al.*, 1996). De plus, quatre gènes FALDH putatifs nommés FALDH1-4 sont détectés quand la séquence d'acides-amino de la FALDH humaine est utilisée comme sonde (Rizzo *et al.*, 2001). En effet, les protéines codées par ces gènes présentent 34-39% d'identité avec la séquence FALDH humaine, alors qu'elles présentent une faible identité (< 25%) avec les autres classes d'ALDH.

Considérant que la réaction d'hydroxylation des alcanes ou des acides gras a lieu dans le réticulum endoplasmique alors que la réaction d'oxydation des alcools et des aldéhydes a lieu dans les peroxysomes, les alcools doivent être la forme essentielle de transport, plutôt que les acides gras ou les DCA. Ceci suggère une prolifération importante des structures de transport de la membrane du réticulum endoplasmique et leur association étroite avec les peroxysomes durant la croissance sur *n*-alcanes (Tanaka et Fukui, 1989; Mauersberger *et al.*, 1992; Mauersberger *et al.*, 1996)(Figure 8).

D.2. Oxydation des acides gras

Les acides gras, **toxiques** pour la cellule, sont immédiatement activés en thioester de Coenzyme-A par des acyl-CoA synthétases (ACS). Chez *Y. lipolytica*, deux acyl-CoA synthétases (ACS I et ACS II) spécifiques des acides gras à longue chaîne ont été identifiées (Kamiryo *et al.*, 1977; Mishina *et al.*, 1978). L'ACS I est localisée dans différentes fractions cellulaires et semble impliquée dans la synthèse des lipides alors que l'ASC II est présente dans les peroxysomes, siège de la principale voie de dégradation des acyl-CoA, la β -oxydation (Figures 8 et 11).

Dans les cellules eucaryotes, la β -oxydation des acides gras peut avoir lieu dans deux compartiments cellulaires : les mitochondries et les peroxysomes. Les acides gras à longue chaîne carbonée sont raccourcis dans les peroxysomes puis dégradés dans les mitochondries (Osmundsen *et al.*, 1991). Chez les levures, la **β -oxydation** des acides gras a lieu exclusivement dans les **peroxysomes** (Hiltunen *et al.*, 1993). Cependant, une très faible activité β -oxydative mitochondriale a été détectée chez *C. tropicalis* (Dommes *et al.*, 1983). D'autre part, Blin-Perrin *et al.* ont suggéré une organisation différente pour certaines espèces de levures du genre *Sporidiobolus* (Blin-Perrin *et al.*, 2000).

Le peroxysome est donc le lieu où se déroule la β -oxydation majoritaire chez les levures. La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée de l'acyl-CoA est réduite de deux atomes de carbone (Figure 11). L'acyl-CoA dont la chaîne carbonée est réduite de deux unités, retourne alors dans la spirale de la β -oxydation et est de nouveau réduit de deux atomes de carbones au niveau de sa chaîne aliphatique.

L'acyl-CoA subit ainsi plusieurs cycles de β -oxydation jusqu'à sa dégradation complète en acétyl-CoA ou en propionyl-CoA (si le nombre de résidus carbonés formant la chaîne est impair). Ce mécanisme en spirale peut être arrêté plus tôt selon les propriétés physico-chimiques de l'acyl-CoA, la longueur de la chaîne carbonée, la concentration du substrat, la présence de CoA, d'acétyl-CoA ou selon le ratio NAD^+/NADH .

D.2.1. Oxydation des acides gras saturés

Chez *S. cerevisiae*, le processus de la β -oxydation débute par l'oxydation de l'acyl-CoA en *trans*- Δ^2 -énoyl-CoA par une seule acyl-CoA oxydase, codée par le gène *POX1* (ou *FOX1*) (Dmochowska *et al.*, 1990), en produisant du peroxyde d'hydrogène (Figure 11). Celui-ci est détoxifié par la catalase peroxydomale, codée par le gène *CTAI* (Cohen *et al.*, 1985; Skoneczny *et al.*, 1988).

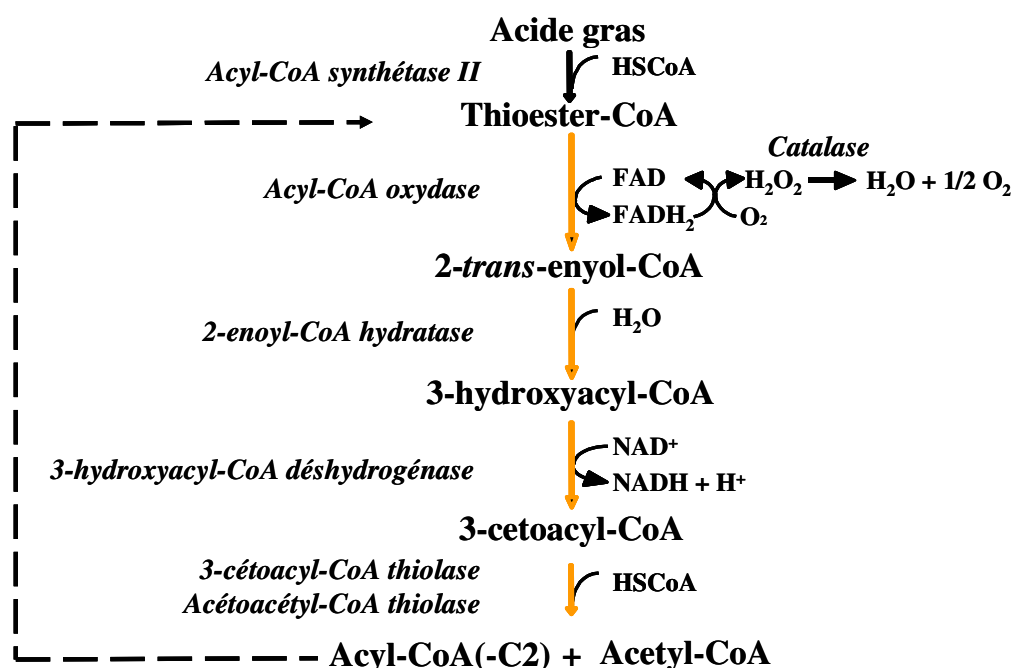


Figure 11. Voie de la β -oxydation des acides gras saturés chez les levures.

Les substrats sont activés par estérification en CoA avant la β -oxydation. L'acyl-CoA est alors converti en 2-*trans*-énoyl-CoA par une acyl-CoA oxydase et une hydratase multifonctionnelle catalyse l'hydratation du 2-*trans*-énoyl-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA et l'oxydation suivante en 3-cétoacyl-CoA. Dans la réaction finale de la β -oxydation, la 3-cétoacyl-CoA thiolase catalyse le clivage du 3-cétoacyl-CoA pour produire de l'acyl-CoA et de l'acétyl-CoA. Ce cycle est répété avec la réduction de deux unités de carbone jusqu'à ce que l'acide gras soit complètement oxydé (Adapté de Theodoulou *et al.*, 2006).

Les étapes de la *trans*- Δ^2 -énoyl-CoA hydratase et de la D-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase NAD⁺-dépendante produisant du 3-céto-acyl-CoA sont catalysées par une protéine bifonctionnelle codée par le gène *FOX2* (Hiltunen *et al.*, 1992). Le NAD⁺ exigé pour cette réaction n'est pas obtenu à partir du cytosol, car la membrane peroxysomale est imperméable aux NAD(H) (van Roermund *et al.*, 1995). Le NAD(H) est de nouveau oxydé par une malate déshydrogénase peroxysomale (Mdh3p). Le clivage final du cétoacyl-CoA conduisant à la formation de l'acétyl-CoA et/ou au raccourcissement de l'acyl-CoA, est catalysé par une cétoacyl-CoA thiolase codée par le gène *FOX3* (ou *POT1*) (Einerhand *et al.*, 1991; Igual *et al.*, 1991). La disruption des gènes *POX1*, *FOX2* ou *FOX3* entraîne l'incapacité des cellules à se développer sur acides gras comme seule source de carbone (Dmochowska *et al.*, 1990; Igual *et al.*, 1991; Hiltunen *et al.*, 1992).

Chez *Y. lipolytica*, cinq gènes (*POX1* à *POX5*) codant des acyl-CoA oxydases (Aox1 à Aox5) ont été initialement identifiés (Wang *et al.*, 1999) puis l'analyse du génome a révélé, récemment, un sixième gène (*POX6*) (Fickers *et al.*, 2005). *Y. lipolytica* se différencie, de par son **nombre important de gènes *POX*** codant des acyl-CoA oxydases (6 gènes), des autres levures comme *C. tropicalis* (3 gènes) (Baumgartner *et al.*, 1999), *C. maltosa* (2 gènes) (Al-Feel *et al.*, 1992) et *S. cerevisiae* (1 gène) (Abumrad *et al.*, 1999). Ceci suggère une spécialisation fonctionnelle au sein de cette famille multigénique. Des analyses de mutants et d'enzymes purifiées ont montrées que deux acyl-CoA (Aox2 et Aox3) sont spécifiques, respectivement, des acyl-CoA à chaîne longue et à chaîne courte (Wang *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2002). Les autres acyl-CoA présentent soit une faible activité envers un large spectre de longueur de chaîne (Aox4 et Aox5) soit aucune activité détectable (Aox1).

Des souches mono- et multi-disruptées pour ces gènes ont été construites, notamment les souches MTLY35, MTLY36 (délétée pour *pox2,3,5*) et MTLY37 (délétée pour *pox2,3,4,5*). Les souches MTLY35 et MTLY36 présentent une croissance ralentie sur acides gras contrairement à la souche MTLY37 qui est incapable de croître sur acides gras (Wang *et al.*, 1999). Des études de mutagenèse montrent que la sélectivité de substrat de l'Aox3p (spécifique des chaînes courtes) peut être transformée en acyl-CoA oxydase spécifique des acides gras activés à longue chaîne, par le changement d'un seul acide aminé (Luo *et al.*, 2002; Mlickova *et al.*, 2004). Les acyl-CoA oxydases seraient importées sous la forme d'un hétéropentamère dans les peroxysomes (Titorenko *et al.*, 2002).

Les dernières étapes de la β -oxydation sont catalysées par deux types d'enzyme : une enzyme multifonctionnelle et une thiolase (Figure 11). Contrairement aux acyl-CoA oxydases qui sont codées par de nombreux gènes, l'enzyme multifonctionnelle portant les activités hydratase et déshydrogénase (gène *MFE2*) et la 3-cétoacyl-thiolase (gène *POT1*) sont respectivement codées par un seul gène.

Toutefois, pour les substrats à chaîne courte, c'est une acétoacétyl-CoA thiolase qui serait impliquée. En effet, une acétoacétyl-CoA thiolase peroxysomale (gène *PAT1*) inductible, en présence de décane, fut clonée par complémentation dans un mutant incapable de croître sur décane. Cette enzyme présente une forte similarité avec les enzymes correspondantes chez *C. tropicalis* et *S. cerevisiae* (codée par *ERG10*) (Tanaka et Fukui, 1989). Comme chez d'autres levures, le gène codant une seconde acétoacétyl-CoA thiolase a été identifié dans la séquence du génome de la souche E150 de *Y. lipolytica* (Fickers *et al.*, 2005).

Le produit final de l'oxydation des acides gras, l'acétyl-CoA (ou le propionyl-CoA) alimente le cycle du glyoxylate qui est lié au cycles des acides tricarboxyliques et du méthylcitrate, localisés dans la mitochondrie (Tanaka et Fukui, 1989; Barth *et al.*, 2003). Deux voies d'exportation de l'acétyl-CoA des peroxysomes ont été décrites (van Roermund *et al.*, 1995). Dans la première voie, l'acétyl-CoA est transporté dans les mitochondries en tant qu'acétyl-carnitine. Le gène *CAT2* code une acétyl-carnitine acyl-transférase localisée dans les peroxysomes et les mitochondries (Elgersma *et al.*, 1995). Alternativement, l'acétyl-CoA peut être métabolisé par l'intermédiaire du cycle du glyoxylate, produisant quatre unités de carbone à partir de deux acétyl-CoA. Les intermédiaires de cette voie incluent l'isocitrate et/ou le succinate, qui peuvent être importés dans les mitochondries (van Roermund *et al.*, 1995). Des expériences de génétique indiquent qu'au moins une de ces voies doit être en activité pour soutenir l'oxydation des acides gras dans les peroxysomes chez les levures (van Roermund *et al.*, 1995).

D.2.2. Oxydation des acides gras insaturés

Les levures oxydent également les acides gras insaturés et polyinsaturés avec des doubles liaisons *cis* en position impaire ou paire. Des données récentes indiquent que les levures peuvent également dégrader les acides gras *trans*-insaturés (Gurvitz *et al.*, 2001).

Pendant la β -oxydation des acides gras *cis*-insaturés en position impaire, tels que l'acide oléique (18:1 Δ 9), un intermédiaire, le 2,5 diénoyl-CoA, est formé. Après un cycle d'oxydation, une double liaison 3-*cis* est créée et isomérisée par une Δ^3 -*cis*- Δ^2 -*trans*-énoyl-CoA isomérase, permettant à l'oxydation de se poursuivre. Une forme peroxysomale de cette enzyme est codée par le gène *ECII* chez *S. cerevisiae* (Geisbrecht *et al.*, 1998; Gurvitz *et al.*, 1998). Les cellules, dont le gène *ECII* est disrupté, ne peuvent pas utiliser l'acide oléique comme seule source de carbone. L'expression hétérologue de l'ADNc codant une enzyme mitochondriale de rat restaure le phénotype sauvage du mutant Δ *eci1* (Gurvitz *et al.*, 1998). *Eci1p* est également exigée pour la dégradation des acides gras présentant un nombre impair de double liaison en *trans*, indiquant que c'est une Δ^3 -*cis/trans*- Δ^2 -*trans*-énoyl-CoA isomérase (Gurvitz *et al.*, 2001). Une enzyme additionnelle, la $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase, impliquée dans une voie alternative du métabolisme du 2,5 diénoyl-CoA, est codée par le gène *DCII* chez *S. cerevisiae* (Gurvitz *et al.*, 1999).

L'oxydation des acides gras présentant des doubles liaisons en *cis* en position paire produit un intermédiaire, le 2 *trans*-4-*cis*-diénoyl-CoA. Des oxydations supplémentaires sont nécessaires pour réduire cet intermédiaire en 3-énoyl-CoA par une 2,4-diénoyl-CoA réductase NADPH-dépendante, et sont suivies de l'isomérisation en 2-énoyl-CoA par la Δ^3 -*cis*- Δ^2 -*trans*-énoyl-CoA isomérase (*Eci1p*). La croissance des mutants Δ *eci1* sur des acides gras comportant des doubles liaisons en *cis* en position paire ou impaire est altérée (Gurvitz *et al.*, 1998). En revanche, le gène *SPS19* qui code la 2,4-diénoyl-CoA réductase, est requis pour la croissance sur acide pétrosélinique (18:1 Δ 6), mais pas sur acide oléique (18:1 Δ 9). Ceci confirme son rôle essentiel dans le métabolisme des acides gras présentant des doubles liaisons en position paire (Gurvitz *et al.*, 1997). La dégradation des acides gras présentant des doubles liaisons en *trans* en position paire n'exige pas *Eci1p*, *Sps19p*, ou *Dci1p* (Gurvitz *et al.*, 2001).

Il est peu probable que *Sps19p*, la 2,4-diénoyl-CoA réductase, utilise du NADPH issu du cytosol (van Roermund *et al.*, 1995). Le NADPH nécessaire semble provenir d'une activité inductible par l'acide oléique, l'activité isocitrate déshydrogénase peroxysomale codée par le gène *IDP3* (Henke *et al.*, 1998; van Roermund *et al.*, 1998).

Les cellules, dont pour le gène *IDP3* est disrupté, ne se développent pas sur des acides gras qui comportent au moins une double liaison en position paire (c'est-à-dire 18:1 Δ 6 ou 18:2 Δ 9,12) mais maintiennent leur croissance sur acide stéarique (18:0) et acide oléique (18:1 Δ 9) (Henke *et al.*, 1998; van Roermund *et al.*, 1998). Hypothétiquement, Idp3p fonctionnerait dans le cadre d'une navette redox à travers la membrane peroxysomale pour maintenir les niveaux de NADPH dans l'organite (van Roermund *et al.*, 1998)

D.3. Induction de l'expression de gènes par les acides gras

Comme mentionné précédemment, la biogenèse et la fonction des peroxysomes sont induites par l'exposition aux acides gras. Chez les levures, l'expression des protéines peroxysomales, comme les enzymes de la β -oxydation, est sujette à plusieurs types de régulation, principalement au niveau transcriptionnel (Lazarow et Kunan, 1997). La transcription de la plupart de ces gènes est réprimée en présence de glucose par l'intermédiaire de Abf1p, de RP-A, et de Car80p.

L'élimination du glucose et la croissance des cellules, en présence d'une source de carbone non fermentescible, comme l'acétate ou le glycérol, entraînent une faible augmentation de l'expression de ces gènes. Adr1p, Snf1p et Snf4p sont requises pour activer les gènes réprimés en présence de glucose. L'expression de nombreux gènes codant des protéines peroxysomales, est non seulement possible par l'élimination du glucose et par l'induction par les acides gras tels que l'acide oléique. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, quand des cellules sont cultivées sur un milieu contenant du glucose à 2%, les activités de l'acyl-CoA oxydase (Pox1p) et de la thiolase (Fox3p) sont presque indétectables. La croissance sur une source de carbone non fermentescible augmente ces activités d'un facteur 20. L'exposition à l'acide oléique permet d'augmenter l'activité de ces enzymes d'un facteur 20 de nouveau (Lazarow et Kunan, 1997). L'efficacité de l'induction des gènes codant les enzymes peroxysomales par les acides gras dépend de la présence ou non de glucose. Ainsi, les protéines qui lèvent la répression, Adr1p et Snf1p, sont également nécessaires pour l'induction complète par l'acide oléique, de plusieurs gènes codant les protéines peroxysomales (Navarro et Igual, 1994; van Roermund *et al.*, 1995; Lazarow et Kunan, 1997).

D.3.1. Régulation *via* des éléments de réponse oléate

Les promoteurs de nombreux gènes codant des protéines peroxysomales présentent une séquence d'activation en aval, responsable de la régulation de la transcription par l'acide oléique, doublée d'un **élément de réponse à l'oléate** (« Oleate Response Element », **ORE**) (Einerhand *et al.*, 1993; Filipits *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Ce motif se compose de palindromes CGG avec un espace de 15-18 paires de bases qui contient des nucléotides T et A conservés et peut être présent en une ou deux copies, selon le gène (Wang *et al.*, 1994; Rottensteiner *et al.*, 1996). La séquence consensus des ORE a été définie comme CGG-N₁₅₋₁₈-CCG (Rottensteiner *et al.*, 1996) ou CGGNNNTNA-N₉₋₁₂-CCG (Karpichev et Small, 1998). Chez *S. cerevisiae*, des expériences d'empreinte et de gel retard ont démontré que la fixation d'une protéine à l'élément ORE coïncide avec l'activation de la transcription. L'analyse de mutations dans le motif ORE a permis de constater une altération de la fixation de la protéine et également de l'activation du gène (Einerhand *et al.*, 1993; Filipits *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). La moitié de l'élément palindromique de *FOX3* ne permet pas de fixer de protéines. Ainsi, il a été proposé que l'activation de la transcription, par l'intermédiaire de l'ORE, se produit *via* la fixation d'un complexe de dimères activateurs (Einerhand *et al.*, 1993).

Chez *S. cerevisiae*, des gènes codant deux protéines qui interagissent avec des ORE, ont été identifiés. Le gène *PIP2* (*OAF2*), identifié chez des mutants d'induction des peroxysomes (Karpichev *et al.*, 1997), est induit par l'acide oléique. Il code une protéine capable de se fixer à l'ADN et d'activer la transcription d'un gène rapporteur en présence d'acide oléique. Les cellules $\Delta pip2$ ne présentent aucun défaut dans la levée de la répression mais ne peuvent pas se développer sur acide oléique ou induire la biogenèse des peroxysomes. Ceci s'explique par l'altération de l'induction de l'expression des gènes par l'acide oléique.

Une seconde protéine appelée Oaf1p a été purifiée sur colonne d'affinité à laquelle des oligonucléotides codant des ORE ont été couplés (Luo *et al.*, 1996). L'analyse des microséquences d'Oaf1p a permis d'identifier le gène correspondant. Les cellules contenant un allèle $\Delta oaf1$ ne se développent pas sur acide oléique, vraisemblablement parce que l'induction de gènes par l'acide oléique et la fixation des protéines aux ORE sont altérées.

L'analyse de l'expression de plus de 20 gènes induits par l'acide oléique et contenant des ORE putatifs a permis de constater que la plupart des gènes dépendent d'Oaf1p et de Pip2p pour leur induction complète (Rottensteiner *et al.*, 1996; Karpichev et Small, 1998). Cependant, tous les gènes contenant un ORE n'exigent pas Oaf1p/Pip2p pour leur régulation et au moins un gène régulé par Oaf1p/Pip2p ne présente pas d'ORE (Karpichev et Small, 1998).

Des expériences d'immunoprécipitation indiquent que Oaf1p interagit avec Pip2p. Ceci suggère que les deux facteurs de transcription interagissent avec l'ORE et activent la transcription sous forme d'un hétérodimère (Karpichev *et al.*, 1997). L'organisation structurale des deux protéines est semblable; chacune contient un domaine de fixation à l'ADN en Zn_2Cys_6 en N-terminal, deux domaines inhibiteurs et un domaine auxiliaire au milieu de la protéine, et un domaine d'activation en C-terminal (Baumgartner *et al.*, 1999). Le rôle individuel de chaque protéine dans l'activation de la transcription par l'acide oléique, a été déterminé en utilisant des fusions protéiques et des constructions de rapporteurs. L'ensemble de ces données a conduit à la proposition d'un modèle (Baumgartner *et al.*, 1999) dans lequel l'activité de Pip2p est inhibée dans des conditions de levée de la répression *via* son interaction avec Oaf1p inactif. Quand l'acide oléique est présent, Oaf1p est activé, le complexe Oaf1p/Pip2p fixe l'ORE et la transcription est alors activée. Quand du glucose est ajouté, l'activité d'Oaf1p et de Pip2p est directement réprimée. Jusqu'ici, le mécanisme moléculaire, qui engendre une activation du complexe Oaf1p/Pip2p par l'acide oléique et une répression par le glucose, demeure inconnu.

D.4. Biosynthèse d'acides gras

Chez *S. cerevisiae*, les acides gras issus du milieu sont incorporés aux lipides complexes, particulièrement quand la synthèse d'acides gras est inhibée (Choi *et al.*, 1996). Ainsi, le changement de composition en lipides membranaires est un bon indicateur pour étudier ses effets. Le profil des acides gras synthétisés *de novo*, chez *S. cerevisiae*, est relativement peu compliqué. La grande **majorité des acides gras** est saturée et mono-insaturée et se compose de **16 et 18 atomes de carbone** (Welch et Burlingame, 1973; Cottrell *et al.*, 1986). En outre, 1% à 2% des acides gras totaux synthétisés sont les acides gras à très longue chaîne (20-30 atomes de carbone) parmi lesquels le 26:0 est le plus abondant (Welch et Burlingame, 1973).

La synthèse des acides gras est catalysée par le complexe de la synthase des acides gras avec comme substrats, l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA et comme agent réducteur le NADPH (Figure 12). Le malonyl-CoA est formé par la carboxylation de l'acétyl-CoA en présence d'ATP. La synthèse se produit après que l'acétate et le malonate ont été transférés du Coenzyme A au groupe sulhydryle de la protéine porteuse d'acyle (ACP pour « acyl carrier protein ») une petite protéine qui transporte la chaîne d'acide gras au cours de son allongement. La synthase ajoute deux carbones à la fois à l'extrémité carboxyle de la chaîne d'acide gras au cours d'un processus en deux étapes. D'abord, la malonyl-CoA réagit avec l'acide gras-ACP pour produire du CO_2 et un acide gras à deux carbones supplémentaire. A noter que l'ATP est utilisé pour ajouter le CO_2 à l'acétyl-CoA et former le malonyl-CoA. Le même CO_2 est perdu quand la malonyl-ACP donne ses carbones à la chaîne. Dans la seconde partie de la synthèse, le groupe β -cétonique produit, par la réaction de condensation initiale, est éliminé dans un processus à trois étapes qui nécessite deux réductions et une déshydratation. L'acide gras est alors prêt pour l'addition de deux nouveaux atomes de carbone.

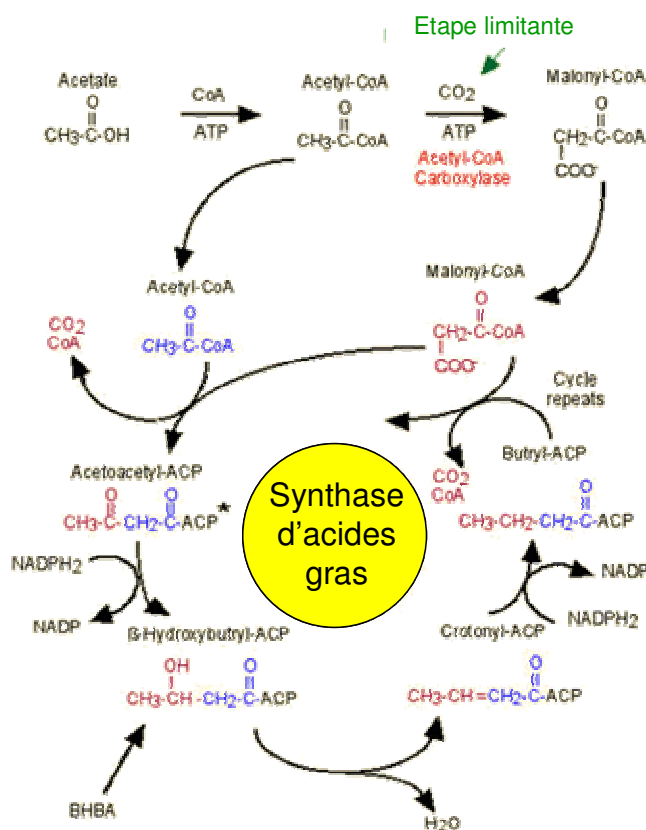


Figure 12. La synthèse des acides gras chez les levures.

Le cycle est répété jusqu'à ce que la chaîne atteigne la longueur correcte. L'acétyl-CoA et le reste du malonyl-CoA sont en bleu et rose, respectivement. ACP représente la protéine porteuse d'acyle.

D.4.1. Biosynthèse d'acides gras saturés

La biosynthèse *de novo* des acides gras saturés exige le complexe composé de l'acétyl-CoA carboxylase et de la synthase d'acides gras chez *S. cerevisiae*. Le gène codant l'acétyl-CoA carboxylase, appelé *ACC1* (ou *FAS3*), code une protéine de 250 kDa approximativement (Al-Feel *et al.*, 1992; Hasslacher *et al.*, 1993). La séquence d'acides aminés déduite de cette protéine présente 34% d'identité avec l'enzyme du rat et contient les domaines typiques de carboxylase biotine, de fixation à la biotine et de transcarboxylase (Al-Feel *et al.*, 1992). Un mutant haploïde du gène *acc1* est incapable de se développer même en présence d'acides gras exogènes. Ceci indique que le gène est nécessaire à d'autres fonctions que la biosynthèse d'acides gras (Hasslacher *et al.*, 1993).

La synthase d'acides gras chez la levure se compose de deux sous-unités multifonctionnelles différentes, α et β , organisées comme un hexamère ($\alpha_6\beta_6$). La sous-unité α , codée par le gène *FAS2*, est trifonctionnelle. Elle est composée des fonctions de la β -cétoacyl synthase, de la β -cétoacyl réductase et de transporteurs de groupement acyl (Mohamed *et al.*, 1988). La sous-unité pentafonctionnelle β est codée par le gène *FAS1* et possède les activités d'acétyl-, de malonyl-, et de palmitoyl-transférase, ainsi que les activités de déshydratase et d'énoyl réductase (Schweizer *et al.*, 1986; Chirala *et al.*, 1987). Les mutants haploïdes présentant des mutations dans le complexe de la synthase d'acides gras ne sont pas viables sauf si le milieu est complété avec les acides myristique (MC14:0), palmitique (MC16:0), stéarique (MC18:0), ou oléique (MC18:1) exogènes (Schweizer et Bolling, 1970).

La biosynthèse d'acides gras est **réprimée en présence d'acides gras** (Kamiryo *et al.*, 1976; Chirala, 1992). La croissance en présence d'acides gras exogènes, diminue les activités d'acétyl-CoA carboxylase et de la synthase d'acides gras de 50% à 70%. La transcription des gènes *FAS1*, *FAS2*, et *ACC1* est diminuée en présence d'acides gras exogènes. Si *FAS2* est surexprimé, l'expression de *FAS1* et *ACC1* augmente, suggérant une régulation coordonnée de ces trois gènes. Ils sont également régulés, de façon coordonnée, par les éléments de réponse inositol/choline avec un certain nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse des phospholipides (Chirala, 1992; Hasslacher *et al.*, 1993).

D.4.2. Désaturation des acides gras

S. cerevisiae est capable de synthétiser des acides gras mono-insaturés contenant une double liaison $\Delta 9$, principalement de l'acide palmitoléique (MC16 :1) et oléique (MC 18 :1). La $\Delta 9$ désaturase à l'origine de ces produits est localisée dans le réticulum endoplasmique et est codée par le gène *OLE1* (Stukey *et al.*, 1990; Mitchell et Martin, 1995). Afin de se développer, les mutants présentant une mutation *ole1* ont besoin d'un apport supplémentaire en acides gras mono-insaturés ou poly-insaturés exogènes présentant une insaturation $\Delta 9$ ou dans certains acides gras, une double liaison $\Delta 10$, $\Delta 11$ ou $\Delta 5$ (Stukey *et al.*, 1989; McDonough *et al.*, 1992).

OLE1 a été également considéré comme un gène impliqué dans le mouvement mitochondrial et le transfert dans les cellules filles pendant la mitose, suggérant un rôle des acides gras insaturés dans ce processus (Stewart et Yaffe, 1991). *OLE1* code une protéine avec une région interne qui présente 60% de similarité avec la stéaroyl-CoA désaturase du rat. Une fusion protéique contenant les 27 acides aminés de la région N-terminale d'Ole1p et la stéaroyl-CoA désaturase de rat complémente fonctionnellement le mutant $\Delta ole1$ (Stukey *et al.*, 1990). A la différence de l'enzyme des mammifères, la désaturase de levure ne montre pas de dépendance à l'égard du cytochrome b5, donneur d'électrons. Ole1p a une extension C-terminale présentant une similarité élevée avec les cytochromes b5 qui pourrait faciliter le transfert d'électrons (Mitchell et Martin, 1995). Ole1p est considérée comme la seule désaturase exigée pour la synthèse des acides gras mono-insaturés chez *S. cerevisiae* (Stukey *et al.*, 1989).

Récemment, la régulation de l'expression d'*OLE1* a suscité un grand intérêt. La transcription d'*OLE1* est faiblement induite par les acides gras saturés et fortement réprimée par les acides gras insaturés (McDonough *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1996). Cette régulation est également reflétée par l'activité enzymatique de cette désaturase. En fait, quand des cellules de levure se développent en présence d'acides gras insaturés exogènes, comme l'acide linoléique (MC18 :2 $\Delta 9,12$), elles les incorporent aisément dans les lipides membranaires, remplaçant presque tous les acides gras mono-insaturés (Stukey *et al.*, 1989; Borst et Schinkel, 1997).

La régulation du gène *OLE1* dépend de la formation d'acyl-CoA par les acyl-CoA synthétases, Faa1p et Faa4p, et la fixation d'acyl-CoA par Acb1p. Ceci indique que le métabolisme des acides gras est requis (Choi *et al.*, 1996). La régulation de l'expression d'*OLE1* se produit au niveau de la transcription (McDonough *et al.*, 1992) et *via* la stabilité de l'ARNm (Gonzalez et Martin, 1996). Des mutants, insensibles à la répression d'*OLE1* par les acides gras insaturés (McHale *et al.*, 1996; Fujimori *et al.*, 1997) ou incapables de lever la répression *OLE1* en réponse aux acides gras saturés, (Fujimori *et al.*, 1997) ont été isolés. Deux facteurs redondants de transcription, codés par les gènes *SPT23* et *MGA2*, sont exigés pour la transcription d'*OLE1*. L'expression d'*OLE1* sur un plasmide ou une complémentation avec des acides oléique ou palmitoléique supprime la létalité du double mutant de $\Delta spt23 \Delta mga2$ (Zhang *et al.*, 1999). Une étude récente suggère que le passage de Spt23p de la forme liée à la membrane et inactive, à la forme soluble, est régulée par le pool d'acides gras *via* un processus dépendant de l'ubiquitine et des protéasomes (Hoppe *et al.*, 2000).

D.4.3. Elongation des acides gras

S. cerevisiae possède des systèmes enzymatiques permettant d'allonger les acyl-CoA issus de la synthèse *de novo* ou acquis dans le milieu. L'activité d'élongation dépend du malonyl-CoA comme donneur de deux atomes de carbone, du NADPH, et des acides gras activés à longue (LCFA) ou moyenne chaîne (MCFA) (> 10 atomes de carbone) (Dittrich *et al.*, 1998). Plusieurs systèmes d'élongation différents, liés à la membrane, sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Ils comprennent des systèmes capables d'allonger les MCFA (12 et 14 carbones à 16 et 18 carbones) et un système qui convertit les acides gras de 18 atomes de carbone en acides gras de 20 atomes de carbone ou plus (Toke et Martin, 1996; Bessoule *et al.*, 1988; Dittrich *et al.*, 1998).

Des études génétiques, chez *S. cerevisiae*, ont permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans ce processus. Deux équipes de recherche ont indépendamment identifié un gène essentiel pour l'élongation des MCFA (12 carbones) et LCFA (16-18 carbones) (Toke et Martin, 1996; Dittrich *et al.*, 1998). Le gène *ELO1* a été identifié comme codant une enzyme impliquée dans l'allongement des acides gras de 12 à 16 atomes de carbone. La comparaison de la séquence d'acides aminés déduite d'Elo1p à la base de donnée du génome de *Saccharomyces*, indique deux gènes additionnels, *ELO2* et *ELO3*, impliqués dans la formation des acides gras à très longue chaîne (VLCFA) (Oh *et al.*, 1997).

Les séquences d'acides aminés d'*ELO2* (précédemment cloné comme *GNS1* et *FEN1*) et d'*ELO3* (précédemment identifié *APA1*, *SUR4*, et *SRE1*) présentent une similarité de 76% et de 72% respectivement, par rapport à Elo1p. La disruption de ces deux gènes est létale, mais la délétion d'un seul gène entraîne une grande diminution des acides gras C26:0 formés à partir des acides gras à 16 ou 18 atomes de carbone. L'analyse des profils d'acides gras chez les mutants $\Delta elo2$ et $\Delta elo3$ indique que Elo2p est impliqué dans l'allongement des chaînes d'acides gras jusqu'à 24 atomes de carbone, tandis que Elo3p présente une plus large spécificité de substrat et est exigée pour l'allongement de 24 à 26 atomes de carbone.

Les sphingolipides, chez les levures, contiennent des céramides composés d'une base à longue chaîne, comme le phytosphingosine, la dihydrosphingosine, N-acylé, avec un acide gras non substitué (C26:0) ou hydroxylé (HO-C26:0) (Lester *et al.*, 1993). Comme les souches $\Delta elo2$ ou $\Delta elo3$ sont incapables de synthétiser des acides gras en C26:0, il y a une accumulation des bases à longue chaîne et une absence de céramide (Oh *et al.*, 1997). Le gène, *TSC13*, récemment identifié, code une enoyl-CoA réductase requise pour la synthèse de VLCFA. Les souches contenant une mutation du gène *tsc13* accumulent également des LCFA et les niveaux des VLCFA diminuent. Ce phénotype est aggravé par l'introduction d'une mutation dans les gènes *ELO2* ou *ELO3*. De plus, l'hydroxylation de C26:0 à HO-C26:0 exige le gène *FAH1* (Mitchell et Martin, 1997). Ainsi, les produits des gènes *ELO2*, *ELO3*, et *TSC13* semblent jouer des rôles essentiels dans la formation des VLCFA nécessaires à la biosynthèse des sphingolipides.

D.5. Accumulation des lipides dans les corps lipidiques

Selon les conditions environnementales, les levures telles que *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*, sont capables de mobiliser les acides gras libres ou de les stocker sous forme de **triacylglycérol (TAG)** et **d'ester de stérol (SE)** dans des corps lipidiques (Ratlege et Tan, 1990). Les corps lipidiques sont composés d'un noyau hydrophobe formé de lipides neutres qui sont entourés par une couche de phospholipides, présentant peu de protéines incorporées. A l'origine, les corps lipidiques étaient uniquement considérés comme des dépôts de lipides neutres qui pouvaient être mobilisés durant une phase de carence en nutriments.

Cependant, cette image de compartiment de stockage a été révisée depuis que plusieurs protéines présentes dans les corps lipidiques ont été identifiées comme des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, les protéines des corps lipidiques contribuent à l'activation des acides gras (Johnson *et al.*, 1994), à la synthèse des TAG ainsi qu'à leur dégradation (Leber *et al.*, 1998; Sorger et Daum, 2002), sont impliquées dans le métabolisme des stérols (Leber *et al.*, 1998; Koffel *et al.*, 2005) et dans la synthèse des acides phosphatidiques (Athenstaedt et Daum, 1997; Athenstaedt *et al.*, 1999). D'autre part, la participation des corps lipidiques à la formation des composés lipophiliques tels que les hormones stéroïdiennes ou les prostaglandines, a été démontrée (Gwynne et Strauss, 1982; Freeman et Ascoli, 1982; Bisgaier *et al.*, 1985; Haid et Suissa, 1983).

Sur milieu glucose, peu de corps lipidiques sont observés chez la levure oléagineuse *Y. lipolytica* alors qu'en présence d'acides gras ou de triglycérides, un phénomène d'accumulation de corps lipidiques a lieu (Figure 13).

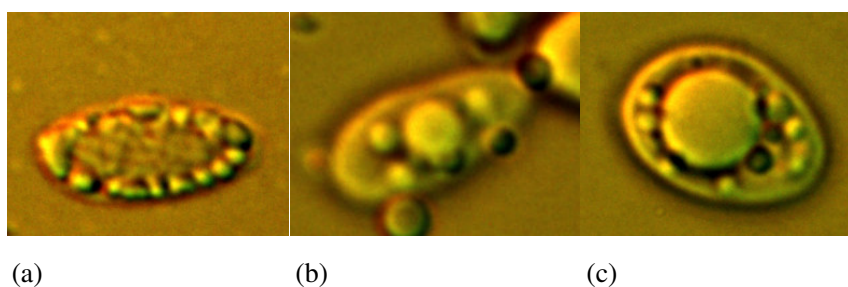


Figure 13. Formation des corps lipidiques chez *Y. lipolytica*.

Au cours de la croissance de *Y. lipolytica* sur milieu minimum en présence d'acide oléique comme seule source de carbone. Les photos correspondent à des cellules fixées à différents temps de culture $t=6h$ (a), $t=16h$ (b) et $t=40h$ (c) Après 6h de culture sur milieu acide oléique, de petits corps lipidiques apparaissent (a). Puis, ils grossissent et fusionnent (b). Pendant la phase stationnaire, la quantité de corps lipidiques est faible mais ils sont de grande taille (c) (d'après Fickers *et al.*, 2005).

Ainsi, la teneur et la composition des corps lipidiques dépendent des conditions de croissance et de la composition du substrat (Papanikolaou et Aggelis, 2003). Il a été également démontré, chez *Y. lipolytica*, que la voie de la β -oxydation et plus précisément l'activité des acyl-CoA oxydases, peut influencer sur la taille des corps lipidiques ainsi que sur leur composition (Mlickova *et al.*, 2004). Ainsi, de petits corps lipidiques, en faible quantité, sont observés quand seule l'acyl-CoA oxydase 4 est exprimée, alors que les souches exprimant l'acyl-CoA oxydase 3 présentent un phénotype sauvage de corps lipidiques. Enfin, l'acyl-CoA oxydase 2 régulerait la taille et la quantité des corps lipidiques (Mlickova *et al.*, 2004).

Les corps lipidiques sont constitués principalement de TAG et de SE. Les TAG sont la forme la plus importante de stockage chez les eucaryotes. Le précurseur direct de la synthèse des TAG est le diacylglycérol (DAG), qui peut être formé par (i) la déphosphorylation d'acides phosphatidiques synthétisés *de novo*, (ii) la dégradation de glycérolphospholipides à travers l'action de phospholipases et de phosphatidates phosphatases ; et/ou (iii) la déacylation des TAG catalysée par les lipases TAG.

La dernière étape de la formation de TAG *de novo*, chez les levures, peut être effectuée par différentes voies. Dans la réaction acyl-CoA dépendante, l'activation des acides gras peut être liée au glycérol du DAG par Dga1p. **Dga1p** est un membre de la famille DGAT2 qui comprend un nombre de DGAT issus d'espèces variées. Des études, sur différentes fractions subcellulaires d'un mutant de *S. cerevisiae* délété du gène *DGA1*, ont révélé que (i) Dga1p catalyse l'acylation acyl-CoA dépendante des DAG, (ii) Dga1p est localisée dans le réticulum endoplasmique ; et (iii) d'autres enzymes catalysent la synthèse de TAG car l'activité TAG synthase ne diminue que légèrement dans les microsomes du mutant $\Delta dga1$ (Sorger et Daum, 2002). Des analyses enzymatiques ont révélé que Dga1p présente une préférence pour l'oléoyl-CoA et le palmitoyl-CoA *in vitro* (Oelkers *et al.*, 2002).

Une seconde TAG synthase, **Lro1p**, catalyse le transfert du groupe acyl de la position sn-2 de la phosphatidylcholine ou de la phosphatidyléthanolamine du DAG (Dahlqvist *et al.*, 2000; Oelkers *et al.*, 2002). L'activité de Lro1p est restreinte au RE (Sorger et Daum, 2003). La contribution relative de Lro1p et de Dga1p à la synthèse des TAGs varie suivant la phase de croissance. Alors que Lro1p est active principalement pendant la phase exponentielle, Dga1p présente une activité majeure pendant la phase stationnaire (Oelkers *et al.*, 2002). Le double mutant délété des gènes *DGA1* et *LRO1* présente une activité TAG synthase mineure (Sorger et Daum, 2002). Are1p et Are2p, les deux SE synthases chez *S. cerevisiae*, sont responsables de cette activité résiduelle. Enfin, l'absence totale de TAG, chez un quadruple mutant $\Delta dga1 \Delta lro1 \Delta are1 \Delta are2$, suggère une large spécificité de substrat des protéines Are (Sandager *et al.*, 2002; Sorger *et al.*, 2004).

Chez *S. cerevisiae*, des quantités égales de TAG et de SE sont présentes dans les corps lipidiques (Leber *et al.*, 1994). Par contre, les corps lipidiques de *Y. lipolytica* sont constitués principalement de TAG et, dans une moindre mesure, de SE. Cependant, les corps lipidiques de cette levure ressemblent plus à des **adipocytes** (Athenstaedt et Daum, 2006).

Un modèle de biogenèse des corps lipidiques propose que les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides accumulent des domaines spécifiques dans le RE, favorisant ainsi la synthèse des lipides neutres dans ces régions (Figure 14b et 14c). Puisque les TAG et les SE sont incapables d'interagir avec les phospholipides de la double couche, des microgouttelettes (précurseurs des corps lipidiques) sont formées par ces molécules hydrophobes entre les deux feuillettes de la double couche du RE (Figure 14d). Après avoir atteint une certaine taille, les corps lipidiques matures, chargés des protéines qui ont perdu leur domaine transmembranaire, se détachent du RE en bourgeonnant (Figure 14e) (Czabany *et al.*, 2006).

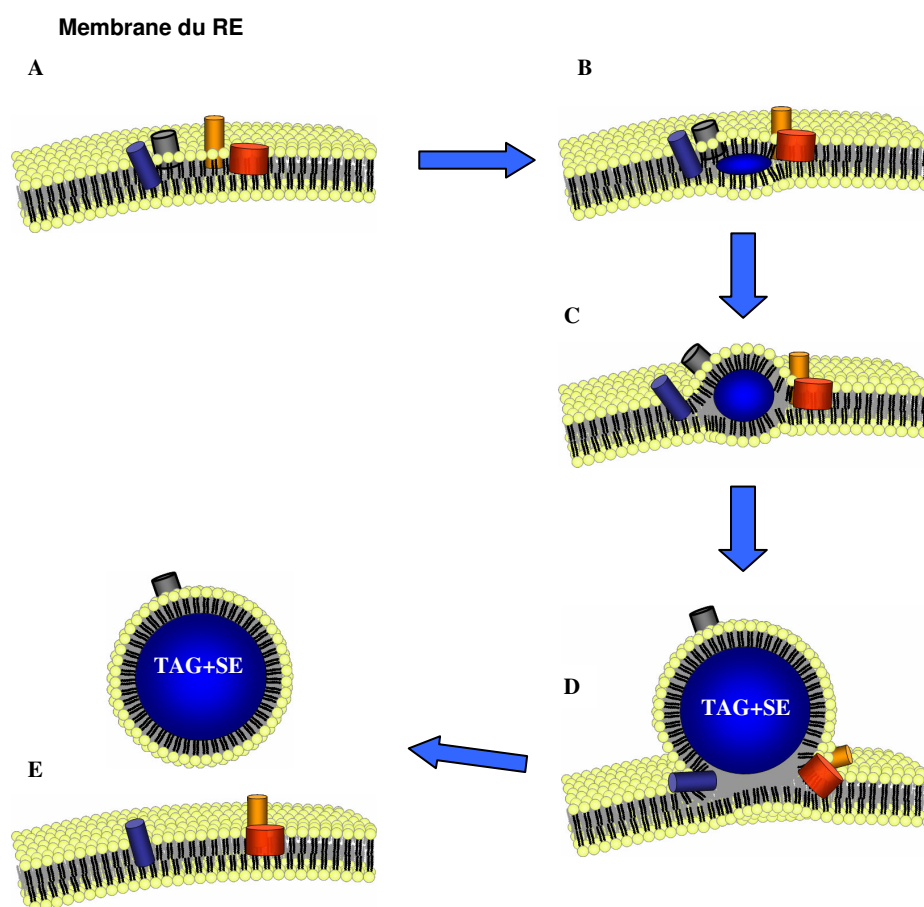


Figure 14. Modèle de biogenèse des corps lipidiques.

La synthèse des TAG et SE par les enzymes du réticulum endoplasmique entraîne l'accumulation des TAG et des SE entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique (B,C). Ces lipides forment des microgouttelettes qui se détachent en bourgeonnant quand elles ont atteint une taille critique (D,E). RE, réticulum endoplasmique ; TAG, triacylglycérol ; SE, ester de stérol ; (D'après Czabany *et al.*, 2006).

Des données expérimentales soutiennent ce modèle. L'analyse du protéome des corps lipidiques chez *S. cerevisiae* a révélé que toutes les protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme des lipides. De nombreuses protéines des corps lipidiques perdent les domaines transmembranaires (Athenstaedt *et al.*, 1999). Plusieurs protéines des corps lipidiques sont aussi détectées dans le réticulum endoplasmique. Enfin, le quadruple mutant, $\Delta dgal \Delta vro1 \Delta are1 \Delta are2$, présente une absence de corps lipidiques et toutes les protéines des corps lipidiques sont localisées dans le RE (Sorger *et al.*, 2004). Ce dernier résultat souligne une forte relation entre ces deux compartiments.

Cette vision est renforcée par le fait que la délétion des domaines hydrophobes des protéines des corps lipidiques entraîne, au moins, leur rétention partielle dans le RE (Mullner *et al.*, 2004). Cependant, il n'a pas été détecté de séquences cibles typiques dans les protéines des corps lipidiques.

E. Production d'acides dicarboxyliques par les levures

Comme nous venons de le décrire, le métabolisme des substrats hydrophobes est complexe impliquant de nombreuses voies métaboliques localisées dans différents compartiments cellulaires. Dans le but de produire des DCA à partir d'alcane principalement *via* des levures, des études ont été menées depuis 1971. Les données disponibles relatives à ces études sont résumées dans cette partie.

Les souches sauvages de levures excrètent des quantités relativement faibles de DCA. Il a été démontré chez des levures sauvages du genre *Candida* que les DCA produits sont dégradés, après activation en ester acyl-CoA, par la voie de la β -oxydation (Chan *et al.*, 1991). Ainsi, la production de DCA par les levures nécessite l'obtention de mutants.

C. maltosa fut la première levure étudiée, dans le cadre de la production de DCA, par l'industrie Ajinomoto Company au Japon. Le mutant de *C. maltosa*, obtenu par génétique classique, est incapable de se développer sur *n*-alcane (Shiio et Uchio, 1971). Le taux de production de DCA atteint à partir d'hexadécane est de 21,8 g.L⁻¹ après trois jours de culture (Uchio et Shiio, 1972). Plus tard, un mutant dérivant du précédent, incapable de se développer sur *n*-alcane et sur DCA, a conduit à une production de 61 g.L⁻¹ de DCA en quatre jours de fermentation soit une productivité de 0,6 g.L⁻¹.h⁻¹. Un essai pilote a été réalisé en fermenteur de 300 L. Cependant, pour des raisons inconnues, ce procédé n'a pas été industrialisé par cette compagnie. Ceci pourrait être due à la réduction du taux d'oxydation de l'alcane de 10% chez ce mutant comparé aux souches sauvages (Schindler *et al.*, 1990).

Le premier procédé industriel a été développé par la société japonaise Nippon Mining (maintenant Japan Energy Company) en utilisant une souche de *C. tropicalis* (M2030), obtenue par mutagenèse aléatoire (Uemura, 1985). Depuis 1987, cette compagnie produit, à partir du tridécane, 150 tonnes d'acide brassilique (DC13) par an. Ce dernier est utilisé dans l'industrie cosmétique comme lactone macrocyclique de musc (Kato et Uemura, 1982) (Uemura, 1985). A l'heure actuelle, ce procédé est exploité par les sociétés Cathay Biotechnology of Shanghai (Chine) et Cognis (Allemagne et Etats-Unis, anciennement Henkel). Ces industries ont maintenant élargi leur production jusqu'à des DCA comportant quinze atomes de carbone.

Récemment, une étude biochimique sur ce mutant très productif a révélé que les mutations ont amené à l'inactivation de deux acyl-CoA oxydases et de la 3-cétoacyl-CoA thiolase, responsables de la première et quatrième étape de la β -oxydation (Kanayama *et al.*, 1998). De plus, l'activité de la deuxième et troisième étape de la β -oxydation, réalisée par l'enzyme bifonctionnelle (enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA deshydrogénase), est fortement diminuée dans les cellules de ce mutant. Enfin, ce mutant présente, dans les mêmes conditions de culture, un nombre de peroxysomes relativement faible par rapport à la souche sauvage dont il est issu. Le site des mutations entraînant une activité très faible des enzymes de la voie de la β -oxydation et une diminution du nombre de peroxysomes n'a toujours pas été mis en évidence.

Cependant, chez cette souche, la voie de la β -oxydation n'est que partiellement bloquée et il se forme des co-produits de longueurs de chaînes plus courtes et/ou comportant des insaturations ou des groupements hydroxyles supplémentaires. Une étape de purification est donc nécessaire.

Plus récemment, plusieurs études ont été réalisées, par le groupe Cognis, afin d'améliorer la production de DCA par des expériences de mutagenèse dirigée à partir d'une souche sauvage de *C. tropicalis*. Dans un premier temps, les gènes codant deux acyl-CoA oxydases (*POX4* et *POX5*) ont été disruptés chez *C. tropicalis* et ont conduit à une accumulation de DCA (Picataggio *et al.*, 1991). Cette même équipe de recherche a, dans un deuxième temps, surexprimé les gènes codant un cytochrome P450 et la NADPH cytochrome P450 réductase impliqués dans la première étape limitante de l' ω -oxydation (Gilewicz *et al.*, 1979; Picataggio *et al.*, 1992; Picataggio *et al.*, 1995). Cette souche AR20 (ATCC20962) permet une amélioration de la production de DCA de 30%. De plus, lors des fermentations utilisant des acides gras comme substrat, un niveau faible d' ω -hydroxy acides gras est accumulé. Ceci indique que la deuxième étape de la voie de l' ω -oxydation est également limitante (Wilson *et al.*, 2004). Cependant, les mutants de *C. tropicalis* obtenus selon ces techniques ne semblent pas totalement stables et se prêtent à des réversions. C'est pourquoi des améliorations ont dû être apportées (Wilson *et al.*, 2004). Enfin, dans un troisième temps, cette équipe a identifiée, chez *C. tropicalis*, trois gènes codant des alcool oxydases (*FAO1-3*). Le gène *FAO1* est fortement induit en présence d'acides gras et *Fao1p* oxyde l'acide gras en ω -hydroxy acide gras.

L'augmentation du nombre de copie des gènes FAO et/ou de l'activité de transcription pourrait entraîner une forte activité de l'alcool oxydase et une augmentation de la productivité de DCA (Craft et Eirich, 2003; Wilson *et al.*, 2004).

Néanmoins, certaines contradictions apparaissent. En effet, le mutant AR20, bloqué au niveau de la β -oxydation et surexprimant les gènes du système P450, le groupe de Picataggio chez Cognis décrit une production de DCA de 150 g.L⁻¹ (productivité de 1,65 g.L⁻¹.h⁻¹) à partir de methymyristate (C16) (Picataggio *et al.*, 1992). Or, en utilisant cette même souche, le groupe General Electric Company obtient 34,4 g.L⁻¹ (productivité de 0,9 g.L⁻¹.h⁻¹) de DCA à partir du même substrat (Mobley et Shank, 2000). Ces niveaux de production sont plus proches des valeurs que nous avons obtenues au cours des essais de production que nous avons réalisés avec cette souche AR20.

Y. lipolytica est capable d'accumuler des DCA par un mutant délété de quatre acyl-CoA oxydases (Smit *et al.*, 2005). Cette levure présente un certains nombres d'avantages par rapport aux levures du genre *Candida*. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est une levure haploïde et la séquence de son génome entier est disponible. De plus, de nombreux outils génétiques ont été développés. Ceci facilite l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique. *Y. lipolytica* est une des « levures non-conventionnelle » les plus étudiée à l'heure actuelle et elle est considérée comme un organisme modèle pour l'étude du métabolisme des alcanes et des acides gras.

Enfin, un autre avantage de *Y. lipolytica* sur *C. tropicalis* pour la production de DCA à partir d'esters d'acides gras ou d'huiles végétales, est le suivant : la transformation des huiles naturelles en DCA par *C. tropicalis* nécessite une hydrolyse chimique au moins partielle du substrat avant la mise en œuvre de la fermentation. Cette hydrolyse est réalisée par une saponification conduite en présence d'hydroxyde de calcium ou de magnésium. Elle produit les sels d'acides gras (savons) correspondants. Or, *Y. lipolytica* présente la capacité d'assimiler les triglycérides comme source de carbone. La première étape de ce catabolisme implique l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et glycérol par les lipases. *Y. lipolytica* hydrolyse donc directement les esters et les huiles naturelles en acides gras libres et glycérol dans des conditions de pH compatibles avec la conduite de la fermentation. Dans ces conditions, l'hydrolyse de l'ester ou de l'huile et sa conversion en DCA a lieu simultanément, ce qui présente l'avantage de mener à un protocole opératoire simplifié l'étape d'hydrolyse chimique étant éliminée.

Chapitre II – MATERIEL ET METHODES

Chapitre II - MATERIEL ET METHODES

A. Matériel

A.1. Souches

Les différentes souches d'*E. coli* et de *Y. lipolytica* utilisées sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Souches d'*E. coli* et de *Y. lipolytica* utilisées dans cette étude.

Souche	Génotype	Références
Mach1-T1	<i>F mcrA</i> ▲ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ▲ 80 <i>lacZ</i> ▲M15▲ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> ▲ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> .	kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning, Invitrogen
DH5α	<i>F-F80d, lacZDM15, D(lac ZYA-argF), B169, recA1, endA1, hsdR17, (rk-, mk), supE44, thil, gyrA, relA1</i> .	Promega
H222	MatA, sauvage	(Barth et Gaillardin, 1996)
H222-41	MatA, <i>ura3-41</i>	(Mauersberger <i>et al.</i> , 2001)
W29	MatA, sauvage	(Barth et Gaillardin, 1996)
Po1d	MatA, <i>leu2-270, ura3-302, xpr2-322</i>	(Barth et Gaillardin, 1996)
MTLY37	<i>Δpox5Δpox2Δpox3Δpox4 ::URA3</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1999)

A.2. Vecteurs

A.2.1. Plasmides

pCR[®]4Blunt-TOPO (Invitrogen) : vecteur permettant le clonage de fragments PCR.

A.2.2. Vecteurs d'expression

Les cartes de restriction sont présentées aux pages suivantes.

JMP61-URA3_{ex} : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur d'auxotrophie *URA3* (Figure 15).

JMP61-LEU2_{ex} : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur d'auxotrophie *LEU2* (Figure 15).

JMP61-hph_{ex} : vecteur navette entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Il contient l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta et *lox* ainsi que le marqueur de résistance à l'hygromycine *hph* (Figure 15).

pRRQ2 : vecteur répliatif qui contient le gène *cre* sous le promoteur constitutif hp4d (Madzak *et al.*, 2000) et le marqueur d'auxotrophie *LEU2* (Figure 16).

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

JMP61-URA3, JMP62-URA3 et JMP21-LEU2 : vecteurs navettes entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. Ils contiennent l'origine de réplication Col E1 de *E. coli* et le gène de résistance à la kanamycine. Ce sont des vecteurs de type intégratif comportant le promoteur fort inductible pPOX2, les séquences zeta ainsi que le marqueur d'auxotrophie *URA3* (Figure 16).

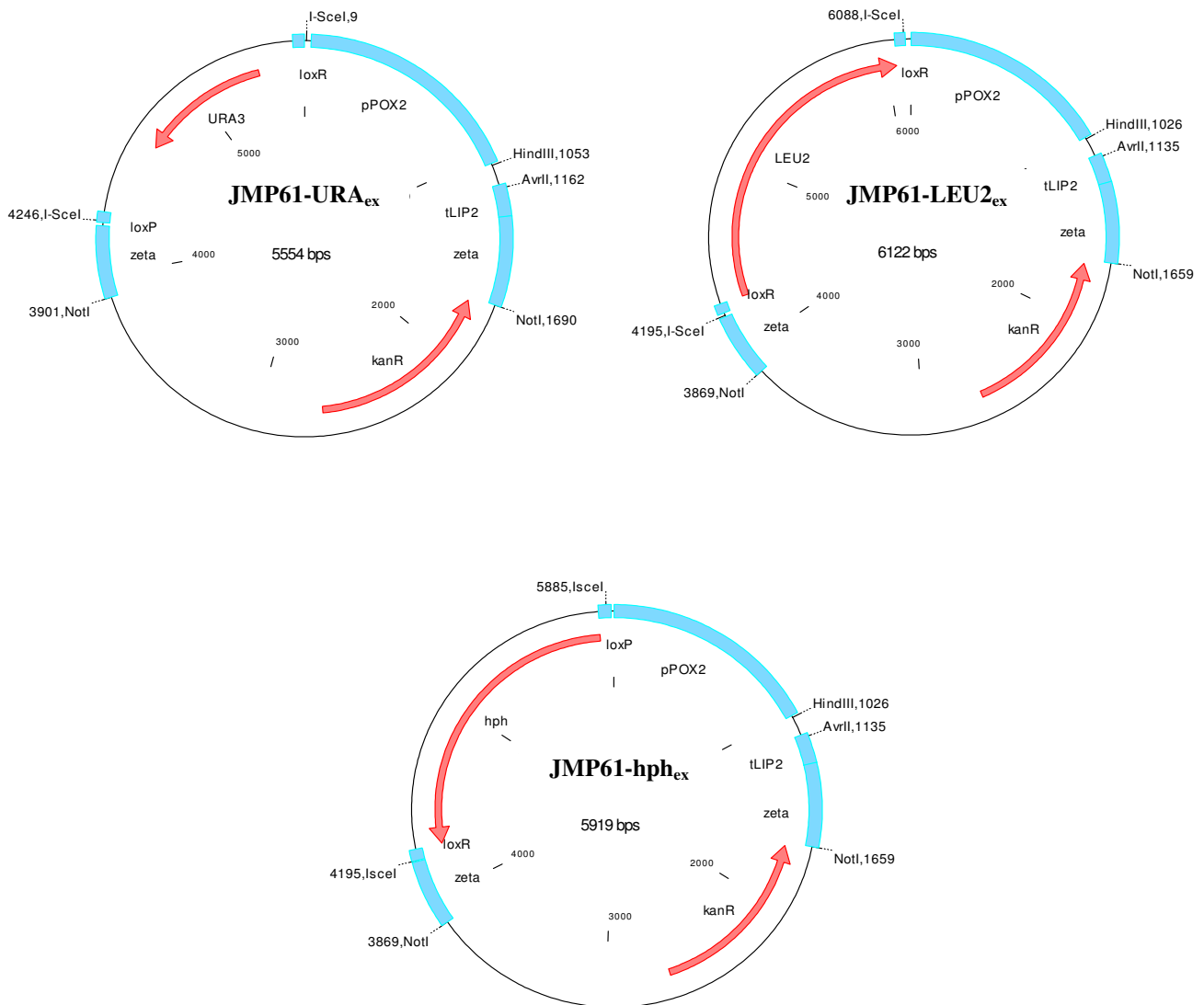


Figure 15. Vecteurs d'expression excisables.

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

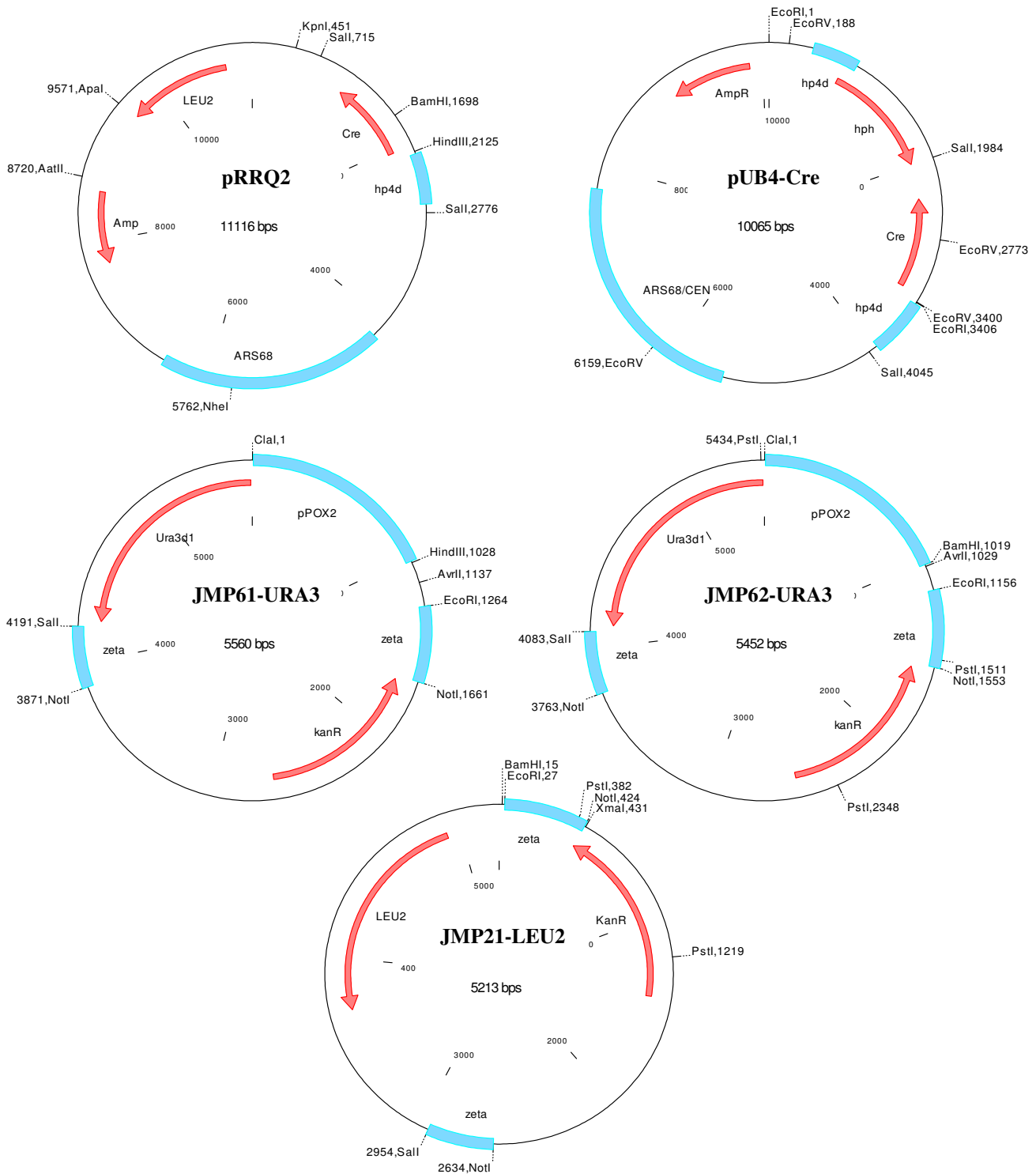


Figure 16. Vecteurs réplcatifs et vecteurs d'expression.

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

A.3. Milieux de culture

Les milieux sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes.

A.3.1. Milieux de culture complet pour *Escherichia coli* : LB

- 10 g.L⁻¹ Bactotryptone
- 5 g.L⁻¹ Extrait de levure
- 10 g.L⁻¹ NaCl
- pH ajusté à 7

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

LB + Kanamycine (50 à 100 µg.mL⁻¹) ou Ampicilline (50 à 100 µg.mL⁻¹).

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

◆ *Milieu complet YPD*

- 10 g.L⁻¹ Bactopeptone
- 10 g.L⁻¹ Extrait de levure
- 10 g.L⁻¹ Glucose

◆ *Milieu complet YEA*

- 5 g.L⁻¹ Extrait de levure
- 10 g.L⁻¹ Glucose

◆ *Milieu minimum YNB*

- Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (Difco, Detroit, MI.)
- 5 g.L⁻¹ NH₄Cl
- 50 mM PO₄ NaK pH 6,8
- 10 g.L⁻¹ Glucose

◆ *Milieu alcanes*

YNB auquel est ajouté de l'extrait de levure ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$) et l'alcane choisi à une concentration finale de 5 ou 10 g.L^{-1} .

Les alcanes testés sont les suivants : le nonane (C9), le décane (C10), le undécane (C11), le dodécane (C12), le tridécane (C13), le tétradécane (C14), le pentadécane (C15), l'hexadécane (C16), et l'heptadécane (C17).

Deux alcanes radiomarqués au carbone 14 furent également utilisés : le décane ($^{14}\text{C10}$) et l'hexadécane ($^{14}\text{C16}$).

La leucine et l'uracile sont ajoutés pour compenser les auxotrophies à $0,05 \text{ g.L}^{-1}$.

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

◆ *YNB Casa*

Milieu permettant de cribler les souches Leu-, Ura+, Hyg- composé de YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g.L^{-1}) et des casaminoacides (2 g.L^{-1}).

◆ *YNB Ura*

Milieu permettant de cribler les souches Leu+, Ura-, Hyg- composé de YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g.L^{-1}) et de l'uracile ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$).

◆ *YEA Hyg*

Milieu permettant de cribler les souches Leu-, Ura-, Hyg+ composé de YEA auquel est ajouté de l'agar (17 g.L^{-1}) et de l'hygromycine ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$).

A.3.5. Milieux utilisés lors des tests en gouttes

◆ *Alcanes*

Milieu YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g.L^{-1}). Un filtre, imbibé d'hexadécane ou de décane, est positionné sur le couvercle de la boîte de pétri. Celle-ci est enfermée dans un sac hermétique afin d'éviter l'évaporation de l'alcane.

◆ *Acides gras*

Milieu YPD auquel est ajouté l'acide nonanoïque (C6:0), l'acide hexanoïque (C9:0), ou l'acide heptanoïque (C17:0) dilué dans de l'éthanol à des concentrations finales de 1 g.L^{-1} ; $0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ou $0,001 \text{ g.L}^{-1}$, respectivement.

◆ *Antifongiques azolés*

Milieu YNB auquel est ajouté de l'agar (17 g.L^{-1}), du glucose (10 g.L^{-1}) et l'antifongique choisit. Les antifongiques testés sont les suivant :

Voriconazole ($0,03 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,06 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,12 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), Fluconazole ($0,10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$; $0,16 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), Kétonazole ($0,5 \text{ } \mu\text{M}$; $1 \text{ } \mu\text{M}$), Miconazole ($0,5 \text{ } \mu\text{M}$; $1 \text{ } \mu\text{M}$); Clorimazole; Econazole ; Methimazole ; Métronidazole ($10 \text{ } \mu\text{M}$).

A.3.6. Milieux de production des acides dicarboxyliques

◆ *Milieu de préculture YPD2*

- 10 g.L^{-1} Bactopeptone
- 10 g.L^{-1} Extrait de levure
- 20 g.L^{-1} Glucose

◆ *Milieux de production en fioles*

Différents milieux de production ont été testé en modifiant les proportions d'extrait de levure, de peptone et de tryptone.

Tableau 4. Composition des milieux de production utilisés

Milieux de production	Extrait de levure (g.L^{-1})	Proteose peptone (g.L^{-1})	Glucose (g.L^{-1})	Tween 80% (v/v)
YPD4	10	10	40	0,5%
YP2D4	10	20	40	0,5%
Y2P2D4	20	20	40	0,5%
		Tryptone (g.L^{-1})		0,5%
YTD4	10	10	40	
YT2D4	10	20	40	0,5%
Y2T2D4	20	20	40	0,5%

◆ *Substrat de bioconversion*

Le substrat de bioconversion est ajouté après 24 h. Les substrats utilisés à une concentration de 3% sont les suivants : l'huile de tournesol oléique, l'acide oléique (MC18:1), l'acide heptadécanoïque (MC17:0), le pentadécane (C15 :0), le tridécane (*n*C13).

A.4. Fermentation

A.4.1. Matériel

L'ensemble du système utilisé est schématisé en Figure 17. Le fermenteur autoclavable est du type F2P 4L avec un volume utile de 2 à 3 litres. L'agitation est assurée par une turbine à double effet centripète, de diamètre 80mm (Rayneri), reliée à un moteur (type KM87-60 de Groschopp & Co).

La régulation du pH implique une sonde pH de type Ingold. Le maintien du pH à une consigne donnée se fait grâce à une électrovanne qui actionne l'apport de la solution de NaOH 1 M dans le milieu de culture. La quantité de soude ajoutée est suivie à l'aide d'une balance de type Mettler PC 4400.

La présence de mousse est détectée grâce à une sonde de type G 8846 IFP par différence de potentiel. Dès lors, l'antimousse, le Rhodorsil (silicone 426), est apporté au milieu à l'aide d'une pompe Minipuls 2 (Gilson).

Une armoire d'acquisition Csl Biolafitte contrôle et régule plusieurs paramètres à savoir le pH, la température, l'oxygène dissout grâce à une sonde polarographique Ingold. Le taux d'aération est mesuré par un compteur volumétrique.

L'apport des deux substrats à la culture est effectué par deux pompes de type Pharmacia P-500 pilotées par un programmeur de gradient de concentration de la même marque ayant pour référence GP 250 et le débitmètre est du type BROOKS. Les mesures issues des différents paramètres sont gérées par un système d'acquisition et de traitement des données équipé du logiciel Bioexpert de chez Applikon.

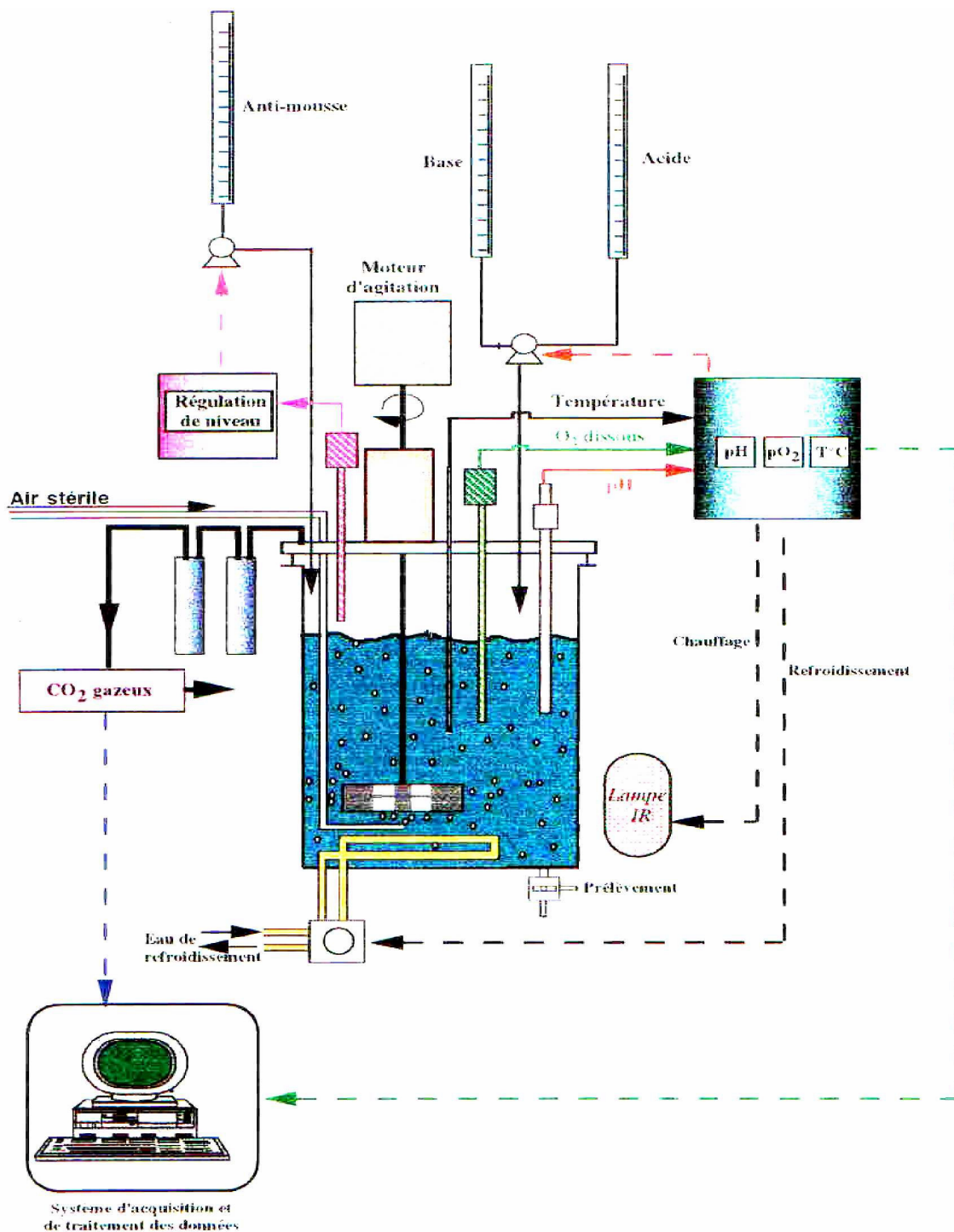


Figure 17. Schéma de fonctionnement du bioréacteur utilisé.

A.4.2. Conditions de production

La production des DCA à longue chaîne carbonée est conduite par un procédé de type batch. La cinétique de production comprend deux phases :

- la phase de production de biomasse ou de croissance
- la phase de bioconversion

La phase de croissance est amorcée par l'inoculation à 1% (v/v) d'une préculture dans le fermenteur batch contenant un milieu nutritif stérile maintenu à 30°C. Dès que le substrat de croissance, le glucose, présent dans le milieu de culture est épuisé, la phase de conversion est initiée par ajout du substrat de bioconversion, de l'huile de tournesol oléique (3%,v/v) et du substrat énergétique, le glycérol (1 mL.L⁻¹.h⁻¹). Durant la phase de croissance le pH est maintenu à 5 puis il est porté directement à 8 durant la phase de conversion afin de neutraliser et solubiliser les acides dicarboxyliques produits dans le milieu de culture.

B. Méthodes

B.1. Techniques de préparation des acides nucléiques

B.1.1. Méthodes de préparation de l'ADN

◆ ADN plasmidique

Les volumes de culture sont différents selon les quantités de plasmides désirées et la finalité de l'extraction.

Les mini-préparations réservées pour des analyses rapides sont réalisées avec 3 mL de milieu sélectif. Le culot de centrifugation est repris dans 200 µL de tampon STET (3% saccharose, 5% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8), auxquels sont ajoutés 10 µL de lysozyme 10 mg.mL⁻¹. Les suspensions sont bouillies au bain-marie pendant une minute avant d'être refroidies et centrifugées pendant 10 min à 15000 rpm à 4°C. Le surnageant est précipité par addition de 200 µL d'isopropanol. Après centrifugation, le culot est repris dans 50 µL d'eau stérile.

Un ADN plasmidique de meilleure qualité est préparé en utilisant le kit « QIAprepTM Spin Miniprep » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

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

◆ *ADN génomique de levure*

La souche d'intérêt est cultivée toute une nuit dans 5 mL YPD à 28 °C. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 0,5 mL de tampon sorbitol (Sorbitol 1M, Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 0,1 M) auxquels sont ajoutés 50 µL de zymolyase à 3 mg.mL⁻¹ (Zymolyase 100T Seikagaku Corp Coger préparée dans du tampon sorbitol) puis 50 µL de β-mercaptoéthanol 0,28 M. La préparation est alors incubée 1 h à 37°C.

Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 500 µL de TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA). 50 µL de SDS 10 % (v/v) sont ajoutés avant une incubation de 20 min à 65 °C suivie d'une incubation de 30 min dans la glace après avoir ajouté de 200 µL d'acétate de potassium 5 M. Après centrifugation, le surnageant est récupéré dans 800 µL d'éthanol 100%. Le culot récupéré après une nouvelle centrifugation est repris dans 400 µL de TE-Rnase A (TE + 100 µg.mL⁻¹ de RNase A) et incubé à 37°C pendant 30 min. La précipitation de l'ADN est effectué en ajoutant 40 µL d'acétate de sodium 2,5 M pH 5,2 et 1 mL d'éthanol 100%. Un lavage de l'ADN est réalisé avec 700 µL d'éthanol 70 % (v/v). Après centrifugation le culot est séché et repris dans 100 µL d'eau.

B.1.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR ("polymerase chain reaction") qui a été décrite par Mullis *et al.* (1986), permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN. Il s'agit d'une amplification enzymatique *in vitro* à l'aide d'une polymérase thermostable. Nous avons utilisé deux enzymes : la Taq polymérase (New England Biolabs) et la Pyrobest (TaKaRa) ainsi qu'une mélange de Taq, Expand Long Template PCR System (Roche). La Pyrobest est une polymérase beaucoup plus fidèle que la Taq polymérase. La PCR se déroule en cycles d'amplification successifs (généralement 30 cycles). Chaque cycle est composé de 3 étapes :

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

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 0,5 mL. Le mélange réactionnel standard est composé de l'ADN matrice (environ 10 ng), 50 pmoles de chaque amorce, 200 μ M de chaque dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 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. Pour les réactions de fusion de fragments d'ADN par PCR, nous avons réalisé 5 cycles à une température d'hybridation basse de 55°C et 20 cycles au T_m des amorces utilisées. La matrice utilisée pour l'amplification peut être une préparation d'ADN (plasmidique ou génomique) ou une colonie jeune de *Y. lipolytica* ou *E. coli* repiquée directement de la boîte dans le mélange réactionnel. A partir de colonies, un cycle de 10 min à 95°C est effectué avant d'ajouter la polymérase.

B.1.3. Purification de fragments d'ADN

Avant d'être clonés, les fragments de PCR ou les fragments de restriction sont purifiés. Cette purification est effectuée avec les kits « QiaquickTM gel extraction kit » ou « QiaquickTM PCR purification kit » (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur.

B.2. Technique d'analyses des acides nucléiques

B.2.1. Hydrolyse par des endonucléases de restriction

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 dans les conditions préconisées par le fournisseur

B.2.2. Déphosphorylation de l'ADN

Afin d'insérer, avec une bonne efficacité, un fragment d'ADN dans un vecteur linéarisé, il est recommandé de déphosphoryler les extrémités 5' de ce dernier afin d'éviter sa recircularisation. La phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP New England Biolabs) est utilisée pour la déphosphorylation à raison de 0,1 unité/picomole d'extrémités sortantes, 1 unité/picomole d'extrémités 3' sortante ou franches.

La réaction s'effectue pendant 45 min à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 min à 75°C en présence de 5mM EDTA. L'ADN est ensuite purifié.

B.2.3. Ligature de l'ADN

La ligature de l'ADN s'effectue pendant une nuit à 18°C, dans un volume final de 10 à 40 µL, en présence d'une unité de T4 DNA ligase (New England Biolabs) dans les conditions préconisées par le fournisseur.

B.2.4. Analyse par séparation électrophorétique

Les gels sont préparés à 0,8% d'agarose (pour une séparation de fragments de taille > 500 pb) ou à 3% d'agarose « low melting » (pour une séparation de fragments de taille < 1000 pb) dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) en présence de Bromure d'éthidium à 0,5 µg.L⁻¹.

B.3. Techniques de transformation

B.3.1. Transformation d'Escherichia coli

La bactérie est cultivée dans 50 mL de milieu SOB à 37°C jusqu'à une DO600nm de 0,3 à 0,5. La culture est incubée sur glace pendant 20 min puis centrifugée à froid 10 min à 5000 rpm. Les cellules sont lavées avec 16 mL de la solution 1 froide (acétate de K 30mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glycérol 15%, ajuster au pH 5,8). Les cellules sont gardées dans la glace pendant 15 min. Après une centrifugation de 5 min à 5000 rpm à 4°C, les cellules compétentes sont reprises dans 4 mL de solution 2 (PIPES 10 mM, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15%, ajuster au pH 6,8). Les cellules sont ensuite aliquotées par 100 µL et congelées à -80°C. Pour 10 à 15 µL d'ADN transformant, 100 µL de bactéries compétentes ainsi préparées sont ajoutées. Après 30 min à 4°C, un choc thermique de 2 min à 42°C est réalisé. Après une incubation de 5 min à 4°C, il est ajouté 900 µL de milieu SOC et une incubation de 1 heure à 37°C est effectuée. Différentes quantités sont étalées sur milieu sélectif.

B.3.2. Transformation de la levure *Yarrowia lipolytica*

◆ *Obtention des cellules rendues compétentes :*

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

◆ *Transformation des cellules rendues compétentes :*

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

B.4. Construction de souches disruptées

B.4.1. Construction des cassettes de disruption

Les grandes étapes de construction de ces souches sont retracées ici et en Figure 18. On nomme les cassettes de disruption : PUT, PLT, ou PHT

La cassette PT (Promoteur-Terminateur) est obtenue par deux étapes d'amplification PCR selon la méthode SEP (Maftahi *et al.*, 1996). Le promoteur et le terminateur sont situés respectivement en amont et en aval de l'ORF du gène d'intérêt. Ces deux régions, d'environ 1kb, sont amplifiées à partir de l'ADN génomique de la souche Po1d ou E150 de *Y. lipolytica* avec, respectivement, les couple d'amorces P1/P2 et T1/T2 (Figure 18). Les amorces P2 et T1 contiennent le site rare de reconnaissance de la méganucléase I-SceI.

Les fragments PCR, P-I-SceI et I-SceI-T, sont ensuite mélangés et utilisés comme matrice pour l'amplification PCR de la cassette P-I-SceI-T en utilisant les amorces P1 et T2. Cette cassette est ensuite clonée dans le plasmide pCR4[®]-Blunt TOPO (Invitrogen). Ce plasmide est ensuite analysé par restriction enzymatique et séquencé en utilisant les amorces universelles T6/SP7.

Le plasmide portant la cassette PT et le plasmide portant le marqueur de sélection d'intérêt sont digérés par I-SceI. Après déphosphorylation du produit de digestion du plasmide PT, une ligature entre celui-ci et le marqueur de sélection est réalisée. Les plasmides résultant présentant les modules P-URA3-T, P-LEU2-T ou P-hph-T sont analysés par restriction enzymatique pour déterminer l'orientation du gène.

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

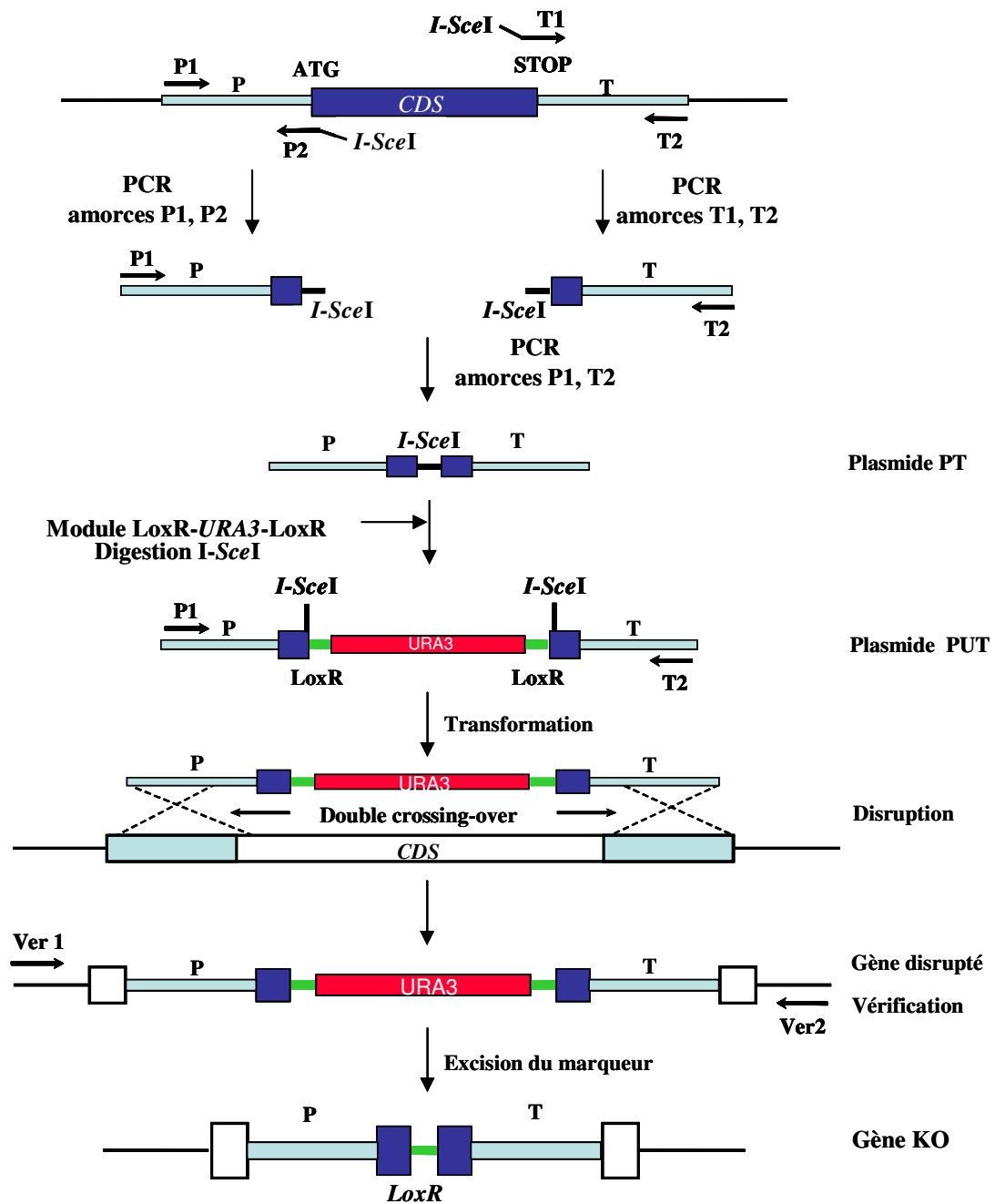


Figure 18. Stratégie de disruption de gène : méthode *Cre lox SEP*.

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

B.4.2. Expression de la recombinaise *Cre* et marqueur d'excision

Quand la disruption du gène d'intérêt a été réalisée avec un marqueur excisable tels que *URA3ex*, *LEU2ex* ou *hphex*, nous pouvons exciser le marqueur par expression de la recombinaise *Cre*.

Les cellules de levure sont transformées par le plasmide pRRQ2 (*hp4d-cre*, *ylLEU2*) pour le marqueur d'excision *ylURA3ex* ou *hphex* ou par le plasmide pUB-CRE (*hp4d-cre*) quand les marqueurs *ylLEU2ex* ou *ylURA3ex* sont utilisés pour la disruption de gènes (Figure 18). Les transformants sont ensuite sélectionnés pour les phénotypes *Leu*⁺ ou *HygR* sur milieu YNBura et YEAhyg, respectivement. Pour permettre l'expression de la recombinaise *Cre*, les cellules poussent sur milieu YPD pendant 12h à partir d'une préculture YPD diluée à 1/1000. Les cellules transformées par pRRQ2 sont ensuite striées sur milieu YNBcasa, sur lequel les transformants *Leu*⁻ sont aisément identifiables. La perte du plasmide pUB-CRE est vérifiée par des répliques sur boîtes YPD et YEAhyg

B.4.3. Vérification de la disruption et de l'excision

La vérification de la délétion du gène d'intérêt est réalisée par PCR suivie dans certains cas, par une restriction enzymatique du produit PCR. L'utilisation des amorces Ver1 et Ver2, spécifiques du gène d'intérêt et situées à l'extérieur de la cassette de disruption, permet de vérifier la disruption correcte du gène (Figure 18).

Alternativement, l'hybridation par Southern blot est également utilisée. Dans ce cas, la sonde utilisée est soit le marqueur d'auxotrophie ou de résistance, soit un fragment du gène d'intérêt.

B.4.4. Hybridation des acides nucléiques

◆ *Marquage d'ADN double brin*

L'ADN double brin est marqué par une technique de marquage interne. La méthode utilisée pour la préparation de sonde est celle de « l'amorçage au hasard » utilisant le kit MegaprimeTM (Amersham). L'ADN (25 à 50 ng) en solution dans 25 µL d'eau est dénaturé en présence de 5 µL d'un mélange d'amorces aléatoires hexanucléotidiques pendant 5 min à 100°C, puis laisser à température ambiante pendant 15 min pour l'hybridation des amorces avec l'ADN.

L'échantillon est ensuite placé à 37°C pendant 30 min en présence du nucléotide radioactif 30 μCi de (α - ^{32}P)dCTP (ICN), 10 μL de tampon de réaction contenant les autres nucléotides non radioactifs et 2 μL de polymérase de Klenow (1 U. μL^{-1}). Cette sonde est dénaturée 5 min à 100°C avant utilisation.

Les sondes sont purifiées par chromatographie d'exclusion moléculaire en utilisant du Sephadex G-50 (ProbeQuantTM G-50 Micro Columns, Amersham). Avant d'être utilisées, les sondes purifiées sont préalablement dénaturées (5 min à 100°C puis 5 min dans la glace) afin qu'elles soient sous forme simple brin.

◆ *Southern Blot*

La technique de Southern blot concerne le transfert sur membrane des gels d'électrophorèse d'ADN. Après migration, le gel d'agarose est traité par une solution 0,2 N HCl pendant 15 min afin de dépuriner l'ADN. Le gel est ensuite immergé dans une solution 0,4 N NaOH pendant 15 min de façon à dénaturer l'ADN. Le transfert est effectué pendant une nuit par capillarité avec du NaOH 0,4 N sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham). Ce type de membrane permet de fixer l'ADN de façon covalente. Après transfert, la membrane est rincée avec du tampon 2X SSC.

Les membranes sont préhybridées pendant 1 heure à 60°C dans une solution contenant 5X SSC, 5X Denhardt, du tampon phosphate de sodium 25 mM pH 6,8, 0,1% SDS et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé. L'hybridation avec la sonde dénaturée est effectuée à 60°C entre 3 et 16 heures dans la solution de préhybridation. Ensuite, les membranes sont rincées pendant 1 min dans du 2X SSC à température ambiante, puis 2 lavages successifs de 20 min sont effectués à 65°C dans une solution 2X SSC, 0,1% SDS. En dernier, 2 autres lavages successifs de 10 min sont effectués à 65°C dans une solution 0,1X SSC, 0,1% SDS.

Les membranes sont exposées avec des films autoradiographiques à -80°C dans une cassette contenant des écrans intensificateurs.

B.5. Assimilation d'alcane radioactifs

Les cultures sont réalisées sur milieu YNB auquel est ajouté de l'extrait de levure (1,5 g.L⁻¹). Elles sontensemencées à partir d'une préculture de 24h à une DO_{600nm} égale à 1 dans un volume final de 10 mL dans des fioles pénicilline hermétiques. Une phase d'induction est effectuée pendant 2h en ajoutant du décane ou de l'hexadécane froid (0,005%).

Puis le décane ou l'hexadécane radiomarké au carbone 14 sont incorporés (1 μL ; 0,1 mCi/mol, SA 55 mCi.mmol⁻¹). A différents temps, les cultures sont placées à 0°C pendant 10 minutes puis filtrées. Deux lavages méthanol/chloroforme (1/1, v/v, 5 mL) sont ensuite effectués afin d'éliminer l'alcane résiduel des cellules de levure. Les lipides extraits sont considérés comme de faible importance (Gill et Ratledge, 1972). Le filtre et le filtrat sont placés respectivement dans le liquide de scintillation et la radioactivité est mesurée (compteur à scintillation Tri Carb 2300TR Packard).

B.6. Localisation cellulaire des protéines par immunofluorescence

Les cellules sont cultivées en YPD auquel on ajoute de l'acide oléique 1% jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ comprise entre 1 et 2 puis lavées. Elles sont ensuite fixées par l'addition dans le milieu de culture de formaldéhyde 5%. Après centrifugation, les cellules sont incubées à température ambiante pendant 2 heures en 50 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 , 5% formaldéhyde pH 6,5 sans agitation. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 mL de tampon KH_2PO_4 0,1 M contenant 25 mM de β -mercaptoéthanol et perméabilisées par l'ajout de 10 mg de zymolyase 20T et 20 mg de cytohelicase pendant 20 minutes à 37°C. Après rinçage, les cellules sont remises en suspension dans du PBS, et 10 μL de suspension cellulaire sont déposés dans un puit de lame d'immunofluorescence préalablement traitée à la polylysine. Les cellules sont alors traitées par 10 μL de PBS – 0,5% BSA – 0,05% Nonidet P-40 pendant 15 minutes puis lavées en PBS et finalement incubées avec les anticorps dirigés contre la protéine ou le tag d'intérêt dilués au 1:300. Après 1 heure d'incubation et des lavages en PBS, l'anticorps primaire fixé est décoré par des anticorps secondaires de lapin ou de souris conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (vert) ou au fluorochrome Cy3TM (rouge). Les lames sont alors traitées avec 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) puis montées dans une goutte de solution de montage (PBS : 1/10 – Glycérol : 9/10 – p-phénylènediamine : 1 mg.mL⁻¹).

B.7. Techniques analytiques

B.7.1. Dosage du glucose résiduel

Le dosage par la méthode au Glucostat Beckman est une méthode enzymatique avec de la glucose oxydase. En effet, celle-ci oxyde le glucose en présence d'O₂ pour donner de l'acide gluconique et de l'eau oxygénée. La réaction est la suivante :



GOD : glucose oxydase

La vitesse de consommation d'O₂, qui est directement proportionnelle à la concentration de glucose, est mesurée à l'aide d'une sonde à oxygène. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration de glucose contenue dans 10 µL de l'échantillon. Cependant, ce dosage possède certaines limites : 0,2 à 0,3 < [Glucose] g.L⁻¹ < 4

En dessous ou au-dessus de ces limites, la concentration de glucose déterminée n'est pas significative et on ne peut pas en tenir compte. Il faut procéder à une dilution après élimination des cellules.

B.7.2. Dosage des acides dicarboxyliques

◆ *Extraction des acides dicarboxyliques*

L'extraction des DCA en fin de fermentation suit le protocole suivant : l'ensemble du moût de fermentation est centrifugé afin de récupérer le surnageant. Celui-ci est acidifié avec une solution d'acide fort tel que l'HCL à 1 M jusqu'à un pH compris entre 1 et 2 afin d'obtenir les fonctions carboxyliques des diacides produits sous forme protonée. Une seconde centrifugation permet de recueillir le culot de DCA précipité qui sera par la suite séché par lyophilisation à -60°C. La concentration du produit brut est évaluée selon la relation suivante :

$$[DCA]_{\text{Brut g/L}} = \frac{\text{Masse du lyophilisat recueilli}}{\text{Volume du prélèvement}}$$

La cinétique de production des DCA à longue chaîne carbonée est réalisée en effectuant des prélèvements réguliers. Chaque échantillon prélevé (500 µL) subit une acidification par l'ajout de 10 µL de HCl 1 M. Puis 300 µL d'une solution de MTBE et de DCA en DC14 :0 à 6,6 g.L⁻¹ sont ajoutés.

L'utilisation d'une solution de MTBE contenant un standard interne permet de pallier les variations d'efficacité d'extraction. Ce mélange est vortexé pendant 5 min. Après centrifugation, la phase supérieure extraite est récupérée. Ce protocole est réalisé deux fois. La phase extraite est évaporée sous flux d'azote.

◆ *Chromatographie sur couche mince (TLC)*

Les DCA extraits par la méthode précédente, peuvent être directement analysés par TLC. Ainsi, des plaques d'aluminium de chromatographie pré-enduites de gels de silice (Merck Silica Gel 60F254) sont utilisées pour analyser les différents échantillons. La migration s'effectue en présence de la solution suivante : acide formique (3%), diethyl ether (40%) et hexane (60%). La révélation des plaques est réalisée dans une solution de vert de bromocresol (0,2 g.L⁻¹), éthanol 1 L, et 1 mL NaOH 1 M après séchage à 100°C pendant 15 minutes. Les plaques sont par la suite soumises à un logiciel d'analyse d'image (Molecular Dynamics Image QuaNT version 4.2, Build 13) afin de quantifier la production de DCA.

◆ *Estérification*

Les DCA extraits sont repris dans 2 mL de méthanol à 1% (v/v) d'acide sulfurique et sont estérifiés à 100°C durant une heure en présence de 1 mL de toluène. Après refroidissement, les esters méthyliques sont extraits par 5 ml de cyclohexane. 5 mL de chlorure de sodium à 5% (v/v) sont ensuite rajoutés afin de piéger l'excédent d'acide sulfurique. La phase organique obtenue est prête à être quantifiée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

◆ *Chromatographie en Phase Gazeuse*

Une fois que les produits de la fermentation ont bien été identifiés comme étant des diacides par couplage CG-SM, il sera effectué ultérieurement un dosage par chromatographie gaz. La méthode de l'étalon interne est employée sur le chromatographe de modèle VARIAN 3800 muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Pour chaque pic identifié, la concentration de ce constituant se calcule de la manière suivante :

$$[DCA]_{g.L^{-1}} = [\text{étalon interne}]_{g.L^{-1}} \frac{Aire_{DCA}}{Aire_{\text{étalon interne}}}$$

L'identification des DCA par leur temps de rétention a été rendue possible grâce au chromatogramme de différents DCA à longue chaîne, traités dans les mêmes conditions que les produits de la fermentation.

D'une manière générale, on observe que le temps de rétention d'un ester de diacide est d'autant plus élevé que son nombre de carbone est grand et que le diacide correspondant est saturé. D'autre part, nous avons établi une gamme étalon afin de vérifier qu'il existait une relation linéaire entre les quantités de diacides injectés et les aires obtenues.

Conditions opératoires CG-SM:

Programmation de la colonne DB1 : 150°C (2 min) $\xrightarrow{8^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C (10 min)
Pression constante Helium = 29 Psi Température injecteur : 280°C
Volume injecté : 1.0 μL Split : 1/50

Conditions opératoires CG:

Volume d'injection : 1 μL
Colonne : DB-1
Gaz vecteur : hélium
Température initiale de la colonne : 150°C
Température finale de la colonne : 290°C
Température de l'injecteur : 280°C pendant les 31 minutes d'analyse
Température du détecteur : 300°C
Split : 1/20

B.7.3. Estimation de la biomasse

La croissance des cellules a été estimée soit par détermination de la matière sèche ou par la lecture de l'absorbance à 600 nm. Dans le cas des cultures en présence d'alcane, la culture est agitée après ajout de NaOH (0,05 M) puis lavée dans du milieu YNB. La densité optique à 600 nm est ensuite mesurée.

B.7.4. Données de fermentation

On calcule les taux de recouvrement en carbone pour la phase de bioconversion et le rendement de conversion des acides gras en DCA.

$$\text{Taux Carbone (\%)} = \frac{\text{Masse de C (DCA + MA non consommés + CO}_2\text{ produit)}}{\text{Masse de C (Huile + Glycérol)}} \times 100$$

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de C (DC18)}}{\text{Masse de C (C18 consommés)}} \times 100$$

$$\text{Taux de bioconversion (\%)} = \frac{\text{n de C (DC18 + DC16)}}{\text{n de C Totaux dans Substrat}} \times 100$$

$$\text{Coefficient de raccourcissement} = (\text{DC16/DC}_{\text{Totaux}} - \text{C16/C}_{\text{Totaux}})$$

Chapitre III – RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre III - RESULTATS ET DISCUSSION

La production de DCA par des microorganismes impose la manipulation des voies métaboliques. Chez *Y. lipolytica*, le catabolisme des alcanes fait intervenir majoritairement l'oxydation monoterminale des groupements méthyles pour conduire à l'acide gras de même longueur de chaîne. Ensuite, la voie de la β -oxydation réduit la longueur de la chaîne carbonée des acides gras. Cependant, parallèlement à cette voie privilégiée, il existe une voie alternative, l' ω -oxydation, qui aboutit à la production de DCA. Enfin, les acides gras peuvent être stockés sous forme de triacylglycérol dans les corps lipidiques. Afin d'orienter ces métabolismes vers la production de DCA, nous avons modifié les différentes voies impliquées.

(A) A partir d'alcanes ou d'acides gras, la production de DCA nécessite la construction de mutants totalement bloqués au niveau de la β -oxydation afin de réorienter le flux métabolique vers l' ω -oxydation. Celle-ci conduit à la formation de DCA de même longueur de chaîne que le substrat. Notre premier objectif fut donc de mettre au point un procédé de production de DCA par une souche bloquée au niveau de la β -oxydation.

(B) Dans un deuxième temps, la voie de l' ω -oxydation a été modifiée afin d'augmenter la production de DCA en jouant sur l'expression du système cytochrome P450 qui intervient au niveau de la première étape de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation.

(C) La voie de stockage des acides gras a été réduite, afin d'augmenter les rendements de production, en jouant sur l'activité de deux facteurs clé de celle-ci.

(D) Enfin, un système de transport spécifique des substrats hydrophobes impliquant une famille d'ABC transporteurs a été identifié puis étudié fonctionnellement.

A. Blocage de la voie de la β -oxydation

A.1. Méthodes de dosage des acides dicarboxyliques

Une des grandes difficultés du procédé de production des DCA par biotechnologie est la phase de séparation du produit d'intérêt des sous-produits dérivant de la fermentation. Disposer d'autre part, d'une méthode d'analyse permettant une quantification aussi précise que possible des DCA produits est primordial. C'est pourquoi, la mise au point de méthodes de dosage et de séparation des DCA a été réalisée.

Ainsi, la méthode d'extraction et de séparation des DCA des moûts de culture a été optimisée. Nous avons développé une méthode rapide, qualitative et semi-quantitative de dosage des DCA par chromatographie sur couche mince (TLC) utilisable pour le criblage de souches.

Afin d'identifier et de quantifier les DCA produits dans le cadre d'une analyse fine de la bioconversion, nous avons également développé une méthode de dosage des DCA en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Pour cette dernière, il est nécessaire d'estérifier les DCA. L'estérification étant jugée comme une étape critique de la méthode, des tests d'optimisation ont été réalisés à partir de moûts de fermentation. Après avoir identifié les DCA estérifiés par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, nous avons mis au point une méthode chromatographique permettant une bonne résolution des DCA en CPG sous forme de leurs esters méthyliques. Par ailleurs, l'utilisation d'un détecteur par ionisation à flamme permet leur quantification précise puisque les réponses spécifiques des différents esters sont très voisines. Cette méthode permet d'identifier et de quantifier un grand éventail de composés : des alcanes en C10 à C16, des acides gras en C10 à C20 et des DCA en C8 à C18.

A.2. Procédé de production des acides dicarboxyliques

Afin de réorienter le flux métabolique vers la voie de l' ω -oxydation, nous avons étudié des mutants dont la voie de β -oxydation est altérée.

La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée de l'acyl-CoA est réduite de deux atomes de carbone. L'acyl-CoA dont la chaîne carbonée est réduite de deux unités, retourne alors successivement dans la spirale de la β -oxydation jusqu'à sa dégradation complète en acétyl-CoA. Les acyl-CoA oxydases sont responsables de la première étape de la voie de la β -oxydation.

Chez *Y. lipolytica*, cinq acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX1* à *POX5* ont été initialement identifiées. Deux acyl-CoA oxydases (Aox2 et Aox3) sont spécifiques, respectivement des acyl-CoA à chaîne longue et à chaîne courte carbonée (Wang *et al.*, 1999 ; Luo *et al.*, 2002). Les autres acyl-CoA oxydases présentent une faible activité envers un large spectre de longueur de chaîne (Aox4 et Aox5) ou aucune activité détectable (Aox1).

Toutes les combinaisons de double mutant montrent une croissance normale sur acide oléique en milieu liquide. Seul le double mutant délété des gènes *POX2* et *POX3* voit sa croissance légèrement inhibée sur milieu solide en présence d'acide oléique. Le triple mutant dont les gènes *POX2-POX3-POX5* sont délétés présente une croissance partielle sur acides gras alors que le quadruple mutant délété des gènes *POX2-POX3-POX4-POX5* ne se développe pas sur ce même substrat (Wang *et al.*, 1999). De plus, cette souche est incapable de se développer sur acides gras méthylés ou sur triglycérides. Ce quadruple mutant présente probablement une voie de β -oxydation inactive, bloquée au niveau de la première étape.

Ainsi, cette souche (MTLY37) disruptée de quatre gènes codant des acyl-CoA oxydases pourrait accumuler des DCA à longue chaîne carbonée à partir de substrats hydrophobes à longue chaîne carbonée. Le blocage de la première étape de la β -oxydation semble suffisant pour inactiver l'ensemble de la voie puisque ce mutant est incapable de croître sur acides gras. Cette modification pourrait permettre de réorienter le flux métabolique vers la voie de l' ω -oxydation qui conduit à la production de DCA.

Afin de vérifier cette hypothèse, un procédé de production en fioles dans un premier temps, puis en bioréacteur dans un second temps a été développé. Celui-ci est composé de deux phases : une phase de croissance (production de la biomasse) et une phase de bioconversion. La phase de croissance est initiée par un ensemencement à 1% (v/v) sur un milieu riche, à partir d'une préculture. Après épuisement de la source de carbone principale (glucose), le substrat de bioconversion est ajouté à 3% (v/v) et une régulation du pH à 8, par une solution de soude à 1 M, est initiée permettant la dissolution des DCA produits sous forme de sels de sodium (voir partie Matériel et Méthodes).

Les souches de *Y. lipolytica* W29 (sauvage) et MTLY37 (Δ *pox2*, Δ *pox3*, Δ *pox4* et Δ *pox5*) sont utilisées pour comparer la production de DCA dans différentes conditions en fioles et en fermenteur. L'influence de paramètres tels que le substrat de bioconversion, le milieu de production ou l'apport d'un cosubstrat énergétique, sur la production de DCA a été étudiée.

A.2.1. Influence du substrat de bioconversion

Nous avons testé la production de DCA par la souche sauvage et la souche modifiée, MTLY37, à partir de différents substrats : dodécane, diol correspondant (1,12-dodecanediol), acide oléique, oléate de méthyle, et huile de tournesol oléique. Seule la souche MTLY37 est capable de convertir le dodécane et le 1,12-dodecanediol en DCA correspondant (DC12:0) (Résultats non présentés). Des productions similaires d'acide octadécènedioïque (DC18:1) par la souche MTLY37 sont obtenues avec comme substrats de bioconversion, l'acide oléique, l'oléate de méthyle ou l'huile de tournesol oléique, composés majoritairement d'acides gras en C18:1 (Résultats non présentés).

Ainsi, l'interruption de la β -oxydation au niveau de la première étape, par la délétion de quatre gènes codant les acyl-CoA oxydases 2, 3, 4 et 5 permet de réorienter le flux métabolique vers l' ω -oxydation et donc d'accumuler des DCA dont la longueur de chaîne carbonée correspond à celle des substrats de bioconversion utilisés. Ceci confirme des résultats précédemment obtenus avec des souches de *C. tropicalis* ou de *Y. lipolytica* bloquées au niveau de la voie de la β -oxydation (Picataggio *et al.*, 1991; Smit *et al.*, 2005).

A.2.2. Influence de la composition du milieu de culture

Afin d'évaluer l'influence de la composition du milieu de culture sur la bioconversion d'huile de tournesol oléique en DCA par la souche MTLY37, différents milieux riches de production ont été testés (Tableau 2, Matériel et Méthodes). Ces derniers diffèrent de par leur composition et leur concentration respective en extrait de levure (noté Y), en glucose (noté D), en peptone (noté P) ou en tryptone (noté T).

Les tests de production sont réalisés en fioles. Après 24h, le substrat de bioconversion est ajouté (30 g.L^{-1}) et le pH est régulé à 8. Les DCA extraits au cours des cultures sont analysés par chromatographie sur couche mince (TLC). A l'image de la composition de l'huile de tournesol oléique, le DCA majoritaire est l'acide octadécènedioïque (DC18:1). Celui-ci est quantifié par l'analyse des plaques et l'établissement d'une droite étalon propre à chaque migration afin de déterminer sa cinétique de production. La figure 19 est un exemple de la cinétique de production de DC18:1 issue du milieu de production Y2T2D4 composé de 20 g.L^{-1} d'extrait de levure, de 20 g.L^{-1} de tryptone et de 40 g.L^{-1} de glucose.

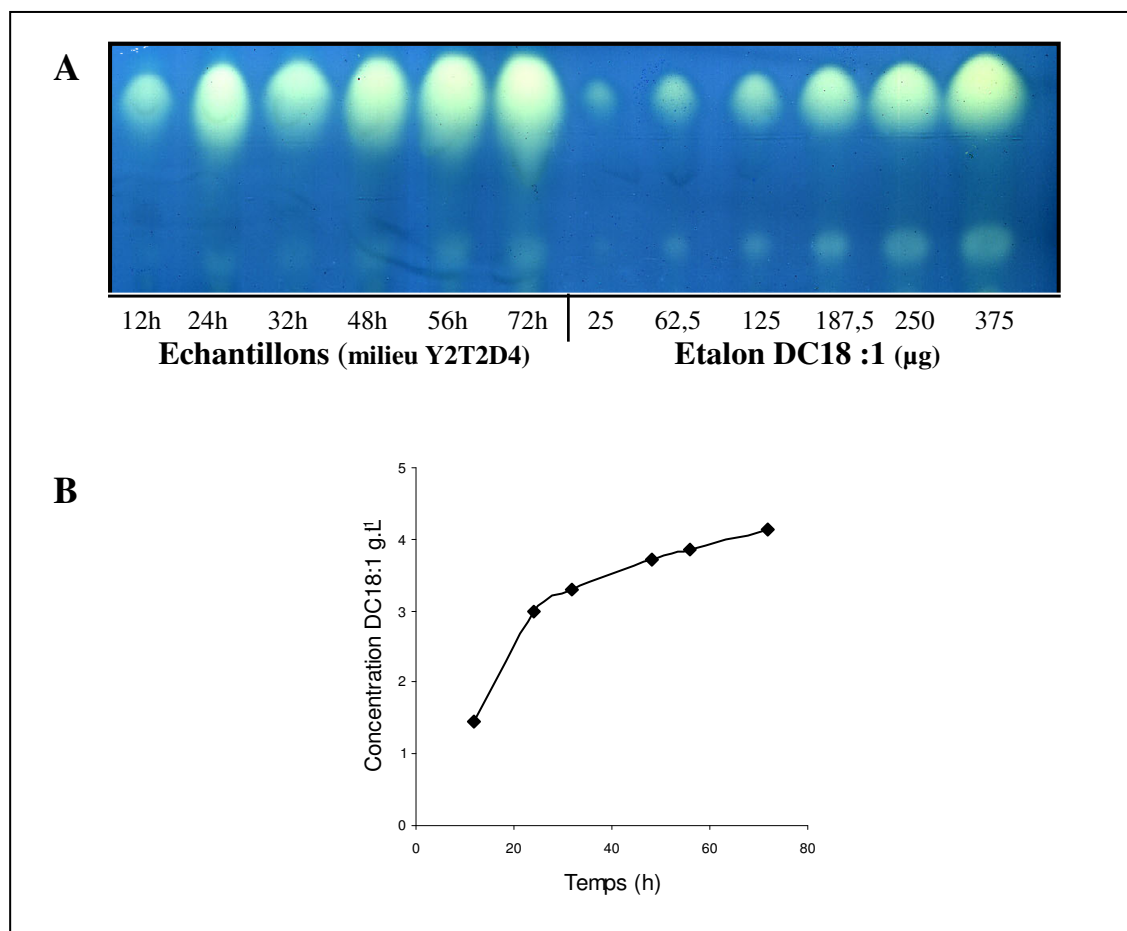
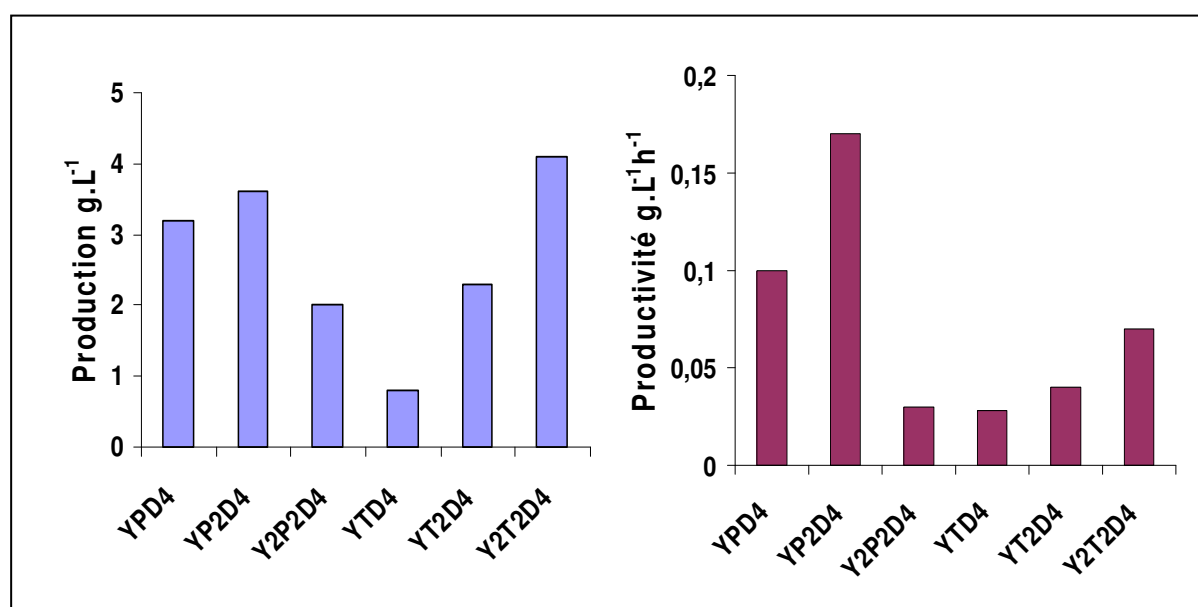


Figure 19. Cinétique de production de l'acide dicarboxylique DC18:1. Analyse par chromatographie sur couche mince (TLC) des échantillons issus du milieu Y2T2D4 (A) et cinétique de production des diacides DC18:1 à partir d'huile de tournesol oléique ($t = 0$) (B) à partir de la souche MTLY37.

La production de DCA sur le milieu Y2T2D4 atteint environ $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ (Figure 19). En extrapolant la courbe de production, nous pouvons estimer le début de production à 1h environ après l'ajout du substrat de bioconversion.

D'une manière globale, nous constatons que la production de DCA débute après 1h en présence de tryptone et à environ 10h en présence de peptone, après l'ajout de l'huile de tournesol oléique. Les productions finales de DC18:1 les plus élevées sont obtenues sur les milieux Y2T2D4, YP2D4 et YPD4 (Figure 20). Cependant, la productivité maximale de DC18:1 sur milieu Y2T2D4 ($0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) est relativement faible par rapport à celles obtenues sur milieux YPD4 et YP2D4 ($0,1$ et $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivement).

Figure 20. Production finale et productivité du diacide majoritaire, DC18:1, sur différents milieux de production à partir de la souche MTLY37. Les milieux testés diffèrent de par leur composition en extrait de levure (noté Y), en glucose (noté D), en peptone (noté P) ou en tryptone (noté T) et leur concentration (noté 2 pour 20 g.L^{-1} , 4 pour 40 g.L^{-1} et en absence de chiffre 10 g.L^{-1}).



Les différents milieux testés dans cette étude montrent des différences au niveau de la production finale de DC18:1. Il semble que la présence de tryptone dans le milieu de culture conduise à une production plus précoce de DCA. Cependant, l'utilisation du milieu YP2D4 permet d'obtenir une production et une productivité relativement élevées. Nous avons donc utilisé le milieu YP2D4 lors de ce travail.

A.2.3. Production en fermenteur sur milieu riche

Afin de pouvoir confirmer ces résultats, nous avons réalisé une culture en fermenteur dans les conditions suivantes :

- Souche de *Y. lipolytica* : MTLY37 ($\Delta pox2$, $\Delta pox3$, $\Delta pox4$ et $\Delta pox5$)
- Milieu de culture : YP2D4
- Substrat de bioconversion : huile de tournesol oléique par ajout ponctuel (3% (v/v) à la 24^{ème} heure de culture)

Dès que le glucose présent dans le milieu de culture est épuisé, la phase de conversion est initiée par l'injection du substrat de bioconversion, l'huile de tournesol oléique. Cette phase de bioconversion est caractérisée par une production de DCA finale de 5 g.L⁻¹. Elle est marquée par une hausse importante du taux d'oxygène dissous, une acidification du milieu de culture et une lyse cellulaire, après environ 40 h de bioconversion (Résultats non présentés). L'augmentation de l'oxygène dissous traduit un arrêt de la croissance et est corrélée à une baisse de la production de dioxyde de carbone. La forte consommation de soude pourrait être due à la production d'acide citrique. En effet, il a été démontré qu'une carence en azote entraîne la production d'acide citrique par *Y. lipolytica* (Fickers *et al.*, 2005). Enfin, la lyse cellulaire observée pourrait s'expliquer par un effet toxique des DCA produits ou par un apport énergétique insuffisant. La peptone et l'extrait de levure ne permettent pas de maintenir le métabolisme énergétique basal de la souche MTLY37 bloquée au niveau de la première étape de la β -oxydation. Afin de maintenir la croissance et l'intégrité cellulaire ainsi qu'augmenter la phase production, un cosubstrat énergétique pourrait être rajouté en mode continu (« feed batch ») au cours de la phase de bioconversion.

A.2.4. Influence du cosubstrat énergétique

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons répété l'essai de fermentation précédant en ajoutant un cosubstrat, le glycérol, dans les conditions suivantes :

- Souche de *Y. lipolytica* : MTLY37 ($\Delta pox2$, $\Delta pox3$, $\Delta pox4$ et $\Delta pox5$)
- Milieu de culture : YP2D4
- Substrat de bioconversion : huile de tournesol oléique par ajout ponctuel (3% (v/v) à la 26^{ème} heure de culture)
- Substrat énergétique : glycérol ($1\text{mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Nous avons choisi le glycérol car sa dégradation n'emprunte pas la voie de la β -oxydation et il est déjà apporté, en faible quantité, sous forme de glycérides dans l'huile de tournesol oléique utilisée. Le glycérol permettrait d'alimenter le métabolisme basal des levures. Il est ainsi ajouté à la fin de la phase de croissance simultanément avec le substrat de bioconversion, de manière continue et en flux limitant. En effet, des essais préalables ont démontré qu'un excès de substrat énergétique entraîne d'une part, une forte minéralisation se traduisant par un fort pourcentage de dioxyde de carbone dans l'effluent ($> 4\%$) ; et d'autre part, inhibe la bioconversion, entraînant par conséquent l'arrêt de la production de DCA (Résultats non présentés). La consommation de glycérol est suivie par des dosages réguliers réalisés par HPLC. Un débit de glycérol fixé à $1\text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ limite son taux résiduel présent dans le milieu de culture.

◆ *Cinétiques globales de fermentation*

Au cours de la phase exponentielle de croissance (de 8 à 15h), les cellules consomment une grande quantité d'oxygène (Figure 21). De ce fait, on observe une diminution du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu en fonction du temps et à l'inverse une augmentation du dégagement gazeux (CO_2) due à la consommation du glucose introduit initialement dans le milieu par les levures. Après 26h, le glucose étant épuisé, l'ajout d'huile de tournesol oléique est effectué. Les dosages de DCA produits sont réalisés sur l'ensemble du moût de fermentation (cellules et milieu de culture).

A partir de 40h, la production de dioxyde de carbone s'équilibre autour de 4 % traduisant une stabilisation de la masse cellulaire (Figure 21). D'autre part, aucune augmentation d'oxygène dissous ou d'apport de soude n'est observable. Le phénomène de lyse cellulaire observé précédemment a donc été éliminé par l'ajout d'un substrat énergétique.

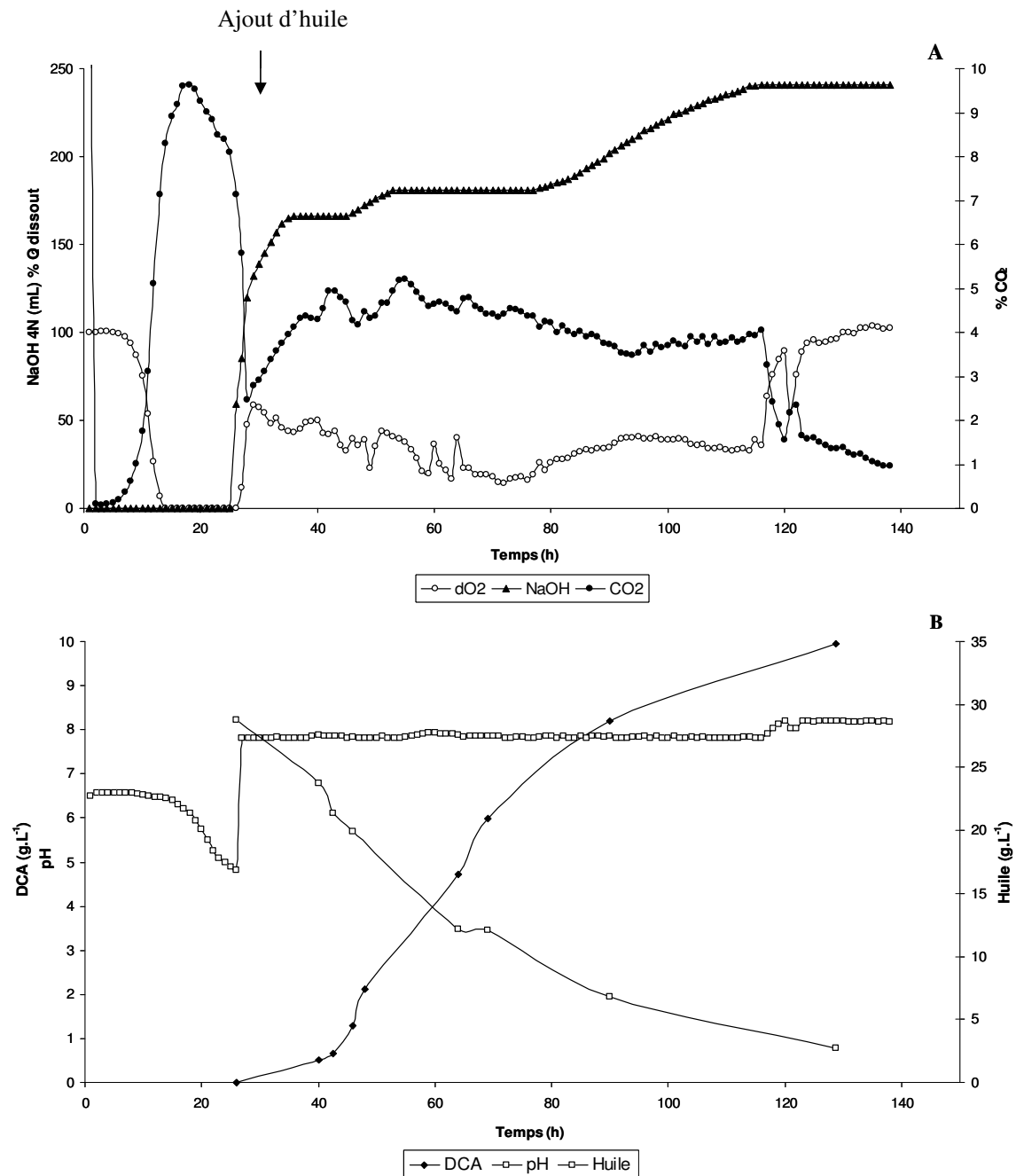


Figure 21. Cinétiques globales de fermentation de la souche MTLY37 en présence d'un cosubstrat.

(A) : Dioxyde de carbone produit dans l'effluent gazeux (●), Oxygène dissous (○) Soude ajoutée au réacteur (▲).
 (B) : Production de DCA totaux (◆), Huile de tournesol oléique (◇), pH (□).

Le dosage de l'huile de tournesol oléique a été réalisé par CPG durant la fermentation. Peu après son ajout dans le fermenteur, elle est dosée à 33 g.L^{-1} ce qui est représentatif de la quantité de substrat de bioconversion introduite (Figures 21 et 22).

D'après la figure 21, la production de DCA débute immédiatement après l'introduction du substrat de bioconversion. Après 102 h, environ 30 g.L^{-1} d'huile de tournesol oléique ont été consommés soit une consommation moyenne de $0,292 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La vitesse de consommation atteint son maximum de $0,485 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ entre 40 et 64h. Parallèlement, la production de DCA atteint $9,94 \text{ g.L}^{-1}$ après 103 h soit une productivité sur l'ensemble de la fermentation de $0,097 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure 21).

D'autre part, le début de la phase de production maximale à 48h est en corrélation avec un ajout important de soude ainsi qu'une augmentation du pourcentage de CO_2 ($> 4\%$) traduisant une forte minéralisation. L'excrétion, entre 48h et 72h atteint $7,83 \text{ g.L}^{-1}$ de DCA soit une productivité maximale de $0,326 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A partir de 72h, un ralentissement de la vitesse de production de DCA est amorcé et celui-ci s'accroît progressivement jusqu'à la fin de la fermentation. Durant cette période, la productivité ($0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) est divisée par un facteur de 4,5 par rapport à la productivité maximale.

◆ *Cinétique de production des acides dicarboxyliques*

Afin de mieux appréhender la formation des DCA, la cinétique de production des différents DCA a été étudiée. L'huile de tournesol oléique, utilisée comme substrat de bioconversion, a la composition suivante :

82% d'acides gras en C18:1 (MC18:1)

9% d'acides gras en C18:2 (MC18:2)

4% d'acides gras en C18:0 (MC18:0)

3% d'acides gras en C16:0 (MC16:0)

2% d'autres composés

La production de diacides DC18 est amorcée immédiatement après l'ajout de substrat de bioconversion (26h), alors qu'elle débute après 15h pour les diacides DC16 (Figure 22).

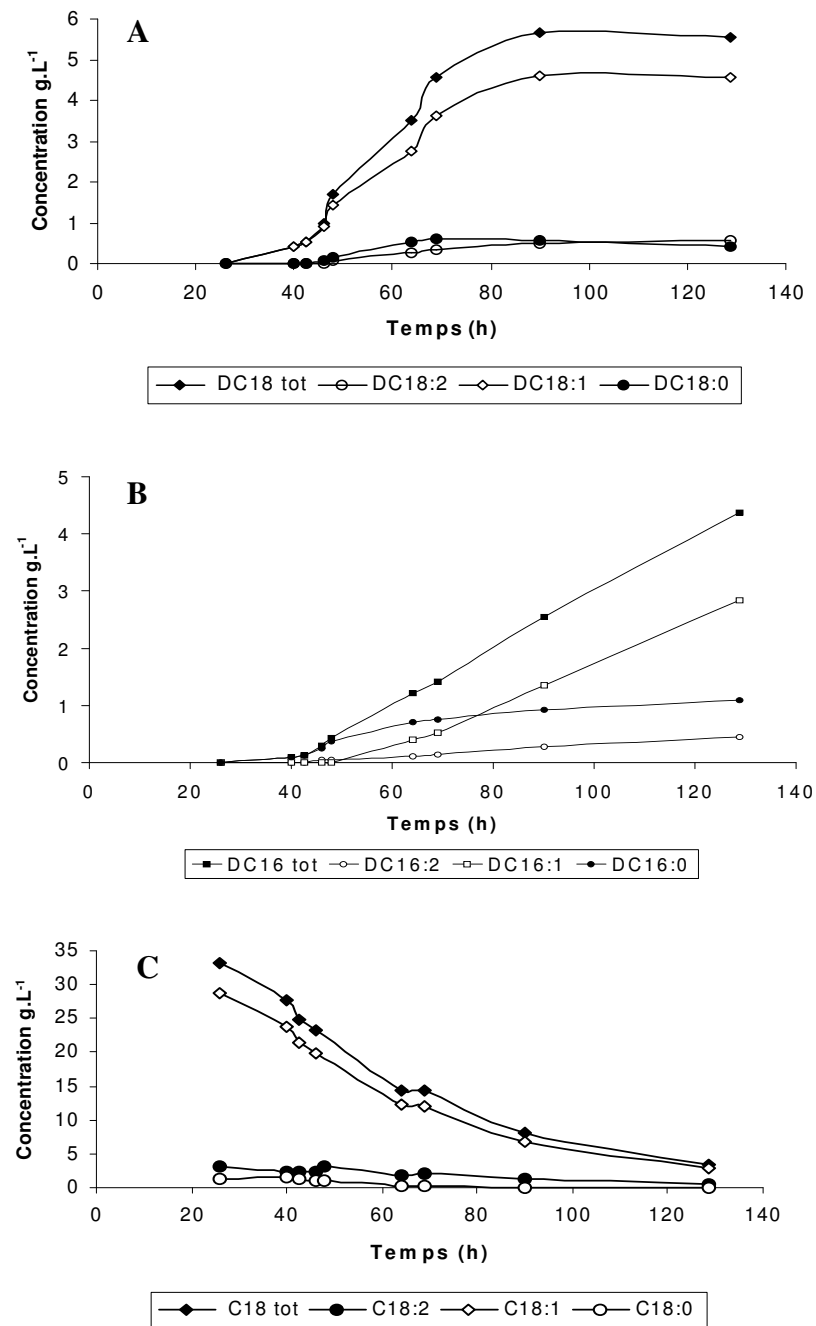


Figure 22. Cinétique de production des diacides et de consommation des monoacides MC18.

Cinétique de production des différents types de diacides DC18 (A) et DC16 (B). Cinétique de consommation des acides gras MC18 présents dans le substrat de bioconversion (C).

Le DC18:1 est le produit majoritaire de la fermentation. La production du DC18:1 représente tout au long de la fermentation au moins 80% des DC18 totaux (Figure 22A) tandis que les DC18:0 et les DC18:2 représente chacun environ 10% de DC18 totaux produits. Cette distribution est globalement constante au cours de la fermentation. Les productivités moyennes et maximales des DC18:0 et DC18:2 sont du même ordre de grandeur (Tableau 6). Cependant, les productivités moyennes et maximales du DC18:1 sont de 5 à 10 fois plus importantes. Ceci est en corrélation avec l'abondance du monoacide MC18:1 dans le milieu.

Contrairement au DC18, la vitesse de production des DC16 est globalement constante et leur abondance relative évolue durant la fermentation. Jusqu'à la 48^{ème} heure, les DC16:0 et DC16:2 varient respectivement entre 85 et 100% pour l'un et entre 14% à 0% pour l'autre, alors qu'il n'y a pas encore de DC16:1. Au delà de cette période, la production des diacides DC16:1 débute et augmente régulièrement jusqu'à représenter la proportion majoritaire (65%) alors que la production de DC16:0 passe de 88% à 25% des diacides DC16 produits. Comme pour les diacides DC18, les productivités moyennes et maximales les plus importantes se retrouvent pour le diacide monoinsaturé DC16:1.

Tableau 5. Productivités des différents diacides DC18 et DC16

DCA	Productivité moyenne (g.L⁻¹.h⁻¹)	Productivité maximale (g.L⁻¹.h⁻¹)
DC18 totaux	0,090	0,150
DC18:0	0,010	0,020
DC18:1	0,070	0,100
DC18:2	0,006	0,009
DC16 totaux	0,044	0,050
DC16:0	0,010	0,006
DC16:1	0,040	0,040
DC16:2	0,005	0,005
DCA totaux	0,097	0,326

◆ *Caractéristiques finales du produit*

D'après le profil chromatographique des échantillons prélevés en début de phase de bioconversion et en fin de fermentation (Figure 23), nous retrouvons de l'huile de tournesol oléique résiduelle, composée à plus de 95% de monoacides en C18 et d'une faible quantité de monoacides en C16 (3%). Nous pouvons nous attendre à ce que la teneur relative des différents DCA produits soit à l'image de la composition de l'huile de tournesol oléique utilisée.

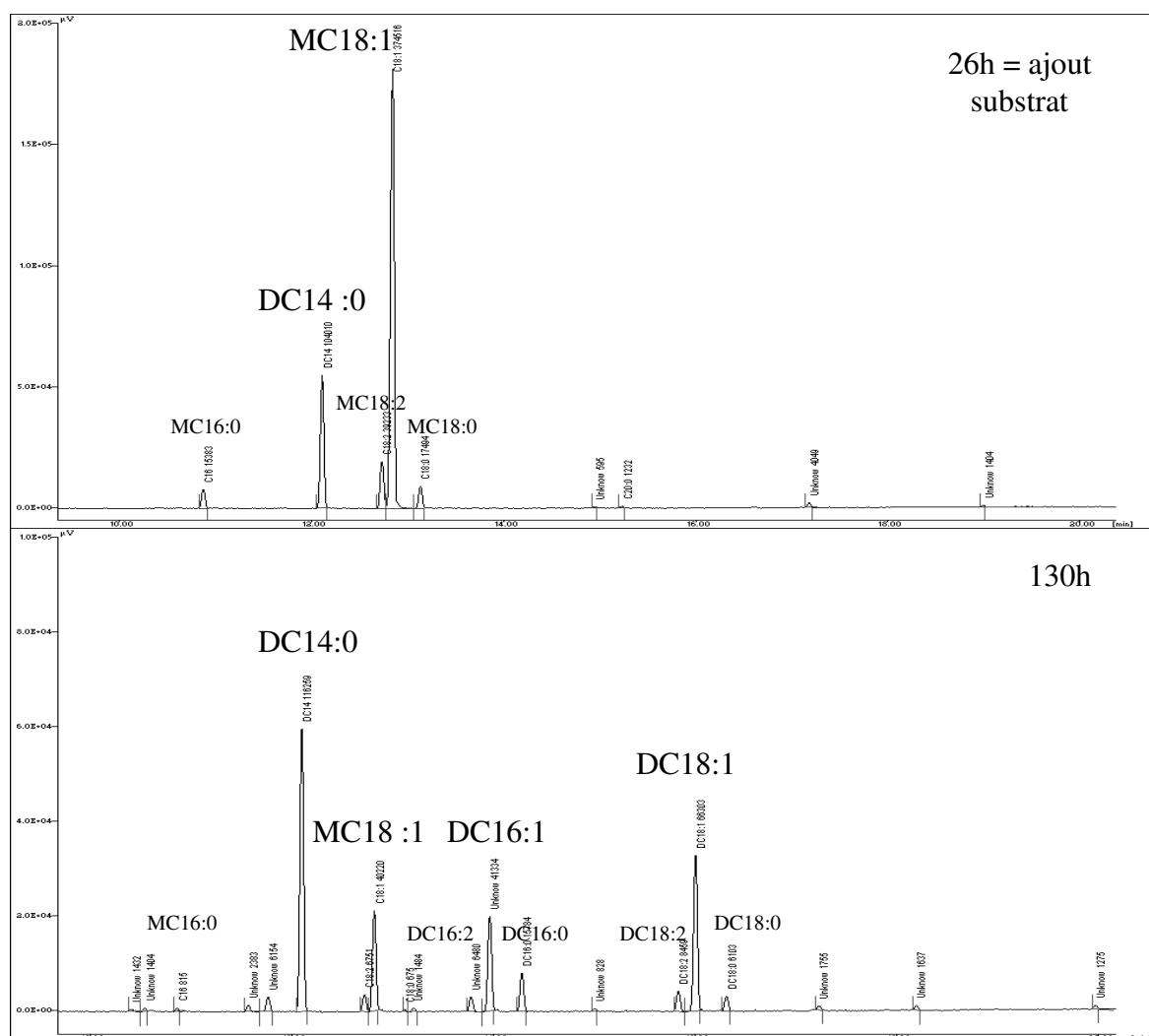


Figure 23. Chromatogrammes des esters d'acides dicarboxyliques produits à partir d'huile de tournesol oléique. Composition des moûts de fermentation après l'ajout du substrat de bioconversion (26h) et en fin de fermentation (130h) en présence du standard interne, le DC14:0. Les acides gras, comme les diacides, sont organisés en triplet, en fonction de la longueur de chaîne carbonée et de leur degré d'insaturation. MC : Monoacides ; DC : diacides.

Or, en fin de fermentation, les DCA produits sont composés d'environ 49% de DC18 et de 37% de DC16 alors que la teneur relative en monoacides en C18 et C16 est respectivement de 95 et 3% (Tableau 6). D'autre part, nous constatons également une production de DC14 représentant 12% des DCA produits alors qu'aucun acide gras de même longueur n'est détecté dans le substrat de bioconversion. Dans une moindre mesure, des DCA en C12 et C10 sont également présents dans le mout de fermentation finale.

Les DCA à monoinsaturés représentent la grande majorité des DCA produits : 81% des DC18 produits sont des DC18:1, 64% des DC16 produits sont des DC16:1 et 83% des DC14 sont des DC14:1.

Tableau 6. Comparaison de la composition théorique (huile de tournesol oléique) et obtenue en DCA.

Types DCA	Composition théorique en DCA (%)	Composition obtenue en DCA (%)	
DC18 :0	4	4	49
DC18 :1	82	40	
DC18 :2	9	5	
DC16 :0	3	10	37
DC16 :1	-	24	
DC16 :2	-	3	
DC14 :0	-	0,5	12
DC14 :1	-	10	
DC14 :2	-	1,5	
« Autres » DCA	2	2	2

◆ *Evolution des différentes formes de DCA*

La question relative à l'origine du profil de DCA biosynthétisés nous a conduit à étudier différents paramètres. Il apparaît clairement en effet, que les DCA produits, dont la longueur de chaîne est inférieure à 18 atomes de carbone, n'ont pas pour origine leur homologue monoacide du substrat de bioconversion (Tableau 6). Ceci est renforcé par le fait que les monoacides en C16 présent dans l'huile de tournesol oléique sont uniquement du type C16:0 alors que 24% des DCA produits sont des DC16:1.

D'autre part, le bilan carbone de la phase de bioconversion confirme que le dioxyde de carbone produit est supérieur à celui issu de l'huile de tournesol oléique et du glycérol. Ce mutant de *Y. lipolytica* doit donc utiliser une autre source énergétique.

La teneur relative des diacides DC18:1 et DC16:0 diminue régulièrement alors qu'apparaissent d'autres composés (Figure 24). L'ensemble de ces éléments, nous a amenés à proposer l'hypothèse suivante. L'origine des DCA dont la longueur de chaîne est inférieure à 18 atomes de carbone serait due à un raccourcissement de chaîne aliphatique des DC18. Une production importante de diacides DC16 est en effet observée, représentant jusqu'à 37% de la production de DCA totale en fin de fermentation, alors que la consommation de monoacides en C16 présents dans l'huile de tournesol oléique ne représente que 1,5%. D'autre part, la teneur relative des DC18:1 diminue régulièrement au cours de la fermentation au profit, majoritairement, des DC16:1.

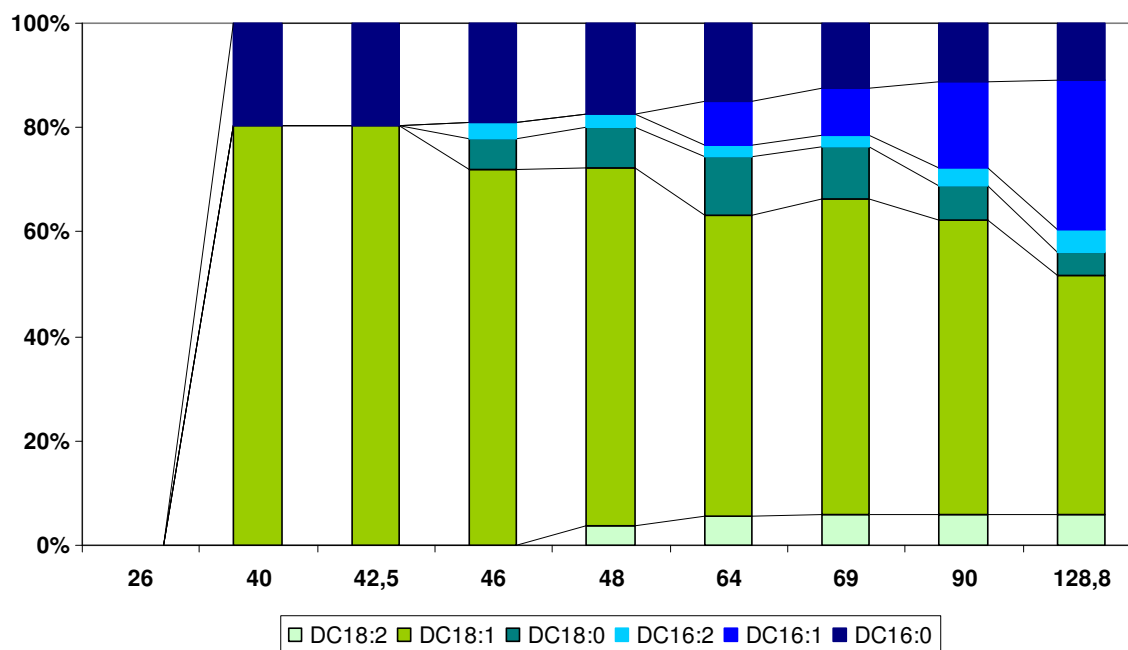


Figure 24. Evolution de la composition et de la teneur relative des DCA produits au cours de la production.

Les DCA produits seraient donc reconstitués en perdant successivement deux atomes de carbone (DC18, DC16, DC14,...) comme dans la voie de la β -oxydation. Cette dégradation des DCA biosynthétisés est synonyme d'un blocage seulement partiel de la voie de la β -oxydation.

La délétion de quatre acyl-CoA oxydases permet de réorienter le flux métabolique des acides gras de la β -oxydation vers l' ω -oxydation entraînant la production de DCA. Nous ne détectons pas, en effet, d'augmentation des intermédiaires issus de la dégradation des acides gras en C18 par la β -oxydation. Cependant, les DCA produits entrent dans le cycle de la β -oxydation pour être dégradés jusqu'à des DCA à 10 atomes de carbone dans notre cas. Mais, il est probable que cette dégradation se poursuive successivement jusqu'à l'obtention d'acétyl-CoA.

Ce raccourcissement n'est pas suffisant pour expliquer la quantité de DCA courts produits. Bien que les concentrations soient faibles, nous constatons, en effet, l'apparition des diacides DC16:2 avant l'apparition des DC18:2 (Figure 24). Les DC16:2 ne proviennent donc pas du raccourcissement des DC18:2. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'action de deux désaturases successivement sur le diacide DC16:0 et entraînant la formation de DC16:2. Une autre explication possible est l'utilisation d'un substrat, différent de l'huile de tournesol oléique, pour produire ces DCA.

Le calcul du coefficient de raccourcissement de chaque type de DCA, représente globalement le rapport du taux du DC16 sur celui du DC18 en prenant compte la consommation des acides gras correspondants, au cours de la fermentation (Figure 25). Il permet d'observer une évolution similaire pour les diacides DC16:2 et DC16:1. Ceci indique que la concentration de ces DC16 suit la concentration des DC18 présentant le même nombre d'insaturation et renforce l'hypothèse du phénomène de raccourcissement des chaînes aliphatiques des DCA produits, du moins pour ces DCA.

Concernant les DC16:0, l'évolution du coefficient de raccourcissement est totalement différente. Nous constatons que la production de ce DCA avant 46h est issue des acides gras en C16:0 (Figure 22 et 25). Cependant, à partir de 46h, la concentration de DC16:0 est constamment supérieure à celle du DC18:0 même en ne prenant pas en compte la production du DC16:0 à partir du monoacide MC16:0. La concentration des DC16:0 présente un facteur variant de 1,2 à 3,2 par rapport à la concentration de DC18:0.

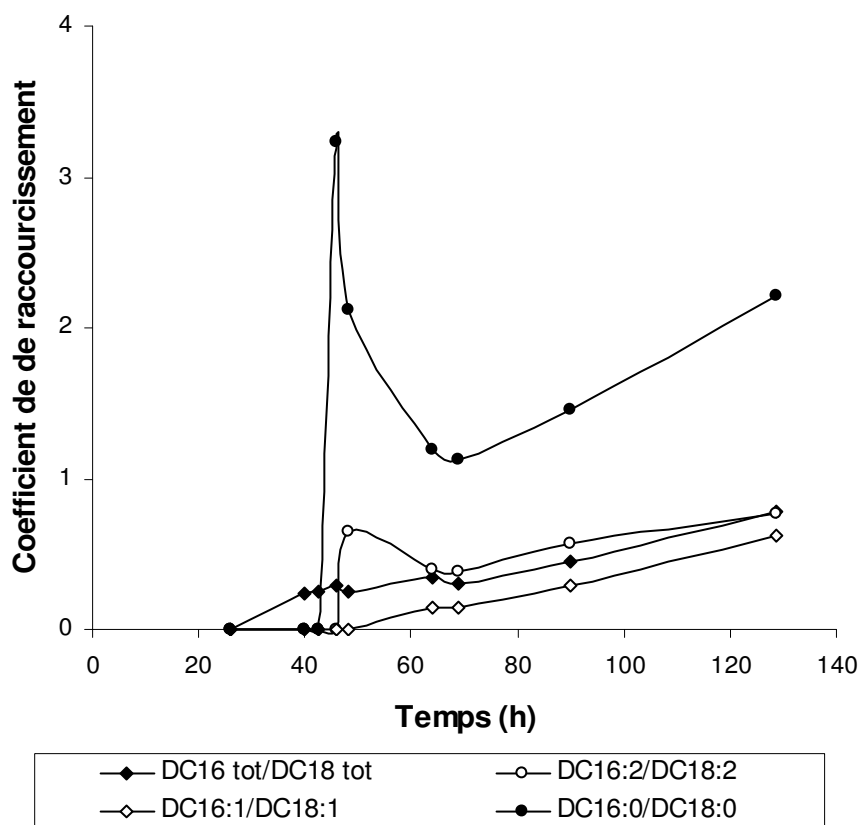


Figure 25. Evolution du coefficient de raccourcissement au cours de la production de DCA.

La production de DCA est réalisée en fermenteur, par la souche MTLY37 en présence du glycérol et à partir de l'huile de tournesol oléique. Le coefficient de raccourcissement correspond au rapport des diacides DC16 sur les diacides DC18 en prenant compte la consommation des substrats correspondants.

Une partie des DC16:0 produits, n'est donc issue ni de la consommation ou de la modification de DCA biosynthétisés, ni de la consommation des acides gras MC16:0.

De plus, les DC16:0 sont présents de manière précoce par rapport aux autres DC16 ou DC14 (Figure 24). Ceci suggère que le substrat dont est issu ce diacide était présent également de manière précoce.

L'ensemble de ces données a conduit à considérer qu'une partie des substrats des diacides produits pourrait provenir de la biosynthèse d'acides gras (Figure 12, paragraphe D.4, Introduction). La grande majorité des acides gras synthétisés *de novo* saturés et insaturés se compose de 16 et 18 atomes de carbone. *Y. lipolytica* possède trois désaturases permettant de synthétiser des acides gras contenant une ou des double(s) liaison(s) aux positions $\Delta 6$, $\Delta 9$ et $\Delta 12$. Lors de la formation d'une double liaison, l'oxygène est réduit en eau par les électrons provenant à la fois de l'acide gras et du NADPH.

D'autre part, la biosynthèse d'acides gras est réprimée par la présence d'acides gras exogènes (Chirala *et al.*, 1992 ; Kamyrío *et al.*, 1976). Nous pouvons donc supposer que la formation d'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse des acides gras est réalisée au cours de la phase de croissance à partir du glucose, préalablement à l'ajout d'huile de tournesol oléique. La glycolyse fournirait les éléments (acétyl-CoA, ATP) essentiels à la synthèse des acides gras.

Dans le cas présent, les acides gras synthétisés *de novo* pourraient alors être intégrés aux lipides complexes de la membrane plasmique, s'accumuler dans les corps lipidiques et/ou être convertis en DCA. Cette hypothèse provient notamment de l'étude de la cinétique de production du DC16:0. La formation d'acide gras en C16:0 pourrait être privilégiée. On peut néanmoins supposer qu'une partie des substrats de l'ensemble des DCA produits proviennent de la synthèse *de novo* des acides gras.

◆ Conclusions

Cet essai de fermentation est caractérisé par l'élimination du phénomène de lyse cellulaire par l'ajout de manière continue et en concentration limitante d'un cosubstrat énergétique. D'autre part, malgré la consommation des DCA produits, la production de DCA représente $9,94 \text{ g.L}^{-1}$ en fin de fermentation soit une productivité maximale de $0,326 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ce qui représente un gain d'un facteur deux par rapport aux essais précédents.

Néanmoins, le rendement de cet essai est relativement faible 35% (Tableau 7). Ceci pourrait s'expliquer par le ralentissement de la vitesse de production de DC18 :1 à partir d'environ 70h de fermentation. Ce ralentissement est en accord avec la dégradation des DC18 en DC16.

Tableau 7. Bilan de la fermentation par la souche MTLY37 en présence d'un cosubstrat.

Variables mesurées	Produit final
	Temps de culture 129h
Recouvrement en Carbone (%)	144
Rendement (%)	35
Taux de conversion (%)	31
Productivité moyenne (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,097
Productivité maximale (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,326
Production finale (g.L ⁻¹)	9,94

La dégradation des DCA à longue chaîne carbonée implique la voie de la β -oxydation. Par conséquent, la β -oxydation n'est pas totalement bloquée dans la souche délétée de quatre acyl-CoA oxydases malgré une incapacité à se développer sur acides gras.

Hormis les acyl-CoA oxydases délétées dans la souche MTLY37, l'acyl-CoA oxydase 1 codée par le gène *POX1* et dont aucune activité spécifique n'a été détectée, est présente (Luo *et al.*, 2002). De plus, le séquençage complet du génome de *Y. lipolytica* (Dujon *et al.*, 2004) a permis d'identifier une sixième acyl-CoA oxydase codée par le gène *POX6* (Fickers *et al.*, 2005).

Ainsi, on peut émettre les deux hypothèses suivantes concernant le blocage partiel de la β -oxydation : (i) Les acyl-CoA oxydases 1 et/ou 6 dégraderaient les acides gras avant la bioconversion en DCA de même longueur (ii) Les gènes *POX1* et/ou *POX6* seraient spécifiques des DCA. La dégradation des DCA chez *Y. lipolytica* pourrait faire intervenir l'acyl-CoA oxydase 1 et/ou 6 présentes dans la souche MTLY37. Les gènes *POX1* et/ou *POX6* pourraient être induits par les DCA et respectivement spécifiques de la longueur de chaîne du substrat.

Il a été montré chez l'homme et *S. cerevisiae*, que la dégradation des DCA à longue chaîne implique la β -oxydation peroxysomale. Chez l'homme, l'oxydation des DCA résulte de l'action séquentielle d'une acyl-CoA oxydase, de deux protéines bifonctionnelles, et d'une protéine inconnue ayant un rôle dans le transport du stérol agissant avec une 3-cétothiolase (Ferdinandusse *et al.*, 2004).

Enfin, cette fermentation a permis d'émettre une seconde hypothèse selon laquelle une partie des substrats des DCA produits proviendrait de la synthèse des acides gras. Cette biosynthèse aurait lieu principalement pendant la phase de croissance en parallèle de la glycolyse.

A.3. Construction et analyse de mutants de la voie de la β -oxydation

Afin d'améliorer le rendement de production et la pureté des DCA produits, l'étude des gènes *POX1* et *POX6* codant pour des acyl-CoA oxydases 1 et 6 a été réalisée.

A.3.1. Analyse génomique des gènes *POX*

D'après l'arbre phylogénétique établi (Figure 26), nous constatons que les séquences protéiques des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica* sont regroupées et distantes de celle de *C. tropicalis*. Elles présentent ensemble, en effet, au moins 54% d'identité (Tableau 8) et au maximum 42% d'identité avec les séquences de *C. tropicalis*.

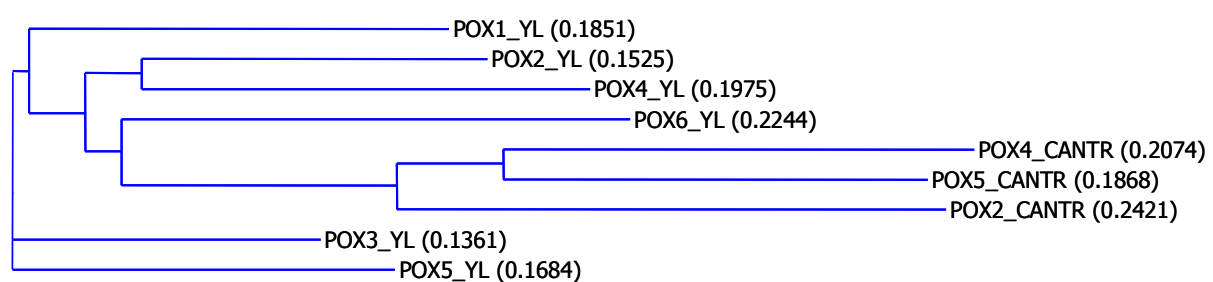


Figure 26. Analyse phylogénique des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica* et de *C. tropicalis*. Arbre basé sur les séquences d'acides aminés déduites codant les acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica* selon la méthode neighbor joining en utilisant la matrice blosum 62 (Programme CLUSTALW).

Les acyl-CoA oxydases 2 et 3 de *Y. lipolytica*, spécifiques des acyl-CoA à longue et à courte chaîne carbonée respectivement (Wang *et al.*, 1999 ; Luo *et al.*, 2000 ; Luo *et al.*, 2002), semblent avoir divergées depuis longtemps. Les séquences des acyl-CoA oxydases 1 et 6 présentent un taux d'identité relativement faible comparé aux autres acyl-CoA oxydases.

Tableau 8. Pourcentages d'identité et de similarité basées sur les séquences d'acides aminés déduites des *POX* de *Y. lipolytica*, respectivement.

	POX1	POX2	POX4	POX6	POX3	POX5
POX1		63/78	54/72	54/73	67/82	64/77
POX2			64/77	57/75	67/80	61/76
POX4				53/70	60/74	56/72
POX6					59/74	57/72
POX3						70/82
POX5						

Comme le montre l'alignement multiple des séquences des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica* et celles de *C. tropicalis* (Figure 26), ces séquences sont très conservées. Ceci peut s'expliquer par le rôle fondamental de ces protéines dans le métabolisme de ces levures hydrocarbonoclastes. Il est donc difficile de prévoir, par ces analyses, une quelconque fonction ou spécificité.

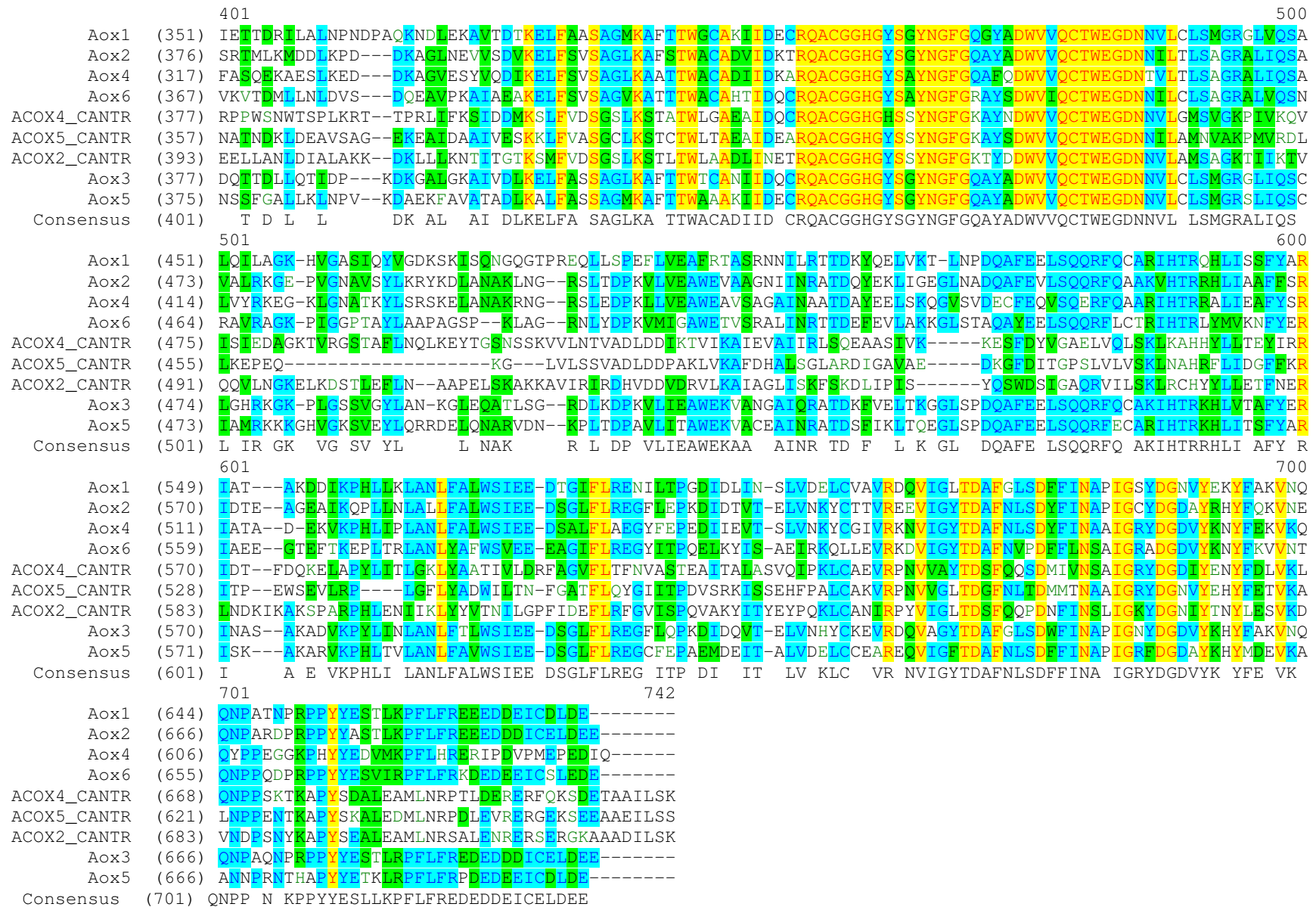


Figure 27. Alignement multiple réalisé avec le programme CLUSTALW des séquences d'acides aminés déduites des gènes POX de *Y. lipolytica* et *C. tropicalis*. Les acides aminés sont surlignés : en jaune lorsqu'ils sont identiques, en bleu (hautement) et en vert lorsqu'ils sont similaires.

A.3.2. Construction d'une souche génétiquement manipulable

Afin de pouvoir manipuler génétiquement la souche prototrophe MTLY37 ($\Delta pox2$, $\Delta pox3$, $\Delta pox4$ et $\Delta pox5$), nous avons construit à partir de cette dernière, une souche auxotrophe pour la leucine et l'uracile, JMY1285 (Leu⁻, Ura⁻) (Le Dall).

Dans un premier temps, la souche prototrophe MTLY37 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -PUT) a été rendu auxotrophe pour l'uracile par introduction de l'allèle *ura3-41* par transformation. La sélection des transformants Ura⁻ est réalisée sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) suivant la méthode décrite par Barth et Gaillardin (1996). Ainsi, nous avons obtenu une souche ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T) correspondant à la souche MTLY37 rendue auxotrophe pour l'uracile.

Dans un second temps, cette souche a été rendue auxotrophe pour la leucine. Pour construire celle-ci, nous avons choisi d'utiliser le système combinant la méthode SEP et le système de recombinaison Cre *lox* (Fickers *et al.*, 2004, Figure 18, Matériel et Méthodes) afin de disrupter le gène *LEU2*. Cette stratégie de délétion, en deux étapes, repose sur l'utilisation d'une cassette de disruption du gène d'intérêt et d'un plasmide répliatif contenant le gène codant la recombinase Cre. Cette cassette de disruption, composée des régions en amont et en aval du gène, permet une intégration dans le génome par double recombinaison homologue. Contrairement à la levure *S. cerevisiae* chez qui, une zone d'homologie de quelques dizaines de paires de bases (30 à 50 pb) suffit, la levure *Y. lipolytica* a besoin, pour une recombinaison efficace, d'une zone d'homologie d'au moins 200 à 400 pb.

Pour construire la cassette de délétion, nous avons choisi deux couples d'oligonucléotides permettant d'amplifier par PCR respectivement, une région en amont de l'ATG, appelée P pour promoteur, et une région en aval du STOP, appelée T pour terminateur, du gène *LEU2*, d'environ 1000 paires de bases chacune et présentant une queue flottante composée d'un site de restriction rare, *I-SceI*. Après fusion par PCR de ces deux fragments, ce fragment est cloné puis digéré par l'enzyme *I-SceI*. A ce site, le marqueur de résistance à l'hygromycine (*hph*), présentant de part et d'autre, les séquences *lox* (*LoxP* et *LoxR*), reconnues spécifiquement par la recombinase Cre, est inséré.

La cassette d'expression ainsi constituée est amplifiée par PCR et utilisée pour la disruption du gène *LEU2* par transformation de la souche précédente. La sélection des transformants est réalisée sur un milieu contenant de l'hygromycine.

Nous avons ainsi obtenu une souche ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, *leu2::hph*) qui présente le gène *LEU2* disrupté. La vérification de la délétion du gène *LEU2* est réalisée par Southern-blot où le marqueur *hph* est utilisé comme sonde.

La dernière étape consiste en l'excision du marqueur de résistance à l'hygromycine par recombinaison aux sites *lox* effectuée la protéine Cre. La souche est transformée par le vecteur répliatif pRRQ2 qui présente le gène codant la recombinase Cre et le marqueur d'auxotrophie *LEU2*. Les transformants sont sélectionnés sur un milieu YNB Ura, se développent sur YPD pour permettre l'expression de la recombinase Cre puis la perte du vecteur répliatif. Cette perte est vérifiée par des répliques sur milieu en présence d'uracile et de leucine ou d'hygromycine. Nous avons obtenu la souche JMY1285 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$) qui présente les auxotrophies pour l'uracile et la leucine.

A.3.3. Construction de mutants de la voie de la β -oxydation

Pour construire les deux mutants délétés respectivement, des gènes *POX1* à *POX5* et *POX2* à *POX6* codant des acyl-CoA oxydases, nous avons choisi la stratégie SEP (Maftahi *et al.*, 1996) utilisée précédemment. La disruption des gènes *POX1* et *POX6* est réalisée par double recombinaison homologue après délétion d'une partie centrale du gène et insertion du gène *hph*, conférant la résistance à l'hygromycine et présentant de part et d'autre, les séquences *lox*.

Des cassettes de délétion appelées PHT (Promoteur-*hph*-Terminateur) correspondant aux gènes *POX1* et *POX6*, ont été construites par PCR par la méthode SEP et utilisées pour transformer indépendamment la souche JMY1285 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$). Les transformants sont sélectionnés sur la base de leur phénotype de résistance à l'hygromycine et vérifiés par Southern-blot. La disruption du gène *POX1* de la souche JMY1285 a permis l'obtention de la souche JMY1286 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$, $\Delta pox1$ -PHT) (Le Dall). Et la disruption du gène *POX6* de la souche JMY1285 permet, quant à elle, l'obtention de la souche JMY1287 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$, $\Delta pox6$ -PHT) (Le Dall).

A.3.4. Essais de production d'acides dicarboxyliques

Afin de déterminer si les acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX1* et *POX6* sont impliquées dans la dégradation des DCA produits, des tests en fioles de bioconversion d'huile de tournesol oléique ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant les souches JMY1286 ($\Delta pox1$ à 5), JMY1287 ($\Delta pox2$ à 6) et MTLY37 ($\Delta pox2$ à 5) comme contrôle. Les DCA produits au cours des 90h de cet essai sont analysés par CPG.

La courbe de production des DCA est identique quelle que soit la souche utilisée (Résultats non présentés). On observe cependant, des proportions relatives de DC16 et de DC14 sensiblement moins importantes. Bien qu'un ralentissement de la consommation des DCA produits soit observé au cours de cet essai, celle-ci subsiste et ce, malgré la délétion du gène *POX1* ou *POX6*. La disruption individuelle des gènes *POX1* et *POX6* ne semble avoir qu'un effet minime sur la consommation des DCA produits.

Ces deux gènes codent des acyl-CoA oxydases qui semblent dégrader des DCA produits. Nous avons donc entrepris la construction d'une souche délétée pour ces deux gènes.

A.3.5. Construction d'un mutant Δpox

Le système combinant la méthode SEP et le système de recombinaison Cre lox (Fickers *et al.*, 2004) a été utilisé une nouvelle fois afin d'obtenir une souche dont l'ensemble des gènes codant des acyl-CoA oxydases est délétée.

Dans un premier temps, la souche JMY1286 a été transformée par le vecteur répliatif pRRQ2 afin que le gène *hph*, lui conférant la résistance à l'hygromycine, soit excisé. Après vérification de l'excision du marqueur et de la perte du vecteur répliatif, la souche a été transformée avec la cassette de disruption $\Delta pox6$ -PHT afin d'obtenir une souche ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$, $\Delta pox1$ -PT, $\Delta pox6$ -PHT).

Enfin, la sensibilité à l'hygromycine de cette souche a été restaurée, de la même manière que précédemment, et les souches obtenues sont les suivantes : JMY1233 et JMY1234 ($\Delta pox5$ -PT, $\Delta pox2$ -PT, $\Delta pox3$ -PT, $\Delta pox4$ -Pura3-41T, $\Delta leu2$, $\Delta pox1$ -PT, $\Delta pox6$ -PT).

A.3.6. Tests de production d'acides dicarboxyliques

Afin de déterminer si la double délétion des gènes *POX1* et *POX6* abolit la consommation des DCA produits, nous avons effectué des essais de bioconversion en fioles, dans des conditions identiques aux précédents essais, avec les souches délétées pour l'ensemble des gènes *POX*. La souche MTLY37 ($\Delta pox2-5$) est utilisée comme contrôle.

Les cinétiques de production des DCA des différentes souches utilisées, ne présentent pas de différences nettes pendant la première moitié de l'essai. On note toutefois, en fin de fermentation, un ralentissement de la courbe de production beaucoup moins marqué pour les souches dont les gènes *POX1* et *POX6* sont délétés. La production de DCA par ces souches augmente de 10 % par conséquent.

La composition en DCA produits par les souches Δpox subit également des variations par rapport à la souche $\Delta pox2-5$. Le moût de fermentation est enrichi en DC18:1 passant de 40% pour la souche $\Delta pox2-5$ à 67 % pour les souches Δpox , JMY1233 et JMY1234 (Tableau 9). D'autre part, la proportion de DC16:1 et de DC14:1 diminue respectivement de 3 et 7 % par rapport à la souche $\Delta pox2-5$ (Tableau 9). Ceci traduit l'élimination ou du moins une forte diminution du phénomène de dégradation des DCA produits par la voie de la β -oxydation.

Tableau 9. Comparaison des compositions théoriques et obtenues en acides dicarboxyliques.

Types de DCA	Composition théorique (%)	Composition réelle souche $\Delta pox2$ à 5 (%)	Composition réelle souches Δpox (1 à 6) (%)
DC18 :0	4	4	4
DC18 :1	82	40	67
DC18 :2	9	5	6
DC16 :0	3	10	7
DC16 :1	-	24	9
DC16 :2	-	3	2
DC14 :0	-	0,5	1
DC14 :1	-	10	3
DC14 :2	-	1,5	1
« Autres » DCA	2	2	-

De plus, on observe, comme précédemment, une forte proportion de DC16:0 par rapport à la proportion de DC18:0 produits. Ce phénomène semble indiquer qu'une partie des substrats des DCA produits pourrait provenir de la biosynthèse *de novo* d'acides gras.

Cet essai de production démontre que les acyl-CoA oxydases 1 et 6 sont, toutes deux, impliquées dans la dégradation des DCA produits. La délétion de l'ensemble des gènes *POX* permet, en effet, d'éliminer potentiellement ce phénomène. Cependant, la composition de DCA finale ne reflète cependant pas la composition de l'huile de tournesol oléique. Il est donc nécessaire de démontrer expérimentalement l'élimination de ce phénomène. L'expérience suivante a donc pour objectif d'une part, de démontrer l'absence de consommation des DCA produits et d'autre part qu'une partie des DCA produits a pour origine, des acides gras issus de la biosynthèse *de novo*.

A.4. Origine des acides dicarboxyliques

Des essais de production de DCA ont été réalisés sur différents substrats, en utilisant la souche JMY1233 (Δpox). Afin de différencier les DCA issus du substrat de bioconversion, des DCA issus d'acides gras synthétisés *de novo*, différents substrats de bioconversion ont été utilisés: l'alcane en C13, l'alcane en C15 et l'acide gras en C17:0 (noté MC17:0). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils soient impairs.

Si la voie de dégradation des DCA produits est toujours active dans cette souche, nous devrions observer en fin de production, dans le cas du substrat C13 par exemple, une majorité de DC13 et l'apparition séquentielle, en proportion moindre, de DC11, DC9,...etc.

Si la biosynthèse *de novo* d'acides gras a lieu au cours de ce procédé, nous devrions observer en fin de production, des diacides en DC18, DC16, DC14, ...etc.

Chaque substrat de bioconversion est testé en fiole et en absence de glycérol. Les conditions de production ne changent pas. Après 24h, le substrat de bioconversion (30 g.L⁻¹) est ajouté et le pH est réglé à 8. Les DCA produits au cours des 90h de cet essai sont analysés par CPG. Nous présentons ici, comme exemple, uniquement les résultats du test de production où l'alcane en C13 est utilisé comme substrat. Ces résultats sont représentatifs des essais réalisés avec les substrats C15 ou MC17:0.

Les cinétiques de consommation de l'alcane C13 et d'apparition de l'acide gras (MC13) et du diacide (DC13) correspondant présentent plusieurs phases (Figures 28 et 29). Dans un premier temps (0 à 25h), la vitesse de consommation du C13 est identique à la vitesse d'apparition du MC13 ($310 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indiquant une oxydation monoterminale efficace. Cependant, l' ω -oxydation du MC13 apparaît limitante car la vitesse de production du DC13 est quatre fois plus faible ($76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)(Figure 30).

Dans un deuxième temps (25 à 100h), la vitesse de consommation de l'alcane C13 ralentie ($170 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et la vitesse d'apparition de l'acide gras MC13 diminue ($20 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Le flux de disparition du MC13 semble constant ($150 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et toujours supérieur à la vitesse d'apparition du diacide DC13. Il apparaît donc que l'oxydation monoterminale n'est pas la voie métabolique limitante à la différence de la voie de l' ω -oxydation.

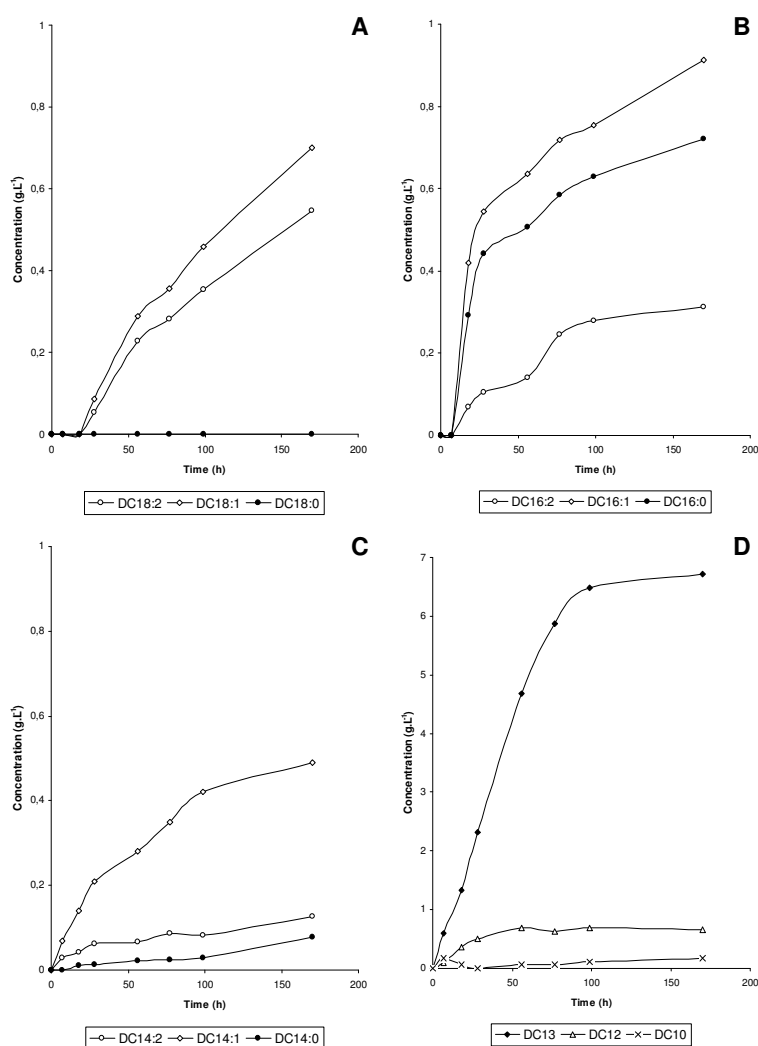


Figure 28. Cinétique de production des acides dicarboxyliques sur alcane C13 comme substrat de bioconversion. Le temps 0 correspond à l'ajout de l'alcane C13. Cinétique de production des DC18 (A), DC16 (B), DC14 (C) et DC13, DC12 et DC10 (D).

D'autre part, nous constatons, au cours de cette culture, l'absence de DCA et d'acides gras impairs, de longueur de chaîne carbonée inférieure à 13. Le phénomène de dégradation des DCA produits n'a donc pas lieu lorsqu'une souche présentant une délétion supplémentaire des gènes *POX1* et *POX6* (en plus des gènes *POX2* à *POX5*) est utilisée dans le procédé de production de DCA. La voie de la β -oxydation est donc complètement bloquée. Les acyl-CoA oxydases 1 et 6 seraient donc, toutes deux, impliquées dans la dégradation des DCA.

Cependant, nous observons également une production de diacides en DC18, DC16, DC14, DC12 et DC10 (Figure 28). La présence de ces diacides est corrélée avec la présence des acides gras correspondants (Figure 29). De plus, ces acides gras sont déjà présents au temps 0 qui correspond à l'ajout de l'alcane C13. Les acides gras et des DCA paires proviendraient donc de la synthèse *de novo* d'acides gras.

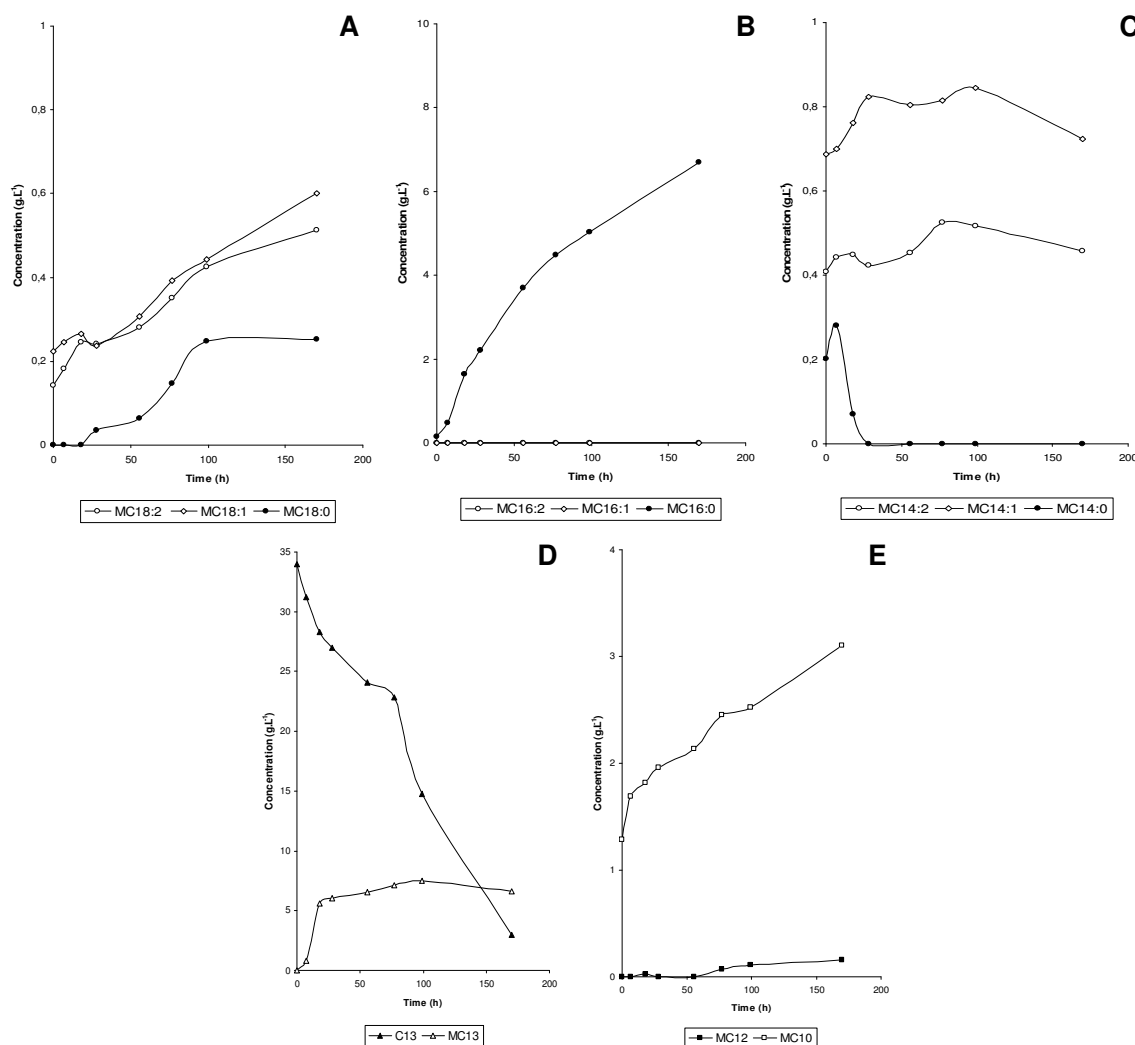


Figure 29. Cinétique de consommation du substrat de bioconversion C13 et d'apparition des acides gras. Le temps 0 correspond à l'ajout de l'alcane C13. Evolution de la concentration des acides gras MC18 (A), MC16 (B), MC14 (C) MC12 et MC10 (E) et de l'alcane C13 ainsi que de l'acide gras correspondant MC13 (D).

Les vitesses d'accumulation des acides gras et des DCA pairs sont dépendantes de la longueur de chaîne mais également du degré d'insaturation. Nous observons aussi des différences en fonction du temps de fermentation. Nous observons une accumulation régulière des acides gras au environ de $2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, excepté pour les MC14:0 qui ne sont présent que transitoirement. Les acides gras MC16:0 s'accumulent avec une vitesse plus importante ($40 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et seule une faible partie est convertie en diacide (Figure 30). Ceci pourrait être dû à une limitation de leur élongation et/ou leur conversion en DC16:0, leur accumulation dans les corps lipidiques ou leur intégration aux lipides complexes membranaires.

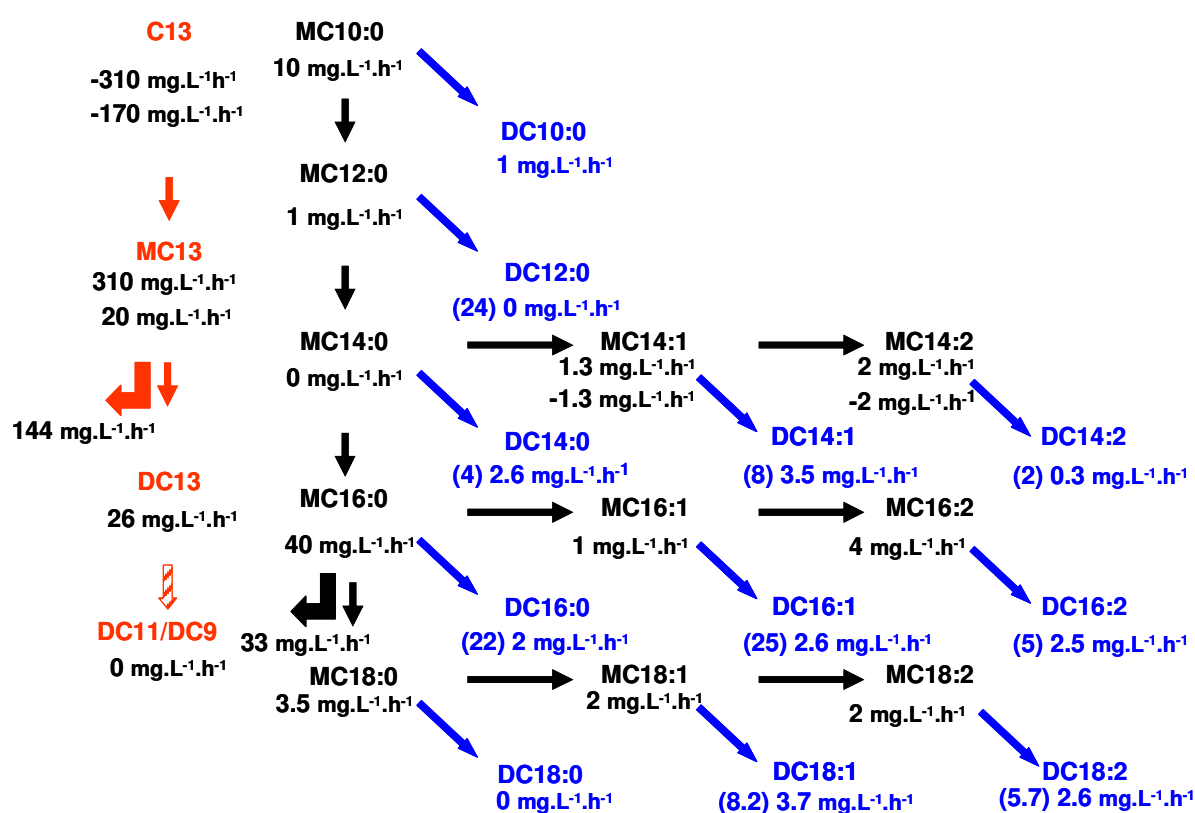


Figure 30. Schéma représentant les flux métaboliques observés au cours de la culture sur alcane C13. Les flux métaboliques représentent le substrat C13 (en rouge), la synthèse *de novo* d'acides gras et la désaturation (en noir) et la bioconversion en DCA (bleu). Le chiffre entre parenthèses correspond à la vitesse durant la première phase (0 à 25h) de culture. Les acides gras sont notés MC et les diacides DC. Le premier correspond au nombre d'atome de carbone et le second au nombre d'insaturation.

Concernant les DCA, nous observons deux phases. Une phase d'accumulation rapide est présente pendant les 25 premières heures de culture et présente un décalage d'apparition en fonction de la longueur de chaîne carbonée. Un décalage de 5h et 10h s'observe pour les DC16 et les DC18 respectivement, pouvant correspondre à une élongation.

Au cours de cette première phase, les vitesses d'accumulation de DCA reflètent la vitesse d'accumulation des acides gras correspondant. Nous observons principalement des MC16:0 ($40 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) qui sont transformés principalement en DC16:0 ($18 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et en DC16:1 ($20 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). La production de DC16:1 pourrait s'expliquer soit par la désaturation du DC16:0 soit par une rapide désaturation du MC16:1 suivie d'une ω -hydroxylation du MC16:1. Cependant, les productions de MC18 entraînant une faible production de DC18 correspondant. On note l'absence de DC18:0 indiquant une rapide désaturation du MC18:0 ou une absence d' ω -oxydation du MC18:0. Après 25h, nous observons une diminution des vitesses d'accumulation des DC14, DC16 et DC18.

Ces résultats nous permettent tout d'abord de répondre à nos deux questions :

La disruption complète des gènes codant les acyl-CoA oxydases abolit le phénomène de consommation des DCA. Les enzymes codées par les gènes *POX1* et *POX6* sont spécifiques des DCA.

Une partie des DCA produits provient d'acides gras issus de la synthèse *de novo* d'acides gras, réalisée au cours de la phase de croissance à partir des produits de la dégradation du glucose.

De plus, ces résultats nous indiquent que la voie de l' ω -oxydation serait limitante dans la bioconversion d'alcanes. Il semblerait également que la synthèse *de novo* et la désaturation des acides gras subissent des régulations. Enfin, ils montrent qu'une partie des acides gras n'est pas convertie en DCA. Celle-ci pourrait être intégrée aux lipides complexes de la membrane plasmique ou stockée au sein de la cellule.

A.5. Blocage de la voie de la β -oxydation : Bilan

L'ensemble de ces expériences démontre que la délétion des gènes *POX2*, *3*, *4* et *5* permet de rediriger le flux d'acides gras de la β -oxydation vers l' ω -oxydation et donc de produire des DCA (Figure 31). La production de DCA passe par un procédé alliant un milieu riche et l'apport d'un co-substrat énergétique. Cependant, en fin de phase de bioconversion, nous assistons à une baisse de la concentration de DCA produits. Nous avons démontré que cette diminution était due à une consommation des DCA bioconvertis *via* la voie de la β -oxydation.

Les gènes *POX1* et *POX6* sont tous deux responsables de ce phénomène puisque leur délétion supplémentaire conduit à un arrêt de la consommation des DCA produits (Figure 31). Les acyl-CoA oxydases 1 et 6 semblent être spécifiques des DCA.

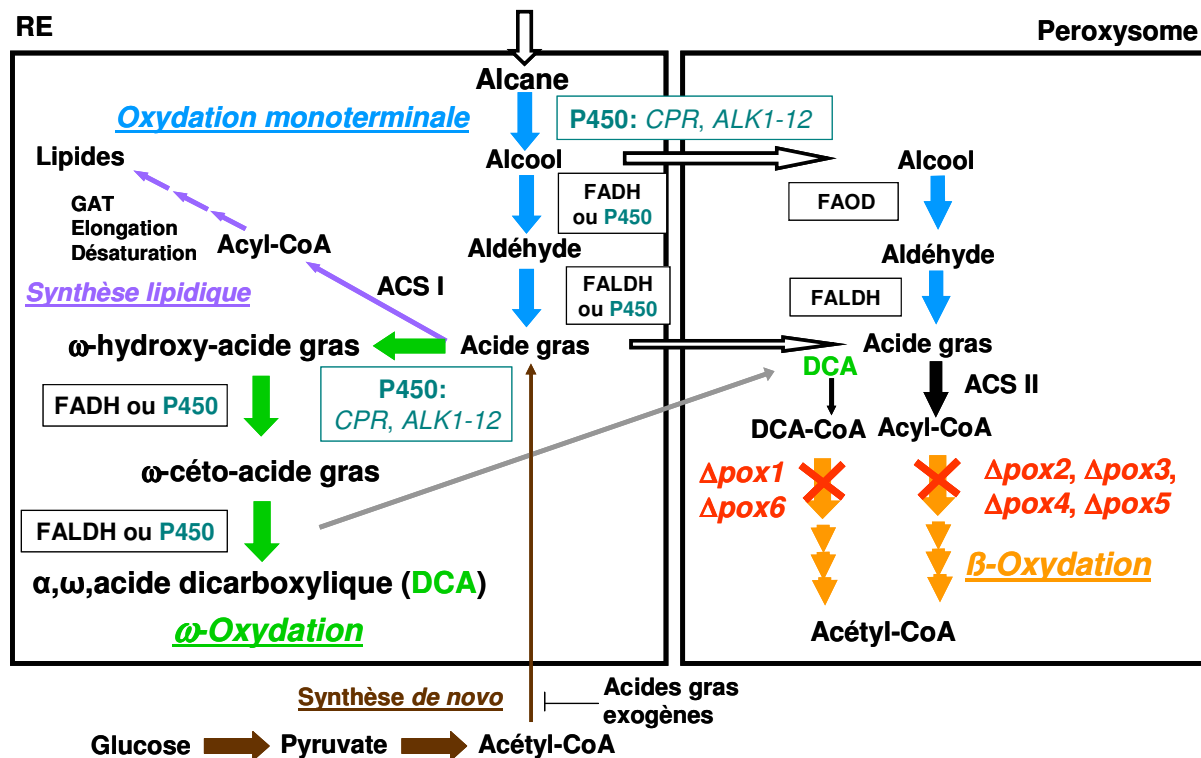


Figure 31. Voies métaboliques impliquées dans la production d'acides dicarboxyliques à partir de substrats hydrophobes par la souche modifiée Δpox de *Yarrowia lipolytica*. L'oxydation monotermiale intervient lorsque l'on utilise des alcanes comme substrat de bioconversion. Cette voie est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) et/ou le peroxyssome (flèches bleues) et convertit les alcanes en acides gras correspondant. A partir d'acides gras ou d'alcanols, la voie de l' ω -oxydation conduit à la formation des acides dicarboxyliques (flèches vertes). En parallèle, une partie des acides gras dérivant des alcanes, de 14 à 18 atomes de carbone, sert aussi à la **synthèse de lipides** (flèches violettes). Elle fait intervenir l'acyl-CoA synthétase I (ACS I dans le RE), la désaturation et l'élongation des acides gras et la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GAT, gènes *GAT*). Une partie des acides gras provient également de la **synthèse de novo d'acides gras** (flèches marrons) nécessitant les produits issus de la glycolyse (phase de croissance). Celle-ci serait réprimée pendant en présence d'acides gras exogènes (phase de bioconversion)(Chirala *et al.*, 1992).

Enfin, la différence de composition des DCA produits par rapport à celle du substrat de bioconversion a révélé la participation d'une autre voie métabolique : la synthèse *de novo* des acides gras (Figure 31). Nous avons pu démontrer que pendant la phase croissance, des acides gras étaient synthétisés à partir du glucose puis transformés en DCA correspondant pendant la phase de bioconversion.

B. Surexpression de la voie de l' ω -oxydation

Le système cytochrome P450 monooxygénase est un élément clé du métabolisme des substrats hydrophobes. En effet, il est responsable de l'étape limitante d'hydroxylation terminale. Dans la voie de l'oxydation monoterninale, l'hydroxylation des alcanes conduit à l'alcool tandis que, dans l' ω -oxydation, l'hydroxylation des acides gras conduit à l' ω -hydroxy acide gras (Figure 31). Ce système d'hydroxylation implique des cytochromes P450 (codés par les gènes *ALK* appartenant à la famille CYP52) liés étroitement à une NADPH cytochrome P450 réductase (gène *CPR*) responsable du transport d'électrons dans cette réaction (Figure 10, Introduction). La séquence du génome de la souche E150 de *Y. lipolytica* révèle douze gènes *ALK* codant pour les douze cytochromes P450 et un gène *CPR* codant une NADPH cytochrome P450 réductase.

B.1. Analyse phylogénétique des cytochromes P450

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences d'acides aminés déduites des gènes *ALK* de *Y. lipolytica* et de celles des gènes *ALK* de *C. tropicalis* révèle une distance phylogénétique entre les gènes de *Y. lipolytica* plus importante qu'entre les gènes de *C. tropicalis* (Figure 32).

De nombreux gènes *ALK* de *C. maltosa* et *C. tropicalis* sont organisés en tandem. Ceci suggère que les familles multigéniques *ALK* pourraient avoir pour origine la duplication de gènes ancestraux. L'existence de nombreux événements de duplication de gènes, suivis d'une évolution différentielle d'une des deux copies est le mécanisme principal permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique et une spécialisation (Dujon *et al.*, 2004; De Hertogh *et al.*, 2006). Chez *Y. lipolytica* les gènes *ALK4* et *ALK5* sont arrangés en tandem, distants de 1,95 Kb et pourraient être issus d'un événement de duplication de gène. La séquence *ALK5* présente un pourcentage d'identité beaucoup plus fort avec celle de *ALK7* (78%) qu'avec celle de *ALK4* (55%). On peut donc supposer que cet événement de duplication putatif est antérieur à ceux qui auraient conduits aux gènes *ALK7*, *ALK3*, *ALK12*, *ALK6* et *ALK4* et qu'il y a eu une spécialisation fonctionnelle.

Cette hypothèse de spécialisation fonctionnelle au sein de cette famille multigénique est renforcée par des études menées chez *Y. lipolytica*, *C. tropicalis* et *C. maltosa* qui démontrent que certains cytochromes P450 diffèrent de par leur spécificité de substrat et de la structure chimique de leurs inducteurs (Iida *et al.*, 2000; Scheller *et al.*, 1998; Craft *et al.*, 2003).

Ainsi, chez *Y. lipolytica*, la synthèse des cytochrome P450 est induite par les alcanes et les acides gras (Mauersberger et Matiashova, 1980). En particulier, le gène *ALK1* présente un fort niveau d'expression en présence de tétradécane, tandis que *ALK5* et *ALK6* sont plus faiblement induits (Mauersberger et Matiashova, 1980). La délétion du gène *ALK1* rend *Y. lipolytica* incapable de se développer en présence de décane. Le mutant $\Delta alk1 \Delta alk2$ présente une incapacité supplémentaire à croître sur hexadécane. Les cytochromes P450 codés par les gènes *ALK1* et *ALK2* semblent avoir des rôles prédominants dans l'assimilation des alcanes chez *Y. lipolytica* (Iida *et al.*, 2000) et seraient spécifiques respectivement, des alcanes à courte (C10) et longue chaîne carbonée (C16) (Iida *et al.*, 1998). Or d'après l'arbre phylogénétique, ces gènes apparaissent relativement distants de la majorité des autres gènes *ALK*. On note toutefois, la présence de deux gènes relativement proches de *ALK1* et de *ALK2* respectivement, *ALK9* et *ALK10*. Le gène *ALK10* présente 50% d'identité avec le gène *CYP52A3* de *C. maltosa*. Scheller *et al.* ont démontré que ce gène serait spécifique des alcanes à chaîne longue (Scheller *et al.*, 1996). Sachant que le gène *ALK10* est relativement proche de deux gènes issus d'espèces différentes et dont les produits sont tous deux spécifiques des alcanes à longue chaîne (Y1 *ALK2* et Cm *CYP52A3*), nous pouvons donc supposer qu'il présente la même spécificité.

L'arbre phylogénétique permet ensuite de distinguer deux nœuds principaux. L'un d'entre eux (nœud 1) comporte uniquement des séquences de *Y. lipolytica* (*ALK3* à *ALK8* et *ALK12*). Sept gènes *ALK* de la souche ATTC-8661 de *Y. lipolytica* ont été exprimés chez la plante *Nicotiana benthamiana*. Cette étude a révélé que les gènes *ALK3*, *ALK5* et *ALK7* pourraient coder pour des ω -hydroxylases de l'acide laurique (MC12) alors qu'aucune activité ω -hydroxylase n'a été détectée pour les produits des gènes *ALK1*, *ALK2*, *ALK4* et *ALK6* (Hanley *et al.*, 2003).

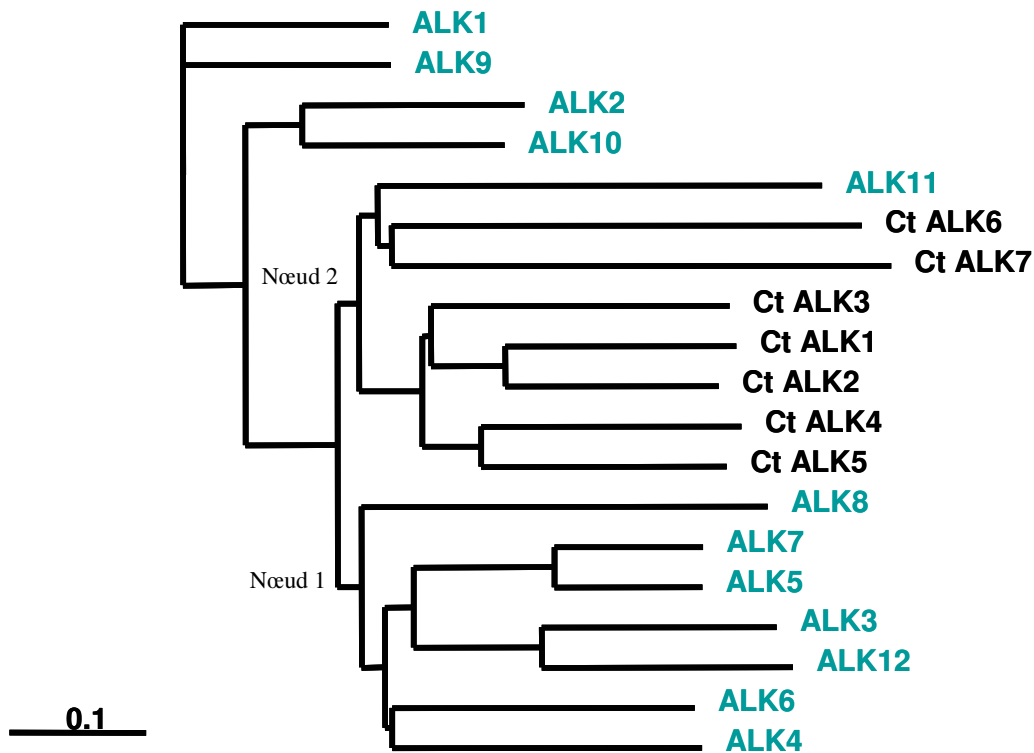


Figure 32. Analyse phylogénétique des gènes *ALK* de *Yarrowia lipolytica* et de *Candida tropicalis*.

Analyse phylogénétique des gènes *ALK1* à *ALK12* de *Y. lipolytica* (en vert) vis-à-vis des gènes *ALK1* à *ALK7* de *C. tropicalis* (en noir) codant pour des cytochromes P450. Les résultats de cette comparaison sont basés sur les séquences d'acides aminés déduites des gènes *ALK* selon la méthode neighbor joining en utilisant la matrice blosum 62 (Programme CLUSTALW).

Le second nœud regroupe l'ensemble des séquences des gènes *ALK* de *C. tropicalis* et le gène *ALK11* de *Y. lipolytica*. Des études d'identification et de caractérisation des cinq premiers cytochromes P450 présents chez la souche ATCC 20336 de *C. tropicalis* ont permis d'identifier des spécialisations de substrats pour ceux-ci (Craft *et al.*, 2003).

Les variants alléliques du gène CtALK2, CYP52A13 et CYP52A14, présentent un haut niveau d'induction en présence d'acide oléique, d'hexadécane et d'huile végétale. Les variants alléliques du gène CtALK5, CYP52A17 et CYP52A18, sont également induits dans ces trois conditions mais dans une moindre mesure. Enfin, le gène CtALK3 présente un faible niveau d'induction dans ces mêmes conditions. Aucune induction n'a été détectée pour les autres gènes.

Les gènes ALK de *Y. lipolytica* pourraient avoir évolué vers une spécialisation fonctionnelle. Cependant, la comparaison des séquences ALK de *Y. lipolytica* avec celles de *C. tropicalis* et *C. maltosa* ne permet pas de prédire une fonction. La multiplication des gènes ALK chez *Y. lipolytica* pourrait avoir eu lieu après spéciation. Il est donc nécessaire d'étudier l'ensemble des gènes de cette famille, en prenant toutefois en compte que le cytochrome P450 majoritaire codé par le gène ALK2 serait spécifique des alcanes à longue chaîne carbonée (Iida *et al.*, 1998). La surexpression d'un cytochrome P450 présentant cette spécificité permettrait d'augmenter la production de DCA.

De plus, il a été démontré *in vitro* qu'un seul cytochrome P450 issu de *C. maltosa*, pouvait catalyser efficacement non seulement l'hydroxylation terminale de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation mais également, l'ensemble des différentes étapes de ces deux voies métaboliques (Scheller *et al.*, 1998). Ainsi, les alcanes seraient directement oxydés en acides gras et/ou en DCA par les systèmes P450. Si une telle donnée se confirmait *in vivo*, la surexpression d'un gène codant un cytochrome spécifique des substrats à longue chaîne carbonée permettrait non pas d'augmenter une seule réaction mais l'ensemble des réactions des voies de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation conduisant à la production de DCA.

Une étude fonctionnelle de l'ensemble des gènes ALK a été réalisée en débutant par les cytochromes majoritaires ALK1 et ALK2. Cependant, la fonction des cytochromes P450 est étroitement liée à une NADPH cytochrome P450 réductase codée par un seul gène CPR chez *Y. lipolytica*. L'étude du système P450 a donc été effectuée en présence ou en absence du gène CPR surexprimé.

B.2. Effet de la surexpression du gène *CPR*

B.2.1. Construction des vecteurs d'expression et des mutants

Dans le but de surexprimer les gènes *ALK1* ou *ALK2* et/ou *CPR*, nous avons construit les vecteurs d'expression suivants : JMP61-*ALK1* (*URA3*, pPOX2-y|*ALK1*), JMP61-*ALK2* (*URA3*, pPOX2-y|*ALK2*) et JMP21-*CPR* (*LEU2*, pPOX2-y|*CPR*) (Figure 16, Matériel et Méthodes). Les gènes *ALK1*, *ALK2* et *CPR* sont placés sous le contrôle du promoteur fort pPOX2 (promoteur du gène *POX2* codant pour l'acyl-CoA oxydase 2). Ce promoteur est inductible en présence d'acides gras et d'alcanes (Juretzek *et al.*, 2001). La digestion enzymatique par *NotI* des vecteurs permet d'obtenir les cassettes d'expression qui comportent deux séquences Zeta permettant d'intégrer dans le génome de *Y. lipolytica*, une ou plusieurs copie(s) du gène d'intérêt de manière non-homologue (Paragraphe B.4.5., Introduction). Celles-ci sont transformées indépendamment dans la souche JMY1285 délétée des gènes *POX2* à 5 et auxotrophe pour l'uracile et la leucine. Cette étude a été réalisée en parallèle de l'étude des gènes *POX1* et *POX6* et donc avant l'obtention de la souche Δ *pox1* à 6. Les transformants obtenus sont vérifiés par Southern blot afin de sélectionner ceux présentant une seule copie supplémentaire du ou des gène(s) d'intérêt(s) (Tableau 10).

Tableau 10. Caractéristiques des souches surexprimant le(s) gène(s) impliqué(s) dans le système P450 monooxygénase.

Souches	Caractéristiques
JMY1354	Δ <i>pox2</i> Δ <i>pox3</i> Δ <i>pox4</i> Δ <i>pox5</i> , JMP61- <i>URA3</i> , JMP21- <i>LEU2</i>
JMY1355	Δ <i>pox2</i> Δ <i>pox3</i> Δ <i>pox4</i> Δ <i>pox5</i> , JMP61-y <i>ALK1</i> - <i>URA3</i> , JMP21-y <i>CPR</i> - <i>LEU2</i>
JMY1356	Δ <i>pox2</i> Δ <i>pox3</i> Δ <i>pox4</i> Δ <i>pox5</i> , JMP61-y <i>ALK2</i> - <i>URA3</i> , JMP21-y <i>CPR</i> - <i>LEU2</i>
JMY1357	Δ <i>pox2</i> Δ <i>pox3</i> Δ <i>pox4</i> Δ <i>pox5</i> , JMP61- <i>URA3</i> , JMP21-y <i>CPR</i> - <i>LEU2</i>

B.2.2. Tests de production d'acides dicarboxyliques

◆ Tests de production d'acides dicarboxyliques en fioles

Des tests de production de DCA en fioles sont réalisés avec les différentes souches construites afin de mesurer globalement l'impact de la surexpression des gènes *ALK1*, *ALK2* et *CPR* sur la bioconversion. Cet essai est réalisé dans les conditions standard précédemment décrites et aucun cosubstrat énergétique n'est ajouté.

De façon générale, les courbes de production de DCA obtenues avec les souches surexprimant les gènes codant le cytochrome P450 I ou II et/ou la NADPH cytochrome P450 réductase présentent le même profil (Figure 33). En fin de phase de bioconversion, elles atteignent une production d'environ $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de DCA et une productivité maximale de $0,216 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ce qui représente un gain d'un facteur 2 par rapport à la production réalisée par la souche contrôle, JMY1354.

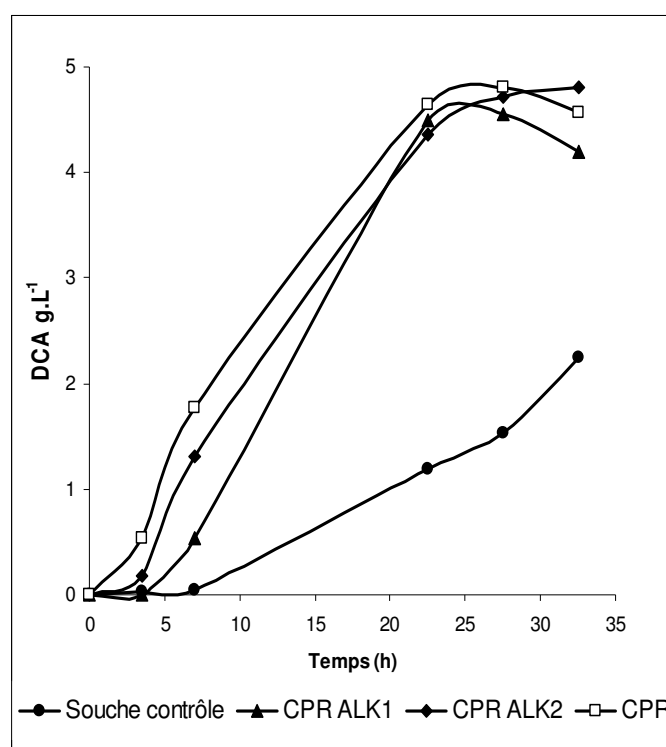


Figure 33. Cinétique de production d'acides dicarboxyliques par des souches surexprimant un ou des gène(s) du système P450. Les cinétiques représentent la production de DCA totaux. Les souches correspondent à la souche JMY1285 délétée des gènes *POX2* à 5 surexprimant les gènes *CPR* et *ALK1* (▲) ou les gènes *CPR* et *ALK2* (◆) ou le gène *CPR* (□). La souche contrôle correspond à la souche JMY1285 prototrophe (●). Le temps 0 correspond à l'apport d'huile de tournesol oléique.

Nous observons cependant, en fin de phase de bioconversion, une baisse de la concentration de DCA pour les souches surexprimant les gènes *ALK1* et/ou *CPR*. Ceci s'explique par l'utilisation de souches présentant les acyl-CoA oxydases 1 et 6 actives (gènes non délétés) et donc consommant les DCA produits (Voir partie A, Résultats et Discussion). La cinétique de production obtenue par la souche surexprimant les gènes *ALK2* et *CPR* montre seulement un ralentissement de la vitesse de production à partir de 22h. Cette différence par rapport aux autres souches, pourrait être le reflet d'une plus grande activité du cytochrome P450 II face aux acides gras à longue chaîne carbonée.

Toutes les souches présentant une production élevée de DCA ont en commun la surexpression du gène *CPR*. L'activité de la NADPHcytochrome P450 réductase, nécessaire au transport d'électrons, semble être limitante dans la réaction d'hydroxylation terminale.

Dans le but de mieux appréhender l'impact de la surexpression du gène codant la NADPH cytochrome P450 réductase, un test en fermenteur a été réalisée.

◆ *Test de production d'acides dicarboxyliques en fermenteur*

Les conditions opératoires du test sont les suivantes :

- Souche de *Y. lipolytica* : JMY1357 : Δ *pox2,3,4,5* ; JMP61-*URA3*, JMP21-*y1CPR-LEU2*.
- Milieu de culture : YP2D4
- Substrat de bioconversion : huile de tournesol oléique par ajout ponctuel (3% (v/v) à la 20^{ème} h de culture)
- Substrat énergétique : glycérol (1 mL.L⁻¹.h⁻¹)

La production de DCA débute immédiatement après l'ajout du substrat de bioconversion et atteint 16 g.L^{-1} en 24h soit une productivité maximale de $0,65 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure 34). Ceci représente une augmentation de la production de DCA de plus 60% et un doublement de la productivité par rapport aux essais réalisés en utilisant la souche MTLY37, délétée des gènes *POX2* à 5 et ne surexprimant pas le gène codant la NADPH cytochrome P450 réductase.

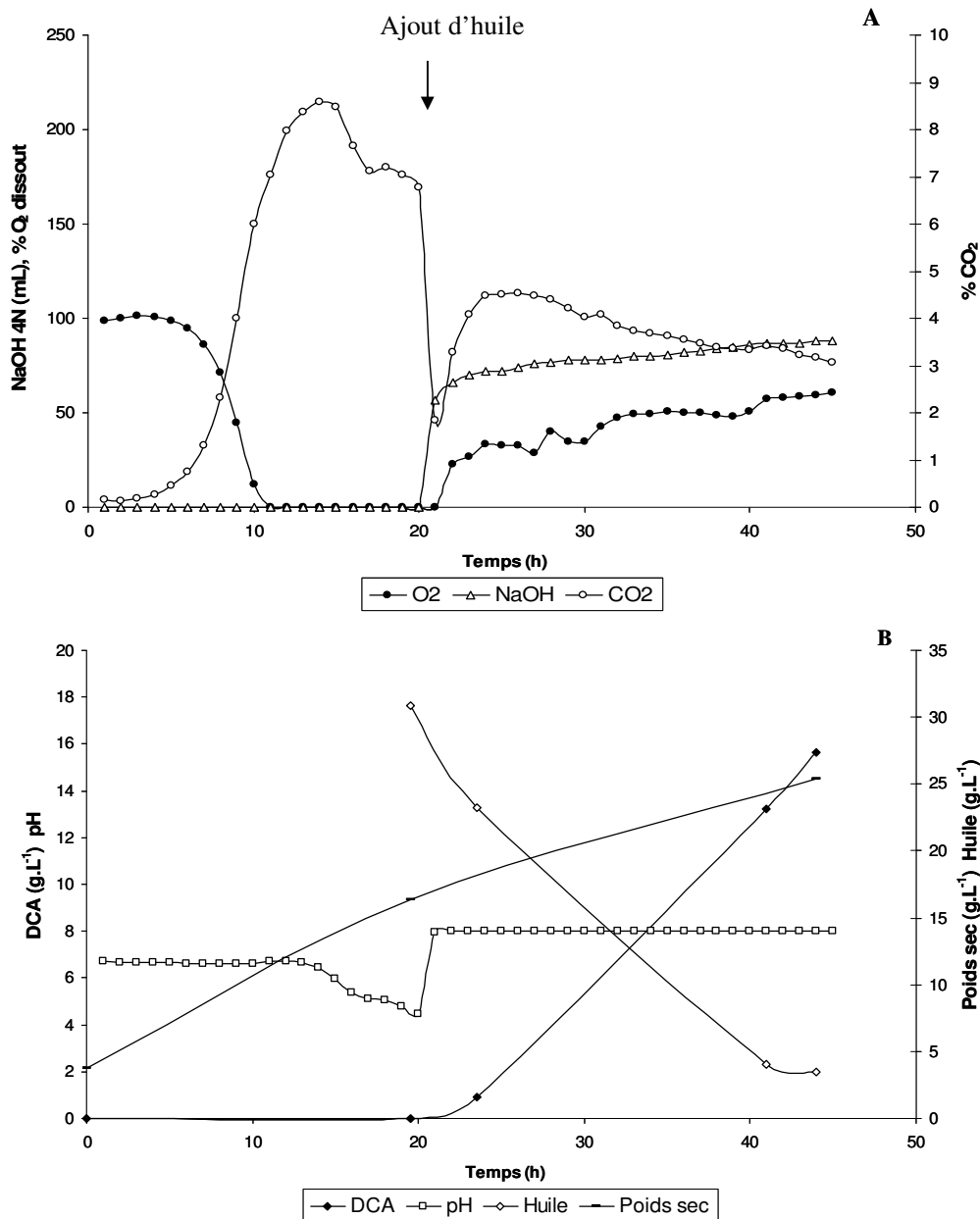


Figure 34. Cinétique de production de DCA obtenue par la souche JMY1357 ($\Delta pox2,3,4,5-CPR$). Evolution du dioxyde de carbone (o), de l'oxygène dissout (•) et de l'ajout de soude (Δ) au cours de la fermentation (A). Production de DCA totaux (\blacklozenge), consommation de l'huile de tournesol oléique (\diamond), évolution du pH (\square) et du poids sec (—) en fonction du temps (B).

D'autre part, la vitesse de consommation de l'huile de tournesol oléique augmente d'un facteur cinq passant de $0,2 \text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à $1 \text{ mL.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en utilisant la souche JMY1357 (Figure 34). Ces résultats tendent à confirmer que la NADPH cytochrome P450 réductase est limitante dans l'étape d'hydroxylation.

Nous constatons également un changement dans la composition et la proportion des DCA obtenus en fin de bioconversion (Tableau 11). La proportion de DC18:1 passe de 40 à 59,3% quand une souche surexprimant le gène CPR est utilisée. D'autre part, on note l'absence de DC14:0, DC14:2 et d'autres DCA de plus faible longueur de chaîne (Tableau 11). Le phénomène de dégradation des DCA produits est toujours observable même s'il est moins marqué (29% par rapport à 42% dans l'essai impliquant la souche MTLY37)(Tableau 12). Ceci s'explique principalement par une durée de fermentation beaucoup plus courte (44h).

Cependant, en dépit de la surexpression du gène *CPR* et de la diminution de la durée de l'essai, la proportion de DC16:0 reste similaire renforçant le fait qu'une grande partie de ces DCA est produite à partir de monoacides MC16:0 synthétisés *de novo* (Tableau 11, Paragraphe A.4. Résultats et Discussion).

Tableau 11. Comparaison des compositions finales en acides dicarboxyliques.

Types de DCA	Composition théorique (%)	Composition réelle Souche MTLY37 Δpox2 à 5 (%)	Composition réelle Souche JMY 1357 Δpox2 à 5 <i>CPR</i> (%)
DC18:0	4	4	5,1
DC18:1	82	40	59,3
DC18:2	9	5	5
DC16:0	3	10	11
DC16:1	-	24	16,8
DC16:2	-	3	1,5
DC14:0	-	0,5	-
DC14:1	-	10	1,3
DC14:2	-	1,5	-
« Autres » DCA	2	2	-

Une nette amélioration des variables mesurées au cours de cette fermentation est par conséquent observable (Tableau 12). En effet, le bilan de carbone est amélioré puisqu'il passe de 31% à 45% dans cet essai. Le rendement et le taux de conversion augmentent de 15% en utilisant une souche surexprimant le gène codant la NADPH cytochrome P450 réductase.

Tableau 12. Bilan de la bioconversion par la souche JMY 1357 surexprimant le gène *CPR*.

Variables mesurées	PRODUIT FINAL
	Temps de culture 44h
Recouvrement en Carbone (%)	68,2
Rendement (%)	50,2
Taux de conversion (%)	44,9
Productivité moyenne (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,65
Productivité maximale (g. L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,65
Production finale (g.L ⁻¹)	16

L'ensemble de ces données confirme que la NADPH cytochrome P450 réductase est limitante dans l'étape d'hydroxylation. La surexpression du gène correspondant, *CPR*, améliore l'activité du système P450 monooxygénase au niveau de l' ω -oxydation dans notre cas, puisque notre substrat de bioconversion est composé d'acides gras (Figure 31). Celle-ci engendre donc une augmentation de la productivité (100%) et de la production (60%) de DCA. Cependant, le rendement (50%) reste insuffisant pour la mise en place d'un procédé de production industriel même si les DCA présentent une haute valeur ajoutée.

C'est pourquoi, l'identification et la surexpression d'un gène *ALK* codant pour la seconde composante du système P450, le cytochrome P450, spécifique des acides gras à chaîne longue pourraient également améliorer les performances de bioconversion en DCA à longue chaîne carbonée.

◆ *Test de production d'acides dicarboxyliques en présence d'alcanes*

Les essais précédents en fioles et en fermenteur ont démontré que la NADPH cytochrome P450 réductase est un facteur limitant de l'hydroxylation terminale. La surexpression des gènes *ALK1* et *ALK2* n'a que peu d'effet sur la production de DCA.

Cependant, d'après la littérature, les cytochromes P450 codés par ces gènes pourraient s'exprimer différemment selon la nature du substrat (Mauersberger et Matiashova, 1980). Ainsi, en utilisant les souches surexprimant les gènes codant le cytochrome P450 I ou II et/ou la NADPH cytochrome P450 réductase, des tests de bioconversion de l'huile de tournesol oléique ont été réalisés en présence soit de dodécane (C12) ou soit d'hexadécane (C16) à 20 g.L⁻¹ supplémentaire. La cinétique de production de DCA résultante est déterminée à partir des dosages en CPG des prélèvements réalisés pendant 100h de culture.

Les résultats montrent que la présence d'hexadécane n'influence pas la production de DCA quelle soit la souche utilisée (Résultats non présentés). Cependant, la présence de dodécane entraîne une diminution d'un facteur trois de la production de DCA totale et plus particulièrement de DC18:1 par rapport aux productions en présence de C16 et ceci quelle que soit la souche utilisée. Cette diminution apparaît plus marquée pour la production de DC18 et DC16 quand la souche surexprimant les gènes *CPR* et *ALK2*, est utilisée. Elle présente néanmoins une forte production de DCA de type C12 et C10.

Ces résultats suggèrent qu'il existe une régulation complexe notamment au niveau des cytochromes P450 selon la nature du substrat. Ceci laisse supposer qu'il pourrait exister un ou des cytochrome(s) P450 spécifique(s) des substrats à longue chaîne carbonée. La surexpression du gène d'un des ces derniers pourrait avoir un effet positif sur la production de DCA.

Dans cette optique, nous avons étudié fonctionnellement l'ensemble des douze gènes *ALK* codant pour les cytochromes P450 de *Y. lipolytica*.

B.3. Effet de la surexpression des gènes ALK

B.3.1. Construction des vecteurs d'expression et des mutants

Dans un premier temps, une cassette d'expression du gène *CPR* à partir du vecteur excisable JMP61-*LEU2*_{ex} (Figure 15, Matériel et Méthodes), a été construite et a servi à transformer la souche JMY1233, délétée de l'ensemble des gènes *POX*. Cette souche a été ensuite transformée avec le vecteur répliquatif pRRQ2 afin d'exciser le marqueur d'auxotrophie *LEU2*.

Les cassettes d'expression correspondantes à l'ensemble des gènes *ALK* (*ALK1* à *ALK12*) ont été construites suivant la même procédure que pour les cassettes des gènes *ALK1* et *ALK2* (paragraphe B.2.1) (P-H Benetti). Celles-ci sont transformées dans la souche JMY1274 délétée de l'ensemble des gènes *POX*, surexprimant le gène *CPR* et auxotrophe pour l'uracile et la leucine. Les transformants obtenus sont vérifiés par Southern blot afin de sélectionner ceux présentant une seule copie supplémentaire du gène d'intérêt. Les souches présentant une copie supplémentaire du gène *CPR* et du gène *ALK1*, *ALK2*, *ALK3*, *ALK5*, *ALK7*, *ALK9*, *ALK10* ou *ALK11* ont été obtenues (Tableau 13). Les mutants *CPR ALK4*, *ALK6*, *ALK8* et *ALK12* sont en cours de construction.

Tableau 13. Caractéristiques des souches surexprimant les gènes codant le système P450 monooxygénase.

Souches	Caractéristiques
JMY1286	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61- <i>URA3</i> , JMP21- <i>LEU2</i>
JMY1247	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61- <i>URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1266	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK1-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1267	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK2-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1268	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK3-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1269	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK5-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1270	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK7-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1271	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK9-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1272	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK10-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .
JMY1273	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61-y <i>ALK11-URA3</i> , JMP61- <i>LEU2</i> _{ex} -y <i>CPR</i> .

B.3.2. Tests de production d'acides dicarboxyliques

◆ Test de production d'acides dicarboxyliques en fioles

Des essais de bioconversion d'huile de tournesol oléique en DCA sont effectués en fioles dans les conditions standard en présence de glycérol comme cosubstrat énergétique. La cinétique de production de DCA résultants est déterminée par des dosages en CPG des prélèvements réalisés pendant 100h de culture. Cette expérience a été répétée trois fois dans les mêmes conditions. Les résultats présentés sont basés sur la moyenne de ces trois essais. Ils représentent la production finale de chaque souche surexprimant un cytochrome P450 différent et la NADPH cytochrome P450 réductase par rapport à celle de la souche surexprimant uniquement la NADPH cytochrome P450 réductase (JMY1247) et sont exprimés en pourcentages (Figure 35).

La production finale obtenue avec la souche témoin JMY1247 est de $13,75 \text{ g.L}^{-1}$. La surexpression des gènes *ALK1*, *ALK9* et *ALK11* a peu d'influence sur la production de DCA (2 à 5%). En effet, elle aboutit à des valeurs similaires à celles de la souche JMY1247 (Figure 35). Cependant, une diminution significative de la bioconversion d'huile de tournesol oléique en DCA (19%) est observée dans le cas de la souche surexprimant le gène *ALK3*. A l'inverse, la surexpression des gènes *ALK7*, *ALK5*, *ALK2* ou *ALK10* a un effet positif sur la production de DCA permettant à celle-ci d'augmenter de 10 à 27%.

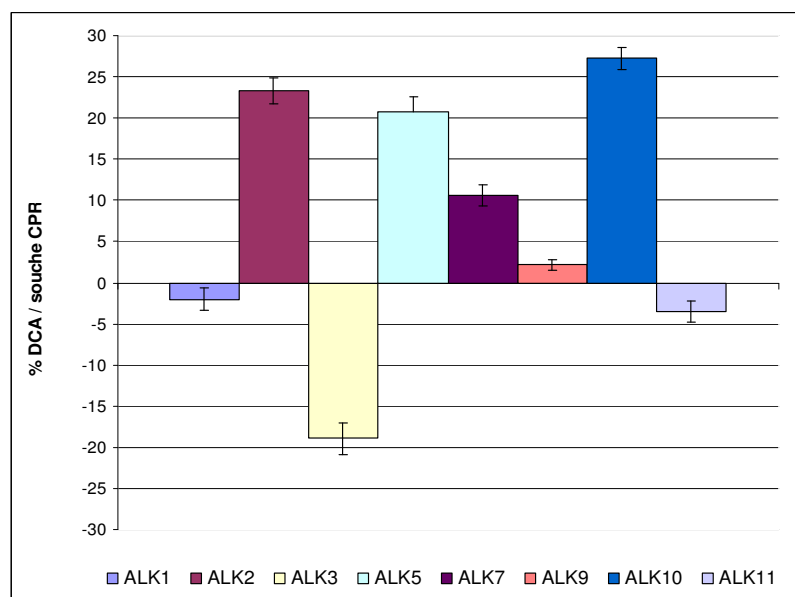


Figure 35. Comparaison de la production finale d'acides dicarboxyliques par des souches surexprimant le système P450. Elle est exprimée en pourcentage par rapport à la production de la souche JMY1247 surexprimant uniquement le gène *CPR*. Le niveau 0 correspond donc à la production finale de cette souche (moyenne $9,5 \text{ g.L}^{-1}$). Cette figure représente la moyenne des résultats de trois expériences réalisées dans les mêmes conditions.

Les résultats concernant le gène *ALK2* peuvent paraître contradictoires avec ceux obtenus lors de la première expérience où les souches surexprimant les gènes *ALK1* et *ALK2* ne présentaient pas de différences nettes au niveau de leur taux de production (Paragraphe B.2.2., Résultats et Discussion). Cependant, il faut noter des variations importantes entre ces deux expériences : la durée de celles-ci (100h pour l'expérience présente contre 33h précédemment), les caractéristiques de la souche utilisée (la souche utilisée pour l'expérience présente est déletée de l'ensemble des gènes *POX*), le cosubstrat (un cosubstrat est utilisé dans l'expérience présente alors qu'il était absent précédemment). Enfin, malgré ces différences, nous avons constaté dans l'expérience précédente que la production par la souche surexprimant le gène *ALK2* ne diminuait pas en fin de fermentation contrairement à celle de la souche surexprimant le gène *ALK1*.

Les effets inverses observés sur la production de DCA, des gènes *ALK10*, *ALK2*, *ALK5* ou *ALK7* et du gène *ALK3*, pourraient être le résultat d'une spécialisation fonctionnelle et /ou d'une régulation de l'ensemble des gènes *ALK*.

Afin de compléter ces résultats, il nous a paru intéressant de rechercher une éventuelle spécificité de substrat des cytochromes P450 codés par les gènes *ALK* et notamment ceux dont la surexpression entraîne une variation de la production de DCA.

◆ Tests de production d'acides dicarboxyliques en présence d'alcane

Des tests de production de DCA sont effectués en présence d'un mélange de décane (C10) et d'hexadécane (C16) (30 g.L⁻¹ respectivement) dans les mêmes conditions que précédemment. La cinétique de production des diacides DC10 et DC16 résultants est déterminée à partir des dosages en CPG des prélèvements réalisés pendant 100h de culture. Les résultats sont traités en réalisant le rapport de la production de DC16 sur celle de DC10 pour chaque souche surexprimant un cytochrome P450 puis comparés à celui de la souche témoin surexprimant uniquement la NADPH cytochrome P450 réductase.

A l'issue de cette expérience, seules les souches surexprimant les gènes *ALK2*, *ALK5* et *ALK11* présentent des modifications significatives. Le cytochrome P450 II semble, en effet, montrer une spécificité vis-à-vis des alcanes à longues chaînes puisque le rapport de production de DC16 sur celle de DC10 est 7 fois plus élevé que celui de la souche témoin (Résultats non présentés). A l'inverse, le rapport de production de DC16 sur celle de DC10 concernant les souches surexprimant les gènes *ALK5* et *ALK11* est, respectivement, 5 et 8 fois plus faible que celui de la souche témoin, surexprimant uniquement le gène *CPR*. Les produits des gènes *ALK5* et *ALK11* seraient spécifiques des alcanes à chaîne courte.

B.3.3. Surexpression du système P450 : Bilan

Les données issues de ces différentes expériences, nous ont permis tout d'abord de démontrer que la NADPH cytochrome P450 réductase responsable du transport d'électrons et codée par le gène *CPR* représentait l'étape limitante dans la réaction d'hydroxylation terminale. En effet, la surexpression de ce gène conduit à une amélioration de la production de DCA de plus de 60% et un doublement de la productivité par rapport aux essais réalisés en utilisant une souche ne surexprimant pas ce gène.

D'autre part, la surexpression des gènes *ALK* nous a permis de montrer un effet sur la production de DCA et une spécificité probable vis-à-vis de la longueur de chaîne du substrat pour certains d'entre eux (Tableau 14). Ainsi, l'augmentation de l'activité du cytochrome P450 codé par le gène *ALK2*, conduit à une augmentation de 23 % de la production de DCA. Ce résultat est cohérent avec une probable spécificité pour les substrats à longue chaîne carbonée et en accord avec ceux de Ida *et al.* (Ida *et al.*, 1998).

Tableau 14. Spécificité et effet de la surexpression des gènes *ALK* sur la production d'acides dicarboxyliques.

Gène <i>ALK</i> surexprimé	Modification de la Production de DCA à longue chaîne carbonée / JMY1247	Spécificité / longueur de chaîne du substrat
<i>ALK1</i>	ns	nd
<i>ALK2</i>	+ 23 %	chaîne longue
<i>ALK3</i>	- 19 %	nd
<i>ALK5</i>	+ 20 %	chaîne courte
<i>ALK7</i>	+ 10 %	nd
<i>ALK9</i>	ns	nd
<i>ALK10</i>	+ 27 %	nd
<i>ALK11</i>	ns	chaîne courte

ns, non significatif ; nd, non déterminé.

Le gène *ALK5* semble être spécifique des substrats à chaîne courte. Ceci est en accord avec l'étude de Hanley *et al.* montrant que *ALK3*, *ALK5* et *ALK7* pourraient avoir un rôle d' ω -hydroxylase des substrats à chaîne courte (Hanley *et al.*, 2003). Cependant, sa surexpression conduit à une augmentation de la production de DCA de 20%. Nous pouvons supposer que ce cytochrome P450 est spécifique des alcanes à chaîne courte et des acides gras à chaîne longue de manière similaire au cytochrome P450 codé par le gène *CYP52A3* chez *C. maltosa* (Scheller *et al.*, 1996).

La surexpression des gènes *ALK7* et *ALK10* conduit également à une amélioration de la production de DCA (10 et 27% respectivement). Cependant, nous n'avons pas pu déterminer une quelconque spécificité pour les cytochromes P450 correspondants. Enfin, les gènes *ALK11* et *ALK3* apparaissent codés pour des cytochromes P450 spécifiques des chaînes courtes. Cependant, la surexpression de ceux-ci n'a d'effet que pour le gène *ALK3* où la production de DCA est diminuée. Nous pouvons supposer que la surexpression du gène *ALK3* conduit à une répression des gènes *ALK* actifs sur substrats à longue chaîne carbonée.

Cette étude a permis d'identifier des gènes *ALK* dont la surexpression pourrait conduire à une amélioration de la production de DCA (jusqu'à 27%). Cependant, elle a également révélé un réseau de régulation probablement complexe au niveau de ces gènes. Ainsi, la surexpression de l'ensemble des gènes *ALK* montrant un effet positif sur la production de DCA pourrait ne pas avoir l'effet escompté.

Enfin, l'ensemble des fermentations réalisées nous a permis d'identifier différentes phases durant le procédé de production de DCA et d'émettre des hypothèses quant aux facteurs limitants.

C. Identification de facteurs limitants la production de DCA

Globalement, le procédé de production de DCA par une souche de *Y. lipolytica* délétée des gènes *POX*, se caractérise par : (1) une phase de production de biomasse sur milieu riche (YP2D4) atteignant environ 30 g.L^{-1} (Figure 36); (2) une phase de production maximale de DCA d'environ 25 h, débutant immédiatement après l'ajout de l'huile de tournesol oléique. La production de DCA est corrélée à une vitesse de consommation maximale de l'huile. Les cellules sont alors en fin de phase exponentielle de croissance. (3) une phase où la courbe de production de DCA subit un ralentissement important jusqu'à atteindre un plateau. Celle-ci est corrélée à un ralentissement de la consommation de substrat, à l'entrée des cellules en phase stationnaire et à l'acidification du milieu de culture.

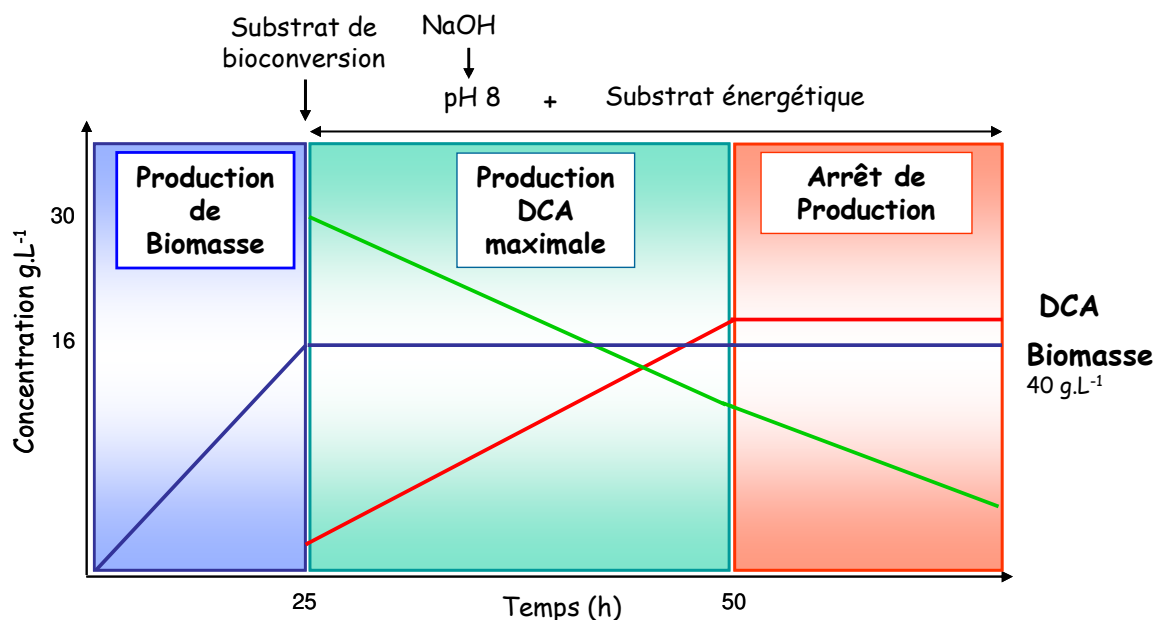


Figure 36. Schéma représentatif du procédé de production d'acides dicarboxyliques par des souches améliorées de *Y. lipolytica*.

L'acidification du milieu de culture pourrait s'expliquer par la production de métabolites secondaires tels que l'acide citrique sous l'effet d'une carence en azote (Fickers *et al.*, 2004). D'autre part, la production de DCA pourrait nécessiter d'avoir des cellules en phase exponentielle de croissance.

C.1. Influence du cosubstrat et de l'apport d'azote

Dans le but de prolonger la phase de production de DCA, les facteurs limitants doivent être identifiés. Deux essais de production de DCA ont été réalisés en jouant sur deux paramètres : le cosubstrat énergétique et l'apport d'azote.

Le premier essai est effectué en utilisant l'acide acétique comme cosubstrat énergétique à la place du glycérol. *Y. lipolytica* présente une très bonne croissance en présence d'acétate comme seule source de carbone (Barth et Gaillardin, 1997). Dans un second essai, afin de déterminer l'influence de l'apport d'azote sur la formation de métabolites acides au détriment des DCA en fin de fermentation, le pH est régulé à 8 par l'apport d'ammoniaque (4N) à la place de la soude.

Dans ces essais, deux apports d'huile de tournesol oléique (3 % [v/v] respectivement) sont réalisés lors de ces deux essais, l'un quand le glucose est épuisé (environ 25^{ème} heure) et l'autre 50h plus tard. Ces deux bioconversions sont réalisées par la souche délétée de l'ensemble des gènes *POX* et surexprimant le gène *CPR*, identique à celle utilisée lors de la fermentation qui nous sert de référence (présentée en paragraphe B.2.2.). Les résultats sont présentés en comparant les paramètres principaux du procédé de production de DCA de ces deux essais et de la fermentation de référence réalisée en présence de glycérol, comme cosubstrat et de soude pour la régulation du pH (Figure 37).

En présence d'acide acétique comme cosubstrat énergétique, la production ($19,85 \text{ g.L}^{-1}$) et la productivité maximale de DCA ($0,73 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) sont améliorées par rapport à un procédé utilisant le glycérol comme cosubstrat. Ces données sont corrélées avec une faible amélioration du rendement et du taux de bioconversion. Le poids sec des cellules augmente également passant de 40 à 50 g.L^{-1} . Cependant, nous constatons toujours un arrêt de la production de DCA à environ 90h de fermentation, corrélé avec un brusque ajout de soude.

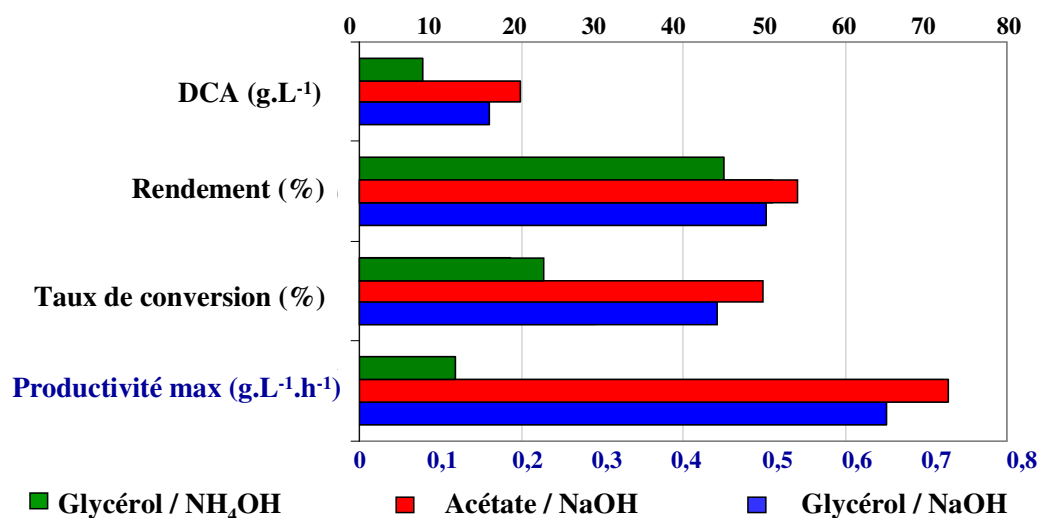


Figure 37. Influence du substrat énergétique et de l'azote sur la production d'acides dicarboxyliques par une souche modifiée de *Y. lipolytica* ($\Delta\text{poxI-6-CPR}$).

Lorsque l'azote est ajouté sous forme d'une régulation du pH à l'ammoniaque, la production ($7,79 \text{ g.L}^{-1}$) ainsi que le taux de bioconversion (24%) sont diminués de moitié tandis que la productivité ($0,277 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) est diminuée d'un facteur cinq. L'ajout d'ammoniaque se déclenche en milieu de phase de production de DCA et reste régulière. Cependant, la durée de la phase de production est doublée puisqu'un ralentissement de la courbe de production n'est observé qu'à partir de 150h.

L'utilisation de l'acide acétique comme cosubstrat énergétique se révèle plus efficace pour la production de DCA que le glycérol. L'acide acétique permet aux cellules de continuer à croître durant la phase de bioconversion. Dans ces conditions, croissance et production de DCA semblent liées. L'apport d'azote permet de doubler la durée de la phase de bioconversion et les cellules en phase stationnaire continuent de produire des DCA.

Cependant, le rendement de l'ensemble des essais de production de DCA reste relativement faible (50%). La moitié de la quantité du substrat de bioconversion n'est donc pas utilisée pour produire des DCA. Des observations par microscopie optique révèlent une accumulation de l'huile de tournesol oléique sous forme de corps lipidiques dans les cellules issues de ces fermentations. Le flux d'acides gras serait donc détourné de la voie de bioconversion en DCA vers une accumulation dans les corps lipidiques.

C.2. Etude fonctionnelle des gènes impliqués dans le stockage des lipides

Dans le but de limiter l'accumulation de l'huile dans les corps lipidiques, nous avons étudié les gènes potentiellement impliqués dans la voie de stockage des lipides. Chez *Y. lipolytica*, une étude protéomique des corps lipidiques a permis d'identifier 21 protéines dont la majorité sont impliquées dans le métabolisme des lipides (Athenstaedt et Daum, 2006). Deux de ces protéines, présentent d'importantes similarités avec des protéines impliquées dans le stockage des lipides chez *S. cerevisiae*, Dga1p et Lro1p. Ces protéines sont des triacylglycérol synthases localisées dans le RE.

Les corps lipidiques sont constitués principalement de triacylglycérols (TAG) et d'esters de stérol (SE). Les TAG sont la forme la plus importante de stockage chez les eucaryotes. Le précurseur direct de la synthèse des TAG est le diacylglycérol (DAG). Dans la réaction acyl-CoA dépendante chez *S. cerevisiae*, l'activation des acides gras peut être liée au glycérol du DAG par Dga1p (Sorger et Daum, 2002). Lro1p catalyse le transfert du groupe acyl de la position sn-2 de la phosphatidylcholine ou de la phosphatidyléthanolamine du DAG chez *S. cerevisiae* (Oelkers *et al.*, 2002).

Nous avons effectuée une étude fonctionnelle des gènes correspondants, *DGA1* et *LRO1*. A partir de la souche sauvage W29 de *Y. lipolytica*, des mutants disruptés pour les gènes *DGA1* et/ou *LRO1* ont été construits puis analysés quant à leur teneur en TAG et SE au cours d'une culture en présence d'acide oléique. Il apparaît que l'ensemble des mutants disruptés pour *DGA1* et/ou *LRO1* présente une baisse importante de l'accumulation par rapport à la souche sauvage. La disruption des gènes *DGA1* et *LRO1* conduit à une diminution de l'accumulation sous forme de TAG et de SE de 75% (Athenstaedt et Thevenieau, non publié). *DGA1* et *LRO1* seraient donc impliqués dans la voie de stockage des lipides chez *Y. lipolytica*. Leur disruption permettrait également de diminuer le stockage chez le mutant délété des gènes *POX* et surexprimant le gène *CPR*. Ceci pourrait conduire à une amélioration du rendement de production de DCA, le flux d'acides gras n'étant plus détourné vers la synthèse de TAG.

C.2.1. Construction des mutants

Le système combinant la méthode SEP et le système de recombinaison Cre *lox* (Fickers *et al.*, 2004) a été utilisé afin d'obtenir la souche JMY1274 délétée du gène *DGA1* ou des gènes *DGA1* et *LRO1* (Tableau 15). Les cassettes de disruption sont construites à partir du vecteur JMP61-*URA3ex* suivant la même méthode que décrit précédemment (Paragraphe B.4 Matériel et Méthodes).

Tableau 15. Caractéristique des souches délétées de gènes impliqués dans le stockage lipidique.

Souches	Caractéristiques
JMY1286	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61- <i>URA3</i> , JMP21- <i>LEU2</i>
JMY1300	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61- <i>y1CPR</i> , Δ <i>dga1</i>
JMY1315	Δ <i>pox1-6</i> , JMP61- <i>y1CPR</i> , Δ <i>dga1</i> , Δ <i>lro1</i>

C.2.2. Test de production d'acides dicarboxyliques

Des tests de bioconversion d'huile de tournesol oléique en DCA sont effectués en fioles dans les conditions standard en présence de glycérol comme cosubstrat énergétique. La cinétique de production de DCA résultante est déterminée par des dosages en CPG des prélèvements réalisés pendant 100h de culture. Les résultats représentent la production finale des souches $\Delta dga1$ et $\Delta dga1 \Delta lro1$ par rapport celle de la souche contrôle JMY1286 ($9,26 \text{ g.L}^{-1}$)(Figure 38).

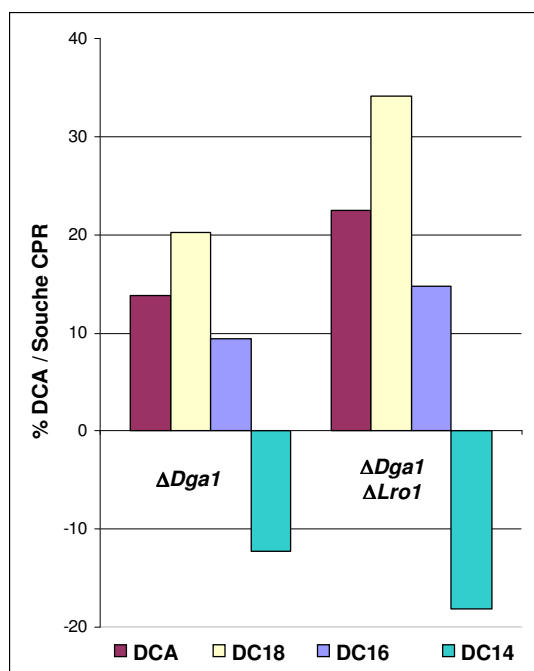


Figure 38. Comparaison des productions finales des souches délétées des gènes $\Delta dga1$ ou $\Delta dga1$, $\Delta lro1$ par rapport à la souche JMY1247.

Le niveau 0 représente la production de la souche contrôle non délétée pour ces gènes.

La production de DCA totaux est améliorée de 13% lorsque le gène *DGA1* est disrupté par rapport à la souche JMY1247. La composition relative des DCA produits est également modifiée en s'enrichissant de DCA à longue chaîne carbonée. Les DC18 et les DC16 présentent une augmentation de production de 20 et 9% respectivement, alors que la production de DC14 diminue de 12%. Cette baisse pourrait s'expliquer par l'utilisation en quantité plus importante de l'huile de tournesol oléique (MC18) destinée à la production de DCA. La teneur relative en DC14 diminue donc par rapport à la proportion de DC18. Le gène *DGA1* serait donc impliqué dans la voie de stockage des lipides

Un phénomène similaire est observé lorsque les deux gènes *DGAI* et *LROI* sont disruptés. Cependant, l'amélioration de la production est, dans ce cas, de 22% pour les DCA totaux. De la même manière que dans le cas de la souche $\Delta dgal$, les proportions relatives de DC18 et DC16 augmentent également quand la souche $\Delta dgal \Delta lroi$ est utilisée pour la bioconversion de DCA.

Ces deux gènes sont donc impliqués dans le stockage lipidique dans les corps lipidiques. Leur délétion permet de rediriger le flux d'acides gras vers l' ω -oxydation et donc d'augmenter le rendement de production de DCA à longue chaîne carbonée.

A l'issu des résultats présentés précédemment, un brevet, associant l'IFP et l'INRA, a été déposé à l'organisation mondiale de la propriété industrielle pour la « production d'acides dicarboxyliques par des souches mutantes améliorées de *Yarrowia lipolytica* » en décembre 2005 et publié sous le numéro de publication internationale WO 2006/064131 A1. Ce brevet d'invention est présenté en annexe 2.

D. Identification et étude fonctionnelle d'une famille d'ABC transporteur

D.1. Localisation des DCA produits

Afin de déterminer la localisation des DCA produits, nous les avons quantifiés en réalisant une extraction dans chacune des fractions suivantes : le moût de fermentation comprenant les cellules et le milieu de culture (1, culture totale), les cellules (2), et le milieu de culture (3). Ces dosages ont été effectués au cours de la fermentation afin d'étudier l'influence d'un cosubstrat énergétique sur la bioconversion en DCA par la souche délétée des gènes *POX2* à 5 (décrite en paragraphe A.2.4, Résultats et Discussion).

Jusqu'à 48h après le début de la fermentation ou 22h après l'ajout de l'huile de tournesol oléique, les DCA produits sont localisés à l'intérieur des cellules (Figure 39A et B). Après 48h, la sécrétion débute et la proportion de DCA excrétée augmente régulièrement jusqu'à atteindre 90% des DCA totaux en fin de fermentation (Figure 39B). La somme des DCA présents à l'intérieur des cellules (2) et dans le milieu de culture (3) n'équivaut pas la concentration de DCA mesurée dans la culture totale (1, Figure 39A). Ceci pourrait s'expliquer par des pertes lors de la séparation des deux fractions.

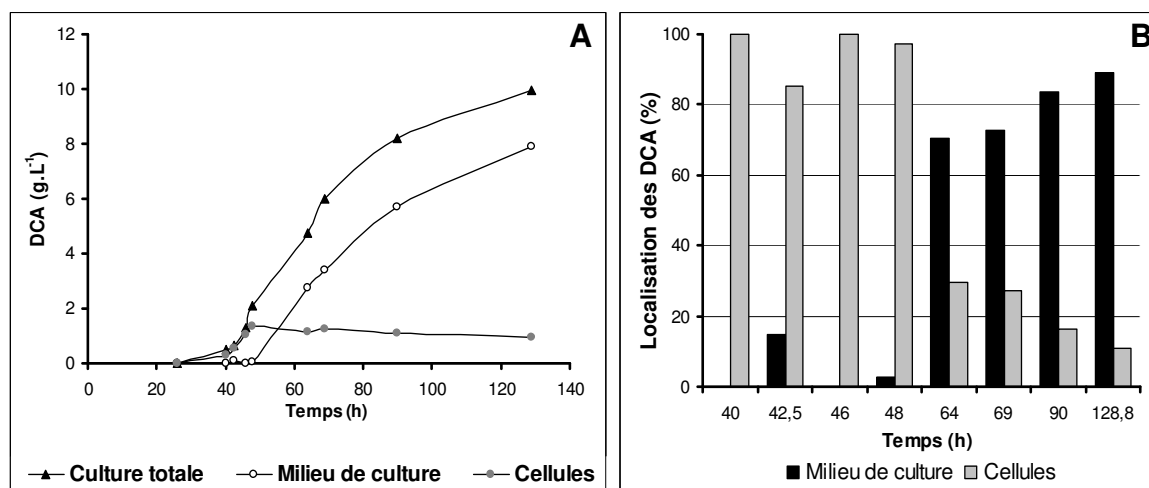


Figure 39. Localisation des DCA produits en fonction du temps.

Cinétique de production de DCA issus d'une extraction sur le moût de fermentation (culture totale), sur le milieu de culture ou sur les cellules à partir d'un même échantillon.

D'autre part, la sécrétion des DCA produits débute à partir d'une concentration intracellulaire égale à 1 g.L^{-1} atteinte après 48h de fermentation. Cette dernière reste constante au cours de la fermentation. Nous pouvons supposer l'existence d'un seuil de production de DCA de 1 g.L^{-1} au delà duquel la sécrétion se déclenche. La présence de DCA en concentration suffisante pourrait ainsi induire une série de transporteurs (exporteurs) spécifiques au niveau de la membrane cytoplasmique.

L'amélioration du transport du substrat de bioconversion à l'intérieur des cellules ou du transport des DCA produits à l'extérieur des cellules pourrait entraîner une augmentation de la productivité des DCA. Cependant, peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce type de transport.

D.2. Collection de mutants

Dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la dégradation oxydative des substrats hydrophobes chez les levures, des mutants étiquetés, affectés dans ces voies ont été produits précédemment par insertion aléatoire d'une cassette de mutagenèse MTC dans le génome de *Y. lipolytica*. Environ 9600 transformants Ura^+ ont été sélectionnés, par des tests sur boîtes, pour leur capacité à utiliser les alcanes (C10, C16), l'acide oléique et la tributyrine. Des mutants incapables de se développer en présence d'alcanes ou d'intermédiaires de cette voie ont été isolés. Afin d'identifier les gènes affectés, les sites d'insertion de la cassette MTC ont été séquencés par PCR convergentes et divergentes. L'analyse des séquences résultantes a mis en évidence des gènes (connus et inconnus) impliqués dans l'utilisation des substrats hydrophobes. Par exemple, l'insertion de la cassette MTC des mutants AlkD/E s'était produite dans les gènes de la réductase de thiorédoxine, des peroxines *PEX14* et *PEX20*, du transporteur de succinate-fumarate *SFC1*, et de l'isocitrate lyase *ICL1*. Plusieurs mutants étaient également affectés dans l'utilisation d'alcanes selon la longueur de la chaîne carbonée.

L'ensemble de cette étude est présentée dans l'article « Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization » en annexe 3 (Thevenieau *et al.*, 2006). Seuls les résultats relatifs aux mutants affectés dans l'utilisation d'alcanes selon la longueur de la chaîne carbonée sont présentés ici.

Les mutants, N046, B095, Z110, présentent ce phénotype et une seule insertion de la cassette de mutagenèse. Le mutant N046 est incapable de se développer sur hexadécane, alors qu'il a un phénotype sauvage de croissance sur décane (Figure 40). Le mutant B095 présente un phénotype identique. A l'inverse, le mutant Z110 se développe sur hexadécane mais est incapable de croître sur décane.

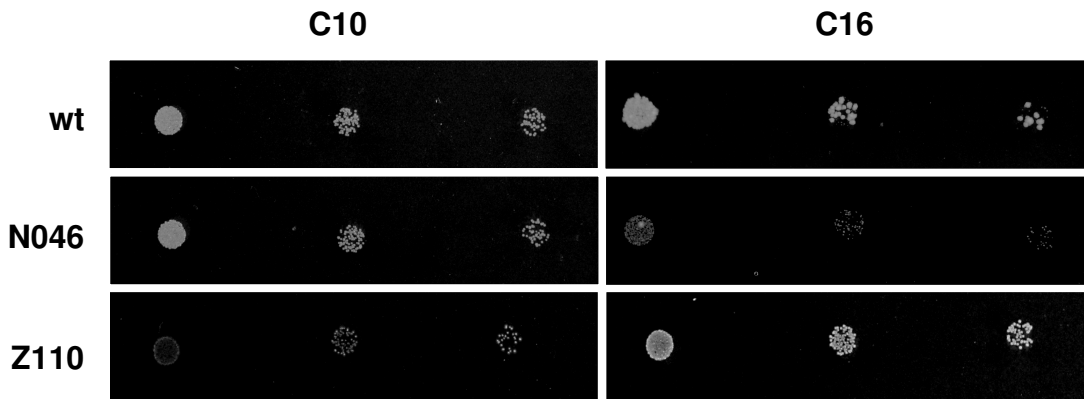


Figure 40. Tests de croissance sur boîte en présence d'alcane de différentes longueurs de chaîne carbonée.

Les souches testées sont : la souche sauvage H222 (wt), le mutant N046 (C10⁺, C16⁻) et le mutant Z110 (C10⁻, C16⁺). Une préculture sur YPD est réalisée durant une nuit. Celle-ci est centrifugée et resuspendue à DO₆₀₀ 1. Des aliquots de 10 µL issus de différentes dilutions (non dilué, 10⁻¹, 10⁻²) de cette suspension cellulaire sont déposés sur un milieu minimum en présence de décane (C10) ou d'hexadécane (C16).

D.2.1. *ANTI* est requis pour l'utilisation des alcanes à chaîne courte

Des croissances en culture liquide de la souche sauvage H222 et du mutant Z110 ont été suivies en présence d'alcane de différentes longueurs de chaîne (C10 à C16, Figure 41). La souche sauvage présente des croissances similaires quelle que soit la longueur de chaîne de l'alcane avec une vitesse μ_{\max} de 0,249 +/-0,015h⁻¹ (Figure 41A). Le mutant Z110 présente une faible croissance sur C10 ($\mu_{\max} < 0,027$ +/-0,02h⁻¹) et sur C11 ($\mu_{\max} < 0,065$ +/-0,02h⁻¹). En présence de C12, une croissance est observée et les taux de croissance augmentent avec la longueur de la chaîne aliphatique jusqu'à un taux de croissance identique à la souche sauvage en présence d'hexadécane (μ_{\max} : 0,145 +/-0,015h⁻¹ sur C12 ; 0,157h⁻¹ sur C13 ; 0,165h⁻¹ sur C14 ; 0,174h⁻¹ sur C15 et 0,245 +/-0,015h⁻¹ sur C16 ; Figure 41C).

Le mutant Z110 présente une interruption du gène YALI0E03058g qui code une protéine de 315 acides aminés semblable à la protéine Q06497 (YPR128c/*ANTI*) chez *S. cerevisiae*. Ces protéines appartiennent à la famille de transporteur comportant également les transporteurs d'ATP peroxysomal, PMP34 et PMP47, respectivement chez l'homme et *C. boidinii*.

Ant1p appartient à la famille de protéines GLC.1419 et est très conservée parmi les levures hemiascomycètes (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/GLC.1419.html>). Chez *S. cerevisiae*, plusieurs études ont montré que Ant1p (YPR128c) était requise dans l'utilisation des acides gras à chaîne moyenne (MCFA) (Lasorsa *et al.*, 2004 Palmieri *et al.*, 2001 Rottensteiner *et al.*, 2002 van Roermund *et al.*, 2001). Ant1p est responsable du transport d'ATP dans les peroxysomes nécessaire à l'activation des MCFA dans les peroxysomes. On notera qu'un second gène de fonction inconnue, YALIO06127g, apparenté à *ANT1*, a été identifié dans le génome de *Y. lipolytica*.

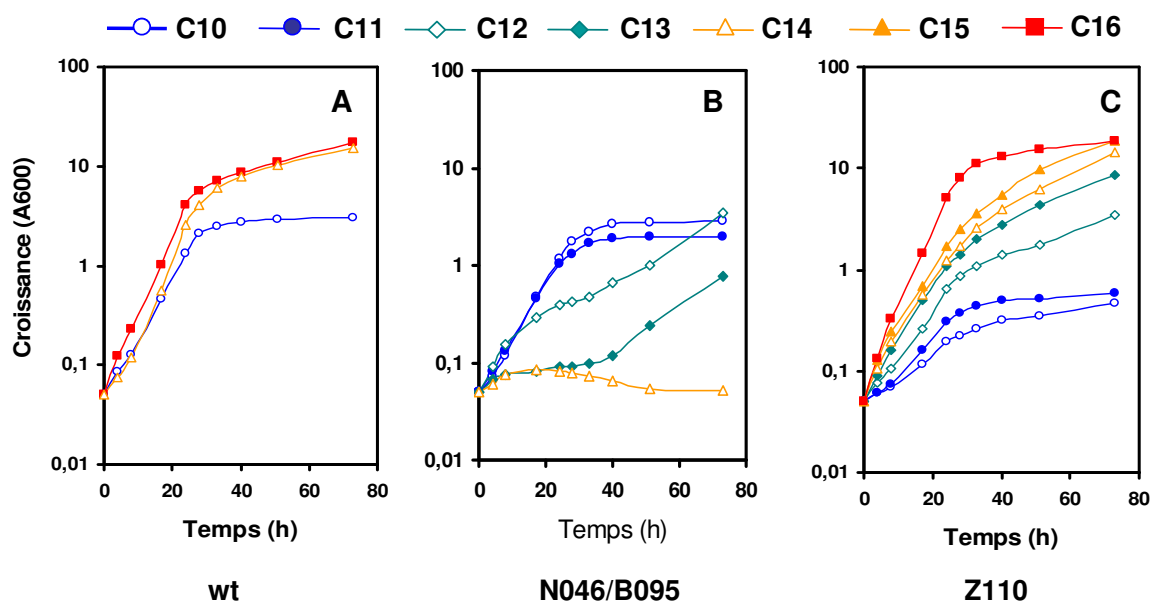


Figure 41. Comparaison de la croissance de mutants sur alcanes de longueur de chaîne différente.

Les souches de *Y. lipolytica* utilisées sont la souche sauvage H222 (A), le mutant N046 (B) et le mutant Z110 (C). La croissance est testée dans des fioles à baffles sur milieu minimum YNBY complété par 0,15% d'extrait de levure et de 1% d'alcane comme sources de carbone. Les alcanes utilisés sont le décane (C10, \circ) ; le undécane (C11, \bullet) ; le dodécane (C12, \diamond) ; le tridécane (C13, \blacklozenge) ; le tétradécane (C14, \triangle) ; le pentadécane (C15, \blacktriangle) et l'hexadécane (C16, \blacksquare). Des cultures dans 50 mL de YNBY dans des fioles sont inoculées avec des cellules issues d'une préculture d'une nuit sur YPD à une DO_{600} initiale de 0,05.

D.2.2. *ABC1* est requis pour l'utilisation des alcanes à chaîne longue

Les croissances en culture liquide sur alcanes du mutant N046 montrent, à la différence du mutant *ANT1*, une altération de leur capacité à se développer plus la longueur de chaîne de l'alcane est importante (Figure 41B). En effet, nous observons une croissance similaire à celle de la souche sauvage en présence de C10 et C11. A partir de douze atomes de carbone, la croissance est altérée (μ_{\max} : $0,078 \pm 0,015h^{-1}$). Une phase de latence de 40h est observée en présence de C13 (μ_{\max} : $0,075 \pm 0,015h^{-1}$). Enfin, ces mutants sont incapables de se développer en présence de C14, C15 et de C16.

L'analyse des séquences du site d'insertion de la cassette de mutagenèse chez le mutant N046 et le mutant B095, présentant tous deux le même phénotype (C10⁺, C16⁻), a été réalisée. Pour ces deux mutants le gène YALI0E14729g est interrompu à deux endroits différents. Ce gène code une protéine de 1659 acides aminés et est homologue au gène *PDR5* de *S. cerevisiae* qui code un ABC transporteur P33302 (YOR153w). Elle appartient à la famille de protéines Genolevures GLC.1360 (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam>) qui contient cinq membres chez *Y. lipolytica* (codées par les gènes YALI0E14729g, YALI0C20265g, YALI0B02544g, YALI0B12980g et YALI0F17996g). Nous avons nommé *ABC1*, le gène YALI0E14729g et les autres *ABC2* à *ABC5*, respectivement.

L'étude des mutants N046 et B095 a permis de démontrer l'implication de *abc1p* dans l'utilisation des alcanes à longue chaîne carbonée. Cependant deux questions restent en suspens : Quelle est la fonction de la protéine codée par *ABC1* ? Les autres membres de cette famille sont-ils également impliqués dans l'utilisation des substrats hydrophobes (alcanes, acides gras, DCA) ?

C'est pourquoi, nous avons initié l'étude fonctionnelle de cette famille multigénique. Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse par génomique comparative puis une analyse fonctionnelle. Des souches mono- et multidisruptées ont été construites afin de mesurer leur croissance sur substrats hydrophobes ainsi que leur sensibilité aux drogues. Enfin, nous nous sommes focalisés sur *abc1p* afin de déterminer sa localisation cellulaire et sa fonction.

D.3. Analyse génomique d'une famille d'ABC transporteur

Le produit du gène *ABC1* est impliqué dans l'utilisation des alcanes à longue chaîne carbonée (C14-C16). Il appartient à la superfamille des ABC transporteurs qui sont impliqués dans l'import ou l'export de substrats (cf Introduction). L'hypothèse la plus évidente serait qu'*abc1p* soit responsable du transport de ces alcanes à l'intérieur de la cellule. Toutefois, une analyse génomique montre une forte homologie du gène *ABC1* avec notamment *PDR5* de *S. cerevisiae* (64%) qui code un ABC transporteur appartenant à la famille PDR (résistance pléiotropique aux drogues) (3.A.1.250) (De Hertogh *et al.*, 2006).

Le phénotype PDR est similaire à celui de résistance multidrogues chez les mammifères. Les membres de cette famille confèrent la résistance à de nombreux composés structurellement et fonctionnellement indépendants (antifongiques et drogues anticancéreuses), et sont impliqués dans la détoxification cellulaire (Rogers *et al.*, 2001). Ils sont décrits comme des exporteurs de substrat, ce qui se révèle contradictoire avec notre première hypothèse.

L'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés déduites des gènes ABC de *Y. lipolytica* avec notamment celles de *S. cerevisiae* (SC), de *C. albicans* (CANAL) et de *Debaryomyces hansenii* (DEBHA) révèle un regroupement phylogénétique des quatre premiers ABC de *Y. lipolytica* (Figure 42). Cette organisation suggère une amplification de ces gènes chez *Y. lipolytica*. Nous constatons que ABC2 et ABC4 sont très proches avec une similarité de 92% et une identité de 82% (Tableau 16) suggérant une duplication plus récente par rapport aux autres gènes ABC. ABC5 présente une plus forte similarité avec SNQ2 (69%) qui appartient également à la famille PDR, qu'avec les autres ABC de *Y. lipolytica* (58 à 60%).

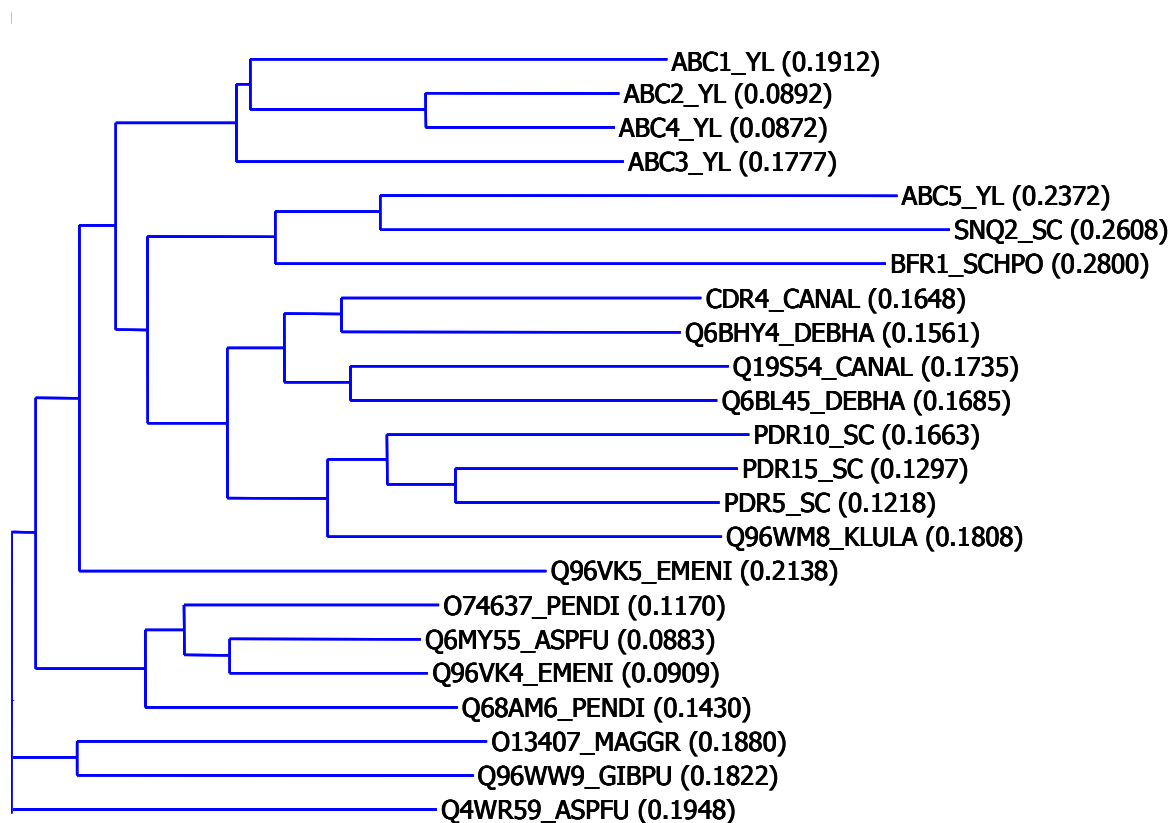


Figure 42. Analyse phylogénétique des gènes ABC de *Yarrowia lipolytica*.

Analyse phylogénétique des gènes ABC1 à ABC5 de *Y. lipolytica*. Les résultats de cette comparaison sont basés sur les séquences d'acides aminés déduites des gènes ABC selon la méthode neighbor joining en utilisant la matrice blosum 62 (Programme CLUSTALW). YL, *Y. lipolytica*; SC, *S. cerevisiae*; SCHPO, *Schizosaccharomyces pombe*; CANAL, *C. albicans*; DEHA, *Debaryomyces hansenii*; KLULA, *Kluyveromyces lactis*; EMENI, *Emericella nidulans*; PENDI, *Penicillium digitatum*; ASPU, *Aspergillus fumigatus*; MAGGR, *Magnaporthe grisea*; GIBPU, *Gibberella moniliformis*.

Tableau 16. Pourcentages d'identité et de similarité basés sur les séquences d'acides aminés déduites des ABC de *Y. lipolytica* et d'autres espèces.

	ABC1 YL	ABC2 YL	ABC4 YL	ABC3 YL	ABC5 YL	SNQ2 SC	CDR4 CANAL	Q6BHY4 DEBHA	Q19S54 CANAL	PDR10 SC	PDR15 SC	PDR5 SC
YIABC1_YL		64/78	64/78	62/77	39/58	37/57	48/65	48/66	46/65	46/64	46/64	47/64
ABC2_YL			82/92	64/80	41/60	38/59	50/68	50/69	48/68	47/67	48/67	47/67
ABC4_YL				66/80	41/60	38/59	50/68	49/68	47/68	47/67	48/67	47/67
ABC3_YL					41/59	39/58	49/67	49/67	48/66	49/66	49/66	49/66
ABC5_YL						50/69	39/59	39/60	40/60	38/58	38/58	39/58
SNQ2_SC							36/58	36/59	38/58	37/57	37/58	37/57
CDR4_CANAL								68/83	59/75	52/70	54/72	55/73
Q6BHY4_DEBHA									61/78	54/72	56/74	57/75
Q19S54_CANAL										53/71	52/70	54/72
PDR10_SC											67/82	68/83
PDR15_SC												75/87
PDR5_SC												

L'analyse de l'alignement multiple des séquences d'acides aminés montre une organisation moléculaire des produits des gènes ABC de *Y. lipolytica* similaire à celle de ABC transporteurs de type PDR. En effet, nous constatons la présence de deux domaines ABC-PDR, de deux domaines ABC2 membrane et d'un domaine PDR-CDR (Figure 43). Les ABC transporteurs de type PDR sont des transporteurs entiers présentant une organisation dupliquée en tandem (NDB-TMS₆)₂ (Figure 3, Paragraphe C, Introduction). Ils présentent ainsi deux moitiés homologues composées chacune d'une région hydrophile intracellulaire en N-terminal qui contient le site de fixation à l'ATP (domaine ABC-PDR) et d'une région associée à la membrane contenant six segments transmembranaires (domaine ABC2 membrane).

Les domaines ABC-PDR sont hautement conservés (Figure 43). Chacun fixe et hydrolyse l'ATP nécessaire au transport de molécule. Les résidus importants pour l'hydrolyse et/ou la fixation de l'ATP se situent au niveau de la boucle P (Figure 43). Sa séquence primaire est hautement conservée présentant une boucle typique de fixation au phosphate, Walker A, et un site de fixation au magnésium, Walker B. Trois autres motifs sont également présents : une région « switch » contenant une boucle histidine, nécessaire à la fixation de la molécule d'eau pour l'hydrolyse, le motif signature spécifique des ABC transporteurs, et le motif Q qui interagit avec le phosphate γ de l'eau. Les motifs Walker A et Walker B, la boucle Q et la région « switch » forment le site de fixation aux nucléotides (NDB).

Le nombre de segments transmembranaires présents dans les *abcp* de *Y. lipolytica* varie, selon les outils de prédiction utilisés, entre 12 et 13 et correspond aux ABC transporteurs de type PDR.

Le domaine PDR-CDR est spécifique des sous-familles PDR et CDR et comprend la boucle extracellulaire 3, le segment transmembranaire 6 et une région de liaison.

L'ensemble de ces données renforce l'idée que les protéines *abcp* et notamment *abc1p* de *Y. lipolytica* pourraient fonctionner comme des transporteurs de type PDR et donc comme des exporteurs.

Afin d'identifier leur rôle, nous avons réalisé une étude fonctionnelle de cette famille multigénique en nous focalisant tout d'abord sur l'étude des gènes phylogénétiquement proches, *ABC1* à *ABC4*, en réalisant des constructions de souches mono et multidisruptées et en les caractérisant.

	601		700
ABC1_YL	(492)	VRLCLWRGFLLRVGDLSMTLMTIIGNFMALILASMYNLRRES--TDAFFSRGALLFLAMLNAMA-----SVLEIFVLYGQRPLTEKH	
ABC2_YL	(473)	TRLCLWRGFLRIKGDMSDITATVFGNFMALVLSMFMYPQI--TESFFSRGALLFFAILINAF-----SILEILSLYEQRPIVLDKQ	
ABC4_YL	(476)	TRLCLWRGFLRIKGDMSDITSIVVGNFMALVLSMFMYPQI--TDTFFSRGALLFFAILLNAFS-----SVLEILSLYEQRPIVEKQ	
ABC3_YL	(463)	VKLCLTRGFQRLRGDLSMALTTVLGNFMALVLSMFMYPED--TSFFSRGALLFFAMIMNAMS-----SVLEITVLYELRPIVEKH	
ABC5_YL	(507)	MRLLTQRGFERLKGDMAYQITINVCANIQALVIGSLFYNI--TES--TAGAFSRGGVLFLLFNALAS-----MAEISHSFSORPIIVKQ	
SNQ2_SC	(504)	VKLCTQRGFQRLYGNKSYIVINVCSAIQSFLITGSLFYNT--TPSS--TSGAFSRGGVLFLLFYYSLMG-----LANISFEHR--PIIQKH	
BFR1_SCHPO	(523)	LWYCLARSWERYINDPAYIGSMAFAFLFQSLIIGSIFYDMKLN--TVDFVSRGGVLFLLFCALQS-----LSEIANMESORPIIAKH	
CDR4_CANAL	(500)	VRYIAHRNILRIKGNPSLHIFQIFGNIGMSFLLSSIFYNLPTA--TSSEYHRTAALFFAVLFFNAFS-----CLLEIFSLYEARSIVEKH	
Q6BHY4_DEBHA	(494)	VKYIMGRNIMRIKGDPSITLFSIFGNITVMGLIISIFYNLDDI--TGSFYRTVAMFFAVLFFNAFS-----SLLEIFALYEARPIVEKH	
Q19S54_CANAL	(495)	VRYVIARNLFLMKGDPSIPILISILSGLVMGLILASVFNLRKS--TDTFYFRGGALFFSVLFFNAFS-----SILEILSLYEARPIVEKH	
Q6BL45_DEBHA	(499)	TRYIMGRNILRTKRNPSVALIQSIAQAFIGITLIGSMFYNSAT--TEELLYRCATLFGAVLFFNAFS-----SILEITMSLFEARPIIEKH	
PDR10_SC	(525)	VKYILIRDIWRKKNPSIQIFTVLSHAAMALILGSMFYVMLSTTITTFYFRGAAFFAVLFFNAFS-----SLLEIFSLYETRPIIEKH	
PDR15_SC	(515)	VKYLLIRNFWRMKQASAVTLWQVIGNSVMAFILGSMFYKVMKKND--TSFYFRGAAFFAVLFFNAFS-----CLLEIFSLYETRPIIEKH	
PDR5_SC	(505)	VKYLLIRNMWRILRNNIGTIFMLIGNCSMALILGSMFYKIMKKGD--TSFYFRGSAMFFAVLFFNAFS-----SLLEIFSLYETRPIIEKH	
Q96WM8_KLULA	(493)	VKYLTMRNLRKIKSYGTLVGTIVGNTAMSLVLGSIYKSMKDDTINTFYFRGAAFFAVLFFNSFS-----SMLEIFSLYEARPITEKH	
Q96VK5_EMENI	(513)	IRLCLSRRGFLRLKGDMSMTLATTIGNSMALIISSIFYNMNGI--TEKFFSRGALLFFAVLFFNAFS-----SALEILTLLWQQRPIVEKH	
O74637_PENDI	(475)	VQICVTRGFQRLKSDYSLISALIGNTAMALIVGSMFYVQLPDD--VTSEYFRGALLFFAVLFFNSFS-----SALEILTLYAQRPIVEKQ	
Q6MY55_ASPFU	(506)	IELCMIRGFQRLKGDSSITMSQLIGNFMALVIGSVFYNLPPD--TSSEYFRGALLFFAVLFFNAFS-----SALEILTLYAQRPIVEKQ	
Q96VK4_EMENI	(520)	VHLCMIRGFQRLKGDASLTLISQLIGNFMALVIGSMFYVDLND--TGSFYFRGALLFFAVLFFNAFS-----SALEILTLYAQRPIVEKQ	
Q68AM6_PENDI	(497)	ISLCVTRGFQRLRGDLSLITATAIGNFMALVIGSMFYVNLND--TSSEYFRGALLFFAVLFFNAFS-----SALEILTLYAQRPIVEKH	
O13407_MAGGR	(545)	TKLCLWRGKRLIGDPLTIFGALFANTMALVLSIFNYLQMT--TSSEYFRGALLFFAVLFFNAFS-----AALEILTLYAQRPIVEKH	
Q96WW9_GIBPU	(503)	VQLCLWRGFKRLVGSPTITFQLIANTVALIASLIFYNMEPT--TGFDFKRGAVLFLAVLFFNAFS-----SALEILTLYAQRPIVEKH	
Consensus	(601)	VKLCL RGF RLKGD SITL IIGN IMALILGSMFYNL T T SFFSRGALLFFAVL NAFS SLLEILSLY QRPIVEKH	
	701		800
ABC1_YL	(574)	KRYALYHPFAESIASMVDLPLKATLISVNLALYFMTNLRRTGAFIFHLLFSFTCTMAMSMIFRTASVTKTMEQALAPASVLLALVIYTGFTIPVD	
ABC2_YL	(555)	NRYAMYHPAADALAAITTFPTKTLTLVSVNLTIYFMTNLRREVGPFFIFFLFSLLCTMAMSMIFRTIGSVTKTLEQALAPASIIILALVIYTGFSLEPIS	
ABC4_YL	(558)	TRYALYHPFTEALASILTTFPTKTLTLAVNLTYFMTYLRREPGFFIFFLFSLLCTMAMSMIFRCMAAITKTLEQALAPASVIIILALVIYTGFSLEPIT	
ABC3_YL	(545)	QRYAMYHPFCEALASIICTFFPKLITMLCVNVTLYFMTNLRREAGPFFIFFLFSLLCTMAMSMIFRTIAAVTKTLQALAPAAVIIILALVIYTGFTIPIS	
ABC5_YL	(589)	KSYSFYHPAGEALQALLTDFPGLVMTICFTLIVYFLLHLNRTAGQFAHLFILFVTTQCMTAFFQVLASATPSVEVNSLAGIGLIIIVVYSGYMIPTP	
SNQ2_SC	(584)	KGYSLYHPSAEAIIGSTLASFPRMIGLTCFTLILFFLSGLHRTAGSFTIYFLFTMCSEALNGLFEMVSSVCDTLISOANSISGILMMSISMYSTYMIQLP	
BFR1_SCHPO	(605)	RASALYHPAADVSSSLVDLPLFRFINISVFSIVLYFLINLKRTAGGFVYFLFLFIGATCMSAFFRSLAGIMPNVESASALGGIGVLAIAIYTGVAIPNI	
CDR4_CANAL	(582)	KKYALYHPAADAFASIVTELETKFIIAIGFNLVYFVNFRRTPGNFFYLLINFSATLAMSIFRTIGATKTLQEAMTPAAIILLALTIYTGVIPTP	
Q6BHY4_DEBHA	(576)	KTYALYHPSADAFASIIITELPKLLVLSFNLVLYFVNFRRNAGNFFYLLVNFATLMSHFRITIGSAIKSLSQAMTPASVLLALTIYTGVIPTP	
Q19S54_CANAL	(577)	KRYALYRPSADALASIISELVLLMTMSFNIVYFMTNLRRTAGNFFYFLMCCASCITVMSHMFRSIGAVTTIATAMSLSTVFLAMIIYAGVLEIP	
Q6BL45_DEBHA	(581)	KQYALYRPSADALAGIITELPKLLIAFNFFIYFLSNLRRTAGRFFFWLMCCMCTLIVMSHFRSLGAISTSFAGAMTPATVLLAMVIYAGVLEIP	
PDR10_SC	(609)	KTYSLYRPSADAFASVFSVPTKLTAVTFNIPYFLLINLKRDTAGAFFYFLINIIIVFAMSHLFRCTIGSVSKTLPQAMVPASVLLALFAMYTGVAIPRV	
PDR15_SC	(599)	RTYSLYHPSADAFASVLSLEPPKLTAVCFNIIFYFLVDFRRNGGVFFYFLINVIATFTLSHLFRCVGSLTKTLQEAMVPASMLLALSMYTGVAIPKT	
PDR5_SC	(589)	RTYSLYHPSADAFASVLSLEPPSKLIIAVCFNIIFYFLVDFRRNGGVFFYFLINIIVAVFSMSHLFRCVGSLTKTLEAMVPASMLLALSMYTGVAIPKK	
Q96WM8_KLULA	(577)	KRYSLYHPSADALASMLSELPAKIITACFNLIILYFVNFRRRAGPFFYFLMNFATLIVMSAIFRCVGSATKTLSEAMVPASCLLALSLYVGFSLPKK	
Q96VK5_EMENI	(595)	YKYALYHPSAEAISSMVDLPAKVLVSVFNIIYFMTNLRRTAGHFFVYFLFSFTTITLMSNIFRWLGAISSRMAQAMVPSSIFMLILVIYTGFTIPVR	
O74637_PENDI	(557)	ARYAMYHPFAEAISSMCDMPYKILNATFNVTLYFMTGLRQNGAFTFMFLSFVTTITMSMIFRTIASYSRTLSQALVPAAILILGLVIYTGFTIPTR	
Q6MY55_ASPFU	(588)	ARYAMYHPFAEAISSMCDMPYKITNAIFNVTLYFMTNLRREPGAFFVFLFSFVTTITMSMIFRTMAASRTLSQALVPAAILILGLVIYTGFTIPTR	
Q96VK4_EMENI	(618)	ARYAMYHPFAEAISSMCDMPYKITNTFTFNIPLYFMTNLRREPGAFFHLLFSFVTTITMSMIFRTMAASRTLSQALVPAAILILGLVIYTGFTIPTR	
Q68AM6_PENDI	(579)	ARYAFHHFPAEALASMLCDMPYKIANSFTFNIPLYFMTHLRREGPFFTFWVFSVLTITFMSMIFRTIAASRSLSQALVPAAVLILGMVIYTGFTIPTR	
O13407_MAGGR	(627)	DRYALYHPSAEAVASMLCDMPYKVFNAIVFNLVLYFMANLRREPGAFFYLLISFATVLAMSMIFRTIASMSRSLQAMVPAAILILGLVIYTGFTIPLD	
Q96WW9_GIBPU	(585)	ARYAFHHASAESFASIIIDMPYKITNSLIFNIIYFMTNLRDAGAFFYLLVFSFIMVLAAMSGIFRSIASISRTLSQAMVPAAILILALVIYAGVLEIPVD	
Consensus	(701)	KRYALYHPSAEALASML DLP KIL AI FNIIYFMTNLRREAG FF FFL SFI TL MS IFRTIASVTKTLSQAM PASIILALVIYTGFI P	

Domaine ABC2 membrane

	801		900
ABC1_YL	(674)	YMHGWARWNYLNPVAYAFEAVMVNEFRNRFP	CGLYVP--SRSFYNSVPAESKSCVAIGAKLGQDYVDG
ABC2_YL	(655)	YMHGWARWINWLNVPVAYGFEAVMVNEFRNREY	ECMSFVPG--SGGAYENVSLDYRSCAAVGAEPGLRFV
ABC4_YL	(658)	YMHGWARWINWLNVPVAYGFEAVMVNEFRNDY	GCASVYPT--TGGEYDQDLQYKSCSVVGSVPAESSV
ABC3_YL	(645)	YMRGWARWNYIDPIAYGFEAVMVNEFRNRFP	CAALFVPT--QQSTYDQIGSPYQGCMAVGAAPGERF
ABC5_YL	(689)	TMHVWFKWLNRANPVAYGFEALMANEFHNRVMT	CEQIVP--AGPDYSGMPESNKVCSFSGSTPGSLVY
SNQ2_SC	(684)	SMHPWFKWISYVLPRIYAFESMLNAEFHGRHMD	CANTLVP--SGGDYDNLSDDYKVCVAVGSKPGQSV
BFR1_SCHPO	(705)	DVGWFRWLIAYLDPIQGFESMLINEFKARQF	ECSQLVPT--YGGSDYDNPVANKICPVVSAEPGTD
CDR4_CANAL	(682)	NMHGWCRIWNYLDPLAYAFESLIANEFHNRDF	ECSQYVPT--SGGSYPTA-GPNRICTPVGVSVP
Q6BHY4_DEBHA	(676)	EMLGWCRIWNYLDPIGYAFESLIANEFHGRDF	DCSQVFP--SGPGYPTS-GNSIICSVVGSQPGSDI
Q19S54_CANAL	(677)	YILGWSRWIRYINPVYIYIFESLMVNEFHGR	FEFCGQYIP--SGPGFENLPVENKVCITVGS
Q6BL45_DEBHA	(681)	SMLGWSRWIYINPIAYVFEALMANEYTD	DFECSQVFP--SGPGYEDRNSVHRICTATGSKAGS
PDR10_SC	(709)	QMLGWSKWIYINPLSYLFEESLMINEFHGRN	FPCAQYIP--SGPNYVNAATGDEVTCSALGSI
PDR15_SC	(699)	KILGWSIWIYINPLAYLFEESLMINEFHGR	NDFPCAQYIP--AGPAYQNTGTQRVCSAVGAY
PDR5_SC	(689)	KILRWSKWIYINPLAYLFEESLMINEFHGR	IKFPCAQYIP--RGPAYANLSTESVCTVAVG
Q96WM8_KLULA	(677)	NILGWSRWIYINPLSYIYIFESLMINEFHGR	DFPCAAYIP--SGSGYENLGLYERVCNTV
Q96VK5_EMENI	(695)	NMHPWFRWLNYPVAYGFEALMANEYTD	DFECSQVFP--DGPYADVPLSSKICSGRGAVAG
O74637_PENDI	(657)	NMLGWSRWNYIDPIAYGFEALIVNEFHGR	NDFPCAQYIP--AGDSYADVGRFNKICSAKGA
Q6MY55_ASPFU	(688)	NMLGWSRWNYIDPIAYGFEESLMVNEFHGR	FLCPDSAFVPSGAYDSQPLAYRVCS
Q96VK4_EMENI	(718)	NMLGWSRWNYIDPIAYGFEESLMVNEFHGR	FLPCAQYIP--YGDYANRVCAVVGATPGELM
Q68AM6_PENDI	(679)	NMLGWSRWNYIDPIAYGFEESLMVNEFHGR	NDFPCAQYIP--AAIVPSSGAYDSISMENR
O13407_MAGGR	(727)	YMLPWCRIWNYIDILAYGFEESLMINEFHGR	NDFPCAQYIP--RAEFPGYDLSGTNRICQAV
Q96WW9_GIBPU	(685)	YMLGWCRIWNYIDPIAYGFEESLMVNEF	SGRNFPCAQYIP--TCTGFVFNPLIPGYADV
Consensus	(801)	MLGWSRWIYINPIAYGFEESLMVNEFHGR	F CA YVP SG GY V RVCS VGS PG YV GD YL SY Y SHKWRNLGILIAFIIFFL
			Domaine PDR-CDR
	901		1000
ABC1_YL	(772)	GVYLLAAEYVIMAQSKGEVLLFRRKRSQH	RKNLAKPKDKRFQD-----VELGDNLGDHNL
ABC2_YL	(753)	AFYLFVAVYIQGAKSKGEVLLFRRKEHL	KKKQFKEK-----NGDIESGVTMAGEKGTQ
ABC4_YL	(756)	FCYLVAVYIQGAKSKGEVLLFRRKSYL	KKKIKKHA-----ANDEEAGAMMAGEK-SE
ABC3_YL	(743)	FTYLTAVYIQGAKSKGEVLLFRRSS	LKQRKRAHLMVDVEANAE-----KVGAAQDRE
ABC5_YL	(787)	FFNVTFSEYIQYHSSGDVLLFRRG	---HIPEELQKEG-----ADIDEVIADKAQ
SNQ2_SC	(783)	VLKVIFTEYKRPVKGGGDALEFKKKGSK	RFAHADEESP-----DNVNDIDAKEQFSS
BFR1_SCHPO	(803)	FVNIIVASETINFNFDLKEGYLVR	RGRHAPDAVKAANVNEGKPLDL-----ETGQ
CDR4_CANAL	(779)	CTYILLCEINKGAMQKGEVLLFRR	LKRRKANNDIE-----SGEIEKVTFEFDN
Q6BHY4_DEBHA	(773)	FVHILICEYNKGAMQKGEVLLFRR	LKRRQRKDIE-----SGNIEKVVNPEFNE
Q19S54_CANAL	(775)	GYYVALTEFNKGAMQKGEVLLFRR	LKSKKKTAAASNKGDI EAGPVAGKLDYQD
Q6BL45_DEBHA	(779)	FVYITLTFNKGSMQKGEVLLFRR	LKSSITDQKKSQKSGKSGKSGKSGKSGKSGK
PDR10_SC	(807)	FLYLFCEYNNEGAKQNGEMLVFP	PHSVVKMKKKGIVSEKKKKNQPTLSTSDA
PDR15_SC	(797)	FVYLLICEYNNEGAKQKGEVLLFRR	LKSKKQKLEKGRPGDIENNAGSSPDSATTE
PDR5_SC	(787)	FVYLFCEYNNEGAKQKGEVLLFRR	PSIIVKRMKRGVLTTEKNANDPENVERGERS
Q96WM8_KLULA	(775)	AFYLLFCEYNESAVQKGEVLLFRR	PKSVLRAKQKLIKAKKHDEAVQDSE
Q96VK5_EMENI	(793)	AAVILCEYLRAKPSKGEVLLFRR	RGKLPFAFAKVEVRRDEEDAKT-----
O74637_PENDI	(757)	VTYLVGTEYISEAKSKGEVLLFRR	RYAPKNSGNSDGDVEQTH-----GVSSA
Q6MY55_ASPFU	(788)	FTYLTATEYISEAKSKGEVLLFRR	RGAHQPTGSHDVEKSPVTH-----SAAK
Q96VK4_EMENI	(813)	FTYLTATEYISEAKSKGEVLLFRR	QAPPVNDVETHSP-----ATAGEKVDQ
Q68AM6_PENDI	(777)	STYLFATEYISEKSKGEVLLFRR	RGYQPAHAAGEGDLKSSQ-----PSA
O13407_MAGGR	(827)	SRTWLRPRMCKERKSKKGEVLLFRR	QRPAAIKDAKTDP EAGPP-----KVG
Q96WW9_GIBPU	(785)	IVYIVATEYISAKSKGEVLLFRR	SNMPANVKSDEPEAASSGP-----IPV
Consensus	(901)	- YLV TEYI AKSKGEVLLFRR LK KK	

	1001		1100	
ABC1_YL (834)	--TYSYQQP	QAQI	GVFQNTDVCYDIK	VAGENKRLLDHIDGYVVKPGTITALMGASGAGKTLLDVLADRKSTGIVHGDMLVNGQQRNASFORKTYVVOQ
ABC2_YL (807)	--SSNTSIN	QAQR	GIYQWKDVCYDIK	VGDGERRLLDHVDGFVVKPGTITALMGASGAGKTLLDVLADRKSTGVVTEMLVNGEHRDGSFORKTYVVOQ
ABC4_YL (809)	--SEDSSIN	QAQK	GIFQWKDVCYDIK	VGDGERRLLDHVDGWVVKPGTITALMGASGAGKTLLDVLADRKATGVITGDMLVNGEPRDESFORKTYVVOQ
ABC3_YL (808)	--TSSCTP	SDSTPKD	IFQWKDVCYDIK	VGGEKRLLDNVDGWVVKPGTITALMGCSGAGKTLLDVLADRKATGVITGDMLVNGQKRDESFORKTYVVOQ
ABC5_YL (841)	---MDRLLS	DEERD	FTWQNV	DYVIPLAGGTRKLLDNVQGYVVKPGTITALMGESGAGKTLLNVLRSQRI
SNQ2_SC (840)	---NDEVFDD	LEAKGVF	IWKDVCFT	IPYEGGKRLLDNVSGYCI
BFR1_SCHPO (869)	---NKEYEG	EKGHD	IFSWFN	LNIDYDIQIKGHRRL
CDR4_CANAL (833)	---NNQDKM	QSGGDT	FWRD	LYQVQIKSEDRV
Q6BHY4_DEBHA (829)	---NEIDNK	LPSSGD	IFHWREL	TYQVQIKSEDRV
Q19S54_CANAL (844)	---STGSVD	FENRE	IFWRD	LYQVQIKKEDRV
Q6BL45_DEBHA (845)	---ETAEKAL	LPSSND	IFHWREL	TYQVQIKSEDRV
PDR10_SC (907)	SFSKSD	DIELSKSQ	AIFHWK	NLCYDIPKNGK
PDR15_SC (868)	SSSDNAGL	GISKSEA	AIFHWK	DLCYDVPKGGQ
PDR5_SC (853)	ESDTYGEI	GISKSEA	AIFHWK	NLCYEVQIKKATR
Q96WM8_KLULA (844)	SSDKSVN	VGISKSEA	AIFHWK	NVCYDVQIKKETR
Q96VK5_EMENI (850)	-----VGA	ISKQTA	AIFHWQ	DVCYDIKIKGENR
O74637_PENDI (813)	--GEQESAA	IQQTS	IFQWQ	DVCYDVHINKERR
Q6MY55_ASPFU (841)	----EATGA	IQQEA	AIFQWQ	DVCYDIKIKGEP
Q96VK4_EMENI (863)	----QDVAN	IQQTA	AIFHWQ	DVCYDIKIKNEP
Q68AM6_PENDI (831)	----STTA	IQQTA	AIFQWQ	DVCYDIKIKGEP
O13407_MAGGR (884)	----NAGF	IQQTS	IFQWQ	DVCYEVQIKKETR
Q96WW9_GIBPU (836)	-----EVAN	IQGSTS	IFHWQ	DVCYDIKIKGEP
Consensus (1001)	----	I K	IF WRDVCYDIKIK E	RRILDHVDGWVVKPGTITALMG SGAGKTLLDVLADRVTMGVITG DMLVNG RD SFQRKTYVVOQ
	1101		1200	
ABC1_YL (931)	QDLHTATA	TVRESLEF	SALLRQ	PSSVSRADK
ABC2_YL (904)	QDLHTATA	TVRESLEF	SALLRQ	PSSIPES
ABC4_YL (906)	QDLHTS	TVRESLEF	SALLRQ	PSSISVK
ABC3_YL (905)	QDLHTATS	TVREAL	FSALLRQ	PSSVKA
ABC5_YL (937)	QDLHLA	ES	TVRESL	IFSA
SNQ2_SC (935)	QDLHIA	E	LVRESL	QFSA
BFR1_SCHPO (965)	QDVHIG	ES	TVREAL	RFSA
CDR4_CANAL (930)	QDLHLE	TS	TVREAL	RFSA
Q6BHY4_DEBHA (926)	QDLHLQ	TS	TVREAL	RFSA
Q19S54_CANAL (941)	QDVHLE	TS	TVREAL	RFSA
Q6BL45_DEBHA (942)	QDLHLPT	TS	TVREAL	RFSA
PDR10_SC (1006)	QDLHLK	TA	TVRESL	RFSA
PDR15_SC (967)	QDLHLK	TA	TVRESL	RFSA
PDR5_SC (952)	QDLHLK	TA	TVRESL	RFSA
Q96WM8_KLULA (943)	QDLHL	ST	TVRESL	RFSA
Q96VK5_EMENI (943)	QDLHL	ST	TVRESL	RFSA
O74637_PENDI (910)	QDLHLHT	TT	TVREAL	RFSA
Q6MY55_ASPFU (936)	QDLHLHT	TT	TVREAL	RFSA
Q96VK4_EMENI (958)	QDLHLHT	TT	TVREAL	RFSA
Q68AM6_PENDI (925)	QDLHL	ST	TVREAL	LVFS
O13407_MAGGR (978)	QDLHLQ	TT	TVREAL	LNFS
Q96WW9_GIBPU (930)	QDLHLE	TS	TVREAL	TFSA
Consensus (1101)	QDLHL	T	STVREAL	FSALLRQ

Boucle P

		1201		1300																																																														
ABC1_YL	(1031)	LLKKLAAN	GOAILCTIHQPSA	LLFQEFDRLLFLAAGGKTVYYGDLGDKASLLIEYFESNGADPCP DNENPAEWMLEVI GAAPGSRAKDWPSVWRY S QLR																																																														
ABC2_YL	(1004)	LLKKLAAN	GOAILCTIHQPSA	LLFQEFDRLLFLASGGRTVYYGDI GPSSILTEYFERNGADPCPKQENPAEWMLEVI GAAPGSTAKRDWPVWVAE S PER																																																														
ABC4_YL	(1006)	LLKKLAAN	GOAILCTIHQPSA	LLFQEFDRLLFLASGGRTVYYGDI GPSTILTSYFERNGADPCPKQENPAEWMLEVI GAAPGSTAKRDWPVWVNE S SER																																																														
ABC3_YL	(1005)	LLKKLANR	GOAILCTIHQPSA	LLFQEFDRLLFLM TLGGKTVYYGDI GANSALIN YFESK GADPCPEANPAEWMLEVI GAAPGSI AKHDWAVVWNE S EER																																																														
ABC5_YL	(1037)	FLKNLAAA	GOAILCTIHQPSA	TLFEFDRLLLLKKGQT VYF GDI GKNSNLVSYFERQGRKCAPDENPAEYILECIGAGATATADGDWHDKWKNS E EY																																																														
SNQ2_SC	(1035)	LLRKLSKA	GOAILCTIHQPSA	TLFEFDRLLLLRKGGQTVYFGDIGKNSATLLNYFERNGARKCDSSENP AEYILEAIGAGATASVKE DWHKWLNS VEF																																																														
BFR1_SCHPO	(1065)	FLRKLADAG	GOAILCTIHQPSA	VLFDQFDRLLLQKGGKTVYFGDIGHSKTLNLYFESHGAVHCPD DGNPAEYILDVIGAGATATTNRDWEHVWNS E ER																																																														
CDR4_CANAL	(1030)	LIRKLADN	GOAILCTIHQPSA	LLAEFDRLLFLQRGGQTVYFGDLGKNFTLLIN YFER YGAPKCPPEANPAEWMLEVI GAAPGSKANQDYDVWLK S EEF																																																														
Q6BHY4_DEBHA	(1026)	LIRKLADH	GOAILCTIHQPSA	LLKEFDRLLFLQRGGKTVYFGDLGDN CQTLIDYFEKYGAPKCPPEANPAEWMLEVI GAAPGSHA S QDYDVWMS T EHY																																																														
Q19S54_CANAL	(1041)	LMRKLADH	GOAILCTIHQPSA	LLMAEFDRLLFLQKGGRTAYFGE LGEN CQTMIN YFER YGANPCPEANPAEWMLEVI GAAPGSHA KQDYFEVWRNS E EY																																																														
Q6BL45_DEBHA	(1042)	LMRKLADH	GOAILCTIHQPSA	LLLQEFDRLLFLQKGGKTVYFGDLGENCQTLIN YFER YGAHHCPEANPAEWMLEVI GAAPGSHANQDYHEVWKN S TEF																																																														
PDR10_SC	(1106)	LMKKLASR	GOAILCTIHQPSA	LLMQEFDRLLFLQEGGQTVYFGE LGKGC TMIN YFEAHGAKHCPPEANPAEWMLEVI GAAPGTHA S QDYFAIWRD S E EY																																																														
PDR15_SC	(1067)	LMRKLATH	GOAILCTIHQPSA	LLMQFDRLLFLQKGGQTVYFGDLGEGCKTMDYFE SKG AHKCPPEANPAEWMLEVI GAAPGSHA TQDYNEVWRNS D EY																																																														
PDR5_SC	(1052)	LMKKLANH	GOAILCTIHQPSA	LLMQEFDRLFLMQRGGKTVYFGDLGEGCKTMDYFE SHGAKHCPPEANPAEWMLEVI GAAPGSHANQDYHEVWRNS E EY																																																														
Q96WM8_KLULA	(1043)	LMRKLADH	GOAILCTIHQPSA	LLMQEFDLFLQKGGKTVYFGNLGEGCQEMIN YFER YHGASKCPPEGANPAEWMLEVI GAAPGSHA TQDYHEVWRNS D EY																																																														
Q96VK5_EMENI	(1043)	LMRKLADH	GOAILCTIHQPSA	LLMQFDRLLFLAKGGKTVYFGE LGENMGTLIEYFEK KSTPCPNANPAEWMLEVI GAAPGSHA DRDWEVWNS Q S PER																																																														
O74637_PENDI	(1010)	LIDTLTKH	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLAKGGRTVYFGEI GEHS TL SN YFERNGAPKLSPEANPAEWMLEVI GAAPGTHS D IDWPAVWRS E PER																																																														
Q6MY55_ASPFU	(1036)	LIDTLTKH	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLAKGGKTVYFGEI GEKSTLAS YFERNGAPKLPPEANPAEWMLEVI GAAPGSHS D IDWPAVWRS E PER																																																														
Q96VK4_EMENI	(1058)	LIDTLTQH	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLAKGGKTVYFGEI GEKSTLAS YFERNGAPKLPPEANPAEWMLEVI GAAPGSHS D IDWPAVWRS E PER																																																														
Q68AM6_PENDI	(1025)	LLETLTKH	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLARGGRTVYFGEI GENS TL SN YFERNGAHHLTGEPNAEWMLEVI GAAPGTHS D IDWPKVWRS E PER																																																														
O13407_MAGGR	(1078)	LLEKLTKS	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLAKGGKTVYFGDIGKNSKIMTDYFERNGGFP CPHANPAEWMLEVI GASPGTTS D IDWHPQVWRS E PEC																																																														
Q96WW9_GIBPU	(1030)	LLEKLSKA	GOAILCTIHQPSA	MLFQRFDRLLFLAKGGRTVYFGDIGKNS ELLTN YFVKN GSDPCPKGENPAEWMLEVI GAAPGSHTEIDWHTWRS E S EY																																																														
Consensus	(1201)	LLRKLA	GOAILCTIHQPSA	LLFQEFDRLLFL KGGKTVYFGDIGENS TLI YFERNGA CP DANPAEWMLEVI GAAPGSHA DW EVWR S EY																																																														
		1301		1400																																																														
ABC1_YL	(1131)	RQORE	ELDD	MRLAFN-----	ADSQAALAVGGEDT	DFAVSQWT	QLYYVT	KRLLQF	HWRTPS	YLWS	KMTL	LCIGCAL	FIGFSFYK	SARD	IQ																																																			
ABC2_YL	(1104)	AAKRE	ELDE	MART	VERV-----	QTNTERDSTAGYSDSDQ	FAVGWWT	QFKIVS	KRQF	QALW	RTPSYLWS	KVFL	CAASAL	FIGFSFFKA	PNDM																																																			
ABC4_YL	(1106)	AAKRAE	ELDE	MAQT	VERT-----	QTNTERDSTAGYSDSDQ	FAVGWWT	QFKIVS	KRQF	QALW	RTPSYLWS	KVFL	CAASAL	FIGFSFFKA	PNDM																																																			
ABC3_YL	(1105)	ARERDL	LD	KMAE	ELAAQ	STHDEK	NELVTS	KSVGSS	QTS	SSSYSAKS	QATS	QAT	QLYYVT	KRLLW	TYWRS	PRYIWS	KLLMS	SIASAL	FIGFSYYKA	SQDI																																														
ABC5_YL	(1137)	RQTTDE	ELAK	QQ	ELAQ-----	RPQKELDP	SLQRK	YAAP	YMT	QLRW	VLRR	TQIQ	QFWRSP	GYIMAK	FMLL	IVGG	LF	IGFS	FWDIK	FTLS																																														
SNQ2_SC	(1135)	EQTKEK	VQD	IND	LSK-----	QETKSEV	G	KPSK	MAT	SAY	QFRY	VL	IRT	ST	FWRS	LN	YIM	KMM	ML	IVGG	LY	IGFT	FFNV	GKSYV																																										
BFR1_SCHPO	(1165)	KAT	SA	ELDK	IN	ASFNS	-----	EDK	TL	SKED	RST	YAM	LWF	QVKM	MT	RNF	QS	YWR	EPS	IL	MS	KL	AL	DF	AG	LF	IGFT	IFY	NQ	GL	GV																																			
CDR4_CANAL	(1130)	QEMNS	ELD	LM	SEL	VKK-----	PLDDDP	DR	LK	YAAP	YWE	QYLF	VT	KRV	FE	QNR	TPSYL	YS	KFL	LV	VT	SS	LF	NG	FSFYK	ADR	SL																																							
Q6BHY4_DEBHA	(1126)	REV	KG	ELD	V	MEQ	EL	VKK-----	PKDDSP	EM	KT	F	AV	FM	QY	IN	V	TR	V	LQ	YWR	TPSY	YS	KV	LS	IF	SS	LF	NG	F	FA	KANN	FM																																	
Q19S54_CANAL	(1141)	QAVKEE	EL	NR	EA	EL	SKL-----	PRDNDP	E	ALL	K	FA	AV	LK	QY	LL	V	SW	R	TIV	Q	WR	SP	GI	YS	K	LL	V	IS	SS	LF	IG	FS	FFK	KNN	LQ																														
Q6BL45_DEBHA	(1142)	QTVKDE	EL	AN	ME	EL	VSL-----	PRDESP	E	AKKS	KA	T	I	W	Q	Y	L	V	T	KRV	FE	QNR	SP	I	Y	YS	K	V	L	V	S	SA	LF	NG	FS	FFK	DR	SQ																												
PDR10_SC	(1206)	REM	QK	ELD	W	ME	EL	PKR-----	TEGSSN	E	QK	F	A	T	ST	LY	Q	I	K	V	S	R	L	F	H	Q	Y	WR	TP	F	Y	L	W	S	K	FF	ST	I	V	S	E	L	F	IG	FT	FFK	ANT	SLQ																		
PDR15_SC	(1167)	KAV	QE	ELD	W	ME	EL	PKR-----	SKEPTA	E	H	K	F	A	S	L	Y	Q	F	K	M	V	I	R	L	F	Q	Y	WR	SP	D	Y	L	W	S	K	F	I	L	T	I	F	N	Q	V	F	IG	FT	FFK	ADR	SLQ															
PDR5_SC	(1152)	RAV	QS	ELD	W	ME	EL	PKK-----	GSITAA	E	D	K	H	E	S	Q	S	I	Y	Q	T	K	L	V	S	R	L	F	Q	Y	WR	SP	D	Y	L	W	S	K	F	I	L	T	I	F	N	Q	V	F	IG	FT	FFK	GT	SLQ													
Q96WM8_KLULA	(1143)	QAV	QK	ELD	W	ME	EL	PKR-----	PLDTSS	E	Q	S	L	F	Y	Q	Y	K	V	V	L	R	L	F	E	Q	Y	WR	TPSY	I	WS	K	L	F	L	T	I	F	S	Q	L	F	IG	FT	FFK	AN	SLQ																			
Q96VK5_EMENI	(1143)	EQVRAE	EL	ARM	KA	EL	LQK-----	PEPPRT	P	E	Y	G	F	A	M	L	Q	S	F	L	I	C	L	K	R	M	F	Q	Y	WR	SPSY	I	YS	K	A	T	V	C	V	I	P	L	F	IG	FT	FW	REP	LSQ																		
O13407_MAGGR	(1110)	KAV	QNH	EL	A	E	L	RNN	LSL	KP-----	VATDND	P	A	G	F	N	E	F	A	P	F	A	V	Q	L	R	V	F	S	Q	Y	WR	TP	I	Y	I	S	K	T	A	L	C	S	L	T	A	L	V	G	F	S	FFK	A	QNS	SMQ											
Q6MY55_ASPFU	(1136)	RAV	HEH	EL	E	K	R	T	LS	QKP-----	IDPSKAD	P	G	S	Y	D	E	F	A	F	T	I	Q	L	W	E	C	L	R	V	F	S	Q	Y	WR	TP	V	Y	I	S	K	T	A	L	C	V	L	T	A	L	V	G	F	S	FFK	A	QNS	SAQ								
Q96VK4_EMENI	(1158)	QAV	HQH	EL	A	E	K	T	LS	QKP-----	TETSAD	P	S	E	Y	N	E	F	A	F	S	V	Q	L	W	E	C	L	R	V	F	S	Q	Y	WR	SP	V	Y	I	S	K	A	A	S	I	L	T	S	L	V	G	F	S	FFK	A	QNS	TRQ									
Q68AM6_PENDI	(1125)	GQV	KD	H	S	E	K	S	T	SSK-----	AAVDT	S	P	N	A	F	R	E	F	A	F	H	V	Q	L	E	C	L	R	V	F	A	Q	Y	WR	TP	T	Y	I	WS	K	A	A	L	C	I	L	T	S	L	V	G	F	S	FFK	A	QNS	SLQ								
O13407_MAGGR	(1178)	ADV	HA	ELD	R	L	K	E	Q	V	P	N-----	TPPT	E	D	K	A	S	Y	R	E	F	A	F	H	Q	I	Y	A	V	T	H	R	V	F	Q	Y	WR	TPSY	I	Y	A	K	A	A	L	C	A	V	T	A	L	F	IG	F	V	F	D	A	P	N	IQ				
Q96WW9_GIBPU	(1130)	QEV	Q	Q	EL	Q	R	K	A	E	G	N	A-----	GGAE	I	H	D	A	E	S	Y	R	E	F	A	F	F	G	E	Q	L	R	I	A	T	R	V	F	Q	Y	WR	TPSY	I	Y	S	K	A	A	L	C	I	Q	V	G	L	F	I	G	L	V	F	L	N	P	L	SLR
Consensus	(1301)	V	ELD	M	EL						E	E	F	A	P	W	Q	L	V	T	R	V	F	Q	Y	WR	TPSY	I	Y	S	K	L	I	S	A	L	F	I	G	F	S	FFK	A	SLQ																						

	1401		1500
ABC1_YL (1214)	GLQNMFSIFLMFLIFTTVAEQIMPLFIQRDLYEAREERASKTYSWQVFLGGNMLAELPWQIIVAVVFFCMYYPIGFYRIAAENHQTCERGALYFLFL		
ABC2_YL (1191)	GLQNMFSFFMLFLIFNTVVEQIIPQFDKMRLEYEARERSKTYSWQVFMGSNMVVELIQQFFMGVIVFFCFYYPVGFQWIAEYNDSVHERGGLFLYVL		
ABC4_YL (1193)	GMQNMFSFFMLFLIFNTVVEQIIPQFDQMRLEYEARERSKTYSWQVFMASNMVVELISWQFLMGVIVFFCFYYPVGFQWIAEHNNSVHERGALFLYVL		
ABC3_YL (1205)	GLQNMFAFFMLFLIFVILMVOILPHFAQRELYEARERSSMAYSWQAFMGSNILVELPWQTLVAVVFFCFYYPVGLQNNATGHLGE--RGALFFLLLW		
ABC5_YL (1219)	GMQNAIFAVFMITTLSVPLINQIQSFAFQSRKELFEVRESSSNIFHWSCLLFSQFISELPPYALIGGTIFYCCVYFP TKLGTSARVA-----GYFYFYAL		
SNQ2_SC (1217)	GLQNAMFAAFISILSAPAMNQIQGRAASRELFVRE SQSNMFHWSLVLITQYLSLPPYHLFFSTIFYVSSYFPRLIFFEASRS-----AVYFLNYCI		
BFR1_SCHPO (1248)	NIQNKLFVEMATVLAVPLINGLQPKFTELNRNVEVREKPSNIYSWVAFVFSAILIVEIPFNLVFGTEFFLCWFYPIKFYKHIHPGDK---TGYANLLYM		
CDR4_CANAL (1211)	GLQNMFSVEMFLVILHTLIQQYLPTFVSQRDLYEVRERPSKTFSSWITFLAAQVTAELPWNICGTIGYFCWYYPVGLYQNAITYNTVHQRGAFMFAIV		
Q6BHY4_DEBHA (1207)	GLQNMFSVEMFFVIFNTLIQQYLPNVVSQRDLYEARERPSKTFSSWAFITAQITAEIPWQILGTIAFFFCWYYPVGLYNAEATDTSQRGALMWTIIV		
Q19S54_CANAL (1222)	GLQSOMLAVEMFFVPTTFIDQMLPYFVKHRAVYEVREAPSRTFSWFAFIAGQITSLEIPFOIVVGTISYFCWYYPVGLYANAEPDTSVNSRGLVMWLLIT		
Q6BL45_DEBHA (1223)	GLQNMFAVEMFLVFNITLVOQILPGFVKQRDVEVRESPSKTFSSWAFITAQITSLEIPYQVLVGTIAFFLCWYYPVGFYENSVPNTVDRAVTMWLYIT		
PDR10_SC (1287)	GLQNMFLAVEMFTVFNPLIQQYLPPLFVQRELYEARERPSRTFSWKAFTVSQILVELPWNLLAGTIAFFVYYPVGFYRNASYANQIHERGALFWLIFAC		
PDR15_SC (1248)	GLQNMFLAVEMFTVFNPLIQQYLPPLFVQRELYEARERPSRTFSWLAFFLSQIIVEIPWNLLAGTIAFCIYYAVGFYANASAAGQIHERGALFWLIFSL		
PDR5_SC (1233)	GLQNMFLAVEMFTVFNPLIQQYLPPLFVQRELYEARERPSRTFSWISFIFAQIFVEIPWNLLAGTIAFFIYYPIGFYSNASAAGQIHERGALFWLIFSC		
Q96WM8_KLULA (1223)	GLQNLFAVEMFTTFTVFNPAQQYLPPLFVSQRDLYEARERPSRTFSWLAFFISQITVEIPNLICFGTIAFFVYYPVGFYNNASYAGQIHERGALFWLIFSV		
Q96VK5_EMENI (1224)	GMQNMFAVEMFLVIFPNLVQMMPLYVTRALYEVREPSKAYSWKAFMASICVELPWNILMAVPAFCWYYPVGLYRNAG-PGETV ERGGTMTFLIL		
O74637_PENDI (1194)	GLQNMFSIFMLMIFGNLVQOIMPHFVTRSLYEVREPSKTYSWQAFMSANILVELPWNALMSVLIFFLCWYYPVGLQRNAS-ADDIHERGALMWTLLI		
Q6MY55_ASPFU (1220)	GLQNMFSIFMLMIFGNLVQOIMPNECTORSLYEVREPSKTYSWKAFMAANIIVEIPWNTLMAFLIFVWYYPVGLYRNAEPTDTSVHERGALMWTLLI		
Q96VK4_EMENI (1242)	GLQNMFSIFMLMIFGNLVQOIMPNEFVTRALYEVREPSKAYSWKAFMTANILVELPWNILMAVIMYFCWYYPVGLYRNAEPTDTSVHERGALMWTLLI		
Q68AM6_PENDI (1207)	GLQNMFSVEMLMTIFGNLVQOIMPNEFVTRSLYEVREPSKTYSWKAFMISNILVEIPWNTLMAALIMYFCWYYPVGLYKNAEPHTAVSERGALMWTLLI		
O13407_MAGGR (1260)	GLQNMFAVEMLTLTVFQGLVQMLPMHFVTRSLYEVREPSKTYSWKVFMLSQIIVEIPWNLMAVIMYFCWYYPVGLERNALADQVTERGALMWTLLI		
Q96WW9_GIBPU (1213)	GLQNMFAVEMLTLTVFQGLVQMLPMHFVTRSLYEVREPSKTYSWKVFMLSQIIMAEIPWNTLMSVFLVFCIYYPVGFQKNAEFAQQTAERGLMWTLLI		
Consensus (1401)	GLQNMFAVEML VIF LVQOILP FV QRDLYEVREPSKTYSW AFM SQILVELPWNILMG I FFCWYYPVGLY NA V ERGAL WL IL		
Domaine ABC2 membrane			
	1501		1600
ABC1_YL (1314)	VFFIYDSTVAHMI GVMFNHETAAANFAYLLFSFCLMFCGVLATKESMPGFWIFMYRASELTYFVIGFMAFGLAGGKVTCSQHEILQKFLKQ-----		
ABC2_YL (1291)	LLFLYNSTFAHMIAGIENKDTAAQIGTLFLTLMLIFCGVLATKEQMPGFWFMYRVSSELYFVGGMMATGMGRAPVTCSPHELVRFPVAVG-----		
ABC4_YL (1293)	LLFLYNSTFAHMMIAGIENKDTAAANIGNLLFSLMLIFCGVLATKEQMPGFWIFMYRVSSELYFVGGMLATGIGRAPVTCSGNEIVRFQTFPG-----		
ABC3_YL (1303)	SFYVYNSTFAHMMGAAFENKETAATIGYLLFALCLIFCGVLATKEDMPHFWIFMYRVSSELYLISGLLSAGVGETRVECTDNELVLFKPMNG-----		
ABC5_YL (1313)	LFNLYYLSFGLWILYFSPDVPASIIITSLMFSFVIAFCGVMPASLMPGFWTFMYKLSSEFTYLIQAYVGDVMHDRKVTCLPREFSRFPNPPSG-----		
SNQ2_SC (1311)	MFQLYVGLGLMILYMSPNLPSANVILGLCLISFMLSFCGVTPQVSLMPGFWTFMWKASPTTYFVQNLVGMILHKKPVVCKKKEILNYFNPPNG-----		
BFR1_SCHPO (1345)	FFQMYFSTFGQAVASACPNQIASVNSLLFTFVITFNGVLQPNNSLVGFVHWHMSLTPFTYLIIEGLLSDLVHGLPVECKSHEMLTINPPSG-----		
CDR4_CANAL (1311)	LFPIYSTIAQLICISFLEIDNAANLSVLLFTMCLAFCGVLVTKEQLPGFWFMYRCSEFTYLVSVMLSVGLVDAPVTCAAKEYLRFSPQG-----		
Q6BHY4_DEBHA (1307)	LFPIYCTMAQLCISFMEVADNAANLASLFTMCLTFCGLASPDAMPGFWIFMYRCSEFTYLVSAILSVLQDSSVTCSDKELLRFEEFG-----		
Q19S54_CANAL (1322)	AFYVYTSTMQLAISFNEELIDNAANLATTFLTCLMFCGVLGPNVLPGFWIFMYRCSEFTYLIQATLSTGLANAKVTCAPRELVTLKPPMG-----		
Q6BL45_DEBHA (1323)	AFYVYTSTMAHVCISFNEELADNAANLAINFFTCLMFCGVLISPEAMPGFWIFMYRVSSELYVVGMMSTGLANNGVCCSKELLRFEEFSG-----		
PDR10_SC (1387)	AFYVYISSMGLVVISCIETAENANLASLFFIMSLFCGVLATPNI LRFWFIFMYRVSSELYLIDALLSVGLANASVCCSNELLKIVPPSG-----		
PDR15_SC (1348)	AFYVYIGSMGLLISFNEVETAAHMGTLLFTMALSLFCGVMTIPSA LRFWFIFMYRVSSELYMIDALLALGVANVDVKCSNYEMVKITPPSG-----		
PDR5_SC (1333)	AFYVYVGSMLLVISFNQVAESAANLASLFTIMSLFCGVMTIPSA LRFWFIFMYRVSSELYFIQALLAVGVANVDVKCADYELLEFTPPSG-----		
Q96WM8_KLULA (1323)	SFYVFISSMGLCISFMEVADNAANLSLFTMCLNFCGVFGGSGVLPGFWIFMYRSEFTYLVSVLSTGLANNPVTCANYEYVSNFPPSG-----		
Q96VK5_EMENI (1323)	IFMMFTSTFSMVIAGIEHPDTGSNIAQLLFLNCGVLATPQQMPGFWIFMYRVSSELYLVSSVLSLSTGLSAGAEVCCSDIETLKIPEPDG-----		
O74637_PENDI (1293)	TFMLFTSTFSHMMIAGIELAETGGNLANLLFSLCLIFCGVLATPKMPHFWIFMYRVSSEFTYLVSAMLSTGTSAGAKVECESVELLHFEFTAG-----		
Q6MY55_ASPFU (1320)	SFLFTSTFAHMMIAGIELAETGGNLANLLFSLCLIFCGVLAPPQS LRFWFIFMYRVSSEFTYLVSAMLSTGVSGTNAVCEPVEFLHFDPPSN-----		
Q96VK4_EMENI (1342)	AFLFTSTFAHMIAGIELAETGGNIAQLLFSLCLIFCGVLGPDVLPGFWIFMYRVSSEFTYLVSAMLSTGVS GTTAYCEQVEYLTLYPPSN-----		
Q68AM6_PENDI (1307)	SFLFTSTFAHMIAGIELAETGGNIATLLFSLCLIFCGVLATKEAMPGFWIFMYRVSSEFTYLI SAMLSTGVS GADAVCEAVEYLFKFNPPAN-----		
O13407_MAGGR (1360)	GFLIFTSTFDLMIAGFETAAGGNIANLFFSLCLIFCGVLNPD LRFWFIFMYRVSSEFTYLVGLLSVAVANSEVRCASNEFLHFDLNGTCAEFMRN-----		
Q96WW9_GIBPU (1313)	QFLIFTCTFAHAAIATETAAGGNLANVVFMLSLFCGVFGSPDNMPGFWIFMYRVSSEFTYLVSAI LSTGLI GNAEVTCTAQELITFNPPN-----		
Consensus (1501)	-FYLY STFA MMIAG E AETAANLA LLFSLCLIFCGVLATPE MPGFWIFMYRVSSEFTYLV AMLSTGLA V CS ELL F PP G-----		

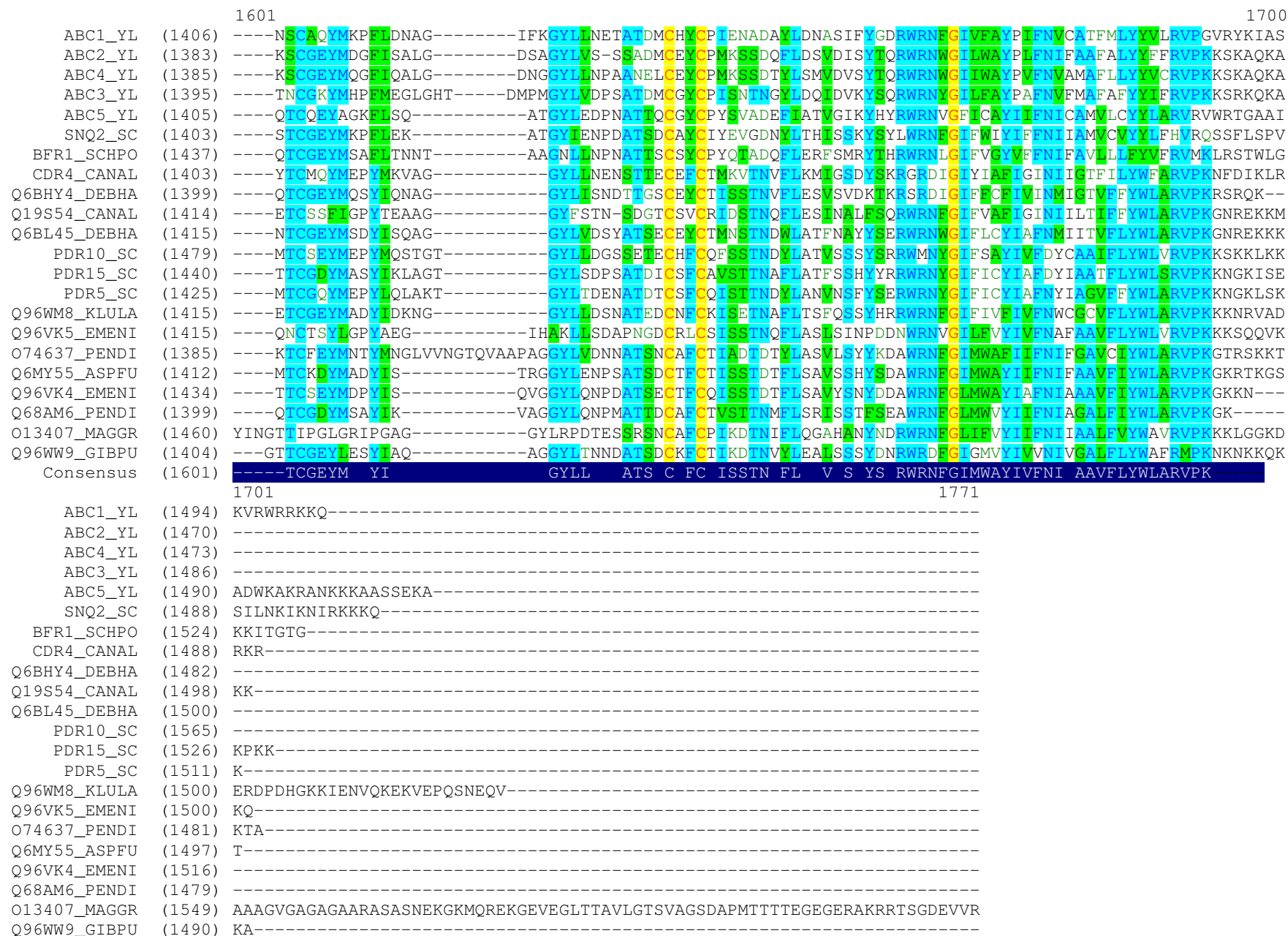


Figure 43. Alignement multiple réalisé avec le programme CLUSTALW des 17 séquences d'acides aminés déduites présentant des similitudes avec les Abcp de *Y. lipolytica*. Les acides aminés sont surlignés : en jaune lorsqu'ils sont identiques, en bleu (hautement) et en vert lorsqu'ils sont similaires. Les motifs caractéristiques conservés sont signalés par un encadré et les domaines sont indiqués par le surlignement de la séquence consensus.

D.4. Analyse phénotypique d'une famille d'ABC transporteur

D.4.1. Construction des souches mono et multidisruptées

Le système combinant la méthode SEP et le système de recombinaison Cre *lox* (Matériel et Méthodes) a été utilisé afin d'obtenir des souches monodisruptées pour les gènes *ABC1* à *ABC4* et des souches multidisruptées pour ces mêmes gènes (Tableau 17).

Dans un premier temps, nous avons construit une série de vecteurs contenant les régions « promoteur » (P) et « terminateur » (T) de chaque gène. Le marqueur URA_{ex} a été introduit au site *I-SceI* afin d'obtenir les cassettes de disruption. Celles-ci ont été amplifiées par PCR, purifiées sur gel et utilisés pour transformer la souche H222-41. La sélection des transformants a été réalisée sur YNB Casa. La disruption a été vérifiée par PCR puis digestion enzymatique. Les monodisruptants obtenus sont résumés dans le Tableau 17.

Les mutidisruptants $\Delta abc1,4$, $\Delta abc1,4,3$ et $\Delta abc1,4,3,2$ ont été obtenus par la répétition successive d'une transformation avec le vecteur répliatif pUB4-CRE permettant d'exciser le marqueur d'auxotrophie *URA3* ainsi que des différentes étapes de sélection et d'une transformation des différentes cassettes de disruption correspondant aux gènes *ABC*. Les différentes souches construites lors de cette étude sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17. Caractéristiques des souches de *Y. lipolytica* utilisées.

Souches	Caractéristiques
JMY322	H222
JMY1261	Z110, H222-41 MTC <i>URA3</i>
JMY 1227	H222-41, $\Delta abc1::URA3$
JMY 1228	H222-41, $\Delta abc2::URA3$
JMY 1235	H222-41, $\Delta abc3::URA3$
JMY 1236	H222-41, $\Delta abc4::URA3$
JMY 1308	H222-41, $\Delta abc1, \Delta abc4::URA3$
JMY 1314	H222-41, $\Delta abc1, \Delta abc4, \Delta abc3::URA3$
JMY 1323	H222-41, $\Delta abc1, \Delta abc4, \Delta abc3, \Delta abc2::URA3$

D.4.2. Phénotypes de croissance

La capacité des souches précédemment décrites à se développer sur différents substrats hydrophobes a été testée.

◆ *Tests en gouttes*

Des tests de croissance sur boîte en présence de glucose, d'acides gras et d'alcanes ont été réalisés en utilisant les souches Δabc . Nous n'avons observé de différences qu'en présence d'alcanes (Figure 44).

Cette analyse montre que le mutant $\Delta abc1$ présente le même phénotype en présence d'alcanes (C10⁺, C16⁻) que les mutants N046 et B095 confirmant ainsi que la disruption complète du gène *ABC1* confère le même phénotype. Les mutants $\Delta abc2$, $\Delta abc3$ et $\Delta abc4$ se développent comme la souche sauvage sur décane ou hexadécane. Sur décane, pour les souches multidisruptées, aucune différence n'est visible. Cependant, sur hexadécane, les croissances du triple ($\Delta abc1,4,3$) et du quadruple ($\Delta abc1,4,3,2$) mutant semblent plus altérées que celles des mutants $\Delta abc1$ et $\Delta abc1,4$.

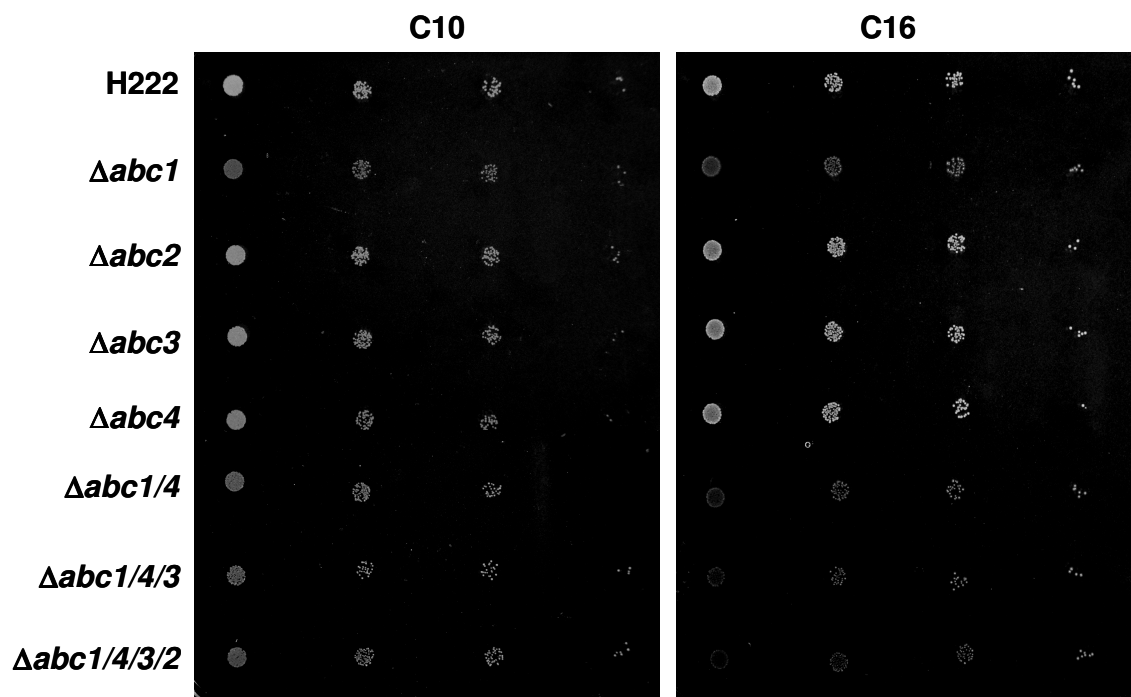


Figure 44. Phénotypes de croissance sur boîte des mutants *ABC* en fonction de la longueur de chaîne carbonée. Une préculture sur YPD est réalisée durant une nuit. Celle-ci est centrifugée et remise en suspension à DO_{600} 1. Des aliquots de 10 μ L issus de différentes dilutions (non dilué, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cette suspension cellulaire sont déposés sur un milieu minimum en présence de décane (C10) ou d'hexadécane (C16).

Ces résultats confirment que le gène *ABC1* est requis pour l'utilisation de l'hexadécane. Il semble qu'aucune délétion des gènes *ABC* n'affecte la croissance sur décane. Cependant, les gènes *ABC2* et/ou *ABC3* pourraient avoir un effet faible pour l'utilisation de l'hexadécane. Toutefois, ces tests en gouttes correspondant à une croissance avec des alcanes ajoutés en phase vapeur ne reflètent pas exactement l'effet de tests en culture liquide.

◆ *Tests en culture liquide*

Les croissances en culture liquide de la souche sauvage H222, du mutant Z110 et des mutants monodisruptés Δabc sont mesurées en présence de décane, d'hexadécane ou d'un mélange équimolaire de décane et d'hexadécane.

En présence de décane, l'ensemble des mutants Δabc se développe de manière similaire à la souche sauvage. Toutefois à partir de 30h, les mutants $\Delta abc4$ et $\Delta abc2$ sont caractérisés par une décroissance pouvant refléter une lyse cellulaire (Figure 45). Ce phénomène est plus marqué pour la souche $\Delta abc2$. Les gènes *ABC2* et *ABC4* pourraient donc être impliqués dans l'utilisation des alcanes à courte chaîne carbonée ou dans la viabilité cellulaire en phase stationnaire.

En présence d'hexadécane, seul le mutant $\Delta abc1$ est affecté, sa croissance étant complètement inhibée. Cependant, nous observons une faible diminution de la DO pour le mutant $\Delta abc3$ à partir de 30h.

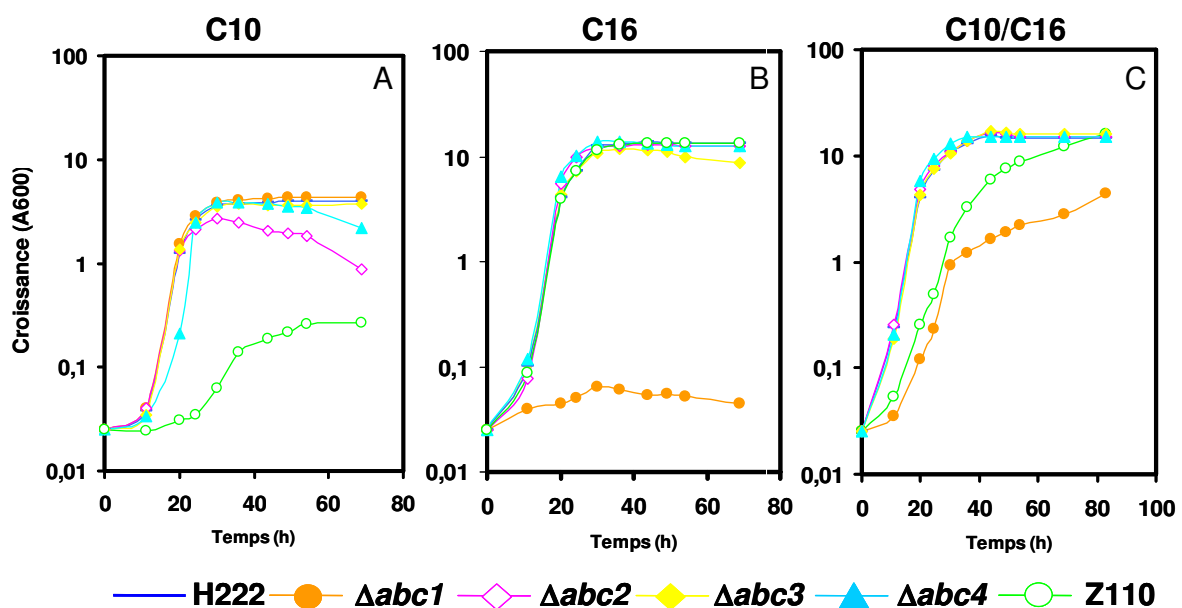


Figure 45. Comparaisons de croissance des mutants Δabc monodisruptés en présence d'alcanes.

Les alcanes testés sont le décane (A), l'hexadécane (B) et un mélange équimolaire de décane et d'hexadécane (C). Les souches de *Y. lipolytica* utilisées sont la souche sauvage H222 (—), $\Delta abc1$ (—●—), $\Delta abc2$ (—◇—), $\Delta abc3$ (—◆—), $\Delta abc4$ (—▲—) et Z110 (—○—). La croissance est testée dans des fioles à baffles sur milieu minimum YNBY complété par 0,15% d'extrait de levure et de 1% d'alcanes comme sources de carbone et répétée à trois reprises. Des cultures dans 50 mL de YNBY dans des fioles sont inoculées avec des cellules issues d'une préculture d'une nuit sur YPD à une DO_{600} initiale de 0,025.

L'absence de croissance du mutant $\Delta abc1$ sur hexadécane et la fonction d'exporteur des ABC transporteur de type PDR, laisse supposer qu' $abc1p$ serait plutôt impliqué dans l'export de l'hexadécane et non pas dans l'entrée de celui-ci dans la cellule. Si c'est le cas, la présence d'hexadécane devrait affecter la croissance sur décane. Nous avons donc testé la croissance des souches délétées des gènes *ABC* sur un mélange équimolaire C10/C16 (Figure 45C). Pour le mutant Z110, nous observons un retard de croissance d'environ 5h, une croissance légèrement réduite puis ralentie en fin de croissance par rapport aux autres mutants. Ceci suggère une utilisation première du C16. Pour le mutant $\Delta abc1$, nous observons un retard de croissance similaire au mutant Z110, une croissance initiale similaire à la croissance sur C10 puis un arrêt brutale de la croissance à une densité optique égale à 1 (μ_{\max} : 0,037 +/-0,015h⁻¹).

Dans les mêmes conditions, les multidisruptants (construits à partir du mutant $\Delta abc1$) présentent le même phénotype de croissance que le mutant $\Delta abc1$ (Figure 46), c'est-à-dire une croissance sur C10, une absence de croissance sur C16 et une croissance sur C10/C16 marquée par un retard de croissance et un ralentissement important à partir de 30h (μ_{\max} : 0,030 +/-0,02h⁻¹). On note toutefois une croissance plus faible, du triple et du quadruple mutants en présence de C10, caractérisés par la disruption supplémentaire du gène *ABC3*.

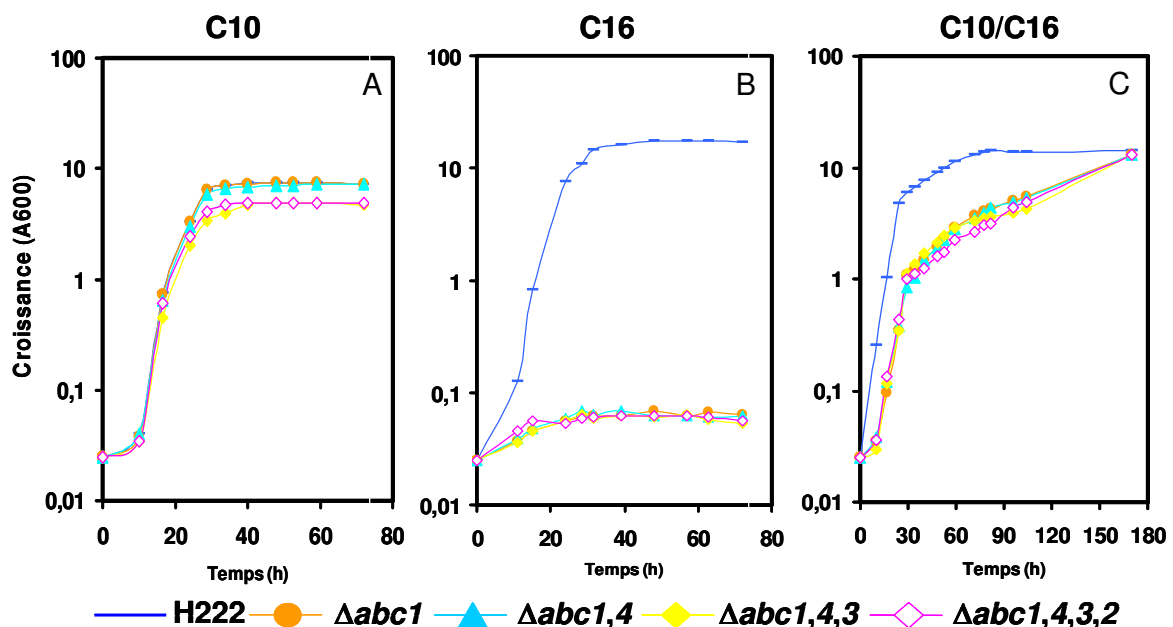


Figure 46. Comparaisons de croissance des mutants Δabc multidisruptés en présence d'alcanes.

Les alcanes testés sont le décane (A), l'hexadécane (B) et un mélange équimolaire de décane et d'hexadécane (C). Les souches de *Y. lipolytica* utilisées sont la souche sauvage H222 (-), $\Delta abc1$ (-●-), $\Delta abc1/4$ (-▲-), $\Delta abc1/4/3$ (-◆-), et $\Delta abc1/4/3/2$ (-◇-). La croissance est testée dans des fioles à baffles sur milieu minimum YNBY complété par 0,15% d'extrait de levure et de 1% d'alcane comme sources de carbone. Des cultures dans 50 mL de YNBY dans des fioles bafflées sont inoculées avec des cellules issues d'une préculture d'une nuit sur YPD à une DO_{600} initiale de 0,025.

D.4.3. Bilan

L'ensemble de ces données confirme que le gène *ABC1* est impliqué dans le transport des alcanes et plus spécifiquement des alcanes à longue chaîne carbonée (> 14 atome de carbone) (Tableau 18). L'ABC transporteur codé par *ABC1* pourrait être responsable du transport des alcanes à longue chaîne carbonée à l'intérieur de la cellule ou alternativement de leur export à l'extérieur de la cellule afin de maintenir une concentration intracellulaire d'alcanes en dessous du seuil de toxicité.

L'absence de croissance sur C16 et le ralentissement brutal de la croissance en présence d'un mélange C10/C16 observés, semblent révéler un effet toxique du C16 pour la souche délétée du gène *ABC1* et renforce l'hypothèse selon laquelle *abc1p* aurait une fonction dans le phénomène de détoxification en tant qu'exporteur d'alcanes à longue chaîne carbonée.

Tableau 18. Phénotypes de croissance des mutants Δabc sur alcanes de différentes longueurs de chaîne.

Gène(s) disrupté(s)	Phénotypes de croissance sur alcanes
$\Delta abc1$	C9: +/- C10/C11/C12: + C13: -/+ C14/C15/C16/C17: - Mélange C10/C16: +/- (Retard de croissance)
$\Delta abc2$	C10: +/- (chute de la DO après 30h) C16: + Mélange C10/C16: +
$\Delta abc3$	C10: + C16: + (chute de la DO après 30h) Mélange C10/C16: +
$\Delta abc4$	C10: +/- (chute de la DO après 30h) C16: + Mélange C10/C16: +
$\Delta abc1,4$	C10: + C16: - Mélange C10/C16: +/- (Retard de croissance)
$\Delta abc1,4,3$	C10: +/- C16: - Mélange C10/C16: +/- (Retard de croissance)
$\Delta abc1,4,3,2$	C10: +/- C16: - Mélange C10/C16: +/- (Retard de croissance)

L'ABC transporteur *abc2p* pourrait être impliqué dans l'utilisation des alcanes à chaîne courte. En effet, nous observons une croissance plus faible et une perte de la viabilité cellulaire lorsque le gène *ABC2* est délété. La souche délétée du gène *ABC3* présente une perte de viabilité sur C16 suggérant qu'*abc3p* pourrait être impliqué de manière indirecte, dans l'utilisation des alcanes à longue chaîne carbonée. Cependant, la délétion de ce gène, en plus des gènes *ABC1* et *ABC4*, n'entraîne aucun phénotype de croissance sur C16 mais une plus faible croissance sur C10.

De la même manière, *abc4p* pourrait être impliqué dans l'utilisation des alcanes à chaîne courte. Cependant, aucun phénotype de croissance n'apparaît lorsque que l'on délète le gène correspondant dans le cadre de disruptions multiples.

Les ABC transporteurs *abcp2*, *abc3p* et *abc4p* pourraient jouer un rôle indirect dans le transport des alcanes. Ils pourraient être impliqués dans la régulation ou avoir une faible activité de transport. Seul l'ABC transporteur *abc1p* présente un phénotype marqué de croissance sur alcanes à longue chaîne carbonée. Afin de déterminer sa fonction (importeur ou exporteur), des cultures du mutant $\Delta abc1$ en présence d'alcanes radiomarqués ont été réalisées.

D.5. Fonction du transporteur Abc1p

Afin de déterminer la fonction de l'ABC transporteur codé par le gène *ABC1*, des mesures de la consommation de l'hexadécane par le mutant $\Delta abc1$ ont été réalisées par CPG. Cependant, aucun résultat concluant n'a pu être déterminé et ceci dû principalement à la faible solubilisation de l'hexadécane et à l'échantillonnage non homogène. C'est pourquoi de l'hexadécane marqué au carbone 14 a été utilisé.

Des précultures de la souche sauvage et de la souche $\Delta abc1$ ont été réalisées sur milieu riche pendant une nuit. A partir de celles-ci, des cultures sur milieu minimum YNB et en présence d'extrait de levure ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) sontensemencées à une densité optique égale à 0,1 dans des fioles pénicilline hermétiques. Après deux heures de croissance en présence ou en absence d'hexadécane non radioactif (0,005%), de l'hexadécane radioactif est ajouté (0,01% ; $2,2 \cdot 10^5$ d.p.m.). A différents temps, l'ensemble de la culture est filtrée puis lavée (méthanol/chloroforme [1/1, v/v]) afin d'éliminer l'alcane résiduel fixé à la surface des cellules de levure. Les lipides extraits sont considérés comme de faible importance (Gill et Ratledge, 1972). Le filtre et le filtrat sont placés respectivement dans le liquide de scintillation et la radioactivité est mesurée. Les résultats présentés correspondent à un essai en absence d'hexadécane non radioactif.

Les cinétiques d'incorporation de l'hexadécane dans les cellules de la souche sauvage et de la souche $\Delta abc1$ présentent une phase de latence d'une heure en début de culture (Figure 47) alors qu'elle est absente après induction avec de l'hexadécane non radioactif (Résultats non présentés). De plus, l'assimilation de l'hexadécane radioactif est relativement lente. En effet, environ 40% de l'hexadécane radioactif sont incorporés dans les cellules au bout de 8h. Ces deux éléments pourraient correspondre à l'induction d'un transport actif de ce substrat ou à une modification de la perméabilité cellulaire.

Nous constatons que les vitesses d'incorporation de l'hexadécane radioactif par les cellules de la souche sauvage et de la souche $\Delta abc1$ sont similaires (respectivement 9337 dpm.h⁻¹ et 9084 dpm.h⁻¹). Cependant, alors que la souche sauvage présente après la phase de latence une croissance exponentielle, la souche $\Delta abc1$ ne se développe que faiblement (uniquement sur l'extrait de levure).

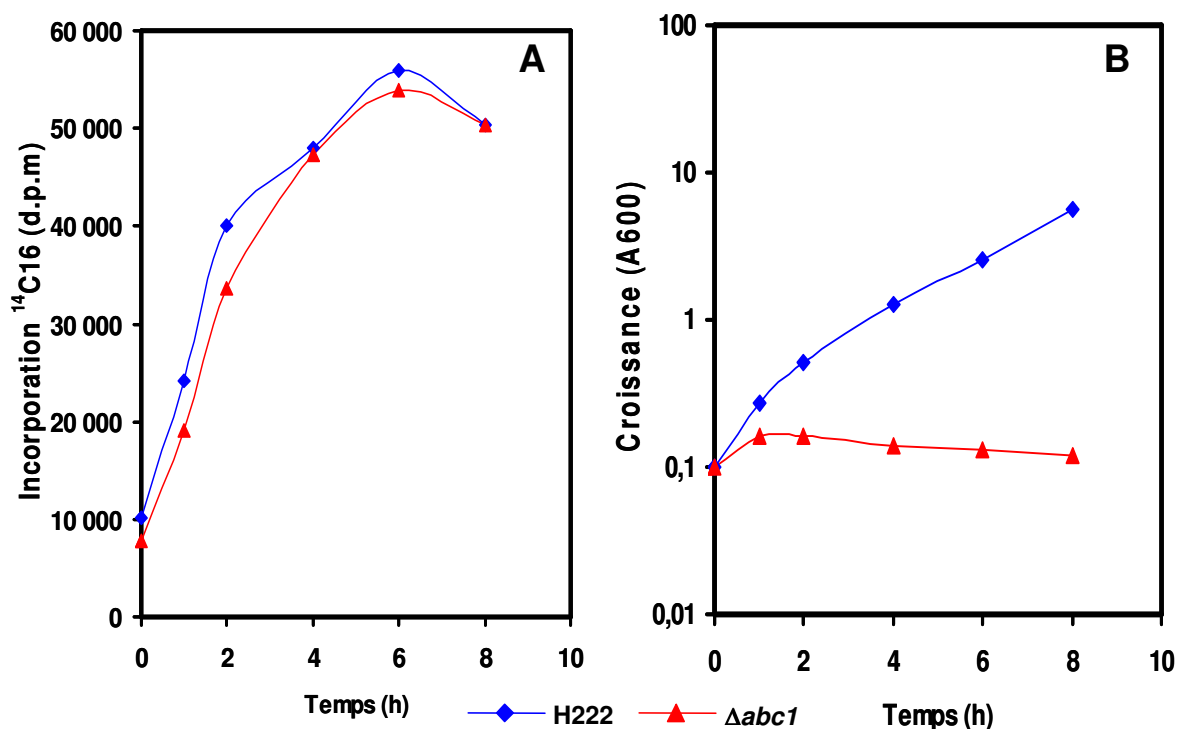


Figure 47. Comparaison de l'incorporation de l'hexadécane radioactif (A) dans les cellules et de la croissance (B) des souches sauvage et de la souche $\Delta abc1$. Les souches de *Y. lipolytica* utilisées sont la souche sauvage H222 (—◆—) et le mutant $\Delta abc1$ (—▲—). La croissance est testée dans des fioles pénicillines hermétiques sur milieu minimum YNBY complété par 0,15% d'extrait de levure et de 0,5 % d'hexadécane comme sources de carbone. Des cultures dans 10 mL de YNBY dans des fioles sont inoculées avec des cellules lavées issues d'une préculture d'une nuit sur YPD à une DO₆₀₀ initiale de 0,1.

Ainsi, le rapport du taux d'hexadécane radioactif incorporé dans les cellules sur la densité optique de ces deux souches, révèle deux phénomènes différents (Figure 48). La souche sauvage présente un taux d'incorporation de C16 par unité de DO qui ne varie relativement peu au cours de la culture ($1,5\% \cdot \text{DO}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ceci suggère une régulation de la concentration intracellulaire de l'hexadécane.

Par rapport à la souche sauvage, le taux d'incorporation de l'hexadécane radioactif par cellule de la souche $\Delta abc1$ est nettement supérieur et augmente régulièrement au cours de la culture ($40\% \cdot \text{DO}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ceci traduit donc une accumulation de l'hexadécane dans les cellules où le gène *ABC1* est disrupté. L'absence de ce gène entraîne donc une accumulation de ce substrat à l'intérieur des cellules conduisant à une inhibition de la croissance due probablement à un effet toxique. L'ABC transporteur codé par le gène *ABC1* serait donc responsable du maintien de la concentration intracellulaire des alcanes à longue chaîne carbonée en dessous d'un seuil toxique en exportant ce même substrat à l'extérieur de la cellule.

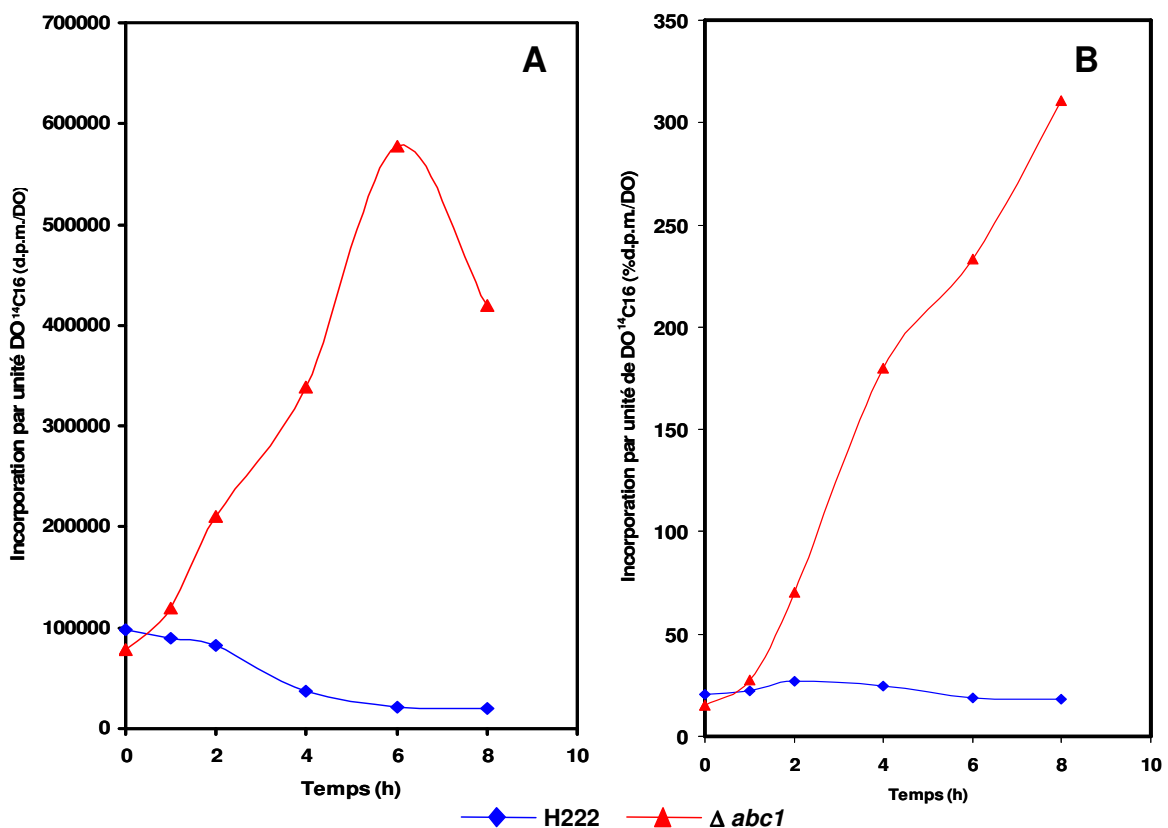


Figure 48. Comparaison de l'incorporation de l'hexadécane radioactif ($^{14}\text{C}16$) dans les cellules par unité de DO, de la souche sauvage et de la souche $\Delta abc1$ exprimée en d.p.m par unité de DO (A) ou pourcentage de d.p.m par unité de DO (B). Les souches de *Y. lipolytica* utilisés sont la souche sauvage H222 (\blacklozenge) et le mutant $\Delta abc1$ (\blacktriangle). La croissance est testée dans des fioles pénicillines hermétiques sur milieu minimum YNBY complété par 0,15% d'extrait de levure et de 0,5 % d'hexadécane comme sources de carbone. Des cultures dans 10 mL de YNBY dans des fioles sont inoculées avec des cellules lavées issues d'une préculture d'une nuit sur YPD à une DO_{600} initiale de 0,1.

L'ensemble de ces données révèle l'existence probable d'un transport actif ou d'une modification de la perméabilité cellulaire permettant l'entrée de l'hexadécane. Chez *Y. lipolytica*, seul le transport des acides gras a été étudié. Les résultats de Kohlwein *et al.* indiquent qu'il existerait deux systèmes de transport des acides gras : l'un spécifique des acides gras à chaîne moyenne (C12 à C14) et un l'autre spécifiques des longues chaînes carbonées (C16 à C18). Toutefois, ces transporteurs n'ont toujours pas été identifiés (Kohlwein et Paltauf, 1984). Concernant le transport des alcanes, peu de données sont disponibles. Seule la toxicité des alcanes en fonction de la longueur de chaîne carbonée a été démontrée : les alcanes à courte chaîne carbonée (< 8 atomes de carbone) sont toxiques, les alcanes de 9 à 12 atomes de carbone entraînent une toxicité variable selon les souches, alors que les alcanes à longue chaîne carbonée ne sont pas toxiques (Gill et Ratledge, 1972).

Nos résultats indiquent que les alcanes à longue chaîne carbonée peuvent également être toxiques. L'ABC transporteur codé par le gène *ABC1* régulerait la concentration intracellulaire de l'hexadécane en dessous d'un seuil de toxicité. Sa délétion entraîne en effet, une accumulation de l'hexadécane qui conduit à l'inhibition de sa croissance probablement due à une concentration intracellulaire toxique pour la cellule. *Abc1p* serait donc un élément clé du maintien de la concentration intracellulaire des alcanes à longue chaîne carbonée au dessous du seuil de toxicité. Il aurait donc probablement une fonction d'exporteur des alcanes à longue chaîne carbonée.

D.6. Localisation du transporteur Abc1p

Nous avons établi une première stratégie avec deux objectifs : d'une part restaurer la croissance sur alcanes à longue chaîne du mutant $\Delta abc1$ par complémentation fonctionnelle avec une copie sauvage du gène *ABC1* et d'autre part, déterminer la localisation cellulaire d'*abc1p*. L'analyse de la composition et la localisation des domaines transmembranaires de la séquence protéique d'*abc1p* prédit 12 à 13 fragments transmembranaires (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>). Les prédictions concernant l'extrémité C-terminal révèlent qu'elle pourrait être située à l'intérieur de la membrane ou que seule une portion de 15 acides aminés serait extracellulaire. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser un tag avec l'étiquette HA au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. Dans un premier temps, un dérivé du JMP62 contenant l'épitope HA a été construit (Figure 49).

Dans un second temps, le gène *ABC1* (5351 bp) a été amplifié par PCR et cloné. Cependant, malgré l'utilisation de différents vecteurs de clonage et de différentes souches d'*E. coli*, nous avons été incapable de cloner ce gène perdant systématiquement 1000 pb au milieu de sa séquence. Ceci pourrait s'expliquer par une instabilité de ce fragment d'ADN ou à une toxicité pour *E. coli*.

C'est pourquoi une seconde stratégie a été élaborée dans le but uniquement de localiser *abc1p*. Pour cela, un fragment de 1000 pb a été amplifié par PCR correspondant au début de l'ORF du gène *ABC1*. Celui-ci fut cloné sans difficultés dans le vecteur JMP62-HA. Une digestion enzymatique par *XmnI* reconnaissant spécifiquement un site unique localisé à environ la moitié du fragment amplifiée d'*ABC1* a permis de linéariser le vecteur obtenu (Figure 49). La souche sauvage H222 de *Y. lipolytica* a ensuite été transformée par ce vecteur. L'intégration chromosomique du vecteur se fait par simple recombinaison au locus du gène *ABC1*. Les transformants obtenus possèdent le gène sauvage tronqué et le gène étiqueté en N-terminal sous le contrôle du promoteur *pPOX2* (Figure 49).

L'intégration correcte du plasmide a été vérifiée par Southern blot en utilisant le fragment *ABC1* amplifiée, comme sonde. Deux transformants ont été sélectionnés. Leur croissance sur hexadécane est similaire à la souche sauvage indiquant que HA-*abc1p* est fonctionnelle et qu'elle complémente l'inactivation d'*abc1p* (Résultats non présentés).

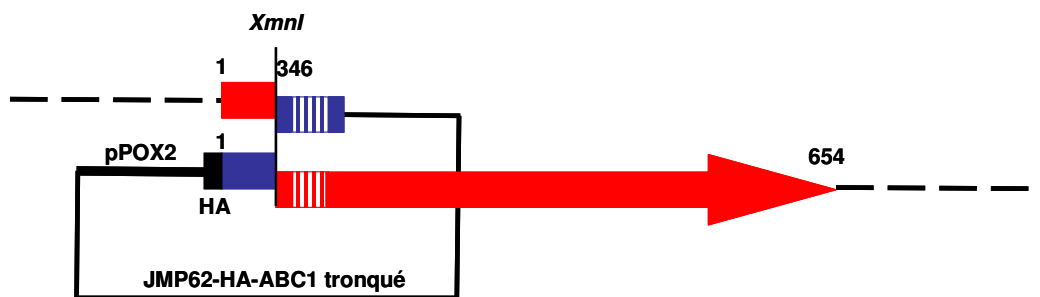


Figure 49. Représentation schématique de l'intégration de JMP62-HA-*ABC1* tronqué au locus *ABC1* par simple recombinaison médiée par l'homologie au site *XmnI*. La région 5' du gène *ABC1* cloné dans le vecteur (bleue) et la région *ABC1* sauvage (rouge) créent après intégration une forme tronquée et une forme étiquetée HA sous le contrôle du promoteur *pPOX2*.

La protéine HA-*abc1p* étant fonctionnelle, nous avons analysé sa localisation par immunofluorescence. Celle-ci a été réalisée à partir de cultures sur milieu YNB en présence d'hexadécane (1%). Les cellules ont été fixées et traitées puis décorées par des anticorps dirigés spécifiquement contre l'épitope HA.

Un anticorps secondaire monoclonal conjugué au fluorochrome Cy3TM permet de localiser la protéine abc1p (Figure 50). Les résultats montrent que abc1p est localisée à la membrane plasmique.

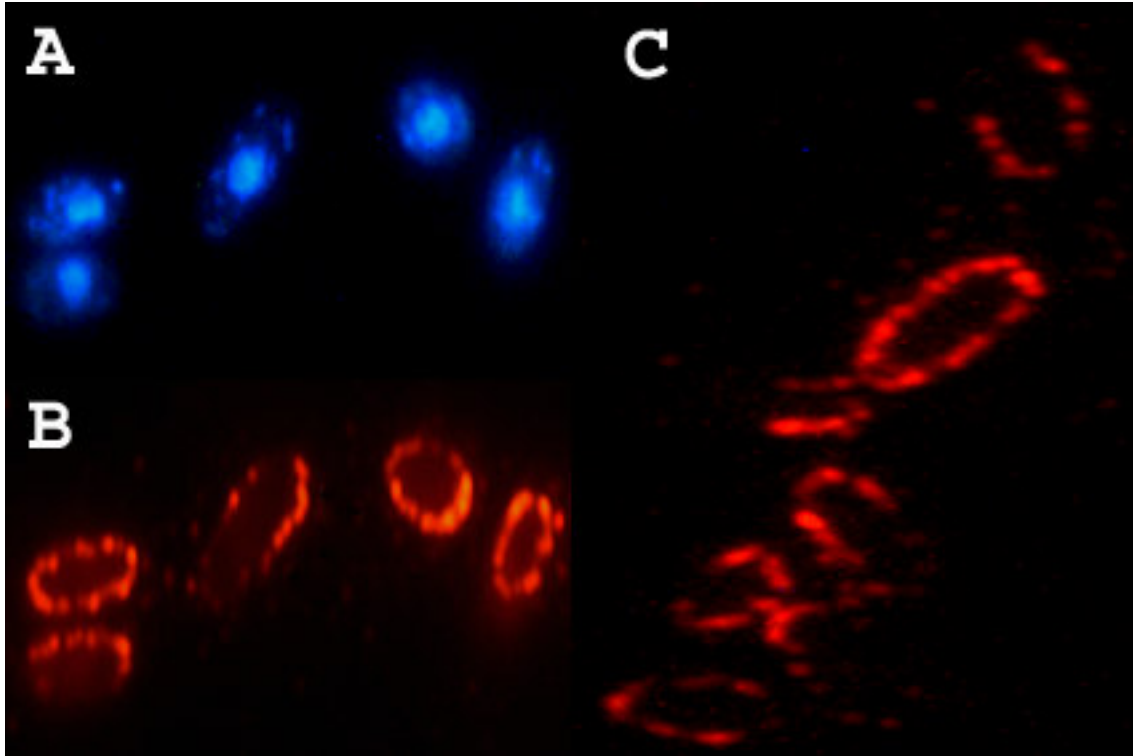


Figure 50. Localisation de l'ABC transporteur abc1p. Les souches étiquetées HA-abc1p ont été préparées pour l'immunofluorescence, puis traitées au DAPI pour visualiser l'ADN nucléaire (A), ou avec les anticorps de lapin anti-HA révélés par des anticorps secondaires anti-lapin conjugués au Texas Red afin de localiser HA-abc1p.

D.7. Sensibilité aux azoles

Les azoles agissent de façon spécifique sur une des enzymes qui, à partir du squalène, aboutissent à la biosynthèse d'ergostérol (Kelly *et al.*, 1993). L'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol conduit à une carence en ergostérol, principal composé de la membrane plasmique et à l'accumulation d'intermédiaires de stérol toxiques. Les azoles, qui comprennent les imidazoles (kétonazole et miconazole) et la triazole plus récent (fluconazole, itraconazole et voriconazole), inhibent la lanosterol déméthylase dépendant du cytochrome P450 (codée par ERG11) en se fixant à l'atome de fer de l'hème, bloquant ainsi l'activité de l'enzyme.

Les mécanismes majeurs de résistance aux azoles décrits, basés sur des études chez *C. albicans* et *S. cerevisiae* sont : la surexpression de la lanosterol déméthylase (Henry *et al.*, 2000), l'altération du site de fixation de lanosterol déméthylase aux azoles (Kelly *et al.*, 1999), la mutation de gènes de la voie de biosynthèse de l'ergosterol (Kelly *et al.*, 1997) et l'augmentation de l'efflux de drogue. Cette augmentation chez les espèces du genre *Candida* est principalement due à l'augmentation de la surexpression des ABC transporteurs et des transporteurs de la superfamille des facilitateurs majeurs (« Major Facilitator Superfamily » MFS) (Prasad *et al.*, 1995).

La sensibilité aux principaux azoles (voriconazole, kétonazole, fluconazole et miconazole) des mono- et multidisruptants a été testée. En présence de voriconazole (0,12 µg/mL), seul le mutant $\Delta abc2$ présente une croissance altérée (Figure 51). Ce phénotype dû à la délétion du gène *ABC2* est confirmée par la sensibilité accrue présentée par le multidisruptant $\Delta abc1,4,3,2$ sur ce même antifongique.

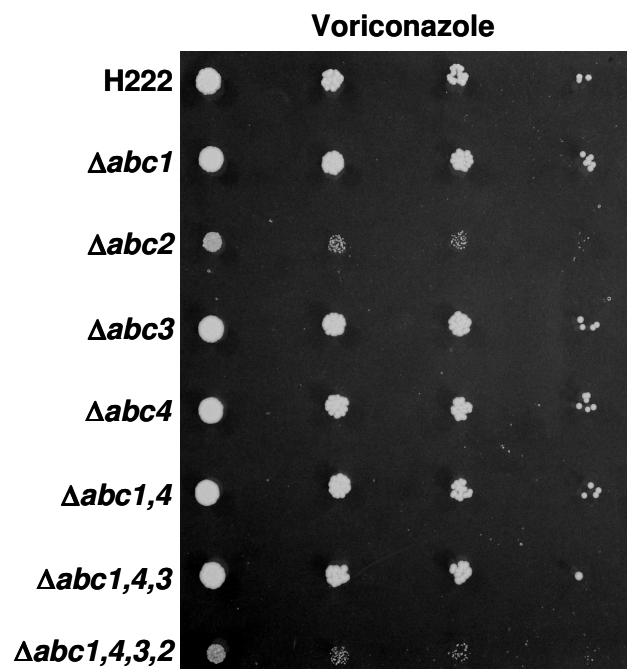


Figure 51. Test de croissance en présence de voriconazole (0,12 µg/mL) de la souche sauvage (H222) et des mutants Δabc après 48h à 28°C. Une préculture sur YPD est réalisée durant une nuit. Celle-ci est centrifugée et remise en suspension à DO_{600} 1. Des aliquots de 10 µL issus de différentes dilutions (non dilué, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cette suspension cellulaire sont déposés.

Les mutants délétés du gène *ABC2* présentent également une sensibilité accrue sur fluconazole ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et sur kétonazole ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tableau 19). Enfin, en présence de miconazole ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ils sont incapables de se développer tandis que les autres mutants sont plus sensibles à cet antifongique.

Tableau 19. Phénotype de croissance des mutants Δabc en présence d'antifongiques de type azole. Croissance normale (+), Croissance partiellement altérée (+/-), Croissance résiduelle (-), Absence de croissance (--).

Mutant	Voriconazole $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Fluconazole $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Kétonazole $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Miconazole $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$
$\Delta abc1$	+	+	+	+/-
$\Delta abc2$	-	-	+/-	--
$\Delta abc3$	+	+	+	+/-
$\Delta abc4$	+	+	+	+/-
$\Delta abc1,4$	+	+	+	+/-
$\Delta abc1,4,3$	+	+	+	+/-
$\Delta abc1,4,3,2$	-	-	+/-	--

La délétion du gène *ABC2* conduit donc à une sensibilité accrue pour l'ensemble des azoles testés. *Abc2p* serait donc responsable d'un phénomène de résistance contre les azoles. Les autres membres de cette famille protéique n'apparaissent pas impliqués dans ce phénomène.

D.8. Bilan

Cette étude a permis tout d'abord d'identifier une famille d'ABC transporteur chez *Y. lipolytica*. Ces membres présentent une forte similarité envers les ABC transporteur de type PDR de *S. cerevisiae* notamment. L'un de ces membres, *abc1p*, est impliqué dans le métabolisme des alcanes à longue chaîne carbonée. Nous avons démontré que cet ABC transporteur est localisé au niveau de la membrane plasmique. *Abc1p* semble responsable de l'export des alcanes à longue chaîne carbonée. *Abc1p* serait un élément clé du maintien de la concentration intracellulaire des alcanes à longue chaîne carbonée au dessous du seuil de toxicité. L'ABC transporteur *abc2p* est impliqué dans le phénomène de résistance aux azoles et dans l'utilisation des alcanes à chaîne courte. En effet, nous observons une sensibilité accrue envers les azoles, une croissance plus faible et une perte de la viabilité cellulaire lorsque le gène *ABC2* est délété. Il pourrait jouer un rôle indirect dans le transport des alcanes ou être exprimé en fin de phase exponentielle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Chapitre IV - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de développer un procédé biotechnologique de production de DCA à longue chaîne carbonée par bioconversion de matières premières renouvelables (huile de tournesol oléique) par la levure *Yarrowia lipolytica*. Les souches sauvages de levure produisent de faibles quantités de DCA. L'utilisation des substrats hydrophobes (substrats de bioconversion) par les levures implique un métabolisme complexe et plusieurs compartiments cellulaires. Les acides gras empruntent principalement la voie de la β -oxydation, localisée, chez la majorité des levures, dans les peroxyosomes, pour donner de l'acétyl-CoA. Cependant, parallèlement à celle-ci, il existe une voie alternative, l' ω -oxydation, localisée dans le réticulum endoplasmique, qui aboutit à la production de DCA. La production et l'accumulation de DCA imposent donc la construction de mutants où le flux d'acides gras est réorienté de la voie de la β -oxydation vers celle de l' ω -oxydation.

Afin de produire des DCA par *Y. lipolytica*, nous avons choisi de bloquer la voie de la β -oxydation en jouant sur les activités des acyl-CoA oxydases (6 gènes *POX*), responsables de la première étape cette voie. Nous disposions d'un mutant délété de quatre gènes *POX* (*POX2,3,4,5*) dont nous supposons que la voie de la β -oxydation était bloquée de par son incapacité à se développer sur acide oléique. Nous avons démontré que les modifications génétiques déjà réalisées dans cette souche permettaient effectivement d'accumuler des DCA. L'analyse des cinétiques de production de cette souche et de la composition des produits obtenus a cependant révélé que les DCA biosynthétisés étaient dégradés séquentiellement par la voie de la β -oxydation. Nous avons donc entrepris une analyse fonctionnelle des acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX1* et *POX6* encore actives dans ce mutant. Cette étude a révélé que la disruption de ces deux gènes abolit le phénomène de consommation des DCA produits. Les enzymes codées par les gènes *POX2* à *POX5* sont donc impliquées dans la β -oxydation des acides gras alors que celles codées par les gènes *POX1* et *POX6* sont spécifiques de la β -oxydation des DCA (Figure 52). La détermination des activités spécifiques des acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX1* et *POX6* permettrait de confirmer ce résultat. Ces gènes pourraient être surexprimés dans *E. coli* afin de tester leurs activités respectives en présence de dérivés CoA d'acides gras et de DCA de différentes longueurs de chaîne carbonée. Cette étude a également démontré l'absence d'activité β -oxydative mitochondriale chez *Y. lipolytica* à la différence de *C. tropicalis* (Dommes *et al.*, 1983).

L'analyse des cinétiques de production et de la composition des produits obtenus a également révélé qu'une partie des DCA obtenus ne provenait pas de la bioconversion de l'huile de tournesol oléique. Nous avons montré l'implication, pendant le procédé de production des DCA, d'une autre voie métabolique : la synthèse *de novo* d'acides gras. Pendant la phase de croissance, des acides gras sont synthétisés à partir de la glycolyse puis transformés en DCA correspondant pendant la phase de bioconversion.

Cette étude a également révélé la voie de l' ω -oxydation comme une cible potentielle pour augmenter la production de DCA. C'est pourquoi, nous nous sommes focalisés sur le système cytochrome P450 responsable de l'hydroxylation terminale réalisée lors de la première étape de l' ω -oxydation. En surexprimant les deux composants de ce système, un cytochrome P450 (codé par 12 gènes *ALK*) et une NADPH cytochrome P450 réductase (1 gène *CPR*) nous avons précisé les caractéristiques fonctionnelles de ces deux entités. La NADPH cytochrome P450 réductase est limitante dans l'hydroxylation de l'acide gras puisque la surexpression de son gène améliore la production de DCA de plus de 60% (16 g.L^{-1}) et double la productivité ($0,65 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). D'autre part, la surexpression des gènes *ALK* nous a permis de montrer un effet sur la production de DCA et pour certains d'entre eux, une spécificité probable vis-à-vis de la longueur de chaîne du substrat. Ainsi, la surexpression des gènes *ALK2*, *ALK5*, *ALK7* ou *ALK10* conduit à une amélioration de la production de DCA jusqu'à 27% (Figure 52), alors que celle du gène *ALK3* entraîne une diminution de celle-ci de 19%. D'autre part, le cytochrome P450 codé par le gène *ALK2* semble présenter une spécificité pour les alcanes à longue chaîne carbonée à la différence de ceux codés par les gènes *ALK5* et *ALK11* qui seraient spécifiques des alcanes à courte chaîne carbonée. Cette étude a également mis en évidence une régulation complexe au niveau de cette famille multigénique.

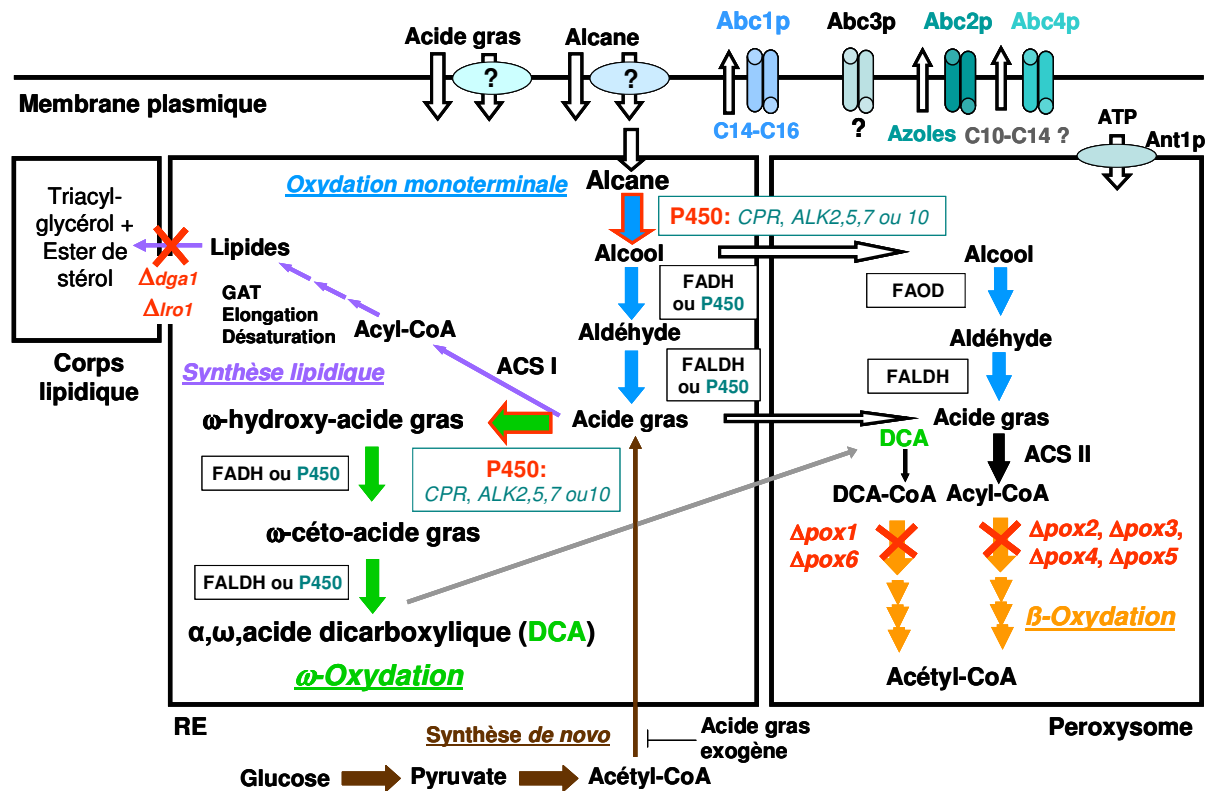


Figure 52. Voies métaboliques impliquées dans la production d'acides dicarboxyliques à partir de substrats hydrophobes par la souche modifiée $\Delta pox-CPR-ALKx$, $\Delta dga1$, $\Delta lro1$ de *Yarrowia lipolytica*. Les modifications sont indiquées en rouge. **La voie de la β -oxydation** (flèches oranges) a été bloquée par la disruption des gènes *POX*. **L'oxydation monoterminale** (flèches bleues) intervient lorsque l'on utilise des alcanes comme substrat de bioconversion, et convertit les alcanes en acides gras correspondant. A partir d'acides gras, la voie de **l' ω -oxydation** (flèches vertes) conduit à la formation des acides dicarboxyliques. Ces deux voies ont été amplifiées par la surexpression des gènes *CPR* et *ALK* (4 gènes). En parallèle, une partie des acides gras dérivant des alcanes sert aussi à la **synthèse de lipides** (flèches violettes) qui peuvent être stockés sous forme de triacylglycérols et d'esters de stérol. La réduction de ce stockage a été réalisée par la disruption des gènes *DGA1* et *LRO1*. Une partie des acides gras provient également de la **synthèse de novo d'acides gras** (flèches marrons) nécessitant les produits issus de la glycolyse (phase de croissance). Celle-ci serait réprimée pendant en présence d'acides gras exogènes (phase de bioconversion) (Chirala *et al.*, 1992). Enfin une famille d'ABC transporteur de type PDR a été identifiée. Abc2p confère la résistance aux azoles. Elle pourrait être impliquée dans l'export des alcanes à courte chaîne carbonée, de même que Abc4p. Le rôle d'Abc3p est inconnu. Abc1p est responsable du maintien de la concentration intracellulaire d'alcanes à longue chaîne carbonée en dessous d'un seuil toxique.

Les souches, délétées de l'ensemble des gènes *POX* et surexprimant le gène *CPR* et un des gènes *ALK*, constituent un outil de choix pour étudier l'activité spécifique des cytochromes P450 *in vivo*. Elles permettent de s'affranchir de l'utilisation de systèmes d'expression hétérologues (*S. cerevisiae* pour *C. maltosa*, cellules d'insectes pour *C. tropicalis*, ou *Nicotiana benthamiana* pour *Y. lipolytica*) (Scheller *et al.*, 1996; Eschenfeldt *et al.*, 2003; Hanley *et al.*, 2003).

Nous pourrions également déterminer *in vivo* si un seul cytochrome P450 est capable de catalyser l'ensemble des étapes de l'oxydation monoterminale et de l' ω -oxydation comme cela a été démontré *in vitro* chez *C. maltosa* (Scheller *et al.*, 1998). Enfin, ce système permettrait également d'étudier le réseau de régulation de cette famille multigénique par une analyse transcriptomique.

L'ensemble de ces données démontre que la surexpression d'un gène *ALK* pourrait améliorer la production de DCA. Toutefois, contrairement à la NADPH cytochrome P450 réductase, les cytochromes P450 présentent une spécificité selon la nature du substrat de bioconversion (alcanes ou acides gras) et la longueur de la chaîne carbonée de celui-ci.

Cependant, les essais de production de DCA par la souche Δ *pox-CPR* sont marqués par un rendement et un taux de conversion proche de 50%. La moitié du substrat de bioconversion n'est donc pas convertie en DCA. Les observations microscopiques ont révélé une accumulation de l'huile de tournesol oléique dans les corps lipidiques des cellules. Le flux d'acides gras serait donc détourné de la voie de bioconversion en DCA vers la voie de synthèse de triacylglycérols et d'esters de stérol, principaux constituants des corps lipidiques. En nous appuyant sur une étude protéomique des corps lipidiques réalisée chez *Y. lipolytica* (Athenstaedt *et al.*, 2006), nous avons effectué une étude fonctionnelle des gènes *DGAI* et *LROI* à partir d'une souche sauvage. Nous avons ainsi démontré que les produits de ces gènes sont impliqués dans la voie de stockage des lipides chez *Y. lipolytica* puisque leur disruption entraîne une baisse importante des taux de triacylglycérols et d'esters de stérol chez ces mutants. De façon similaire, ces gènes ont été disruptés dans la souche Δ *pox-CPR* et la production de DCA s'est trouvée améliorée de 22%. Il reste à mesurer les teneurs en triacylglycérols et en esters de stérol dans cette nouvelle souche de production (Δ *pox-CPR*, Δ *dgal*, Δ *lroi*).

De plus, l'ensemble des essais de production réalisés en utilisant la souche $\Delta pox-CPR$, dont la β -oxydation est bloquée, ont mis en évidence la nécessité d'une conduite de fermentation atypique. Nous avons identifié les différentes phases durant le procédé de production de DCA et certains facteurs limitants. La présence d'un cosubstrat énergétique en flux continu limitant apparaît nécessaire afin de maintenir le métabolisme basal de la souche. L'apport d'azote permet à des cellules en fin de phase exponentielle de croissance de continuer à produire des DCA augmentant ainsi la durée de la phase de production maximale. Ainsi, en jouant par exemple sur les sucres, les acides organiques, le rapport carbone sur azote ou le taux d'oxygène dissous, nous pouvons raisonnablement penser améliorer de façon significative les taux de production de DCA actuels avec la souche $\Delta pox-CPR$ (20 g.L⁻¹). De plus, l'utilisation d'une souche $\Delta pox-CPR-ALK2$, $\Delta dgal$, $\Delta lro1$ permettrait d'améliorer la production de DCA sans modifier le procédé.

Par ailleurs, 90% des DCA biosynthétisés par cette souche sont sécrétés. Un seuil de concentration de DCA de 1g.L⁻¹ à l'intérieur de la cellule semble nécessaire pour déclencher la sécrétion. Ce seuil de concentration pourrait être requis pour induire, au niveau de la membrane cytoplasmique, des exporteurs spécifiques. Peu de données scientifiques sont disponibles sur le transport des substrats hydrophobes. Or, une étude de mutants d'insertion affectés pour l'utilisation des substrats hydrophobes (substrats de bioconversion) selon la longueur de chaîne a révélé l'implication d'un ABC transporteur (gène *ABC1*) qui appartient à une famille protéique composée de cinq membres. Ces membres présentent une forte similarité envers les ABC transporteurs de type PDR de *S. cerevisiae*, qui confèrent la résistance pléiotropique aux drogues et fonctionnent en tant qu'exporteurs. Ils présentent l'organisation moléculaire (NDB-TMS₆)₂ caractéristique de ces transporteurs. Nous avons donc réalisé une analyse fonctionnelle des quatre gènes phylogénétiquement proches de cette famille multigénique. Des souches mono- et multidisruptées ont été construites afin de mesurer leur croissance sur substrats hydrophobes, leur sensibilité aux drogues (azoles) ainsi que leur fonction.

L'ABC transporteur *abc2p* est impliqué dans le phénomène de résistance aux azoles et probablement dans l'utilisation des alcanes à chaîne courte. En effet, nous observons une sensibilité accrue envers les azoles, une croissance plus faible et une perte de la viabilité cellulaire en présence de décane, lorsque le gène *ABC2* est délété. Il pourrait jouer un rôle indirect dans le transport des alcanes ou n'être exprimé qu'en fin de phase exponentielle.

L'ABC transporteur, *abc1p*, est impliqué dans le métabolisme des alcanes à longue chaîne carbonée. Sa délétion entraîne, en effet, à une incapacité à se développer sur des alcanes dont la longueur de chaîne est supérieure à 14 atomes de carbone. Nous avons démontré, en n'utilisant de l'hexadécane radiomarqué, que ce transporteur localisé à la membrane plasmique, n'a pas une fonction d'importeur. Il semble responsable de l'export des alcanes à longue chaîne carbonée à l'extérieur de la cellule. L'absence de ce gène entraîne une accumulation de l'hexadécane à l'intérieur des cellules conduisant à une inhibition de la croissance due à un phénomène de toxicité. *Abc1p* serait donc un élément clé du maintien de la concentration intracellulaire des alcanes à longue chaîne carbonée au dessous du seuil de toxicité. Il serait donc responsable du phénomène de détoxification des alcanes à longue chaîne carbonée. Il constitue, à ce jour, le premier ABC transporteur de type PDR identifié comme étant responsable de l'export de molécules physiologiques.

Une vérification expérimentale de la fonction d'*abc1p* consisterait à exprimer le gène *ABC1* sous le contrôle d'un promoteur fort inductible tel que le système TetON qui est induit par la tétracycline. Nous pourrions ainsi moduler son activité et mesurer l'export d'alcanes radiomarqués. Dans ce même contexte, nous pourrions également envisager de produire et de purifier les quantités d'*abc1p* nécessaires à la détermination de sa structure tridimensionnelle afin de compléter les seules données disponibles obtenues avec *pdr5p* chez *S. cerevisiae* (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003).

D'autre part, il serait intéressant de compléter cette étude par l'analyse fonctionnelle du gène *ABC5* présentant une plus forte similarité avec *SNQ2* de *S. cerevisiae* qu'avec les membres de sa famille. De plus, une analyse transcriptomique nous permettrait d'identifier des phénomènes de compensation d'activité lorsqu'un ou plusieurs gènes sont délétés ou un réseau de régulation au sein de cette famille comme chez *S. cerevisiae* (Kolaczowska et Goffeau, 1999).

Enfin, nous pourrions également compléter la souche $\Delta abcI$ avec une banque génomique afin d'isoler les transformants capables de se développer de nouveau sur hexadécane. Ceci nous permettrait d'identifier des gènes responsables de la détoxification mais également des gènes entraînant une conversion de l'alcane en composés moins toxiques afin de trouver de nouvelles cibles pour augmenter la production de DCA.

Ces travaux ont permis d'accroître nos connaissances sur différentes voies impliquées dans le métabolisme des substrats hydrophobes : l'oxydation monoterminale, la β -oxydation, l' ω -oxydation, la synthèse *de novo* d'acides gras et la voie de stockage des lipides. Cette étude a également amené, de manière inattendue, à identifier une famille d'ABC transporteur de type PDR impliquée dans ce métabolisme. L'ensemble de ces données a conduit au développement d'une souche génétiquement modifiée de *Y. lipolytica* pour la production de DCA à longue chaîne carbonée à partir d'huiles végétales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abele, R., and R. Tampe. 2004. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* **19**:216-24.

Abumrad, N., C. Coburn, and A. Ibrahimi. 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* **1441**:4-13.

Abumrad, N. A., C. C. Forest, D. M. Regen, and S. Sanders. 1991. Increase in membrane uptake of long-chain fatty acids early during preadipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:6008-12.

Abumrad, N. A., R. C. Perkins, J. H. Park, and C. R. Park. 1981. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem* **256**:9183-91.

Aguedo, M., L. Beney, Y. Wache, and J. M. Belin. 2003. Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* **94**:258-65.

Aguedo, M., Y. Wache, V. Mazoyer, A. Sequeira-Le Grand, and J. M. Belin. 2003. Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J Agric Food Chem* **51**:3007-11.

Akache, B., S. MacPherson, M. A. Sylvain, and B. Turcotte. 2004. Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:27855-60.

Akache, B., and B. Turcotte. 2002. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem* **277**:21254-60.

Al-Feel, W., S. S. Chirala, and S. J. Wakil. 1992. Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4534-8.

Albuquerque, C. D., A. M. Filetti, and G. M. Campos-Takaki. 2006. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol* **52**:575-83.

Ambudkar, S. V., I. W. Kim, D. Xia, and Z. E. Sauna. 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett* **580**:1049-55.

Athenstaedt, K., and G. Daum. 1997. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**:7611-6.

Athenstaedt, K., and G. Daum. 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci* **63**:1355-69.

- Athenstaedt, K., P. Jolivet, C. Boulard, M. Zivy, L. Negroni, J. M. Nicaud, and T. Chardot.** 2006. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* **6**:1450-9.
- Athenstaedt, K., S. Weys, F. Paltauf, and G. Daum.** 1999. Redundant systems of phosphatidic acid biosynthesis via acylation of glycerol-3-phosphate or dihydroxyacetone phosphate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**:1458-63.
- Athenstaedt, K., D. Zweytick, A. Jandrositz, S. D. Kohlwein, and G. Daum.** 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**:6441-8.
- Balzi, E., W. Chen, S. Ulaszewski, E. Capieaux, and A. Goffeau.** 1987. The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **262**:16871-9.
- Barker, K. S., M. M. Pearson, and P. D. Rogers.** 2003. Identification of genes differentially expressed in association with reduced azole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* **51**:1131-40.
- Barnett, P., H. F. Tabak, and E. H. Hettema.** 2000. Nuclear receptors arose from pre-existing protein modules during evolution. *Trends Biochem Sci* **25**:227-8.
- Barth, G., and C. Gaillardin.** 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**:219-37.
- Barth, G., and C. Gaillardin.** 1996. *Yarrowia lipolytica*, p. 313-388. In K. Wolf (ed.), *Non conventional Yeasts in Biotechnology*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Barth, G., B. JM, A. Dominguez, S. Kerscher, D. Ogrydziak, V. Titorenko, and C. Gaillardin.** 2003. Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*, p. 227-271. In d. W. J.H. (ed.), *Fuctional Genetics of industrial yeasts*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Barth, G., and W. Kunkel.** 1979. Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeasts. II. NAD⁺-and NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenases in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z Allg Mikrobiol* **19**:381-90.
- Barth, G., and T. Scheuber.** 1993. Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol Gen Genet* **241**:422-30.
- Baumgartner, U., B. Hamilton, M. Piskacek, H. Ruis, and H. Rottensteiner.** 1999. Functional analysis of the Zn(2)Cys(6) transcription factors Oaf1p and Pip2p. Different roles in fatty acid induction of beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**:22208-16.
- Beckerich, J. M., A. Boisrame-Baudevin, and C. Gaillardin.** 1998. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int Microbiol* **1**:123-30.

- Bessoule, J. J., R. Lessire, M. Rigoulet, B. Guerin, and C. Cassagne.** 1988. Localization of the synthesis of very-long-chain fatty acid in mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **177**:207-11.
- Bisgaier, C. L., R. Chanderbhan, R. W. Hinds, and G. V. Vahouny.** 1985. Adrenal cholesterol esters as substrate source for steroidogenesis. *J Steroid Biochem* **23**:967-74.
- Bissinger, P. H., and K. Kuchler.** 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J Biol Chem* **269**:4180-6.
- Black, P. N.** 1990. Characterization of FadL-specific fatty acid binding in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1046**:97-105.
- Blanchin-Roland, S., R. R. Cordero Otero, and C. Gaillardin.** 1994. Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **14**:327-38.
- Blin-Perrin, C., D. Molle, L. Dufosse, J. L. Le-Quere, C. Viel, G. Mauvais, and G. Feron.** 2000. Metabolism of ricinoleic acid into gamma-decalactone: beta-oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. *FEMS Microbiol Lett* **188**:69-74.
- Blobel, F., and R. Erdmann.** 1996. Identification of a yeast peroxisomal member of the family of AMP-binding proteins. *Eur J Biochem* **240**:468-76.
- Bobrowicz, P., R. Wysocki, G. Owsianik, A. Goffeau, and S. Ulaszewski.** 1997. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:819-28.
- Boisrame, A., M. Kabani, J. M. Beckerich, E. Hartmann, and C. Gaillardin.** 1998. Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **273**:30903-8.
- Bon, E., S. Casaregola, G. Blandin, B. Llorente, C. Neuveglise, M. Munsterkotter, U. Guldener, H. W. Mewes, J. Van Helden, B. Dujon, and C. Gaillardin.** 2003. Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* **31**:1121-35.
- Borst, P., and A. H. Schinkel.** 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet* **13**:217-22.
- Bossier, P., L. Fernandes, C. Vilela, and C. Rodrigues-Pousada.** 1994. The yeast YKL741 gene situated on the left arm of chromosome XI codes for a homologue of the human ALD protein. *Yeast* **10**:681-6.
- Casaregola, S., C. Neuveglise, E. Bon, and C. Gaillardin.** 2002. Ylli, a non-LTR retrotransposon L1 family in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biol Evol* **19**:664-77.

Casaregola, S., C. Neuveglise, A. Lepingle, E. Bon, C. Feynerol, F. Artiguenave, P. Wincker, and C. Gaillardin. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* **487**:95-100.

Chan, E. C., J. Kuo, H. P. Lin, and D. G. Mou. 1991. Stimulation of n-alkane conversion to dicarboxylic acid by organic-solvent- and detergent-treated microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**:772-777.

Chen, C. A., and J. A. Cowan. 2003. Characterization of the soluble domain of the ABC7 type transporter Atm1. *J Biol Chem* **278**:52681-8.

Cheng, Q., D. Sanglard, S. Vanhanen, H. T. Liu, P. Bombelli, A. Smith, and A. R. Slabas. 2005. *Candida* yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1735**:192-203.

Chirala, S. S. 1992. Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10232-6.

Chirala, S. S., M. A. Kuziora, D. M. Spector, and S. J. Wakil. 1987. Complementation of mutations and nucleotide sequence of FAS1 gene encoding beta subunit of yeast fatty acid synthase. *J Biol Chem* **262**:4231-40.

Chloupkova, M., L. S. LeBard, and D. M. Koeller. 2003. MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol* **331**:155-65.

Choi, J. Y., and C. E. Martin. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene encodes an acyl-CoA synthetase that is required for maintenance of very long chain fatty acid levels. *J Biol Chem* **274**:4671-83.

Choi, J. Y., J. Stuke, S. Y. Hwang, and C. E. Martin. 1996. Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* **271**:3581-9.

Cirigliano, M., and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **48**:747-750.

Cohen, G., F. Fessl, A. Traczyk, J. Rytka, and H. Ruis. 1985. Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol Gen Genet* **200**:74-9.

Cordero, O., and C. Gaillardin. 1996. Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**:143-148.

Cornils, B., and P. Lappe. 1987. Dicarboxylic acids, aliphatic, vol. A8.

Cottrell, M., B. C. Viljoen, J. L. F. Kock, and P. Lategan. 1986. The long-chain fatty acid compositions of species representing the genera *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* and *Lipomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2401-2401.

- Craft, D. L., and L. D. Eirich.** 2003. Fatty alcohol oxidase genes and proteins from *Candida tropicalis* and method relating thereto. WO03089610
- Craft, D. L., K. M. Madduri, M. Eshoo, and C. R. Wilson.** 2003. Identification and Characterization of the CYP52 Family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, Important for the Conversion of Fatty Acids and Alkanes to $\{\alpha\},\{\omega\}$ -Dicarboxylic Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5983-5991.
- Cui, Z., T. Shiraki, D. Hirata, and T. Miyakawa.** 1998. Yeast gene YRR1, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene SNQ2. *Mol Microbiol* **29**:1307-15.
- Czabany, T., K. Athenstaedt, and G. Daum.** 2006. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta*.
- Dahlqvist, A., U. Stahl, M. Lenman, A. Banas, M. Lee, L. Sandager, H. Ronne, and S. Stymne.** 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6487-92.
- Daum, G., N. D. Lees, M. Bard, and R. Dickson.** 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:1471-510.
- Davidow, L., A. Franke, and J. De Zeeuw.** 1987. New *Yarrowia lipolytica* transformants used for expression and secretion of heterologous proteins, especially prorennin and human anaphylatoxin C5a. *European Patent Application EP 86 307 839*.
- De Hertogh, B., F. Hancy, A. Goffeau, and P. V. Baret.** 2006. Emergence of species-specific transporters during evolution of the Hemiascomycete phylum. *Genetics*.
- Dean, M., and T. Annilo.** 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**:123-42.
- Delahodde, A., T. Delaveau, and C. Jacq.** 1995. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol* **15**:4043-51.
- Delaveau, T., A. Delahodde, E. Carvajal, J. Subik, and C. Jacq.** 1994. PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol Gen Genet* **244**:501-11.
- Dell'Angelica, E. C., C. A. Stella, M. R. Ermacora, E. H. Ramos, and J. A. Santome.** 1992. Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Comp Biochem Physiol B* **102**:261-5.
- Dittrich, F., D. Zajonc, K. Huhne, U. Hoja, A. Ekici, E. Greiner, H. Klein, J. Hofmann, J. J. Bessoule, P. Sperling, and E. Schweizer.** 1998. Fatty acid elongation in yeast--biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. *Eur J Biochem* **252**:477-85.

- Dmochowska, A., D. Dignard, R. Maleszka, and D. Y. Thomas.** 1990. Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. *Gene* **88**:247-52.
- Dominguez, A., M. Costas, M. A. Longo, and A. Sanroman.** 2003. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **25**:1225-9.
- Dommes, P., V. Dommes, and W. H. Kunau.** 1983. beta-Oxidation in *Candida tropicalis*. Partial purification and biological function of an inducible 2,4-dienoyl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **258**:10846-52.
- Doody, M. C., H. J. Pownall, Y. J. Kao, and L. C. Smith.** 1980. Mechanism and kinetics of transfer of a fluorescent fatty acid between single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **19**:108-16.
- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. de Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J.-L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
- Egner, R., B. E. Bauer, and K. Kuchler.** 2000. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol* **35**:1255-63.
- Egner, R., F. E. Rosenthal, A. Kralli, D. Sanglard, and K. Kuchler.** 1998. Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol Biol Cell* **9**:523-43.
- Einerhand, A. W., W. T. Kos, B. Distel, and H. F. Tabak.** 1993. Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur J Biochem* **214**:323-31.
- Einerhand, A. W., T. M. Voorn-Brouwer, R. Erdmann, W. H. Kunau, and H. F. Tabak.** 1991. Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **200**:113-22.
- Elgersma, Y., C. W. van Roermund, R. J. Wanders, and H. F. Tabak.** 1995. Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *Embo J* **14**:3472-9.

- Epping, E. A., and W. S. Moye-Rowley.** 2002. Identification of interdependent signals required for anterograde traffic of the ATP-binding cassette transporter protein Yor1p. *J Biol Chem* **277**:34860-9.
- Eraso, P., M. Martínez-Burgos, J. M. Falcon-Perez, F. Portillo, and M. J. Mazon.** 2004. Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. *FEBS Lett* **577**:322-6.
- Erdmann, R., and G. Blobel.** 1995. Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol* **128**:509-23.
- Eschenfeldt, W. H., Y. Zhang, H. Samaha, L. Stols, L. D. Eirich, C. R. Wilson, and M. I. Donnelly.** 2003. Transformation of Fatty Acids Catalyzed by Cytochrome P450 Monooxygenase Enzymes of *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5992-5999.
- Faergeman, N. J., P. N. Black, X. D. Zhao, J. Knudsen, and C. C. DiRusso.** 2001. The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization. *J Biol Chem* **276**:37051-9.
- Faergeman, N. J., and J. Knudsen.** 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323 (Pt 1)**:1-12.
- Ferreira-Pereira, A., S. Marco, A. Decottignies, J. Nader, A. Goffeau, and J. L. Rigaud.** 2003. Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J Biol Chem* **278**:11995-9.
- Fickers, P., P. H. Benetti, Y. Wache, A. Marty, S. Mauersberger, M. S. Smit, and J. M. Nicaud.** 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* **5**:527-43.
- Fickers, P., F. Fudalej, M. T. Le Dall, S. Casaregola, C. Gaillardin, P. Thonart, and J. M. Nicaud.** 2005. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol* **42**:264-74.
- Fickers, P., M. T. Le Dall, C. Gaillardin, P. Thonart, and J. M. Nicaud.** 2003. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods* **55**:727-37.
- Fickers, P., J. M. Nicaud, J. Destain, and P. Thonart.** 2003. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:136-42.
- Fickers, P., J. M. Nicaud, C. Gaillardin, J. Destain, and P. Thonart.** 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* **96**:742-9.
- Filipits, M., M. M. Simon, W. Rapatz, B. Hamilton, and H. Ruis.** 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* **132**:49-55.

- Finogenova, T. V., S. V. Kamzolova, E. G. Dedyukhina, N. V. Shishkanova, A. P. Il'chenko, I. G. Morgunov, O. G. Chernyavskaya, and A. P. Sokolov.** 2002. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:493-500.
- Fournier, P., L. Guyaneux, M. Chasles, and C. Gaillardin.** 1991. Scarcity of ars sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **7**:25-36.
- Freeman, D. A., and M. Ascoli.** 1982. Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem* **257**:14231-8.
- Fujimori, K., S. Anamnart, Y. Nakagawa, S. Sugioka, D. Ohta, Y. Oshima, Y. Yamada, and S. Harashima.** 1997. Isolation and characterization of mutations affecting expression of the delta9- fatty acid desaturase gene, OLE1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **413**:226-30.
- Fukui, S., and A. Tanaka.** 1981. Metabolism of alkanes by yeasts. *Adv. Biochem. Eng.* **19**:217-237.
- Gaillardin, C., and A. M. Ribet.** 1987. LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **11**:369-75.
- Gaillardin, C., A. M. Ribet, and H. Heslot.** 1985. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **10**:49-58.
- Galluhn, D., and T. Langer.** 2004. Reversible assembly of the ATP-binding cassette transporter Mdl1 with the F1F0-ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem* **279**:38338-45.
- Gartner, J.** 2000. Disorders related to peroxisomal membranes. *J Inherit Metab Dis* **23**:264-72.
- Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**:4241-57.
- Geisbrecht, B. V., D. Zhu, K. Schulz, K. Nau, J. C. Morrell, M. Geraghty, H. Schulz, R. Erdmann, and S. J. Gould.** 1998. Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Delta3, Delta2-enoyl-CoA isomerase. *J Biol Chem* **273**:33184-91.
- Gilewicz, M., M. Zacek, J. C. Bertrand, and E. Azoulay.** 1979. Hydroxylase regulation in *Candida tropicalis* grown on alkanes. *Can J Microbiol* **25**:201-6.
- Gill, C. O., and C. Ratledge.** 1972. Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. strain 107. *Biochem J* **127**:59P-60P.
- Gonzalez, C. I., and C. E. Martin.** 1996. Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript. *J Biol Chem* **271**:25801-9.

Guerzoni, M. E., R. Lanciotti, L. Vannini, F. Galgano, F. Favati, F. Gardini, and G. Suzzi. 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int J Food Microbiol* **69**:79-89.

Gurvitz, A., B. Hamilton, H. Ruis, and A. Hartig. 2001. Peroxisomal degradation of trans-unsaturated fatty acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**:895-903.

Gurvitz, A., A. M. Mursula, A. Firzinger, B. Hamilton, S. H. Kilpelainen, A. Hartig, H. Ruis, J. K. Hiltunen, and H. Rottensteiner. 1998. Peroxisomal Delta3-cis-Delta2-trans-enoyl-CoA isomerase encoded by ECI1 is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **273**:31366-74.

Gurvitz, A., A. M. Mursula, A. I. Yagi, A. Hartig, H. Ruis, H. Rottensteiner, and J. K. Hiltunen. 1999. Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the beta-oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of YOR180c/DCI1 encoding peroxisomal delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase. *J Biol Chem* **274**:24514-21.

Gurvitz, A., H. Rottensteiner, S. H. Kilpelainen, A. Hartig, J. K. Hiltunen, M. Binder, I. W. Dawes, and B. Hamilton. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19. *J Biol Chem* **272**:22140-7.

Gwynne, J. T., and J. F. Strauss, 3rd. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* **3**:299-329.

Haid, A., and M. Suissa. 1983. Immunochemical identification of membrane proteins after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **96**:192-205.

Hamilton, J. A. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**:467-81.

Hanley, K., L. V. Nguyen, F. Khan, G. P. Pogue, F. Vojdani, S. Panda, F. Pinot, V. B. Oriedo, L. Rasochova, M. Subramanian, B. Miller, and E. L. White. 2003. Development of a plant viral-vector-based gene expression assay for the screening of yeast cytochrome p450 monooxygenases. *Assay Drug Dev Technol* **1**:147-60.

Hasslacher, M., A. S. Ivessa, F. Paltauf, and S. D. Kohlwein. 1993. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem* **268**:10946-52.

Hellauer, K., B. Akache, S. MacPherson, E. Sirard, and B. Turcotte. 2002. Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the PDR5 gene encoding a multidrug transporter. *J Biol Chem* **277**:17671-6.

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

Henry, K. W., J. T. Nickels, and T. D. Edlind. 2000. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2693-700.

- Hettema, E. H., and H. F. Tabak.** 2000. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta* **1486**:18-27.
- Hettema, E. H., C. W. van Roermund, B. Distel, M. van den Berg, C. Vilela, C. Rodrigues-Pousada, R. J. Wanders, and H. F. Tabak.** 1996. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**:3813-22.
- Hikkel, I., A. Lucau-Danila, T. Delaveau, P. Marc, F. Devaux, and C. Jacq.** 2003. A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. *J Biol Chem* **278**:11427-32.
- Hiltunen, J. K., S. A. Filppula, H. M. Hayrinen, K. T. Koivuranta, and E. H. Hakkola.** 1993. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* **75**:175-82.
- Hiltunen, J. K., B. Wenzel, A. Beyer, R. Erdmann, A. Fossa, and W. H. Kunau.** 1992. Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the fox2 gene and gene product. *J Biol Chem* **267**:6646-53.
- Holland, I., S. P. Cole, K. Kuchler, and C. Higgins.** 2003. ABC Proteins Bacteria to Man *Academic Press-Elsevier Science*.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich, and S. Jentsch.** 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**:577-86.
- Igual, J. C., E. Matallana, C. Gonzalez-Bosch, L. Franco, and J. E. Perez-Ortin.** 1991. A new glucose-repressible gene identified from the analysis of chromatin structure in deletion mutants of yeast SUC2 locus. *Yeast* **7**:379-89.
- Iida, T., A. Ohta, and M. Takagi.** 1998. Cloning and Characterization of an n-alkane-inducible Cytochrome P450 Gene Essential for n-Decane Assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**:1387-1397.
- Iida, T., T. Sumita, A. Ohta, and M. Takagi.** 2000. The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* **16**:1077-1087.
- Jank, B., B. Habermann, R. J. Schweyen, and T. A. Link.** 1993. PMP47, a peroxisomal homologue of mitochondrial solute carrier proteins. *Trends Biochem Sci* **18**:427-8.
- Johnson, D. R., L. J. Knoll, D. E. Levin, and J. I. Gordon.** 1994. *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* **127**:751-62.
- Jungwirth, H., and K. Kuchler.** 2006. Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* **580**:1131-8.

- Juretzek, T., M. Le Dall, S. Mauersberger, C. Gaillardin, G. Barth, and J. Nicaud.** 2001. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **18**:97-113.
- Kamiryo, T., M. Mishina, S. I. Tashiro, and S. Numa.** 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.
- Kamiryo, T., S. Parthasarathy, and S. Numa.** 1976. Evidence that acyl coenzyme A synthetase activity is required for repression of yeast acetyl coenzyme A carboxylase by exogenous fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:386-90.
- Kamp, F., D. Zakim, F. Zhang, N. Noy, and J. A. Hamilton.** 1995. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* **34**:11928-37.
- Kanayama, N., M. Ueda, H. Atomi, and A. Tanaka.** 1998. Genetic evaluation of physiological functions of thiolase isoenzymes in the n-alkalane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. *J Bacteriol* **180**:690-8.
- Karpichev, I. V., Y. Luo, R. C. Mariani, and G. M. Small.** 1997. A complex containing two transcription factors regulates peroxisome proliferation and the coordinate induction of beta-oxidation enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**:69-80.
- Karpichev, I. V., and G. M. Small.** 1998. Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**:6560-70.
- Kato, K., and N. Uemura.** 1982. Process for the preparation of long-chain dicarboxylic acid by fermentation. US.
- Katzmann, D. J., P. E. Burnett, J. Golin, Y. Mahe, and W. S. Moye-Rowley.** 1994. Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product. *Mol Cell Biol* **14**:4653-61.
- Kean, L. S., A. M. Grant, C. Angeletti, Y. Mahe, K. Kuchler, R. S. Fuller, and J. W. Nichols.** 1997. Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, PDR1 and PDR3. *J Cell Biol* **138**:255-70.
- Kelly, S. L., A. Arnoldi, and D. E. Kelly.** 1993. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem Soc Trans* **21**:1034-8.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* **400**:80-2.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele, and D. E. Kelly.** 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:174-9.

Kihara, A., and Y. Igarashi. 2004. Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol Biol Cell* **15**:4949-59.

Kim, J. W., T. J. Park, D. D. Ryu, and J. Y. Kim. 2000. High cell density culture of *Yarrowia lipolytica* using a one-step feeding process. *Biotechnol Prog* **16**:657-60.

Kim, T., O. Young-Sook, and S. Kim. 2000. The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil degrading yeast *Yarrowia lipolytica* 180. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**:333-337.

Kispal, G., P. Csere, C. Prohl, and R. Lill. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* **18**:3981-9.

Klein, M., Y. M. Mamnun, T. Eggmann, C. Schuller, H. Wolfger, E. Martinoia, and K. Kuchler. 2002. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* **520**:63-7.

Kleinfeld, A. M., and J. Storch. 1993. Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry* **32**:2053-61.

Klingenberg, M. 1979. Overview of mitochondrial metabolite transport systems. *Methods Enzymol* **56**:245-52.

Klug, M. J., and A. J. Markovetz. 1967. Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of n-alkanes and 1-alkenes by *Candida lipolytica*. *J Bacteriol* **93**:1847-52.

Knoll, L. J., D. R. Johnson, and J. I. Gordon. 1994. Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. *J Biol Chem* **269**:16348-56.

Knoll, L. J., D. R. Johnson, and J. I. Gordon. 1995. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing fatty acid activation gene (FAA) deletions with a mammalian acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **270**:10861-7.

Knudsen, J., N. J. Faergeman, H. Skott, R. Hummel, C. Borsting, T. M. Rose, J. S. Andersen, P. Hojrup, P. Roepstorff, and K. Kristiansen. 1994. Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *Biochem J* **302** (Pt 2):479-85.

Koffel, R., R. Tiwari, L. Falquet, and R. Schneiter. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* **25**:1655-68.

Kogure, T., M. Takagi, and A. Ohta. 2005. n-Alkane and clofibrate, a peroxisome proliferator, activate transcription of ALK2 gene encoding cytochrome P450alk2 through distinct cis-acting promoter elements in *Candida maltosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:78-86.

- Kohlwein, S. D., and F. Paltauf.** 1984. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **792**:310-7.
- Kolaczowska, A., and A. Goffeau.** 1999. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist Updat* **2**:403-414.
- Kolaczowski, M., A. Kolaczowska, J. Luczynski, S. Witek, and A. Goffeau.** 1998. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist* **4**:143-58.
- Kreger van Rij, N.** 1984. The yeasts, a taxonomic study.
- Kren, A., Y. M. Mamnun, B. E. Bauer, C. Schuller, H. Wolfger, K. Hatzixanthis, M. Mollapour, C. Gregori, P. Piper, and K. Kuchler.** 2003. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol Cell Biol* **23**:1775-85.
- Kruse, K., A. Förster, T. Juretzek, S. Mauersberger, and G. Barth.** 2004. Method for the biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*.
- Kuchler, K., R. E. Sterne, and J. Thorner.** 1989. *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *Embo J* **8**:3973-84.
- Kunau, W. H.** 1998. Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr Opin Microbiol* **1**:232-7.
- Kunau, W. H., V. Dommes, and H. Schulz.** 1995. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* **34**:267-342.
- Lasorsa, F. M., P. Scarcia, R. Erdmann, F. Palmieri, H. Rottensteiner, and L. Palmieri.** 2004. The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in DeltapH formation across peroxisomal membranes. *Biochem. J.* **381**:581-585.
- Lazarow, P. B., and W.-H. Kunan.** 1997. Peroxisomes, Cold Spring Harbor ed, vol. III, New-York.
- Le Dall, M. T., J. M. Nicaud, and C. Gaillardin.** 1994. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **26**:38-44.
- Leber, R., K. Landl, E. Zinser, H. Ahorn, A. Spok, S. D. Kohlwein, F. Turnowsky, and G. Daum.** 1998. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol Biol Cell* **9**:375-86.
- Leber, R., E. Zinser, G. Zellnig, F. Paltauf, and G. Daum.** 1994. Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1421-8.

Leighton, J., and G. Schatz. 1995. An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *Embo J* **14**:188-95.

Lester, R. L., G. B. Wells, G. Oxford, and R. C. Dickson. 1993. Mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking sphingolipids synthesize novel inositol glycerophospholipids that mimic sphingolipid structures. *J Biol Chem* **268**:845-56.

Li, X., and S. J. Gould. 2002. PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* **156**:643-51.

Li, Y., and W. A. Prinz. 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate nonvesicular, raft-modulated sterol movement from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**:45226-34.

Li, Z. S., M. Szczypka, Y. P. Lu, D. J. Thiele, and P. A. Rea. 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* **271**:6509-17.

Lopes, T. S., J. Klootwijk, A. E. Veenstra, P. C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H. A. Raue, and R. J. Planta. 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* **79**:199-206.

Lucau-Danila, A., T. Delaveau, G. Lelandais, F. Devaux, and C. Jacq. 2003. Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J Biol Chem* **278**:52641-50.

Luo, Y. S., J. M. Nicaud, P. P. Van Veldhoven, and T. Chardot. 2002. The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. *Arch Biochem Biophys* **407**:32-38.

Luo, Y. S., H. J. Wang, K. V. Gopalan, D. K. Srivastava, J. M. Nicaud, and T. Chardot. 2000. Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Arch Biochem Biophys* **384**:1-8.

Madzak, C., B. Treton, and S. Blanchin-Roland. 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**:207-16.

Maftahi, M., C. Gaillardin, and J. M. Nicaud. 1996. Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**:859-68.

Mahe, Y., A. Parle-McDermott, A. Nourani, A. Delahodde, A. Lamprecht, and K. Kuchler. 1996. The ATP-binding cassette multidrug transporter Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae*: a novel target for the transcription factors Pdr1 and Pdr3. *Mol Microbiol* **20**:109-17.

Mammun, Y. M., R. Pandjaitan, Y. Mahe, A. Delahodde, and K. Kuchler. 2002. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Mol Microbiol* **46**:1429-40.

Mamnun, Y. M., C. Schuller, and K. Kuchler. 2004. Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett* **559**:111-7.

Marchal, R., O. Chaude, and M. Metche. 1977. Production of citric acid from n-paraffins by *Saccharomycopsis lipolytica*: kinetics and balance of the fermentation. *Europ J Appl Microbiol* **4**:111-117.

Marshall, P. A., Y. I. Krimkevich, R. H. Lark, J. M. Dyer, M. Veenhuis, and J. M. Goodman. 1995. Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J Cell Biol* **129**:345-55.

Martens, J. A., J. Genereaux, A. Saleh, and C. J. Brandl. 1996. Transcriptional activation by yeast PDR1p is inhibited by its association with NGG1p/ADA3p. *J Biol Chem* **271**:15884-90.

Mason, D. L., M. P. Mallampalli, G. Huyer, and S. Michaelis. 2003. A region within a luminal loop of *Saccharomyces cerevisiae* Ycf1p directs proteolytic processing and substrate specificity. *Eukaryot Cell* **2**:588-98.

Mason, D. L., and S. Michaelis. 2002. Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Biol Cell* **13**:4443-55.

Mauersberger, S., H. Drechsler, G. Oehme, and H. G. Müller. 1992. Substrate specificity and stereoselectivity of fatty alcohol oxidase from the yeast *Candida maltosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:66-73.

Mauersberger, S., and R. N. Matiashova. 1980. [Cytochrome P-450 content in yeast cells during growth on hexadecane]. *Mikrobiologiya* **49**:571-7.

Mauersberger, S., and J. M. Nicaud. 2003. Tagging genes by insertionnal mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*, p. 343-356. In K. Wolf, K. Breunig, and G. Barth (ed.), *Laboratory manual on non-conventional yeast in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Mauersberger, S., M. Ohkuma, W.-H. Schunck, and M. Takagi. 1996. *Candida maltosa*, p. 411-580. In K. Wolf (ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Mauersberger, S., H. J. Wang, C. Gaillardin, G. Barth, and J. M. Nicaud. 2001. Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *J Bacteriol* **183**:5102-9.

McDonough, V. M., J. E. Stuke, and C. E. Martin. 1992. Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* **267**:5931-6.

McHale, M. W., K. D. Kroening, and D. A. Bernlohr. 1996. Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene. *Yeast* **12**:319-31.

Mishina, M., T. Kamiryo, S. Tashiro, T. Hagihara, A. Tanaka, S. Fukui, M. Osumi, and S. Numa. 1978. Subcellular localization of two long-chain acyl-coenzyme-A synthetases in *Candida lipolytica*. *Eur J Biochem* **89**:321-8.

Mitchell, A. G., and C. E. Martin. 1997. *Fah1p*, a *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b5 fusion protein, and its *Arabidopsis thaliana* homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids. *J Biol Chem* **272**:28281-8.

Mitchell, A. G., and C. E. Martin. 1995. A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase. *J Biol Chem* **270**:29766-72.

Mlickova, K., E. Roux, K. Athenstaedt, S. d'Andrea, G. Daum, T. Chardot, and J. M. Nicaud. 2004. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **70**:3918-24.

Mobley, D. P. L., and G. K. Shank. 2000. Method for high specific bioproductivity of alpha, omega-alkane dicarboxylic acids using *Candida tropicalis*. WO0017380

Mohamed, A. H., S. S. Chirala, N. H. Mody, W. Y. Huang, and S. J. Wakil. 1988. Primary structure of the multifunctional alpha subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from *FAS2* gene sequence. *J Biol Chem* **263**:12315-25.

Morgan, P. 1979. Dicarboxylic acids, vol. 3rd ed.

Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel, and P. Aubourg. 1993. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**:726-30.

Moye-Rowley, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* **2**:381-9.

Moye-Rowley, W. S., K. D. Harshman, and C. S. Parker. 1989. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3**:283-92.

Muller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen, and H. Dalboge. 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**:1267-83.

Mullner, H., D. Zweytick, R. Leber, F. Turnowsky, and G. Daum. 2004. Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1663**:9-13.

- Nakagawa, T., T. Imanaka, M. Morita, K. Ishiguro, H. Yurimoto, A. Yamashita, N. Kato, and Y. Sakai.** 2000. Peroxisomal membrane protein Pmp47 is essential in the metabolism of middle-chain fatty acid in yeast peroxisomes and is associated with peroxisome proliferation. *J Biol Chem* **275**:3455-61.
- Navarro, B., and J. C. Igual.** 1994. ADR1 and SNF1 mediate different mechanisms in transcriptional regulation of yeast POT1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **202**:960-6.
- Nelissen, B., R. De Wachter, and A. Goffeau.** 1997. Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**:113-34.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus, and D. W. Nebert.** 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.
- Neueglise, C., F. Chalvet, P. Wincker, C. Gaillardin, and S. Casaregola.** 2005. Mutator-like element in the yeast *Yarrowia lipolytica* displays multiple alternative splicings. *Eukaryot Cell* **4**:615-24.
- Neueglise, C., H. Feldmann, E. Bon, C. Gaillardin, and S. Casaregola.** 2002. Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Res* **12**:930-43.
- Neueglise, C., J. M. Nicauda, P. Ross-Macdonald, and C. Gaillardin.** 1998. A shuttle mutagenesis system for tagging genes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **213**:37-46.
- Nicaud, J. M., E. Fabre, and C. Gaillardin.** 1989. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr Genet* **16**:253-60.
- Nicaud, J. M., C. Madzak, P. van den Broek, C. Gysler, P. Duboc, P. Niederberger, and C. Gaillardin.** 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* **2**:371-9.
- Oelkers, P., D. Cromley, M. Padamsee, J. T. Billheimer, and S. L. Sturley.** 2002. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* **277**:8877-81.
- Ogrydziak, D. M., A. L. Demain, and S. R. Tannenbaum.** 1977. Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **497**:525-38.
- Oh, C. S., D. A. Toke, S. Mandala, and C. E. Martin.** 1997. ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**:17376-84.
- Ohkuma, M., T. Hikiji, T. Tanimoto, W. H. Schunck, H. G. Muller, K. Yano, and M. Takagi.** 1991. Evidence that more than one gene encodes n-alkane-inducible cytochrome P-450s in *Candida maltosa*, found by two-step gene disruption. *Agric Biol Chem* **55**:1757-64.

- Ohkuma, M., T. Tanimoto, K. Yano, and M. Takagi.** 1991. CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*: molecular cloning and nucleotide sequence of the two tandemly arranged genes. *DNA Cell Biol* **10**:271-82.
- Ortiz, D. F., M. V. St Pierre, A. Abdulmessih, and I. M. Arias.** 1997. A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* **272**:15358-65.
- Osmundsen, H., J. Bremer, and J. Pedersen.** 1991. Metabolics aspects of peroxisomal beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1085**:141-158.
- Osumi, M., F. Fukuzumi, N. Yamada, T. Nagatani, Y. Teranishi, A. Tanaka, and S. Fukui.** 1975. Surface structure of some *Candida* yeast cells grown on *n*-alkanes. *J. Ferment. Technol.* **53**:244-248.
- Palmieri, L., F. M. Lasorsa, A. Voza, G. Agrimi, G. Fiermonte, M. J. Runswick, J. E. Walker, and F. Palmieri.** 2000. Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1459**:363-9.
- Palmieri, L., H. Rottensteiner, W. Girzalsky, P. Scarcia, F. Palmieri, and R. Erdmann.** 2001. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *Embo J* **20**:5049-59.
- Papanikolaou, S., and G. Aggelis.** 2003. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr Microbiol* **46**:398-402.
- Park, C. S., C. C. Chang, J. Y. Kim, D. M. Ogrydziak, and D. D. Ryu.** 1997. Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **272**:6876-81.
- Petrovic, S., L. Pascolo, R. Gallo, F. Cupelli, J. D. Ostrow, A. Goffeau, C. Tiribelli, and C. V. Bruschi.** 2000. The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:561-71.
- Picataggio, S., K. Deanda, and J. Mielenz.** 1991. Determination of *Candida tropicalis* acyl coenzyme A oxidase isozyme function by sequential gene disruption. *Mol Cell Biol* **11**:4333-9.
- Picataggio, S., C. Rohrer, and L. D. Eirich.** 1995. Method for increasing the omega hydrolase activity in *Candida tropicalis*. US.5648247
- Picataggio, S., T. Rohrer, K. Deanda, D. Lanning, R. Reynolds, J. Mielenz, and L. D. Eirich.** 1992. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology (N Y)* **10**:894-8.
- Pignede, G., H. Wang, F. Fudalej, C. Gaillardin, M. Seman, and J. M. Nicaud.** 2000. Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**:2802-2810.

- Pignede, G., H. J. Wang, F. Fudalej, M. Seman, C. Gaillardin, and J. M. Nicaud.** 2000. Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **66**:3283-9.
- Piper, P., Y. Mahe, S. Thompson, R. Pandjaitan, C. Holyoak, R. Egner, M. Muhlbauer, P. Coote, and K. Kuchler.** 1998. The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *Embo J* **17**:4257-65.
- Plempner, R. K., R. Egner, K. Kuchler, and D. H. Wolf.** 1998. Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* **273**:32848-56.
- Pohl, A., P. F. Devaux, and A. Herrmann.** 2005. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1733**:29-52.
- Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**:320-9.
- Prasad, R., S. L. Panwar, and Smriti.** 2002. Drug resistance in yeasts--an emerging scenario. *Adv Microb Physiol* **46**:155-201.
- Ratledge, C.** 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids, p. 235-291. In B. S. Kamel, Kakuda, Y. (ed.), *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*. Blackie academic and professional, London.
- Ratledge, C., and K. Tan.** 1990. Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*:223-254.
- Riordan, J. R.** 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *ANNU. Rev. Physiol.* **67**:701-718.
- Rizzo, W. B., Z. Lin, and G. Carney.** 2001. Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjogren-Larsson syndrome. *Chem Biol Interact* **130-132**:297-307.
- Rodrigues-Pousada, C. A., T. Nevitt, R. Menezes, D. Azevedo, J. Pereira, and C. Amaral.** 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* **567**:80-5.
- Rogers, B., A. Decottignies, M. Kolaczowski, E. Carvajal, E. Balzi, and A. Goffeau.** 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:207-14.
- Rose, T. M., E. R. Schultz, and G. J. Todaro.** 1992. Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11287-91.

- Rottensteiner, H., A. J. Kal, M. Filipits, M. Binder, B. Hamilton, H. F. Tabak, and H. Ruis.** 1996. Pip2p: a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**:2924-34.
- Rottensteiner, H., L. Palmieri, A. Hartig, B. Hamilton, H. Ruis, R. Erdmann, and A. Gurvitz.** 2002. The peroxisomal transporter gene *ANT1* is regulated by a deviant oleate response element (ORE): characterization of the signal for fatty acid induction. *Biochem. J.* **365**:109-117.
- Sakaki, T., and K. Inouye.** 2000. Practical application of mammalian cytochrome P450. *J Biosci Bioeng* **90**:583-90.
- Saleh, A., V. Lang, R. Cook, and C. J. Brandl.** 1997. Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J Biol Chem* **272**:5571-8.
- Sandager, L., M. H. Gustavsson, U. Stahl, A. Dahlqvist, E. Wiberg, A. Banas, M. Lenman, H. Ronne, and S. Szymne.** 2002. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem* **277**:6478-82.
- Sarubbo, L. A., M. C. Marcal, M. L. Neves, M. P. Silva, A. L. Porto, and G. M. Campos-Takaki.** 2001. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol* **95**:59-67.
- Sauer, B.** 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**:2087-96.
- Schaffer, J. E., and H. F. Lodish.** 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**:427-36.
- Scheller, U., T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, and W. H. Schunck.** 1998. Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to alpha,omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* **273**:32528-34.
- Scheller, U., T. Zimmer, E. Kargel, and W.-H. Schunck.** 1996. Characterization of then-Alkane and Fatty Acid Hydroxylating Cytochrome P450 Forms 52A3 and 52A4. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **328**:245-254.
- Schindler, J., F. Meusdoerffer, and H. Giesel-Bühler.** 1990. Microbial production in industrial chemicals: basic features of dicarboxylic acid production by yeast (Germ). *Forum Mikrobiol* **5**:274-281.
- Schjerling, C. K., R. Hummel, J. K. Hansen, C. Borsting, J. M. Mikkelsen, K. Kristiansen, and J. Knudsen.** 1996. Disruption of the gene encoding the acyl-CoA-binding protein (ACB1) perturbs acyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**:22514-21.
- Schmid-Berger, N., B. Schmid, and G. Barth.** 1994. Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **176**:2477-82.

Schuller, C., B. E. Bauer, and K. Kuchler. 2003. Inventory and Evolution of Fungal ABC Protein Genes, Academic Press-Elsevier Science ed, London.

Schuller, C., Y. M. Mammun, M. Mollapour, G. Krapf, M. Schuster, B. E. Bauer, P. W. Piper, and K. Kuchler. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**:706-20.

Schweizer, E., and H. Bolling. 1970. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in saturated fatty acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**:660-6.

Schweizer, M., C. Lebert, J. Holtke, L. M. Roberts, and E. Schweizer. 1984. Molecular cloning of the yeast fatty acid synthetase genes, FAS1 and FAS2: illustrating the structure of the FAS1 cluster gene by transcript mapping and transformation studies. *Mol Gen Genet* **194**:457-65.

Schweizer, M., L. M. Roberts, H. J. Holtke, K. Takabayashi, E. Hollerer, B. Hoffmann, G. Muller, H. Kottig, and E. Schweizer. 1986. The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. *Mol Gen Genet* **203**:479-86.

Senior, A. E., and D. C. Gadsby. 1997. ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol* **8**:143-50.

Servos, J., E. Haase, and M. Brendel. 1993. Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol Gen Genet* **236**:214-8.

Shani, N., and D. Valle. 1996. A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11901-6.

Sharma, K. G., R. Kaur, and A. K. Bachhawat. 2003. The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Arch Microbiol* **180**:108-17.

Sharma, K. G., D. L. Mason, G. Liu, P. A. Rea, A. K. Bachhawat, and S. Michaelis. 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* **1**:391-400.

Shiio, I., and R. Uchio. 1971. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from alkanes. Part I. Screening and properties of microorganisms producing dicarboxylic acids. *Agric. Biol. Chem.* **35**.

Skoneczny, M., A. Chelstowska, and J. Rytka. 1988. Study of the coinduction by fatty acids of catalase A and acyl-CoA oxidase in standard and mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur J Biochem* **174**:297-302.

- Smit, M. S., M. M. Mokgoro, E. Setati, and J. M. Nicaud.** 2005. alpha,omega-Dicarboxylic acid accumulation by acyl-CoA oxidase deficient mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **27**:859-64.
- Smith, B. T., T. K. Sengupta, and I. Singh.** 2000. Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Exp Cell Res* **254**:309-20.
- Sorger, D., K. Athenstaedt, C. Hrastnik, and G. Daum.** 2004. A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *J Biol Chem*.
- Sorger, D., and G. Daum.** 2002. Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dgalp in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **184**:519-24.
- Sorger, D., and G. Daum.** 2003. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:289-99.
- Steinberg, S. J., S. J. Wang, D. G. Kim, S. J. Mihalik, and P. A. Watkins.** 1999. Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:615-21.
- Stewart, L. C., and M. P. Yaffe.** 1991. A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J Cell Biol* **115**:1249-57.
- Storch, J.** 1993. Diversity of fatty acid-binding protein structure and function: studies with fluorescent ligands. *Mol Cell Biochem* **123**:45-53.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough, and C. E. Martin.** 1989. Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264**:16537-44.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough, and C. E. Martin.** 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* **265**:20144-9.
- Sumita, T., T. Iida, A. Hirata, H. Horiuchi, M. Takagi, and A. Ohta.** 2002. Peroxisome deficiency represses the expression of n-alkane-inducible Y1ALK1 encoding cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters* **214**:31-38.
- Sumita, T., T. Iida, S. Yamagami, H. Horiuchi, M. Takagi, and A. Ohta.** 2002. Y1ALK1 encoding the cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica* is transcriptionally induced by n-alkane through two distinct cis-elements on its promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**:1071-1078.
- Swartzman, E. E., M. N. Viswanathan, and J. Thorner.** 1996. The PAL1 gene product is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **132**:549-63.

Swennen, D., M. F. Paul, L. Vernis, J. M. Beckerich, A. Fournier, and C. Gaillardin. 2002. Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* **148**:41-50.

Taglicht, D., and S. Michaelis. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol* **292**:130-62.

Tanaka, A., and S. Fukui. 1989. Metabolism of n-alkanes, p. 261-287. In A. H. Rose and J. S. Harrison (ed.), *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts* vol. 3. Academic Press, London.

Theodoulou, F. L., M. Holdsworth, and A. Baker. 2006. Peroxisomal ABC transporters. *FEBS Lett* **580**:1139-55.

Titorenko, V. I., J. M. Nicaud, H. Wang, H. Chan, and R. A. Rachubinski. 2002. Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* **156**:481-94.

Titorenko, V. I., and R. A. Rachubinski. 2001. The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:357-68.

Titorenko, V. I., J. J. Smith, R. K. Szilard, and R. A. Rachubinski. 2000. Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**:21-6.

Toke, D. A., and C. E. Martin. 1996. Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**:18413-22.

Trotter, P. J. 2001. The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **21**:97-119.

Trotter, P. J., S. Y. Ho, and J. Storch. 1996. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res* **37**:336-46.

Tusnady, G. E., E. Bakos, A. Varadi, and B. Sarkadi. 1997. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**:1-3.

Uchio, R., and I. Shiio. 1972. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from alkanes. Part I. Production by *Candida cloacae* mutant unable to assimilate dicarboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* **36**.

Uemura, N. 1985. Industrialisation de la production des diacides par fermentation de n-paraffines. *Hakko to Kogyo* **43**:436-441.

Urlacher, V. B., S. Lutz-Wahl, and R. D. Schmid. 2004. Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:317-25.

van der Walt, J., and J. von Arx. 1980. The yeast *Yarrowia* gen. nov., vol. 46.

van Roermund, C. W., R. Drissen, M. van Den Berg, L. Ijlst, E. H. Hetteema, H. F. Tabak, H. R. Waterham, and R. J. Wanders. 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.

van Roermund, C. W., Y. Elgersma, N. Singh, R. J. Wanders, and H. F. Tabak. 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *Embo J* **14**:3480-6.

van Roermund, C. W., E. H. Hetteema, A. J. Kal, M. van den Berg, H. F. Tabak, and R. J. Wanders. 1998. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *Embo J* **17**:677-87.

van Roermund, C. W., H. F. Tabak, M. van Den Berg, R. J. Wanders, and E. H. Hetteema. 2000. Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **150**:489-98.

Vance-Harrop, M., N. Gusmao, and G. M. Campos-Takaki. 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Braz. J. Microbiol.* **34**:120-123.

Vanhanen, S., M. West, J. T. Kroon, N. Lindner, J. Casey, Q. Cheng, K. M. Elborough, and A. R. Slabas. 2000. A consensus sequence for long-chain fatty-acid alcohol oxidases from *Candida* identifies a family of genes involved in lipid omega-oxidation in yeast with homologues in plants and bacteria. *J Biol Chem* **275**:4445-52.

Vernis, L., A. Abbas, M. Chasles, C. M. Gaillardin, C. Brun, J. A. Huberman, and P. Fournier. 1997. An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **17**:1995-2004.

Wang, H., M. T. Le Dall, Y. Wache, C. Laroche, J. M. Belin, and J. M. Nicaud. 1999. Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* **31**:165-74.

Wang, H. J., M. T. Le Dall, Y. Wach, C. Laroche, J. M. Belin, C. Gaillardin, and J. M. Nicaud. 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., Y. Luo, and G. M. Small. 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.

Watkins, P. A., J. F. Lu, L. T. Braiterman, S. J. Steinberg, and K. D. Smith. 2000. Disruption of a yeast very-long-chain acyl-CoA synthetase gene simulates the cellular phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**:333-7.

Watkins, P. A., J. F. Lu, S. J. Steinberg, S. J. Gould, K. D. Smith, and L. T. Braiterman. 1998. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very long-chain fatty

acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J Biol Chem* **273**:18210-9.

Welch, J. W., and A. L. Burlingame. 1973. Very long-chain fatty chains in yeast. *J. Bacteriol.* **115**:464-466.

Wemmie, J. A., M. S. Szczypka, D. J. Thiele, and W. S. Moye-Rowley. 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J Biol Chem* **269**:32592-7.

Werck-Reichhart, D., and R. Feyereisen. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**:REVIEWS3003.

Wickerham, L. J., C. P. Kurtzman, and A. I. Herman. 1970. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* **167**:1141.

Wilcox, L. J., D. A. Balderes, B. Wharton, A. H. Tinkelenberg, G. Rao, and S. L. Sturley. 2002. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem* **277**:32466-72.

Wilson, C. R., D. L. Craft, L. D. Eirich, M. Eshoo, M. Madduri, C. Cornett, A. Brener, T. Tang, J. Loper, and M. Gleeson. 2004. Cytochrome P450 monooxygenase and NADPH cytochrome P450 reductase and proteins related to the omega hydroxylase complex of *Candida tropicalis* and method relating thereto. US.

Wolfger, H., Y. Mahe, A. Parle-McDermott, A. Delahodde, and K. Kuchler. 1997. The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett* **418**:269-74.

Wolfger, H., Y. M. Mamnun, and K. Kuchler. 2004. The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J Biol Chem* **279**:11593-9.

Wu, A., J. A. Wemmie, N. P. Edgington, M. Goebel, J. L. Guevara, and W. S. Moye-Rowley. 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* **268**:18850-8.

Wylin, T., M. Baes, C. Brees, G. P. Mannaerts, M. Fransen, and P. P. Van Veldhoven. 1998. Identification and characterization of human PMP34, a protein closely related to the peroxisomal integral membrane protein PMP47 of *Candida boidinii*. *Eur J Biochem* **258**:332-8.

Yamagami, S., D. Morioka, R. Fukuda, and A. Ohta. 2004. A basic helix-loop-helix transcription factor essential for cytochrome p450 induction in response to alkanes in yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **279**:22183-9.

Yarrow, D. 1972. Four new combinations in Yeasts., vol. 38.

Young, L., K. Leonhard, T. Tatsuta, J. Trowsdale, and T. Langer. 2001. Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**:2135-8.

Zhang, S., Y. Skalsky, and D. J. Garfinkel. 1999. MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**:473-83.

Zhang, X., Z. Cui, T. Miyakawa, and W. S. Moye-Rowley. 2001. Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**:8812-9.

Zimmer, T., M. Ohkuma, A. Ohta, M. Takagi, and W. H. Schunck. 1996. The CYP52 multigene family of *Candida maltosa* encodes functionally diverse n-alkane-inducible cytochromes P450. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:784-9.

Zinjarde, S. S., and A. Pant. 2002. Emulsifier from a tropical marine yeast, *yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* **42**:67-73.

Zou, Z., C. C. DiRusso, V. Ctrnacta, and P. N. Black. 2002. Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem* **277**:31062-71.

ANNEXE I

APPLICATIONS OF THE NON-CONVENTIONAL YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*.

France Thevenieau, Jean-Marc Nicaud, Claude Gaillardin.

Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, UMR2585-INRA-CNRS-INAP-G, INRA Centre de Grignon, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France.

Contents

1. Introduction
2. *Yarrowia lipolytica*
3. Hydrophobic substrates utilization
4. Genomic
5. Genetic tools
6. Bioconversion I: secondary metabolite, aroma production, DCA production
7. Bioconversion II: lipase enantioselectivity, EH expression,
8. Single Cell Oil
9. Protein expression/secretion: strains, vectors, kit
10. Conclusion
- 11 References

Abstract

The yeast *Yarrowia lipolytica* is often found associated to proteinaceous or hydrophobic substrates such as alkanes or lipids. To assimilate these hydrophobic substrates, *Y. lipolytica* has developed an adaptative strategy resulting in elaborated morphological and physiological changes leading to terminal and β -oxidation of substrates as well as to lipid storage. The completion of the sequence of the *Y. lipolytica* genome greatly improved our understanding of these mechanisms. Three main applications of this metabolism will be discussed. The first corresponds to bioconversion processes for the production of secondary metabolites (citric acid), of aroma (γ lactone) and of chemicals (dicarboxylic acids). The second leads to fine chemical production by enantio separation of pharmaceutical compounds using *Y. lipolytica* enzymes such as epoxyde hydrolase or lipase. The third one refers to production of Single Cell Oils (SCO) from agriculture feedstock. In addition to its ability to handle hydrophobic substrates, *Y. lipolytica* has also been recognised as a strong secretor of various proteins such as proteases, lipases, Rnases, etc... A comprehensive review of recent developments of the *Y. lipolytica* expression/secretion system will thus finally be presented.

2. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica was assigned to the *Dipodascaceae* family Kurtzman and Fell (1998). This hemiascomycetous yeast was formerly known as *Candida*, *Endomycopsis*, or *Saccharomycopsis lipolytica* Barth and Gaillardin (1996), (1997). *Y. lipolytica* is the only known species in its genus, but the asexual taxon *Candida deformans* appears phylogenetically closely related Bigey *et al.* (2003). Recently, the two species *C. bentonensis* and *C. hispaniensis* were proposed as new members of the *Yarrowia* clade Kurtzman (2005). *Y. lipolytica* is a dimorphic fungus which forms yeast cells, pseudohyphae and septate hyphae depending on strains and growth conditions Dominguez *et al.* (2000). *Y. lipolytica* exhibits various colony shapes ranging from smooth and glistening to heavily convoluted and mat. Most strains are unable to grow above 32°C and the

species is strictly aerobic. It is therefore not considered as pathogenic Holzschu *et al.* (1979).

Y. lipolytica is often found associated to proteinaceous or hydrophobic substrates such as alkanes or lipids Sinigaglia *et al.* (1994), Barth and Gaillardin (1997), Fickers *et al.* (2005a). This yeast can be commonly isolated from dairy products such as cheeses or as a contaminant from various commercial chilled foods (cheeses, yoghurt, and sausages). Strains have also been isolated from soil, sewage and oil-polluted environments.

Most natural isolates are haploids, although occasional isolation of diploid clones has been reported. Both haploid and diploid states are stable under laboratory conditions, although diploids may tend to lose chromosomes upon storage by mitotic haploidisation. Mating of haploids involves two mating types, encoded by the *MatA* and *MatB* loci without silent cassettes Butler *et al.* (2004). Sporulation occurs under specific growth conditions and generates four crescent shaped spores that can be separated with a micromanipulator Barth and Gaillardin (1996).

3. Hydrophobic substrate utilization

Although the first studies on hydrophobic substrate (HS) utilisation by *Y. lipolytica* were published more than 50 years ago Peters and Nelson (1948), Klug and Markovetz (1967), many aspects of this metabolism are still unclear.

Since alkanes, fatty acids and triglycerides are poorly water-miscible compounds, the first challenge for the cell is thus to get access to them. In order to handle these substrates, *Y. lipolytica* has elaborated sophisticated mechanisms both to modify their solubility (surfactant-mediated transport) and to remodel its own cell surface (direct interfacial transport). The surfactant-mediated transport involves solubilization of HS by an extracellular emulsifier, called liposan, which was initially described as a 27 Kda glycolipid consisting of 5% protein, 20% carbohydrate and 75% lipid Zinjarde and Pant (2002). More recently, the production of a different surfactant was reported; containing 43-54.3 % protein, 40-35.5 % carbohydrate and 16-8.4 % lipid Vance-Harrop *et al.* (2003). It is presently unclear whether different emulsifiers are produced depending on strain, growth and media composition, or if there is a single protein presenting different levels of carbohydrate and lipid modification. No information is available on the gene(s) coding them and on their synthesis pathways, but recent successes at optimising culture conditions for bioemulsifier production should permit progress in the near future Albuquerque *et al.* (2006). The second mechanism, direct interfacial transport, entails modification of the cell surface by the production of protrusions on top of which HS droplets binds Mlickova *et al.* (2004). The production of emulsifier together with the synthesis of protrusions results in an increase of the apolar properties of the cell surface, in the decrease of HS droplet sizes and in an increase of the number of HS droplets on the cell surface, all improving the contact between HS and the cells. The protrusions resemble channels that connect the cell wall to the interior of the cell and probably constitute a transport mechanism which details remain to be elucidated. In addition to those surface properties changes, we observed that the periplasmic space width increased from approximately 80 nm to 150 nm while the cell wall thickness decreased from 40 to 25 nm.

The following metabolic steps have been the subject of recent reviews and will only be summarised here Barth *et al.* (2003), Fickers *et al.* (2005c). Once into the cell, alkanes undergo primary or monoterminial oxidation in three steps which take place in both the endoplasmic reticulum (ER) and the peroxisomes. The first step requires terminal hydroxylation by a P450-dependent alkane monooxygenase (AMOS, encoded by *ALK* genes belonging to the *CYP52* family) and its cognate electron transfer component, an NADP-dependent P450 reductase (CPR, *NCP* gene). The second step is performed either by a fatty-alcohol dehydrogenase (FADH, *ADH* genes) located in the

endoplasmic reticulum or by a fatty-alcohol oxidase (FAOD, *FAO* genes) located in the peroxisome. The final step involves oxidation of the fatty aldehyde to a free fatty acid by ER or peroxisomal fatty-aldehyde dehydrogenase (FALDH, *ALD* genes).

The β -oxidation of fatty acid occurs exclusively in the peroxisome and requires four steps. The first step is performed by an acyl-CoA oxidase (AOX, *POX* genes). The two next reactions are catalysed by a multifunctional enzyme bearing the hydratase and dehydrogenase activities (*MFE* gene). The final step is catalyzed by the thiolase (*THIO* gene) and releases an acyl-CoA shortened by two carbons (N-2) and an acetyl-CoA.

Depending on the environmental conditions, *Y. lipolytica* is able to mobilise fatty acids or to store them as triacylglycerides (TAG) and steryl esters (STE) into lipid bodies (LB). Depending on growth conditions, *Y. lipolytica* can thus accumulate large amount of lipids, and is therefore considered as an oleaginous yeast (see below).

4. Genomics

Recently, the complete genome sequence of the haploid *Y. lipolytica* strain E150 (CLIB99) has been determined by the Génolevure consortium Casaregola *et al.* (2000), Dujon *et al.* (2004). More information can be found at the Génolevures web site (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). *Y. lipolytica* has 20,5 Mb genome with a G+C content of 49%, composed of six chromosomes. Although linkage groups are broadly conserved, natural isolates of *Y. lipolytica* seem to propagate mostly in a clonal form: they have thus somewhat divergent genetic structures which may account for the low spore viability observed in the initial inbreeding programs Barth and Gaillardin (1996). Several differences were observed between natural isolates; they differ by chromosomes sizes, the number of rDNA repeats and the presence or absence of the retrotransposon Ylt1 (present in the American strain CBS6142-2 and absent in the French W29 and the German H222 wild-type strains). The total number of putative CDSs is estimated to be 6,703. This low number is unexpected considering the size of the *Y. lipolytica* genome. The estimated overall coding sequence is 45.8 % against 70 % for *S. cerevisiae*, i.e. the gene density is one gene per 3.3 kb for *Y. lipolytica* vs. one gene per 2 kb for *S. cerevisiae*. The number of detected tRNA genes, 510, is very high, with typical eukaryotic classes which are absent from other hemiascomycetous yeasts Marck *et al.* (2006). *Y. lipolytica* also departs from other hemiascomycetous yeasts studied until now with 1006 introns at least in 908 genes (or over 13% intron containing genes), against 252 introns for *S. cerevisiae*. These introns are mainly located at the 5' end of the coding sequences like in *S. cerevisiae*. Genes containing more than one intron (87 cases of genes with two to four introns) are more common than in *S. cerevisiae* (4 cases only). Finally, a greater diversity of transposable elements is observed, with several Ty3/gypsy-like elements, non-LTR retrotransposon of the human L1 family and DNA transposons of the *Mutator* family Casaregola *et al.* (2002), Neuveglise *et al.* (2002), Neuveglise *et al.* (2005).

A striking feature revealed by the sequence of *Y. lipolytica* is a significant expansion of protein families containing paralogues of genes involved in hydrophobic substrates utilisation. Indeed, as shown in Table 1, several gene families contain more members than the other yeasts, which correlate nicely with *Y. lipolytica* addiction for HS utilisation. This was confirmed by functional analysis of the acyl-CoA oxidase family (GLR.2026) in which *POX2* and *POX3* code for long- and short- chain specific acyl-CoA oxidases, respectively Wang *et al.* (1999), Luo *et al.* (2000), Luo *et al.* (2002). Similarly, in the family GLR.1254 encoding lipases, *LIP2*, *LIP7* and *LIP8* are specific of fatty acid chain lengths, C18, C6 and C10, respectively Pignede *et al.* (2000a), Fickers *et al.* (2005c). In the cytochrome P450 family (GLR.3196), *ALK1* and *ALK2* were shown to be involved in alkane hydroxylation, C10 and C16, respectively, while *ALK3*, *ALK5* and *ALK7* code for lauric acid ω -hydroxylases Iida *et al.* (2000), Hanley *et al.* (2003), Fickers *et al.* (2005a). The large number of orthologues clearly complicated functional analysis, although strategies were devised to inactivate successively each member in a family Fickers *et al.* (2003). Recently however, functional analysis was greatly facilitated by the availability of *Y. lipolytica* oligo-arrays (available from Eurogentec), which allow easy follow-up of the expression of each gene in a family according to the alkane or fatty acid used for growth.

5. Genetic tools

Many genetic tools are nowadays available for gene manipulation for *Y. lipolytica*, ranging from conventional *in vivo* genetics (complementation, strain construction by random spore or tetrad analysis, etc.) to genetic engineering using single- or multi-copy integration at preselected sites or at random, transposon mutagenesis, replicative plasmids of controlled copy-number etc.... Available strains, plasmids, cloned genes as well as detailed methods for manipulating this yeast have been reviewed previously Barth and Gaillardin (1996). New cassettes for rapid gene disruption and marker rescue using auxotrophic markers, like *URA3* and *LEU2*, or antibiotic resistance markers, like *hph* which confers resistance to hygromycine-B, have been developed. Those new markers are flanked by *loxR* sites which allow very effective (98%) and precise marker excision by transformation with a plasmid containing the Cre recombinase. Those tools allow efficient gene disruption (average frequency of 45%) and greatly facilitate marker rescue and reuse Fickers *et al.* (2003).

6. Bioconversion I

The possibility of producing valuable compounds by bioconversion of HS was first demonstrated by the production of intermediate metabolites (chapter 6.1). Development of genetic tools

and research on β -oxidation demonstrated that modified *Y. lipolytica* strains could be used for aroma production, e.g. lactone production (chapter 6.2). Recent advances on pathways involved in HS utilisation by *Y. lipolytica* allowed the obtention of genetically modified strains for dicarboxylic acids (DCA) production (chapter 6.3).

6.1 Secondary metabolite

Y. lipolytica is able to grow efficiently on low-cost HS such as fats and vegetables oils, which metabolites feed into its highly efficient TCA cycle. Depending on nutrition factors used for growth limitation, different TCA-cycle intermediates accumulate.

Nitrogen exhaustion triggers production and secretion of citric (CA) and isocitric (ICA) acids. Initially, wild-type strains produced simultaneously CA and ICA. The percentage of CA versus ICA depends on the substrates used. While CA represents 90 % of acids when *Y. lipolytica* is grown on glucose, glycerol or ethanol, it represents only 60 % when growth is performed on HS. However this percentage can be improved by either, i) the addition of acetate to the fermentation medium (the percentage of CA increases from 60 to 80 %), ii) the use of selected mutant strains which increase CA levels from 65 to 80 % Finogenova *et al.* (2002), Finogenova *et al.* (2005), or iii) the use of genetically modified strains over-expressing the isocitrate lyase encoded by the *ICLI* gene. For those strains, CA represents nearly 95 % of the acids when the cells are grown on any substrate Kruse *et al.* (2004). *Y. lipolytica* exhibits a high maximal production rate (up to 3 g CA l⁻¹ h⁻¹) and a high substrate-related yield (up to 1,5 g g⁻¹, especially on HS). Barth and co-workers reported the production of up to 250 g l⁻¹ of CA with sunflower oil as carbon source Kruse *et al.* (2004), Fickers *et al.* (2005a). Archer Daniels Midland (Decatur, Illinois, USA) currently use such a process for the production of CA from rape seed oil Barth and Gaillardin (1996).

Thiamine limitation triggers 2-ketoglutaric acid (KG) production. *Y. lipolytica* exhibit a maximal production rate of 1,4 g KC l⁻¹ h⁻¹ with a good yield of 0.9 g g⁻¹ Weißbrodt *et al.* (1988), Chernyavskaya *et al.* (2000).

Recent work is based on the co-production of citric acid and lipase on animal and vegetable fat as shown by the Finogenova group. Depending on the mutants used, lipase activity varied from 120 to 2760 U ml⁻¹. Four of their mutants produced more than 1200 U ml⁻¹ Svetlana *et al.* (2005).

6.2 Aroma production

γ - and δ - lactone (4- and 5- alkanolides) exhibit fruity and oily notes, which are naturally present in fruit and some fermented food product, and are thus interesting as food additives. The different lactones produced by *Y. lipolytica* and the patents mentioning *Y. lipolytica* for the production of lactones have been recently reviewed Wache *et al.* (2003).

γ - lactone, the main aroma produced by yeast fermentation is obtained by biotransformation of castor oil. *Y. lipolytica* is one of the yeast species that is able to use the

castor oil as well as ricinoleic acid or its methylester, probably due to the high level of lipase and esterase produced by this yeast Fickers *et al.* (2005b). The pathway involves the shortening of the ricinoleic acid (C18) by four cycle of β -oxidation to produce the 4-hydroxydecanoic acid (C10), which is then spontaneously lactonized under acidic conditions. Process have been developed for the production of γ -lactone with the wild-type strain resulting in concentrations of several grams per liter (12g/L; Rabenhorst and Gatfield (2000)). However, *Y. lipolytica* was shown to degrade rapidly the lactone produced due to the high level of acyl-CoA oxidase activity. Indeed, this yeast possesses a family of six acyl-CoA oxidases (Aox1-6, encoded by *POX1-6*). First attempts to improve γ -lactone production involved the use of an uracil auxotrophic strain Nicaud *et al.* (1996). The auxotrophic strain was transferred at high cell density in a medium containing low amounts of uracil allowing weak proliferation and improved lactone production.

Further improvements were obtained by mastering the *POX* genotype of the strain. Interest in this enzyme family came from our first experiments showing that disruption of *POX1* resulted in an increased β -oxidation activity but in a decrease of lactone production Pagot *et al.* (1998). Characterisation of the Aox family enabled us to show that Aox2p was specific for long-chain-fatty acid while Aox3p was specific for short-chain fatty acid Luo *et al.* (2000), Luo *et al.* (2002), Wache *et al.* (2003). Aox4p and Aox5p exhibited a weak activity on the whole spectrum of straight chain-CoA and Aox1p and Aox6p did not exhibit any detectable activity.

The first strategy used to improve lactone production was to decrease the β -oxidation of the C10 lactone-precursor and the degradation of the aroma compound by deleting enzymes involved in β -oxidation of acyl-CoA shorter than C10. A 5-fold increase in γ lactone production was observed upon deletion of the short-chain specific Aox3p resulting most likely from decrease of 4-hydroxy decanoic acid degradation and limited γ -lactone degradation. In this strain, the main lactone accumulated is 3-hydroxy- γ -lactone which represents 2/3 of the C10 lactones produced. The highest level of γ -lactone was obtained with the *Apox2pox3* double mutant which did not accumulate the hydroxy form Wache *et al.* (2000), Wache *et al.* (2001). The second strategy was to increase the β -oxidation of the C18 to the C10 lactone-precursor by over expressing Aox2p involved in long chain acyl-CoA β -oxidation. Even if the lactone production was improved, the results were not fully satisfying as the Aox activity toward long chain acyl-CoA remained low and the biotransformation took place slowly, probably due to failure of the Aox complex to be correctly imported into peroxisome Titorenko *et al.* (2002).

Depending on the *POX* genotype, *Y. lipolytica* mutants accumulated different lactones (dec-2-en-4-

olide, dec-3-en-4-olide and 3-hydroxy- γ -lactone) which seem to result from lactonisation of β -oxidation intermediates at the various steps of the C10- β -oxidation cycle (Figure 1). Their structure is closely related to that of γ -lactone, but their aromatic properties are quite different Gatfield *et al.* (1993). The dec-3-en-4-olide possesses a fruity, peach-like odour more powerful than that of γ -lactone, its isomere (dec-2-en-4-olide) displays a mushroom-like note, while the 3-hydroxy- γ -lactone has no odour. Potential utilisation of those intermediates would depend on a cheap method to separate them or on the isolation of mutants affected in hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase activity. Alternatively, limitation of this activity could be obtained by environmental parameters during bioconversion like pH and agitation.

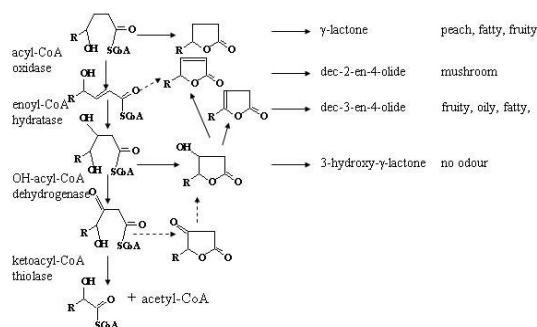


Figure 1 The four steps of β -oxidation of the 4-hydroxydecanoyl-CoA, the catalysing enzymes and the lactones potentially formed at each step with their odorous note are shown. R: C6H13.

6.3 DCA production

Dicarboxylic acids (DCA), with the general chemical formula $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, are fine chemical intermediate for the chemical industry. Nylons and other polyamides, resins, hot melt adhesives, powder coating, corrosion inhibitors, perfumes, lubricants, plasticizers, and greases are just some of the wide variety of products arising from DCA intermediates. The main DCA used are adipic acid (C6, hexanedioic acid), suberic acid (C8, octanedioic acid), sebacic acid (C10, decanedioic acid), dodecanedioic acid (C12) and brassylic acid (C13, tridecanedioic acid).

Chemical synthesis is effective with good yield for DCA smaller than C12. These can also be obtained by chemical conversion of fatty acids, such as sebacic acid which can be obtained by alkali fission of castor oil (ricinoleic acid). In order to develop alternative ways for the production of those short DCA, or to produce DCA longer than C12 or unsaturated DCA which are difficult to produce chemically, research was initiated on bioconversion alternatives. Better characterization of the pathway involved in alkane degradation was a prerequisite. This degradation pathway involves hydroxylation of the alkane by a specific cytochrome P450 monooxygenase to produce the fatty alcohol. The alcohol is oxidized by either an alcohol oxidase or an alcohol dehydrogenase to produce the corresponding aldehyde. The aldehyde is converted to fatty acid by an aldehyde dehydrogenase. This pathway corresponds to the monoterminial-oxidation. Similar steps may occur on the fatty acid, which is called ω -oxidation Fickers *et al.* (2005b).

The fatty acid and the DCA produced may however be degraded through the β -oxidation pathway. Therefore, significant DCA production will necessitate mutants affected in this pathway.

The main yeast species investigated for DCA production using either classical genetics or genetic engineering are *Candida cloacae*, *Candida tropicalis* and *Yarrowia lipolytica*. First DCA production was investigated up to pilot plant scale by the Ajinomoto Company in Japan, using a *C. cloacae* *n*-alkane non assimilating mutant. When fed an *n*-alkane together with a co-substrate that supported growth of the mutant, this strain accumulated the homologous DCA Shiio and Uchio (1971).

The first industrial process was developed by the Nippon Mining Company (Japan), using mutants of *C. tropicalis* Uemura (1985). Since 1987, the company produced approximately 150 tons of brassylic acid (DCA-13) from *n*-tridecane per year, which is used in the perfume industry as a macrocyclic musk component Uemura (1985). At present, this process is exploited by Cathay Biotechnology of Shanghai (China) and Cognis (Düsseldorf, Germany). The mutant is defective for the two acyl-CoA oxidases and for the 3-ketoacyl-CoA thiolase Kanayama *et al.* (1998).

In *C. tropicalis* DCA production was obtained by blocking the β -oxidation by deletion of the *POX* genes Picataggio *et al.* (1991). Further improvement was obtained by overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase and of the cognate cytochrome P450 reductase involved in the first hydroxylation step Picataggio *et al.* (1992). However, in fermentations producing DCA from fatty acids, small amounts (ca 0.5% [wt/wt]) of ω -hydroxy fatty acid consistently accumulated in the broth. This accumulation indicated that the second step in the ω -oxidation pathway was also rate-limiting Eschenfeldt *et al.* (2003).

Recently, Craft and coll. identified in *C. tropicalis*, three fatty alcohol oxidase genes (*FAOI-3*). The *FAOI* gene was shown to be highly induced during growth on fatty acids and *Fao1p* oxidizes ω -hydroxy fatty acid. Increasing the copy number of *FAO* genes and/or their transcriptional activity resulted in a high activity of alcohol oxidase and in an increase in the productivity of DCA Eschenfeldt *et al.* (2003).

Currently, the production of DCA is studied by using *Y. lipolytica*. This yeast has the capacity to assimilate triglycerides as carbon source. The first step of this catabolism implies hydrolysis of triglycerides into free fatty acids and glycerol by the lipolytic enzymes (lipases), identified by Peters and Nelson in 1948 Peters and Nelson (1948) under suitable conditions of pH. Hydrolysis of ester or oil and conversion into DCA take place simultaneously, which simplifies the operational protocol since the stage of chemical hydrolysis is eliminated.

In *Y. lipolytica*, six *POX* genes encode acyl-CoA oxidase isozymes (see above). Smit *et al.* used *Y. lipolytica* wild type strain W29 as well as double, triple

and quadruple *POX*-deleted strains to investigate DCA accumulation Fickers *et al.* (2005b), Smit *et al.* (2005). All the strains accumulated dodecanedioid acid from the diterminal functionalised 1,12-dodecane diol and 12-hydroxydodecanoic acid. The quadruple-deleted strain (*Apox2*, *Apox3*, *Apox4*, *Apox5*) was the only one able to accumulate DCA from C16 alkanol and alkanes. However, the DCA formed were rapidly degraded through the β -oxidation pathway.

By sequential disruption of the six *POX* genes, Thevenieau *et al.* (unpublished) constructed a sextuple *POX*-deleted strain to evaluate the DCA production. Deletion of the six *POX* genes eliminated chain shortening of the DCA produced by completely blocking of the β -oxidation pathway, increasing therefore DCA production. The DCA productivity is similar regardless of the substrate used (fatty acid, vegetable oils, fatty acid ester). To increase the specific bioconversion rate, we put the *CPR* gene (encoding the NADPH-dependent P450 reductase) under the control of the strong promoter *pPOX2* induced by fatty acids. Overexpression of the target gene was carried out using single copy integrants, which were more stable than the multi-copy *C. tropicalis* strains obtained by gene amplification. A two-fold increase of the specific bioconversion rate was observed upon overexpression of the *CPR* gene, indicating that the hydroxylation was rate-limiting step in the ω -oxidation pathway.

Among the twelve *ALK* genes encoding P450 cytochrome oxidase identified in *Y. lipolytica*, only *ALK1* and *ALK2* have a demonstrated role in alkane chain length specific hydroxylation (especially C10-, C16+) Iida *et al.* (1998), Iida *et al.* (2000), Sumita *et al.* (2002). Recently, eight *ALK* genes have been expressed in plant indicating that *ALK3*, *ALK5* and *ALK7* code for ω -hydroxylase Hanley *et al.* (2003). These studies demonstrated that a single P450 form is able to catalyse efficiently a cascade of sequential mono- and diterminal monooxygenation reactions form *n*-alkanes to diacids with high regioselectivity. A functional study of the *ALK* family has been recently undertaken by Thevenieau *et coll.* (unpublished). Among twelve genes *ALK*, some may be specific of alkane chain length and their overexpression would make it possible to increase the production of DCA.

During the bioprocess, *Y. lipolytica* mutants store fatty acids as triglycerides in lipid bodies which are thereafter not anymore transformed into DCA, resulting in reduced bioconversion yield. Using biochemical and proteomic approaches, Athenstaedt *et al.* recently analyzed lipid bodies and identified proteins involved in the storage and utilization of fatty acids Athenstaedt *et al.* (2006). In particular, we identified an acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase like protein (*DGAI*, YALI0E32769g) and a lecithin cholesterol acyltransferase-like gene (*LRO1*, YALI0E16797g) which were shown to be involved in triglyceride and sterol ester accumulation in *S. cerevisiae* Sandager *et al.* (2002) and in *Y. lipolytica* (Thevenieau, unpublished). Deletion of those two genes allowed further improvement of DCA production (Thevenieau *et al.*, patent pending).

7. Bioconversion II

There is a growing industrial need for enantiomerically pure molecules, particularly in the pharmaceutical industry, since the legislation requires the production of molecule as single-enantiomer. Enzymatic methods for resolving racemic mixtures using whole cells or enzyme (free or immobilised) are very attractive due to their efficiency and selectivity. Whole cells or enzymes of *Y. lipolytica* have been applied in the reduction of prochiral carbonyl group and in enantioselective resolution of esters and epoxides.

7.1 Resolution of ketones and alcohols.

Fantin and co-workers screened several *Y. lipolytica* strains isolated from various habitats (chilled food, sea water, butter and poultry meat) for the enantioselectivity of prochiral ketones and for the kinetic resolution of racemic secondary alcohols via oxidation Fantin *et al.* (1996), Fantin *et al.* (2000). They recorded different yields and enantiomeric excesses for the anti-Pre-log reduction (*R*-enantiomer) depending on the structure of the ketones but also depending on the strain isolate. Best results were obtained in the reduction of hexenone and heptenone to their corresponding *R*-alcohols Fantin *et al.* (1996). Lagos and co-workers in a study on the reduction of aryloxy-halo-2-propanones observed that *Y. lipolytica* displayed superior enantioselectivity compared to *S. cerevisiae*, which is widely used for this type of bioconversion Lagos *et al.* (2004). They also demonstrated that *Y. lipolytica* presented a high tolerance to the substrate and that conversion and ees (enantiomeric excess) remained high with either growing or resting cell.

Kinetic resolution of cyclic and alicyclic racemic secondary alcohols was tested by Fantin and Co-worker Fantin *et al.* (2000). While all ten *Y. lipolytica* strains tested were able to oxidize *endo*-bicyclo heptenol and *endo*-bicyclo octenol, only two strains were able to oxidize the *cis*-2-methylcyclohexanol and only one strain oxidized the *trans*-2-methylcyclohexanol. From those results, they proposed that *Y. lipolytica* may contain two genes coding for an alcohol dehydrogenase with opposite enantioselectivity.

7.2 Resolution of esters.

Whole cells of *Y. lipolytica* were shown to carry out enantioselective hydrolysis of a range of racemic acetyl esters of secondary alcohols as well as enol esters Fantin *et al.* (2001). As for ketones and alcohols, these authors demonstrated that the yields, enantiomeric excesses and enantioselectivity varied depending on the strain and the substrates. These activities can probably be ascribed to the membrane-bound lipases or carboxyesterases which are found in

multi gene families (section 4). The development of *Y. lipolytica* for ester resolution could be obtained by the construction of strains overexpressing selected enzyme activity or by the use of a purified enzyme as exemplified for the Lip2 lipase. Strains over producing *Y. lipolytica* Lip2p were obtained by selection of overproducing strains after chemical mutagenesis and by gene amplification Pignede *et al.* (2000b). Strains containing several integrated copies of the *LIP2* gene under the control of the oleic acid inducible *POX2* promoter produced 60 000 U ml⁻¹ of lipase activity. Marty and co-workers showed that free Lip2p was efficient for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters Guieysse *et al.* (2004). Resolution of 2-bromo-*p*-tolylacetic acid ethyl ester catalyzed by Lip2p showed an enantiopreference of 28, almost equal to that obtained with *Burkholderia cepacia* lipase (E=30). The *B. cepacia* lipase is selective to the (*R*)-enantiomer while the *lipolytica* Lip2p is selective to the (*S*)-enantiomer and has a higher catalytic activity. The most interesting observation is that Lip2p was the only enzyme able to catalyse the resolution of 2-bromo-*o*-tolylacetic acid ethyl ester (E=27). By site mutagenesis and saturated mutagenesis at specific amino acid positions, mutants of Lip2p were obtained with improved enantioselectivity (E=200) and higher activities Fickers *et al.* (2005a). He and co-workers tested esterification of 2-ethyl hexanol with different fatty acids. No esterification was obtained with the immobilised Lipolase from Novo or with the free lipase from *Candida* sp 99-125 (a *Y. lipolytica* strain), while efficient esterification (about 85%) was obtained with the immobilized lipase from *Candida* sp 99-125 using saturated fatty acids with chain lengths of C8-C16 and with oleic acid. They optimized the esterification with the palmitic acid at 40°C in 10% petroleum and obtained an esterification degree of 91% He *et al.* (2002).

7.3 Resolution of epoxides.

Optically active epoxides and vicinal diols are versatile fine chemical intermediates, useful for the production of pharmaceuticals, agrochemicals, ferro-electric liquid crystals, flavours and fragrances. Epoxide hydrolases (EHs; E.C. 3.3.2.3) catalyze the hydrolysis of epoxides to the corresponding vicinal trans-diols (Fig. 2A).

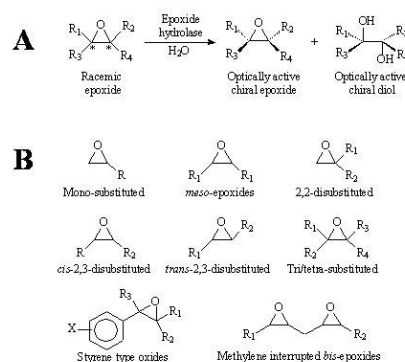


Figure 2 A, Hydrolysis of epoxides by EHs, B, is a depiction of different substrate types for microbial epoxide hydrolases: Tri- and tetra-substituted are shown together in where any one of the R groups = H.

EHs are found in a wide variety of organisms, including mammals, plants, insects, nematodes, protozoa, archae, bacteria, fungi, and yeasts. Analysis of publicly available genomes revealed 239 putative EH's from 91 taxonomically different organisms in addition to the 90 EH's previously known. Whereas about 20% of all sequenced organisms contain one or more putative EH genes, nearly 60% of Actinobacteria and fungi contain one or more putative EH genes van Loo *et al.* (2006).

The biocatalytic applications of EHs have significantly increased with the overexpression of microbial and plant EH's in a variety of microbial hosts. EHs from yeasts are particularly interesting due to their high activity, selectivity and broad substrate ranges. Kinetic resolution of racemic epoxides from all structural classes as well as desymetrisation of *meso*-epoxides are catalysed by yeast EH's (Fig.2B) Weijers and de Bont (1999).

Several host systems like *E. coli*, baculovirus and yeast (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Y. lipolytica*) have been used for the expression of EHs from a variety of origins. For example, cytosolic plant EH's have been successfully expressed in *E. coli*, baculovirus systems and yeast with no apparent changes in their kinetic properties: the soluble EH from potato (StEH1) was functionally expressed in baculovirus and in *E. coli* Li Cao (2006), and the EH's from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* were successfully expressed in *P. pastoris*. In contrast, microsomal epoxide hydrolases (mEH's) from zebra fish, mammals and yeasts have been expressed in different hosts with variable degrees of success. Problems were often encountered such as no expression, formation of inclusion bodies, decreased selectivity of the recombinant enzyme or impaired activity and selectivity. The mEH from zebra fish was expressed in *E. coli* with excellent activity, but no comparison of the selectivity of the recombinant enzyme with the native enzyme of zebra fish is available. Functional expression of human mEH was demonstrated in *S. cerevisiae*, but the effect on selectivity was not studied. Insect mEH were reported to be functionally expressed only in baculovirus systems (e.g. for *Manduca sexta*, *Trichoplasia ni.*, *Bombyx mori*, and *Drosophila melanogaster*), while no active enzyme could be produced by cloning the *Manduca sexta* or the *Ctenocephalides felis* JHEH in *E. coli* Keiser *et al.* (2002). The mEH from yeast were also expressed in different hosts with various successes. For example, the *Rhodotorula glutinis* EH was produced in *E. coli* with excellent activity, but problems were encountered with the formation of inclusion bodies and the recombinant enzyme displayed a decrease in selectivity. Expression in *S. cerevisiae* resulted in a decrease in both activity and selectivity. A 10- fold increase in activity was obtained upon expression in *Pichia pastoris*, but the selectivity was decreased compared to the native enzyme. While *E. coli* appears to be a suitable host for expression of

prokaryotic and cytosolic plant EH's (often with addition of affinity tags such as 6xHis or as fusion proteins with e.g. maltose binding protein), this is not the case for the functional expression of the microsomal EH's from different eukaryotes where retention of the native kinetic properties is often poor.

Yarrowia lipolytica was recently found to efficiently express EH's from other yeasts with excellent activity and selectivity. This expression system was also used to functionally express the problematic microsomal insect EH's, as well as mammalian, bacterial, fungal and plant EH's from many different origins Botes and Lotter (2005), Botes *et al.* (2005a), Botes *et al.* (2005b); A.L. Botes, personal communication). This highly efficient expression system is currently used for the production on an industrial scale of a wide range of chiral epoxides and diols by Oxyrane (Pty) Ltd in South Africa using multi-molar substrate concentrations in a simple, batch stirred tank reactor process. The biocatalytic process for the production of chiral epoxides and vicinal diols compares favourable with existing chemical technologies in terms of cost and productivity and it is the only single technology that can produce chiral epoxides and vicinal diols from all structural classes of epoxides (<http://www.oxyrane.com/>). The versatility of the epoxide hydrolase technology is further enhanced by the fact that catalysts with matching opposite selectivities can be obtained from different sources.

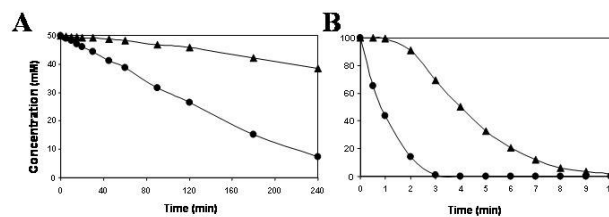


Figure 3 Resolution of 1,2 epoxyoctane by Wild-type *Rhodotorula araucariae* strain (A) and by *Yarrowia lipolytica* catalyst (*Y. lipolytica* strain containing 10-13 copies of the *R. araucariae* gene expressed under the strong hybrid promoter hp4d) (B). Reaction conditions were; 100 mM (A) and 200 mM (B) of 1,2 epoxyoctane, and catalyst were 10 % wet weight/v (A) and 5 % wet weight/v (B). Symbols are: (R) epoxide (●) and (S) epoxide (▲).

For example in *Y. lipolytica*, very good expression of *Rhodotorula araucariae* EH was obtained and the selectivity was conserved (Figure 3). The wild-type *Rhodotorula araucariae* EH presents an initial rate of 11.3 nmol min⁻¹ mg dryweight⁻¹ with 1,2 epoxyoctane, while, when a single copy of the corresponding gene was expressed in *Y. lipolytica* under the *hp4d* promoter (see section 9), the initial rate was 51.4 nmol min⁻¹ mg dryweight⁻¹. Further increase was obtained by amplification of the expression cassette with marker *ura3d1* (2-3 copies) and *ura3d4* (10-13 copies) (154 and 4577 nmol min⁻¹ mg dry-weight⁻¹, respectively, (see also section 9).

EH from yeasts with matching opposite selectivities have been reported for 2,2-disubstituted epoxides Botes *et al.* (2005c), from Archae for meso-epoxides (eg. van Loo *et al.* (2006) and from bacteria for styrene-type epoxides. Enantioconvergent hydrolysis of styrene type epoxides with a nearly 100% yield of *R*-diols was reported using the

Solanum tuberosum plant EH (St-EH) expressed in *E. coli*. The recombinant EH hydrolysed both styrene oxide enantiomers but with opposite regioselectivities to give only the *R*-diol. In the case of mung bean EH's, two enzymes were isolated that displayed opposite enantiopreferences: mbEHA preferentially hydrolysed the *S*-epoxide by regioselective attack at the *a*-C (inversion of configuration) to yield the *R*-diol, while mbEHB preferentially hydrolysed the *R*-epoxide by regioselective attack at the *b*-C (retention of configuration) to produce the *R*-diol from styrene oxide Xu *et al.* (2006). In contrast, when expressed in *Y. lipolytica*, the *S. tuberosum* EH displayed kinetic properties that differed from those of the enzyme made in *E. coli* (A. Botes, personal communication). Although it is difficult to make a direct comparison, since whole cells were used as catalyst with *Y. lipolytica*, while an enzyme extract from *E. coli* was employed in the reactor, the recombinant *Y. lipolytica* EH whole cell catalyst displayed a higher activity (in U/mg) than the *E. coli* derived enzyme extract. Furthermore, the enzyme was highly enantioselective as well as regioselective. In a typical biotransformation reaction employing 20 g/L dry wt catalyst, 100 mM (12 g/L) racemic styrene oxide was resolved within 30 minutes to yield *R*-styrene oxide (enantiomeric excess, ee 99% with a yield of 45%) and *R*-diol (ee 99%, yield 45%). The *Rhodopsoridium paludigenum* EH expressed in *Y. lipolytica* displayed matching opposite selectivity and regioselectivity for styrene-type epoxides: under the same reaction conditions as above, the catalyst yielded *S*-styrene oxide (ee 99%, yield 45%) and *R*-diol (ee 99%, yield 45%). These enzymes can thus be used together in an enantioconvergent fashion to produce (*R*)-diol from racemic styrene-type epoxides (A.L. Botes, personal communication).

Y. lipolytica contains 3 epoxide hydrolases, a situation which apparently did not compromise the selectivity of the heterologously expressed EH's from other sources. To confirm this, the enzymes were cloned and overexpressed in the same host PO1h. None of these native EH's displayed activity or selectivity for the vast majority of epoxides tested for enantioselective hydrolysis by the yeast epoxide hydrolases, except for epoxides bearing carboxylic acids next to or remote from the epoxide moiety (A.L. Botes, personal communication). This means that the host can be used as a production system for heterologous expression of epoxide hydrolases without any need to disrupt the native EH for most applications. Interestingly, when the peroxisomal targeting sequence (terminal SKL motif) was removed and then expressed, the *Y. lipolytica* epoxide hydrolases displayed excellent activity and selectivity for a large number of epoxide substrates (Nicaud and Botes, unpublished results).

8 Lipid accumulations by *Y. lipolytica*.

Lipids are important storage compounds in plants, animals and fungi. Storage lipids, usually found

within special organelles called lipid particles or lipid bodies (LB), are composed of triacylglycerol (TAG) and sterol esters (SE). Some yeasts, called oleaginous yeasts, are able to store lipids in LB which represent more than 20% and up to 70% of the total lipid content of the cell Ratledge (1994). Microbial lipids, termed Single Cell Oil (SCO), have often been considered as an alternative to agricultural and animal oil and fat sources. Indeed, SCO from microorganisms are not too different from oils and fats obtained from plant seeds Ratledge (1991), Certick and Shimizu (1999), Ratledge (2005). Application of SCO will depend on the production of specific oils and on the use of cheap or nearly zero-cost raw materials. This will also depend on the isolation of mutants with improved lipid content or accumulating of specific lipids.

Lipid accumulation in *Y. lipolytica* was investigated by Aggelis and co-workers using industrial glycerol in a single-stage continuous culture. They obtained yeasts containing 43% of lipids in dry biomass with a maximum volumetric productivity of 0.12 g lipid l⁻¹ h⁻¹. *Y. lipolytica* was also tested for the production of Cocoa Butter Equivalent fat (CBE) using different substrates such as corn oil or stearin Papanikolaou and Aggelis (2002). Bati and co-workers evidenced a major effect of dissolved oxygen, nitrogen/carbon ratio, pH and amount of oil substrate on lipid accumulation, resulting in yeast having from 37 % up to 70% of lipid Bati *et al.* (1984). Papanikolaou and co-workers analysed lipid accumulation and composition when yeasts were grown on agro-industrial residues consisting in a mixture of industrial animal fat (stearin), technical glycerol and glucose. They could modulate the level of polyunsaturated fatty acids and obtained a SCO presenting a CBE-type lipid composition Papanikolaou *et al.* (2001), Papanikolaou and Aggelis (2003a), Papanikolaou *et al.* (2003). This was probably due to a difference in selective uptake and fatty acid utilisation by *Y. lipolytica* Papanikolaou and Aggelis (2003b).

It has been demonstrated that lipid accumulation could be modulated also by the modification of the β -oxidation flux depending on the *POX* genotype. Indeed, in *Y. lipolytica* there are six *POX* genes encoding acyl-CoA oxidase isozymes. A strain deleted for *POX2*, *POX3* and *POX5* was shown to accumulate small amounts of TG. In contrast, a strain overexpressing *POX2*, coding for the long chain specific acyl CoA oxidase, accumulated more lipid than the wild-type Mlickova *et al.* (2004).

Recently, Damude and co-workers demonstrate that *Yarrowia lipolytica* could be used for the production of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs). They expressed in *Y. lipolytica* bifunctional $\Delta 12/\omega 3$ desaturases from *Fusarium* species. Expression of *Fusarium moniliformis* *Fml* gene under the strong constitutive glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase promoter results in strains accumulating α -linolenic acid (ALA, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) at 28;1% of total fatty acids Damude *et al.* (2006). This demonstrates that *Y. lipolytica* has good potential to be used as a SCO producer, that lipid accumulation level could be further improved and that the type of accumulated lipids could be modified for the production of CBE and LC-PUFA.

9. Protein expression/secretion

Yarrowia lipolytica was one of the first yeast after *S. cerevisiae* that was considered for heterologous protein production Davidow *et al.* (1987). It naturally secretes various proteins at high yield, including proteases, lipases, Rnases, each under specific conditions. Various promoters, either constitutive or regulated were developed over the years Madzak *et al.* (2004). The most commonly used ones nowadays are : (i) an artificial construct called *hp4d* which is based on four copies of the upstream activating sequences of the alkaline protease gene promoter placed in front of the *LEU2* TATA box Madzak *et al.* (2000), (ii) the *POX2* promoter derived from the major acyl-CoA oxydase encoding gene, which is induced on oleic acid and the *ICL1* promoter derived from the isocitrate lyase gene. Comparative data concerning these promoters have been published Juretzek *et al.* (2000).

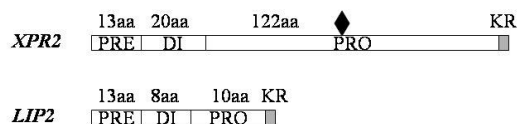


Figure 4 Schematic representation of the targeting sequence of the alkaline extracellular protease (Aep) encoded by the *XPR2* gene and of the major extracellular lipase (lip2) encoded by the *LIP2* gene. Shown are the putative 13-aa signal sequence (PRE), followed by a stretch of X/Ala-X/Pro dipeptide (DI) (five for Aep and four for Lip2), and a pro region (PRO) ending by a Lys-Arg (KR) motif (122 amino acid for Aep and 12-aa for Lip2). The Aep pro region contains an asparagine-linked glycosylation site indicated by a diamond.

The secretion signals of the alkaline extracellular protease (encoded by *XPR2*) and of the major extracellular lipase (encoded by *LIP2*) are routinely used to drive secretion of foreign proteins. These two highly expressed and secreted enzymes are synthesized as precursors with a short signal sequence, followed by a stretch of X/Ala-X/Pro dipeptide, probable substrate of a diamino peptidase encoded by YAL10B02838g, the only homologue of *S. cerevisiae* *STE13*, and by a pro region ending by a Lys-Arg (KR) motif cleaved by the endoprotease encoded by the *XPR6* gene (see Figure 4). A large number of host strains and vectors for heterologous gene expression have been constructed. Strains carrying non-reverting auxotrophic markers (*leu2*, *ura3*) and devoid of all known extracellular protease activities (alkaline and acidic) are available. Some of those strains contains pBR333 or zeta docking platform for the insertion of plasmids in single copy at a specific locus. Although replicating plasmids have been sometimes used, most experiments use integrative vectors (Figure 5B) that can be targeted to selected sites in the genome by homologous recombination with an integration platform: this facilitates comparison of different constructs which are thus stably integrated as single copies in a defined genomic environment. To avoid

bacterial DNA and antibiotic resistance genes, autocloning vectors (Figure 5B) are used, which integrate at random in the genome by non homologous recombination. Autocloning vectors carrying defective markers (such as the *ura3d* series) permit targeting from 2-3 to 6-10 copies at these platforms Juretzek *et al.* (2001), whereas Zeta based vectors permit a dispersed, multicopy integration. Reports have been published on more than 40 different proteins of various origin successfully expressed in this system. For more details, the reader is referred to recent reviews on this subject Madzak *et al.* (2004), Madzak *et al.* (2005). A schematic structure of integrative and auto-cloning vectors is presented in Figure 5.

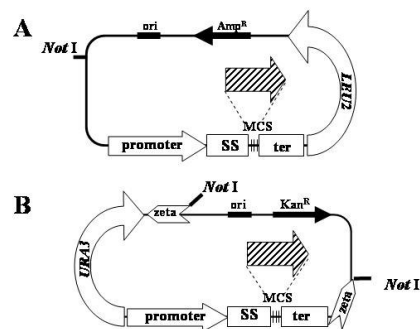


Figure 5 Schematic maps of typical integrative (A) and auto-cloning vectors (B) for gene expression in *Yarrowia lipolytica*. The bacterial moiety from the vectors, represented by a thick line, containing the replicon origin (*ori*) and the selection markers conferring ampiciline (*Amp^R*) and kanamycine resistance (*Kan^R*), is based on pBR322 and pHSS6, respectively. They contain the *LEU2* and the *URA3* marker, respectively for selection in *Y. lipolytica*. A multiple cloning site (MCS) is present for the insertion of the gene of interest (hatched arrow), it ends with *XPR2* or *LIP2* terminator (*ter*). The integrative vectors are digested by *NotI*, which cuts in the pBR322 moiety, for targeting the plasmid at the docking platform. The auto-cloning vectors are digested by *NotI*, which separates the yeast cassette from the bacterial moiety. This yeast cassette integrates at random in the genome.

An expression kit is commercialised by the Yeastern Company (Taiwan) containing the vectors and recipient strains as well as details on how to use them (see <http://www.yeastern.com/>)

For fermentation at high cell density, a synthetic medium was developed which fulfilled *Y. lipolytica* requirements for protein expression driven by the oleic acid inducible promoter *POX2* (developed in the Biotechnology - Bioprocess Laboratory in Toulouse by Alain Marty and Jean-Louis Uribellarrea groups). The culture is conducted in a fed-batch mode. 60 g/L dry-weight biomass production is obtained with glucose as carbon source for 15 hours at 28°C and pH 5,6 (growth rate : 0.27 h⁻¹). Then substrate is switched to an exponential oleic acid feed for protein expression. Fermentation lasts for about 50 hours and a final biomass concentration of 100 g/L was reached with the production of 60.000 lipase U/mL (1U = 1 micromole triolein hydrolyzed per minute) (A. Marty, to be published).

A new recombinant protein expression system for high-throughput screening was developed for *Y. lipolytica*. We constructed strain JMY1212, auxotrophic for uracile and containing a docking zeta platform derived from the LTR of

the Ylt1 retrotransposon, for the integration in mono copy of the expression cassette. JMY1212 derives from W29 which contains no endogenous Zeta nor Ylt1 sequences. The expression cassette can be obtained from a range of autocloning vectors, which are designed to avoid insertion of bacterial sequences into the transformants Pignede *et al.* (2000b), Nicaud *et al.* (2002), Madzak *et al.* (2004). After directed mutagenesis or error-prone PCR, the cassettes transform JMY1212 at a frequency of about 8000 transformants per microgram of DNA. Conditions for transformants picking, for growth and induction in 96-well microplates and for enzymatic test were optimized (Nicaud and Marty, to be published).

10. Conclusion

Whereas the initial industrial interest in *Y. lipolytica* stemmed from its ability to utilize n-paraffins as a carbon source for single cell protein production Klug and Markovetz (1967), these aspects did not elicit much interest after the oil crisis of 1973. Rather, it was the ability of this yeast to produce organic acids like citric acid or to secrete proteins that attracted much of the industrial and academic interest. Although these aspects still elicit considerable interest, the recent years have seen a renewal of researches focussing on hydrophobic substrate utilization, the main application targets concerning bioconversion and formation of high added value compounds. The availability of sophisticated genetic tools, the completion of the genome analysis facilitating global approaches (transcriptomics and proteomics) should permit rapid advances in this exciting field.

11 References

- Albuquerque, C.D., Filetti, A.M. and Campos-Takaki, G.M. 2006. *Can J Microbiol* **52**: 575-583.
- Athenstaedt, K., Jolivet, P., Boulard, C., Zivy, M., Negroni, L., Nicaud, J.M. and Chardot, T. 2006. *Proteomics* **6**: 1450-1459.
- Barth, G., Beckerich, J.M., Dominguez, A., Kerscher, S., Ogrzydzak, D., Titorenko, V. and Gaillardin, C. 2003. In *Functional Genetics of industrial yeasts*, (Ed, J.H., d.W.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 227-271.
- Barth, G. and Gaillardin, C. 1996. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, (Ed, K., W.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 313-388.
- Barth, G. and Gaillardin, C. 1997. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 219-237.
- Bati, N., Hammond, E.G. and Glatz, B.A. 1984. *J Am Oil Chem Soc* **61**: 1743-1746.
- Bigez, F., Tuery, K., Bougard, D., Nicaud, J.M. and Moulin, G. 2003. *Yeast* **20**: 233-248.
- Botes, A.L. and Lotter, J.; 2005 27/10/2005. WO Patent Application 2005/100587 A2.
- Botes, A.L., Lotter, J. and Labuschagne, M.; 2005a 27/10/2005. WO Patent Application 2005/100578 A2.
- Botes, A.L., Lotter, J., M., L. and Mitra, R.K.; 2005b 27/10/2005. WO Patent Application 2005/100569 A2.
- Botes, A.L., Lotter, J., Rhode, O.H. and Botha, A. 2005c. *Syst Appl Microbiol* **28**: 27-33.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C. and Wolfe, K.H. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1632-1637.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Bon, E. and Gaillardin, C. 2002. *Mol Biol Evol* **19**: 664-677.
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Lepingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P. and Gaillardin, C. 2000. *FEBS Lett* **487**: 95-100.
- Certick, M. and Shimizu, S. 1999. *Agro food indistry hi- Tech* 26-32.
- Chernyavskaya, O.G., Shishkanova, N.V., Il'chenko, A.P. and Finogenova, T.V. 2000. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 152-158.
- Damude, H.G., Zhang, H., Farrall, L., Ripp, K.G., Tomb, J.F., Hollerbach, D. and Yadav, N.S. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9446-9451.
- Davidow, L., Franke, A. and De Zeeuw, J.; 1987 EP Patent Application EP86307839.
- Dominguez, A., Ferminan, E. and Gaillardin, C. 2000. *Contrib Microbiol* **5**: 151-172.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, 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., Confaniolieri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. and Souciet, J.L. 2004. *Nature* **430**: 35-44.
- Eschenfeldt, W., Zhang, Y., Samaha, H., Stols, L., Eirich, L., Wilson, C. and Donnelly, M. 2003. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5992-5999.
- Fantin, G., Fogagnolo, M., Giovannini, P.P., Medici, A., Pedrini, P., Gardini, F. and Lanciotti, R. 1996. *Tetrahedron* **52**: 3547-3552.
- Fantin, G., Fogagnolo, M., Guerrini, A., Medici, A., Pedrini, P. and Fontana, S. 2001. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**: 2709-2713.
- Fantin, G., Fogagnolo, M., Medici, A., Pedrini, P. and Fontana, S. 2000. *Tetrahedron: Asymmetry* **11**: 2367-2373.
- Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. and Nicaud, J.M. 2005a. *FEMS Yeast Res.* **5**: 527-543.
- Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. and Nicaud, J.M. 2005b. *FEMS Yeast Res.* **5**: 527-543.
- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M.T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P. and Nicaud, J.M. 2005c. *Fungal Genet Biol* **42**: 264-274.
- Fickers, P., Le Dall, M.T., Gaillardin, C., Thonart, P. and Nicaud, J.M. 2003. *J Microbiol Methods* **55**: 727-737.
- Finogenova, T.V., Kamzolova, S.V., Dedyukhina, E.G., Shishkanova, N.V., Il'chenko, A.P., Morgunov, I.G., Chernyavskaya, O.G. and Sokolov, A.P. 2002. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 493-500.
- Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V. and Cherniavskaia, O.G. 2005. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **41**: 478-486.
- Gatfield, I.L., Güntert, M., Sommer, H. and Werkhoff, P. 1993. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **15**: 165-170.
- Guieysse, D., Sandoval, G., Faure, L., Nicaud, J.-M., Monsan, P. and Marty, A. 2004. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**: 3539-3543.

- Hanley, K., Nguyen, L.V., Khan, F., Pogue, G.P., Vojdani, F., Panda, S., Pinot, F., Oriedo, V.B., Rasochova, L., Subramanian, M., Miller, B. and White, E.L. 2003. *Assay Drug Dev Technol* **1**: 147-160.
- He, X.-l., Chen, B.-q. and Tan, T.-w. 2002. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**: 333-339.
- Holzschu, D., Chandler, F., Ajello, L. and Ahearn, D. 1979. *Sabouraudia* **17**: 71-78.
- Iida, T., Ohta, A. and Takagi, M. 1998. *Yeast* **14**: 1387-1397.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A. and Takagi, M. 2000. *Yeast* **16**: 1077-1087.
- Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G. and Nicaud, J.-M. 2001. *Yeast* **18**: 97-113.
- Juretzek, T., Wang, H., Nicaud, J.-M., Mauersberger, S. and Barth, G. 2000. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**: 320-326.
- Kanayama, N., Ueda, M., Atomi, H. and Tanaka, A. 1998. *J Bacteriol* **180**: 690-698.
- Keiser, K.C., Brandt, K.S., Silver, G.M. and Wisniewski, N. 2002. *Arch Insect Biochem Physiol.* **50**: 191-206.
- Klug, M.J. and Markovetz, A.J. 1967. *J Bacteriol* **93**: 1847-1852.
- Kruse, K., Förster, A., Juretzek, T., Mauersberger, S. and Barth, G.; 2004 WO Patent Application WO2004/009828.
- Kurtzman, C. and Fell, J. 1998. *The yeast :a taxonomy study*, Elsevier Sciences, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. 2005. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**: 121-130.
- Lagos, F., Carballeira, J., Bermudez, J.L., Alvarez, E. and Sinisterra, J. 2004. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**: 763-770.
- Li Cao, J.L.W.C.T.K.W. 2006. *Biotechnology and Bioengineering* **94**: 522-529.
- Luo, Y.S., Nicaud, J.M., Van Veldhoven, P.P. and Chardot, T. 2002. *Arch Biochem Biophys* **407**: 32-38.
- Luo, Y.S., Wang, H.J., Gopalan, K.V., Srivastava, D.K., Nicaud, J.M. and Chardot, T. 2000. *Arch Biochem Biophys* **384**: 1-8.
- Madzak, C., Gaillardin, C. and Beckerich, J.M. 2004. *J Biotechnol* **109**: 63-81.
- Madzak, C., Nicaud, J.-M. and Gaillardin, C. 2005. In *Production of recombinant proteins: microbial and eucaryotic expression systems*, (Ed, Gellissen, G.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp. 163-189.
- Madzak, C., Treton, B. and Blanchin-Roland, S. 2000. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 207-216.
- Marck, C., Kachouri-Lafond, R., Lafontaine, I., Westhof, E., Dujon, B. and Grosjean, H. 2006. *Nucleic Acids Res* **34**: 1816-1835.
- Mlickova, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T. and Nicaud, J.M. 2004. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3918-3924.
- Neueglise, C., Chalvet, F., Wincker, P., Gaillardin, C. and Casaregola, S. 2005. *Eukaryot Cell* **4**: 615-624.
- Neueglise, C., Feldmann, H., Bon, E., Gaillardin, C. and Casaregola, S. 2002. *Genome Res* **12**: 930-943.
- Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., Pagot, Y. and Endrizzi-Joran, A.; 1996 Fr Patent Application FR2734843.
- Nicaud, J.M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P. and Gaillardin, C. 2002. *FEMS Yeast Res* **2**: 371-379.
- Pagot, Y., Le Clainche, A., Nicaud, J.M., Wache, Y. and Belin, J.M. 1998. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 295-300.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. 2002. *Bioresour Technol* **82**: 43-49.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. 2003a. *Curr Microbiol* **46**: 398-402.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. 2003b. *European Journal of Lipid Science and Technology* **105**: 651-655.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. and Marc, I. 2001. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 215-224.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I. 2003. *Curr Microbiol* **46**: 124-130.
- Peters, I. and Nelson, F. 1948. *J Bacteriol* **55**: 581-591.
- Picataggio, S., Deanda, K. and Mielenz, J. 1991. *Mol Cell Biol* **11**: 4333-4339.
- Picataggio, S., Rohrer, T., Deanda, K., Lanning, D., Reynolds, R., Mielenz, J. and Eirich, L.D. 1992. *Biotechnology (N Y)* **10**: 894-898.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. and Nicaud, J.M. 2000a. *J Bacteriol* **182**: 2802-2810.
- Pignede, G., Wang, H.J., Fudalej, F., Seman, M., Gaillardin, C. and Nicaud, J.M. 2000b. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3283-3289.
- Rabenhorst, J. and Gatfield, I.; 2000 WO Patent Application WO0024920.
- Ratledge, C. 1991. *Acta Biotechnol* **11**: 429-438.
- Ratledge, C. 1994. In *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, (Ed, Kamel, B.S., Kakuda, Y.), Blackie academic and professional,, London, pp. 235-291.
- Ratledge, C. 2005. In *Single Cell Oils*, (eds, Cohen, Z. and Ratledge, C.), AOCS Press, Champaign, pp. 1-20.
- Sandager, L., Gustavsson, M.H., Stahl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H. and Stymne, S. 2002. *J Biol Chem* **277**: 6478-6482.
- Shiio, I. and Uchio, R. 1971. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 2033-2042.
- Sinigaglia, M., Lanciotti, R. and Guerzoni, M. 1994. *Can J Microbiol* **40**: 54-59.
- Smit, M.S., Mokgoro, M.M., Setati, E. and Nicaud, J.M. 2005. *Biotechnol Lett* **27**: 859-864.
- Sumita, T., Iida, T., Yamagami, S., Horiuchi, H., Takagi, M. and Ohta, A. 2002. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 1071-1078.
- Svetlana, V., Kamzolova, I., Morgunov, G., Aurich, A., Perevznikova, O., Shishkanova, N., U., S. and Finogenova, T. 2005. *Food Technol. Biotechnol* **43**: 113-122.
- Titorenko, V.I., Nicaud, J.M., Wang, H., Chan, H. and Rachubinski, R.A. 2002. *J Cell Biol* **156**: 481-494.
- Uemura, N. 1985. *Hakko to Kogyo* **43**: 436-441.
- van Loo, B., Kingma, J., Arand, M., Wubbolts, M.G. and Janssen, D.B. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2905-2917.
- Vance-Harrop, M., Gusmao, N. and Campos-Takaki, G.M. 2003. *Braz. J. Microbiol.* **34**: 120-123.
- Wache, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J.M. and Belin, J.M. 2001. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5700-5704.
- Wache, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.M. and Belin, J.M. 2003. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 393-404.
- Wache, Y., Laroche, C., Bergmark, K., Moller-Andersen, C., Aguedo, M., Le Dall, M.T., Wang, H., Nicaud, J.M. and Belin, J.M. 2000. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1233-1236.
- Wang, H.J., Le Dall, M.T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Gaillardin, C. and Nicaud, J.M. 1999. *J Bacteriol* **181**: 5140-5148.
- Weijers, C.A.G.M. and de Bont, J.A.M. 1999. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **6**: 199-214.
- Weißbrodt, E., Gey, M., Barth, G., Weber, H., Stottmeister, U., Duresch, R. and Richter, H.-P.; 1988 DD Patent Application DD 267999 A1.
- Xu, W., Xu, J.H., Pan, J., Gu, Q. and Wu, X.Y. 2006. *Org Lett.* **8**: 1737-1740.
- Zinjarde, S.S. and Pant, A. 2002. *J Basic Microbiol* **42**: 67-73.

Table 1 Gene families involved in hydrophobic substrate utilisation showing expansion in the *Y. lipolytica* genome compared to the ascomycetous yeast *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis* and *D. hansenii*. Family number*, Number of paralogues: nb, gene names, references.

Family	nb	Enzymatic function	Pathway	Gene names	Comment	references
GLS.95	4	Lipase/carboxiesterase	Lipid hydrolysis	LIP1, LIP3, LIP6	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family, similar to bacterial and fungal type B lipases	Domingez et al., unpublished
GLS.94	16	lipase	Lipid hydrolysis	LIP2 LIP4, LIP5 LIP7, LIP8 LIP9 to LIP19	Amplified in <i>Y. lipolytica</i> (one gene in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>K. lactis</i> , two in <i>D. hansenii</i>) Lip2p is the major extracellular lipase	Pignede <i>et al.</i> (2000a), Fickers <i>et al.</i> (2005c)
GLR.2026	6	Acyl-CoA oxidase	β -oxidation	POX1 to POX6	Amplified in <i>Y. lipolytica</i> (one gene in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>K. lactis</i> , three in <i>D. hansenii</i>) Pox2p is long chain specific, Pox3p is short chain specific	Luo <i>et al.</i> (2000), Luo <i>et al.</i> (2002)
GLR.3196	16	Cytochrome P450	Hydroxilation of alkanes or fatty acids; hydroxylation of C-15 trichotecenes, demethylation of sterols	ALK1 to ALK12 (CYP52) YALI0A18062g, YALI0B21824g, YALI0B21824g, YALI0E14509g	Amplified in <i>Y. lipolytica</i> Alk1p for C10 alkane, Alk2p for C16 alkane hydroxilation, Alk3p, 5p, 7p for ω -oxidation	Iida <i>et al.</i> (2000), Hanley <i>et al.</i> (2003), Fickers <i>et al.</i> (2005a)
GLR.3319	4	Dienoyl-CoA hydratase/isomerase	β -oxidation	YALI0D06215g, YALI0F22121g, YALI0A07733g, YALI0B10406g	Amplified in <i>Y. lipolytica</i> (one gene in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>K. lactis</i> , 2 in <i>D. hansenii</i>)	
GLC.1852	3	3-oxoacyl (acyl-carrier protein) reductase	β -oxidation	YALI0C19965g, YALI0D05929g, YALI0F29975g,	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family, similar to bacterial 3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase	
GLC.1876	4	Acyl-CoA dehydrogenase	β -oxidation	YALI0C16797g, YALI0D15708g, YALI0E12573g, YALI0F23749g	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family, similar to fungal acyl-CoA dehydrogenases Two are induced on oleic acid	

GLR.1607	3	Epoxide hydrolase	Not known	YALIOA01441g, YALIOC23224g, YALIOE19899g	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family, similar to fungal and mammalian epoxide-hydrolases Peroxisomal, SKL motif
GLC.1427	11	4-coumarate-CoA ligase	β -oxidation	YALIOA14234g, YALIOA15103g, YALIOB05456g, YALIOB07755g, YALIOC05885g, YALIOD17314g, YALIOE05951g, YALIOE11979g, YALIOE12419g, YALIOE20405g, YALIOF06556g	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family, similar to bacterial and plant 4-coumarate-CoA ligase Peroxisomal, SKL or AKI motif; 2 are induced on oleic acid
GLC.2144	19	Unknown function	Not known	YALIOA01650g, YALIOA03201g, YALIOA03993g, YALIOA04785g, YALIOA05005g, YALIOA06347g, YALIOA10120g, YALIOA11759g, YALIOA20790g, YALIOB00748g, YALIOB19228g, YALIOC01925g, YALIOC07931g, YALIOC16126g, YALIOD18832g, YALIOD21406g, YALIOE07293g, YALIOE14707g, YALIOF23199g	No homologue in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>K. lactis</i> , 1 in <i>D. hansenii</i>) One repressed on oleic acid
GLC.2493	6	Cell wall protein	Not known	YALIOD27214g, YALIOE11517g, YALIOE18788g, YALIOE26125g, YALIOE31108g, YALIOF18282g	<i>Y. lipolytica</i> -specific gene family,
GLC.1851	3	Peroxisomal 2-4 dienoyl-CoA reductase	β -oxidation	YALIOC03003g, YALIOD01694g, YALIOE14322g	Amplified in <i>Y. lipolytica</i> (one gene in <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>K. lactis</i> , 2 in <i>D. hansenii</i>) On induced and one repressed on oleic acid, PKL ans SKI motif

* For nomenclature and description of gene families, see <http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/> *Y. lipolytica* specific gene families have no orthologue in the four species *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis* and *D. hansenii*.

ANNEXE II

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 juin 2006 (22.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/064131 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 7/40 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/003140

(22) Date de dépôt international :
13 décembre 2005 (13.12.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0413468 15 décembre 2004 (15.12.2004) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE** [FR/FR]; 1 & 4, avenue de Bois Préau, F-92852 Rueil Malmaison Cedex (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **NICAUD, Jean-Marc** [FR/FR]; 20, Avenue Hoche, F-78850 Trappes (FR). **THEVENIEAU, France** [FR/FR]; 25 rue Deparcieux, F-75014 Paris (FR). **LE DALL, Marie-Thérèse** [FR/FR]; 3 rue des Agnettes, F-92230 Gennevilliers (FR). **MARCHAL, Rémy** [FR/FR]; 70, rue des Cormiers, F-78400 Chatou (FR).

(74) Mandataire : **ELMALEH, Alfred**; Institut Français du Pétrole, 1 & 4, avenue de Bois Préau, F-92852 Rueil-Malmaison Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: PRODUCTION OF DICARBOXYLIC ACIDS BY IMPROVED MUTANT STRAINS OF *YARROWIA LIPOLYTICA*

(54) Titre : PRODUCTION D'ACIDES DICARBOXYLIQUES PAR DES SOUCHES MUTANTES AMELIOREES DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing dicarboxylic acids (DCA) with long hydrocarbon chains, also called diacids, which consists in culturing a mutant strain of *Yarrowia lipolytica* obtained by mutagenesis directed and more particularly disrupted at least for the POX2, POX3, POX4 and POX5 genes encoding acyl-CoA oxydase, in a medium consisting essentially of an energetic substrate including at least one carbon source and one nitrogen source and in subjecting said strain to a bioconversion substrate selected among *n*-alkanes of at least 10 carbon atoms, fatty acids of at least 10 carbon atoms, their alkyl esters and natural oils.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de production d'acides dicarboxyliques (DCA) à longues chaînes hydrocarbonées, également appelés diacides, dans lequel on met en culture une souche mutante de *Yarrowia lipolytica* obtenue par mutagenèse dirigée et plus particulièrement disruptée au moins pour les gènes POX2, POX3, POX4 et POX5 codant pour l'acyl-CoA oxydase, dans un milieu constitué essentiellement d'un substrat énergétique qui comprend au moins une source de carbone et une source d'azote et on soumet ladite souche à un substrat de bioconversion choisi parmi les *n*-alcanes d'au moins 10 atomes de carbone, les acides gras d'au moins 10 atomes de carbone, leurs esters d'alkyle et les huiles naturelles.

WO 2006/064131 A1

PRODUCTION D'ACIDES DICARBOXYLIQUES PAR DES SOUCHES MUTANTES AMÉLIORÉES DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Domaine de l'invention

L'invention concerne un procédé de production d'acides dicarboxyliques par une fermentation mettant en œuvre une souche mutante de la levure *Yarrowia lipolytica* à partir d'un substrat de bioconversion.

- 5 Les acides dicarboxyliques (aussi appelés "diacides") sont utilisés comme matières premières par exemple dans la synthèse de polyamides et de polyesters, d'huiles lubrifiantes, d'agents plastifiants ou de parfums.

Les procédés de production des diacides varient suivant le nombre d'atomes de carbone du squelette carboné du diacide considéré (Johnson RW, Pollock CM, Cantrell RR, Editors Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Edition, 1983, pp. 118-136). Ainsi, l'acide azélaïque (diacide en C9) est obtenu classiquement par oxydation chimique de l'acide oléique par l'ozone tandis que l'acide sébacique (diacide en C10) est produit par oxydation alcaline de l'acide ricinoléique. L'acide dodécanedioïque (diacide en C12) est un produit de la pétrochimie. La voie microbiologique est utilisée pour la production d'acide brassylique (diacide en C13) à partir de tridécane.

Compte tenu de la diversité des diacides qui sont utilisés dans les différentes applications, l'intérêt d'une voie de production applicable à la plus large gamme possible de diacides est incontestable. Bien que se caractérisant par une vitesse de réaction plus lente que celle de la voie chimique, la voie biologique présente l'intérêt d'être applicable à une grande variété de substrats (le processus de production des diacides par voie biologique est représenté schématiquement à la Figure 1).

En fait, de nombreuses espèces microbiennes sauvages telles que *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida cloacae*, etc. sont capables d'excréter de faibles quantités de diacides (Chan *et al.* : Stimulation of *n*-alkane conversion to dicarboxylic acid by organic-solvent- and detergent-treated microbes. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 1991, 772-777 ; Shiio *et al.* : Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from *n*-Alkanes. Part I. Screening and Properties of Microorganisms Producing Dicarboxylic Acids. Agr. Biol. Chem. 35, No. 13, 1971, p. 2033-2042).

Cependant, pour obtenir des excréments substantielles de diacides, il convient d'utiliser des mutants qui ont été bloqués au niveau de la β -oxydation. Pour de

nombreuses espèces, de tels mutants ont été obtenus par une mutagenèse au hasard, suivie d'une sélection appropriée (brevet EP 0 229 252 B1 ; Shiio *et al.* ; Jiao *et al.* Isolation and Enzyme Determination of *Candida tropicalis* Mutants for DCA Production. J. Gen. Appl. Microbiol. 2000, 46: 245-249).

- 5 Une voie beaucoup plus élégante mais plus contraignante, mettant en œuvre les techniques de mutagenèse dirigée, a cependant été développée pour *Candida tropicalis*. À partir d'une souche sauvage appartenant à cette espèce, Picataggio *et al.* ont disrupté séquentiellement les quatre gènes codant les deux isoenzymes de l'acyl-CoA oxydase (Aox) qui catalysent la première étape de la β -oxydation
10 (Determination of *Candida tropicalis* Acylcoenzyme A Oxidase Isoenzyme Function by Sequential Gene Disruption. Mol. Cell. Biol. 11, 1991, 4333-4339, et brevet US 5 254 466 A1).

Ces mêmes auteurs ont ensuite surexprimé les gènes codant pour la cytochrome P450 mono-oxygénase et la NADPH-cytochrome réductase, qui constituaient les
15 activités limitant la cinétique de la conversion des *n*-alcanes en diacides (Picataggio *et al.* : Metabolic Engineering of *Candida tropicalis* for the Production of Long-chain Dicarboxylic Acids. Biotechnol. 10, 1992, 894-898, et brevet US 5 648 247 A1). Cependant, les mutants de *Candida tropicalis* produits selon un système d'amplification multicopies ne semblent pas totalement stables et se
20 prêtent à des réversions possibles. C'est pour cette raison que des améliorations ont dû être apportées à l'art antérieur (demande de brevet US 2004/0014198 A1).

Objet de l'invention

L'objet de l'invention est de remédier aux inconvénients de l'art antérieur. On a en effet découvert qu'il était possible, de manière avantageuse, de produire des
25 diacides en utilisant des mutants de *Yarrowia lipolytica* dont les gènes codant pour l'acyl-CoA oxydase ont été disruptés.

Les diacides que le procédé de l'invention vise à préparer sont des composés organiques à chaîne hydrocarbonée linéaire d'au moins 10 atomes de carbone comportant une fonction carboxylique à chaque extrémité de la chaîne.

- 30 On utilise comme microorganisme un mutant de *Yarrowia lipolytica* dans lequel au moins les gènes *POX2*, *POX3*, *POX4* et *POX5* ont été disruptés, pour le bloquer partiellement au niveau de la β -oxydation.

Hormis les acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX2*, *POX3*, *POX4* et *POX5*, deux autres acyl-CoA oxydases codées par les gènes *POX1* et *POX6*, de fonction inconnue, sont présentes dans le génome de *Yarrowia lipolytica*.

5 Ces deux acyl-CoA oxydases sont impliquées dans la reconsommation des diacides biosynthétisés par élimination séquentielle de deux atomes de carbone. La disruption supplémentaire des gènes *POX1* et *POX6* entraîne donc la production de diacides correspondant au profil du substrat de bioconversion. Par exemple, si on utilise l'huile de tournesol oléique, composée en majorité d'acides gras à 18 atomes de carbone, comme substrat de bioconversion, la souche
10 déléetée de l'ensemble des gènes *POX*, produira en majorité des diacides à 18 atomes de carbone.

D'autre part, le substrat de bioconversion peut être stocké sous forme de triglycérides au sein même de la cellule sous forme de corps lipidiques et devenir donc inaccessible pour sa bioconversion en diacides. Des gènes ont été identifiés,
15 par analyse protéomique, comme étant impliqués dans l'accumulation du substrat de bioconversion. Nous avons identifié les gènes: *DGA1* (acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase) *TGL1* (triacylglycerol lipase), *G3P* (glycerol-3-phosphate dehydrogénase), *SCP2* (transporteur putatif de stérol), *LR01* (lecithine cholestérol acyltransferase putatif) ainsi que les IFP 621 (fonction inconnue), IPF 905 (fonction inconnue), et IPF 2569 (sous-unité NADH-ubiquinone réductase).
20

La modification de l'activité de ces gènes (par disruption ou surexpression) entraîne donc une diminution de l'accumulation du substrat de bioconversion sous forme de corps lipidiques au sein de la cellule de *Yarrowia lipolytica*.

25 On notera que le système génétique de *Yarrowia lipolytica* est très différent de celui de *Candida tropicalis*. Contrairement à *Candida tropicalis* qui est une levure diploïde, *Yarrowia lipolytica* est en effet une espèce haploïde. Chez ce dernier microorganisme, les opérations de délétion génique sont donc beaucoup plus efficaces et plus sûres, du fait même de la présence d'un jeu unique de chromosomes.

30 D'autre part, un promoteur du gène *POX2* codant pour l'acyl-CoA oxydase est utilisé pour surexprimer des gènes tels que, par exemple, ceux codant pour la cytochrome P450 mono-oxygénase et pour la NADPH-cytochrome réductase. Le promoteur pPOX2 a la propriété d'être un promoteur fort inductible par les substrats de bioconversion. Ainsi, la surexpression d'un gène d'intérêt est réalisée

par l'addition d'une seule copie de gène sous le contrôle du promoteur pPOX2, permettant d'obtenir des mutants de *Yarrowia lipolytica* efficaces, stables et non-revertants contrairement aux mutants de *Candida tropicalis* obtenus par un système d'amplification multicopies.

- 5 Un autre avantage de *Yarrowia lipolytica* sur *Candida tropicalis* pour la production de diacides à partir d'esters d'acides gras ou d'huiles naturelles, par exemple végétales, est le suivant : la transformation des huiles naturelles en diacides par *Candida tropicalis* nécessite une hydrolyse chimique au moins partielle du substrat avant la mise en œuvre de la fermentation (voir brevet US 5 962 285). Cette
- 10 hydrolyse est réalisée par une saponification conduite en présence d'hydroxyde de calcium ou de magnésium. Elle produit les sels d'acides gras (savons) correspondants. Or, *Yarrowia lipolytica* présente la capacité d'assimiler les triglycérides comme source de carbone. La première étape de ce catabolisme implique l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et glycérol par les
- 15 enzymes lipolytiques (lipases), identifiées par Peters et Nelson en 1951. Une activité lipase extracellulaire et deux lipases membranaires de 39 et 44 kDa (Barth *et al.*, *Yarrowia lipolytica*. in: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, pp. 313-388. Springer-Verlag) furent ensuite décrites. *Yarrowia lipolytica* est capable de produire plusieurs lipases
- 20 (activité extracellulaire, membranaire et intracellulaire). Récemment, les gènes correspondants aux lipases décrites ont été identifiés. Le gène *LIP2* code pour une lipase extracellulaire, Lip2p (Pignede *et al.*, 2000). Il a été démontré qu'elle hydrolysait préférentiellement les triglycérides à longue chaîne des résidus oléiques (Barth *et al.*, 1996).
- 25 *Yarrowia lipolytica* hydrolyse donc directement les esters et les huiles naturelles en acides gras libres et glycérol dans des conditions de pH compatibles avec la conduite de la fermentation. Dans ces conditions, l'hydrolyse de l'ester ou de l'huile et sa conversion en diacides ont lieu simultanément, ce qui présente l'avantage de mener à un protocole opératoire simplifié puisque l'étape d'hydrolyse
- 30 chimique est éliminée.

Description détaillée de l'invention

De manière plus détaillée, l'invention propose un procédé production d'au moins un acide dicarboxylique qui comprend :

- 35 (a) une phase de croissance, dans laquelle on met en culture une souche mutante de *Yarrowia lipolytica* disruptée au moins pour les gènes *POX2*,

POX3, *POX4* et *POX5* (codant pour l'acyl-CoA oxydase) dans un milieu de culture constitué essentiellement d'un substrat énergétique qui comprend au moins une source de carbone et une source d'azote ;

- 5 (b) une phase de bioconversion, dans laquelle on soumet ladite souche à un substrat de bioconversion choisi parmi les *n*-alcanes d'au moins 10 atomes de carbone, les acides gras d'au moins 10 atomes de carbone, les esters d'alkyle de 1 à 4 atomes de carbone de ces acides gras, tels que les mélanges d'esters méthyliques ou éthyliques, ou encore les huiles naturelles (mélanges d'esters d'acides gras du glycérol), en présence d'un
- 10 substrat énergétique ; et
- (c) une phase de récupération de l'acide dicarboxylique formé.

Les souches utilisées dans le procédé de l'invention dérivent de la souche sauvage *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC 20460, répertoriée sous CLIB89 dans la Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique-CLIB).

- 15 Ainsi, on peut utiliser de nouvelles souches mutantes dérivant de la souche *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460 par l'intermédiaire de la souche Po1d [souche auxotrophe pour la leucine (leu-) et l'uracile (ura-)], décrite dans la revue de G. Barth *et al.* . Elle est répertoriée sous CLIB139 dans la CLIB.

- L'obtention de ces nouvelles souches mutantes (MTLY37, MTLY66, MTLY74, 20 MTLY79, MTLY80, MTLY81, FT 120 et FT 130) sera décrite plus loin.

- Dans le procédé de production de diacides selon l'invention, on met la souche mutante choisie en culture dans un milieu constitué essentiellement d'un substrat énergétique qui comprend au moins une source de carbone et une source d'azote jusqu'à la fin de la croissance. On ajoute alors le substrat de bioconversion 25 (alcane ou mélange d'alcanes, acide gras ou mélange d'acides gras, ester d'acide gras ou mélange d'esters d'acides gras ou huile naturelle ou mélange de ces différents substrats) de façon à initier la bioconversion en diacides et on récupère les diacides formés par une technique connue de l'homme du métier, telle que la précipitation des sels de calcium.

- 30 Lors de la phase de bioconversion, le milieu de culture peut comprendre un apport de substrat énergétique secondaire consistant en général en au moins un composé polyhydroxylé, tel que par exemple le glycérol ou un sucre.

1. Obtention de la souche mutante MTLY37

Pour obtenir cette souche, on peut procéder comme suit :

- 1) on séquence le gène d'intérêt (ou bien on dispose de la séquence de ce gène dans une banque de données) ;
- 5 2) on construit une cassette de disruption par PCR ("Polymerase Chain Reaction") ou par clonage, en utilisant un marqueur contre-sélectionnable, par exemple le marqueur URA3 (avec lequel on peut sélectionner pour le phénotype Ura+ ou pour le phénotype Ura-) ;
- 10 3) on sélectionne les souches avec le gène d'intérêt délété (transformation et sélection des transformants (avantageusement Ura+ si le marqueur est URA3) et on vérifie la disruption du gène.

On décrit ci-après une méthode particulière d'obtention de la souche mutante MTLY37.

On clone tout d'abord et on séquence des gènes *POX* de la souche sauvage, dont
15 les séquences sont différentes de celles de *Candida tropicalis*. On construit ensuite des cassettes de disruption des gènes codant pour les iso-enzymes de l'acyl-CoA oxydase. On disrupte les gènes de l'acyl-CoA oxydase en utilisant le marqueur sélectionnable URA3. On amplifie les régions promotrices et terminatrices par une première PCR, en utilisant des paires d'oligonucléotides
20 spécifiques, ce qui élimine la séquence complète du cadre de lecture ouverte (ORF : "Open Reading Frame"). On effectue ensuite une seconde PCR avec les amorces externes et les produits de PCR des promoteurs et terminateurs, qui fusionnent via une extension commune de 20 bp comportant un site pour l'enzyme de restriction I-SceI. Le produit de PCR est cloné pour donner une série de
25 plasmides (désignés par pPOX-PT) contenant le module promoteur-terminateur (cassette de disruption 2).

Un gène URA3 est introduit dans le site I-SceI de la cassette POX-PT. Une série de plasmides pPOX-PUT contenant le module promoteur-URA3-terminateur est construite (cassette de disruption 1). On appelle ces constructions pPOX1-PUT,
30 pPOX2-PUT, pPOX3-PUT, pPOX4-PUT et pPOX5-PUT pour les plasmides contenant la cassette de disruption 1, d'une part, et pPOX1-PT, pPOX2-PT, pPOX3-PT, pPOX4-PT, et pPOX5-PT pour les plasmides contenant la cassette de disruption 2, d'autre part.

Les cassettes de disruption sont amplifiées par PCR avec les amorces spécifiques externes en utilisant par exemple la *Pfu* polymérase (fournie par Stratagene, La Jolla, Californie). L'analyse finale des séquences de protéines révèle que les acyl-CoA oxydases de *Yarrowia lipolytica* ont un degré d'identité de 45 % (50 % de similarité) avec celui des autres levures. Le degré d'identité entre elles varie de 55 à 70 % (65 à 76 % de similarité).

Après avoir construit les cassettes de disruption des gènes codant pour les acyl-CoA oxydase, on peut réaliser la transformation de *Yarrowia lipolytica* par différentes méthodes. On peut mettre en œuvre une électroporation, dans laquelle l'ADN rentre grâce au choc électrique. Plus avantageusement, on mettra en œuvre la méthode à l'acétate de lithium et au polyéthylène glycol. Cette méthode est décrite par Gaillardin *et al.* : LEU2 Directed Expression of Beta-galactosidase Activity and Phleomycin Resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* 11, 1987, 369-375.

La présence de disruption est vérifiée par PCR selon la technique de Gussow *et al.* : Direct Clone Characterization from Plaques and Colonies by the Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 1989, 4000, puis confirmée par hybridation Southern blot.

Au départ de la souche Po1d, les disruptions sont effectuées en deux étapes.

Dans un premier temps, Po1d est transformé avec la cassette 1 de disruption de PCR PUT et sélectionné. Dans un deuxième temps, les clones Ura+ sont transformés avec la cassette de disruption 2, pour éliminer le gène URA3 et sont sélectionnés. Ce protocole permet l'obtention du quadruple disruptant MTLY37 - pox2 Δ PT- pox3 Δ PT- pox4 Δ PT-pox5 Δ PUT. La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Étapes de transformation requises pour la production du mutant MTLY37 ne poussant plus sur acide oléique

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	PO1d, Leu-, Ura-	POX5-PUT	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT
2	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT	LEU2	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT
3	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT	POX5, PT	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT
4	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT	POX2, PUT	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT
5	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT	POX2-PT	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT
6	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT	POX3-PUT	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT
7	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT	POX3-PT	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT
8	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT	MTLY18 délété pour POX4 (Δ4-PUT)	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-PUT

La disruption d'un gène et l'excision du marqueur peuvent encore se faire par une méthode mettant en jeu une recombinaison ou une recombinase. On peut par exemple utiliser des marqueurs avec de part et d'autre une séquence répétée (permettant la recombinaison qui est sélectionnée) ou une séquence lox qui est reconnue par la recombinase Cre. L'excision a lieu quand on exprime la Recombinase Cre, Fickers *et al.*, 2003 New Disruption Cassettes for Rapid Gene Disruption and Marker Rescue in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Microbiol. Methods 55/3:727-737.

2. Obtention de la souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74

À partir du mutant MTLY37, on a construit la souche MTLY74 Leu+Ura-.

2a. À partir du mutant MTLY37 prototrophe (Leu+, Ura+), on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 auxotrophe pour la leucine et l'uracile

(Leu-, Ura-). La première étape est la construction de la souche MTLY40 auxotrophe pour l'uracile (Leu+, Ura-) par conversion du marqueur URA3 par le marqueur *ura3-41* en transformant le fragment de PCR contenant ce marqueur et en sélectionnant les Ura- en présence de 5FOA. A partir du mutant MTLY40, on a
5 construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY64 auxotrophe pour la leucine (Leu-, Ura-, Hyg+) par disruption du marqueur LEU2 en transformant la cassette de disruption PHTleu2 et en sélectionnant les transformants hygromycine résistant (leu2 ::Hyg). A partir du mutant MTLY64, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 auxotrophe pour la leucine (Leu-, Ura-) par
10 excision du marqueur HYG en transformant le vecteur répliquatif pRRQ2 contenant la recombinaise Cre et le marqueur LEU2 (Cre-LEU2) et en sélectionnant les transformants hygromycine sensible, Leu+. La perte du plasmide pRRQ2 est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu-, Ura-, Hyg-).

15 **2b.** À partir du mutant MTLY66, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74 Leu+ Ura- qui surexprime la NADPH-cytochrome réductase, en l'exprimant sous le contrôle du promoteur fort pPOX2, induit par les substrats de bioconversion, du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle.

On a introduit le gène codant pour la NADPH-cytochrome réductase (*CPR*) dans
20 un vecteur contenant le gène de sélection LEU2, par exemple JMP21, sous le contrôle du promoteur pPOX2 inducible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles. La cassette marqueur-promoteur-gène (LEU2-pPOX2-*CPR*) est introduite par transformation.

La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans
25 le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Étapes de transformation requises pour la production du mutant MTLY74 à partir de MTLY37

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Transformation avec	Mutant transformé
1	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-PUT	Fragment de PCR <i>ura3-41</i> , sélection 5FOA	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T
2	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T	Cassette PHTleu2, sélection hygromycine	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Leu2::Hyg
3	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Leu2::Hyg	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ leu2
4	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ leu2	Cassette d'expression pPOX2-CPR de JM21-CPR	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, CPR

3. Obtention des souches MTLY79, MTLY80 et MTLY81 à partir du mutant commun MTLY74

- 5 3a. MTLY79 exprimant la NADPH-cytochrome réductase et la cytochrome P450 monooxygénase *ALK1* sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles

10 À partir du mutant MTLY74, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY79 qui surexprime la NADPH-cytochrome réductase et la cytochrome P450 monooxygénase *ALK1* dans les conditions de bioconversion, sous le contrôle du promoteur fort pPOX2 induit par les substrats de bioconversion du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle.

15 On a introduit le gène *ALK1* codant pour la cytochrome P450 monooxygénase dans un vecteur contenant le gène de sélection *URA3*, par exemple JMP61, sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles. La cassette marqueur-promoteur-gène (*URA3-pPOX2-ALK1*) est introduite par transformation.

La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Étape de transformation requise pour la production du mutant MTLY79 surexprimé pour *ALK1* et *CPR* à partir de MTLY74

Étape	Opération de transformation		
	Mutant à transformer	Transformation avec	Mutant transformé
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61- <i>ALK1</i>	MTLY79, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, <i>CPR</i> , <i>ALK1</i>

- 5 3b. MTLY80 exprimant la NADPH-cytochrome réductase et la cytochrome P450 monooxygénase *ALK2* sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles

À partir du mutant MTLY74, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY80 qui surexprime les gènes codant pour la NADPH-cytochrome réductase
10 (*CPR*) et la cytochrome P450 monooxygénase (*ALK2*) dans les conditions de bioconversion, sous le contrôle du promoteur fort pPOX2 induit par les substrats de bioconversion du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle.

On a introduit le gène *ALK2* codant pour la cytochrome P450 monooxygénase dans un vecteur contenant le gène de sélection *URA3*, par exemple JMP61, sous
15 le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles. La cassette marqueur-promoteur-gène (*URA3-pPOX2-ALK2*) est introduite par transformation.

La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Étape de transformation requise pour la production du mutant MTLY80 surexprimé pour *ALK2* et *CPR* à partir de MTLY74

Étape	Opération de transformation		
	Mutant à transformer	Transformation avec	Mutant transformé
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, <i>CPR</i>	JMP61- <i>ALK2</i>	MTLY80, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, <i>CPR</i> , <i>ALK2</i>

3c. MTLY81 exprimant la NADPH-cytochrome réductase sans les gènes de la cytochrome P450 monooxygénase (*ALK1* ou *ALK2*) sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles

À partir du mutant MTLY74, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY81 qui surexprime le gène codant pour la NADPH-cytochrome réductase (*CPR*) sous le contrôle du promoteur fort pPOX2 induit par les substrats de bioconversion du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle.

On a rendu le mutant MTLY74 prototrophe par transformation avec le plasmide JMP61 portant le marqueur URA3.

La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Étape de transformation requise pour la production du mutant MTLY81 surexprimé pour *CPR* à partir de MTLY74

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Transformation avec	Mutant transformé
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, <i>CPR</i>	JMP61	MTLY81, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, <i>CPR</i>

4. Obtention de la souche mutante FT120

Pour obtenir cette souche, on peut procéder comme pour la construction de la souche MTLY37 ou de la souche MTLY66:

1) on construit une cassette de disruption par PCR ("Polymerase Chain Reaction") ou par clonage, en utilisant un marqueur contre-sélectionnable, par exemple le marqueur URA3 (avec lequel on peut sélectionner pour le phénotype Ura⁺ ou pour le phénotype Ura⁻), ou en utilisant un marqueur avec de part et d'autre une
5 séquence répétée (permettant la recombinaison qui est sélectionnée) ou une séquence lox qui est reconnue par la recombinaise Cre

2) on sélectionne les souches avec le gène d'intérêt délété (transformation et sélection des transformants ; avantageusement Ura⁺ si le marqueur est URA3) et on vérifie la disruption du gène ;

10 3) on sélectionne les souches avec le marqueur délété (transformation et sélection des transformants); avantageusement 5FOA^R si le marqueur est URA3 ou avantageusement un plasmide exprimant la recombinaise si le marqueur présente la séquence lox et on vérifie la disruption du gène.

On décrit ci-après une méthode particulière d'obtention de la souche mutante
15 FT120.

À partir du mutant MTLY66, on a construit la souche FT120 Leu⁻ Ura⁻, Δ pox1-6.

4a. À partir du mutant MTLY66 Δ pox2-5, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY95 Δ pox1-6 par insertion de délétion des gènes POX1 et POX6 et délétion du marqueur selon la méthode décrite précédemment.

20 **4b.** À partir du mutant MTLY95, on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT101 Leu⁺ Ura⁻ qui surexprime le gène codant pour la NADPH-cytochrome réductase (CPR) dans les conditions de bioconversion, en l'exprimant sous le contrôle du promoteur fort pPOX2, induit par les substrats de bioconversion, du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle.

25 On a introduit le gène codant pour la NADPH-cytochrome réductase dans un vecteur contenant le gène de sélection LEU2 excisable, par exemple JMP21-LEU2ex, sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles. La cassette marqueur-promoteur-gène (LEU2ex-pPOX2-CPR) est introduite par transformation. La souche FT120 est
30 obtenue à la suite de l'excision du marqueur LEU2ex par transformation avec le plasmide pUB4-CRE, sélection Hyg⁺, perte du plasmide sur YPD et enfin isolement d'un clone Leu⁻.

La représentation schématique de la construction de ce mutant est résumée dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Étapes de transformation requises pour la production du mutant FT120 à partir de MTLY66

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	MTLY66, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T	POX1-PHT	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PHT
2	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PHT	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY85 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT
3	MTLY85 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT	POX6-PHT	MTLY92 Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PHT
4	MTLY92 Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PHT	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY95 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT
5	MTLY95 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT	Cassette d'expression pPOX2-CPR de JM21-LEU2ex-CPR	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR-LEU2ex
6	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR-LEU2ex	Vecteur pUB4-CRE, sélection Hyg+, vérification Leu-, perte du plasmide pUB4-CRE sur YPD, isolement de Hyg-	FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR

5. Obtention de la souche mutante FT130

Pour obtenir cette souche, on peut procéder comme pour la construction de la souche FT120 :

- 1) on construit une cassette de disruption par PCR ("Polymerase Chain Reaction") ou par clonage, en utilisant un marqueur contre-sélectionnable, par exemple le marqueur URA3 (avec lequel on peut sélectionner pour le phénotype Ura⁺ ou pour le phénotype Ura⁻), ou en utilisant un marqueur avec de part et d'autre une séquence répétée (permettant la recombinaison qui est sélectionnée) ou une séquence lox qui est reconnue par la recombinaise Cre ;
- 2) on sélectionne les souches avec le gène d'intérêt délété (transformation et sélection des transformants ; avantageusement Ura⁺ si le marqueur est URA3) et on vérifie la disruption du gène ;
- 3) on sélectionne les souches avec le marqueur délété (transformation et sélection des transformants) ; avantageusement 5FOA^R si le marqueur est URA3 ou avantageusement un plasmide exprimant la recombinaise Cre si le marqueur présente la séquence lox et on vérifie la disruption du gène.

On décrit ci-après une méthode particulière d'obtention de la souche mutante FT130.

À partir du mutant FT120, on a construit la souche FT130 Leu- Ura-, Δ pox1-6, Δ dga1.

6. À partir du mutant FT120 Leu- Ura-, Δ pox1-6, pPOX2-CPR on a construit une souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT130 Leu- Ura+, Δ pox1-6, pPOX2-CPR, Δ dga1 par insertion de délétion du gène DGA1 codant pour l'acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase.

Tableau 7 : Étape de transformation requise pour la production du mutant FT130 à partir de FT120

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR	DGA1-PUT	FT130, Leu-, Ura+, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR, Δ dga1-PUT

Les souches MTLY66, MTLY81, FT120 et FT 130 ont été déposées à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous les numéros d'enregistrement respectifs CNCM I-3319, CNCM I-3320, CNCM I-3527 et CNCM I-3528.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

5 **EXEMPLES**

Dans ces exemples, on a testé l'influence des conditions de culture et de la composition du milieu sur la production de diacides. On a ainsi constaté avec le mutant MTLY37 que l'utilisation de peptone favorisait fortement la production de diacides, notamment par rapport à la bacto-tryptone (Exemples 1 et 2).

10 On a en outre testé dans les mêmes conditions les mutants MTLY79, MTLY80 et MTLY81. On a ainsi constaté que la NADPH-cytochrome réductase catalysait une étape limitante dans la production de diacides. En effet, la surexpression de cette enzyme seule permet d'augmenter significativement la production et la productivité des diacides (Exemples 4 à 6).

15 On a testé dans des conditions identiques les souches mutantes FT120 et FT130 (exemples 7 et 8). La délétion des gènes POX1 et POX 6 permet de diminuer la dégradation des diacides pour FT120. La délétion d'un gène supplémentaire DGA1 codant pour l'acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase entraîne une diminution de l'accumulation du substrat de bioconversion sous forme de corps
20 lipidiques au sein de la cellule de *Yarrowia lipolytica*. Ainsi la majorité des diacides obtenus dans ces exemples est composée de diacides à 18 atomes de carbone à l'image du substrat de bioconversion utilisé, composé en majorité d'acides gras à 18 atomes de carbones.

25 **Exemple 1 : Procédé de production d'acides dicarboxyliques à partir d'huile de tournesol oléique avec le mutant MTLY37**

Une préculture du mutant MTLY37, conservé sur milieu gélosé de composition :
30 extrait de levure 10 g.l⁻¹; peptone 10 g.l⁻¹; glucose 10 g.l⁻¹; Agar 20 g.l⁻¹, est effectué grâce à un ensemencement qui fournit une absorbance initiale du milieu de préculture voisine de 0,30. La préculture est conduite sous agitation orbitale (200 rpm) pendant 24 h à 30°C dans une fiole à ailettes de 500 ml contenant 25 ml de milieu (10 g.l⁻¹ extrait de levure; 10 g.l⁻¹ peptone; 20 g.l⁻¹ glucose).

Le milieu utilisé pour la culture est composé d'eau désionisée, d'extrait de levure à 10 g.l⁻¹; de tryptone à 20 g.l⁻¹; de glucose à 40 g.l⁻¹; et d'huile de tournesol oléique à 30 g.l⁻¹.

5 L'ensemencement du fermenteur est effectué avec la totalité de la fiole de préculture.

La culture est conduite à 30°C dans un fermenteur de 4 l avec 2 l de milieu à un débit d'aération de 0,5 vvm et une vitesse d'agitation de 800 rpm assurée par une turbine centripète à double effet.

10 Après 17 heures de culture dès lors que le glucose du milieu est épuisé, on ajoute 60 ml d'huile de tournesol oléique, composée en majorité d'acides gras à 18 atomes de carbone, dans le réacteur que l'on soumet à une alimentation continue de glycérol à raison de 1 ml.h⁻¹. Le pH de la culture est alors maintenu à la valeur constante de 8 par addition régulée de soude 4 M. La fermentation dure 130 h.

15 En fin de culture, on élimine la biomasse cellulaire par centrifugation. Le surnageant est ensuite acidifié jusqu'à pH 2,5 par addition d'HCl 6M et les acides dicarboxyliques insolubles sont récupérés par centrifugation du moût acidifié puis séchés.

20 La composition en acides dicarboxyliques du mélange est déterminée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne DB1 après conversion des acides dicarboxyliques en diesters selon la méthode décrite par Uchio *et al.* : Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from *n*-Alkanes. Part II. Production by *Candida cloacae* Mutant Unable to Assimilate Dicarboxylic Acid. Agr Biol. Chem. 36, No. 3, 1972, 426-433. La température du four du chromatographe est programmée de 150°C à 280°C à raison de 8°C par min.

25 Les résultats montrent une production maximale de diacides dans les surnageants de 5,9 g.l⁻¹ après 130 h.

Exemple 2

30 On répète l'Exemple 1 en remplaçant dans le milieu de culture la tryptone par de la peptone à la même concentration. Au bout de 130 h de culture, on obtient 9,9 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques, soit un accroissement de production d'environ 68 % par rapport à l'Exemple 1.

Exemple 3 : Production d'acides dicarboxyliques par le mutant MTLY37 avec alimentation continue d'huile de tournesol oléique

On répète l'Exemple 2 en éliminant l'huile de tournesol oléique du milieu de culture et en la remplaçant par une injection continue de cette même huile à un flux sub-limitant de 1 ml dans le réacteur.

Dans ces conditions, 14,7 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques sont produits dans le milieu de culture après 130 h.

Exemple 4 : Production d'acides dicarboxyliques à partir d'huile de tournesol oléique avec le mutant MTLY79 surexprimé pour CPR et ALK1

On répète l'Exemple 3 en remplaçant le mutant MTLY37 par le mutant MTLY79 surexprimant les gènes *CPR* et *ALK1*. Au bout de 130 h de culture, on obtient 16 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques.

Exemple 5 : Production d'acides dicarboxyliques à partir d'huile de tournesol oléique avec le mutant MTLY80 surexprimé pour CPR et ALK2

On répète l'Exemple 3 en remplaçant le mutant MTLY37 par le mutant MTLY80 surexprimant les gènes *CPR* et *ALK2*. Au bout de 130 h de culture, on obtient 16 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques.

Exemple 6

On répète l'Exemple 3 en remplaçant le mutant MTLY37 par le mutant MTLY81 surexprimant uniquement le gène *CPR*. Au bout de 130 h de culture, on obtient 16 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques.

Exemple 7 : Production d'acides dicarboxyliques à partir d'huile de tournesol oléique avec le mutant FT120 délété pour les six gènes *POX* (Δ pox1-6) et surexprimant le gène *CPR*

On répète l'Exemple 3 en remplaçant le mutant MTLY37 par le mutant FT120 délété des six gènes *POX* et surexprimant le gène *CPR*. Au bout de 130 h de culture, on obtient 18 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques

Exemple 8 : Production d'acides dicarboxyliques à partir d'huile de tournesol oléique avec le mutant FT130 délété pour les six gènes *POX* (Δ pox1-6) et délété pour le gène *DGA1* (Δ dga1) et surexprimant le gène *CPR*

On répète l'Exemple 3 en remplaçant le mutant MTLY37 par le mutant FT130 délété des six gènes *POX* et du gène *DGA1* et surexprimant le gène *CPR*. Au bout de 130 h de culture, on obtient 23 g.l⁻¹ d'acides dicarboxyliques

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'acides dicarboxyliques, caractérisé en ce qu'il comprend :
 - 5 a) une phase de croissance, dans laquelle on met en culture une souche mutante de *Yarrowia lipolytica* disruptedée au moins pour les gènes *POX2*, *POX3*, *POX4* et *POX5* (codant pour l'acyl-CoA oxydase) ; dans un milieu de culture constitué essentiellement d'un substrat énergétique qui comprend au moins une source de carbone et une source d'azote ;
 - 10 b) une phase de bioconversion, dans laquelle on soumet ladite souche à un substrat de bioconversion choisi parmi les *n*-alcanes d'au moins 10 atomes de carbone, les acides gras d'au moins 10 atomes de carbone, les esters d'alkyle de 1 à 4 atomes de carbone de ces acides gras et les huiles naturelles, en présence d'un substrat énergétique ; et
 - 15 c) une phase de récupération de l'acide dicarboxylique formé.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est MTLY37.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est
20 MTLY79 surexprimant les gènes *CPR* et *ALK1*.
4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est MTLY80 surexprimant les gènes *CPR* et *ALK2*.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est MTLY81 surexprimant le gène *CPR*.
- 25 6. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est FT 120 surexprimant le gène *CPR*.
7. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le mutant utilisé est FT 130 surexprimant le gène *CPR*.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que ledit substrat de bioconversion consiste en un mélange d'esters méthyliques ou un mélange d'esters éthyliques.
- 5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que ledit substrat de bioconversion consiste en une huile de tournesol oléique.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que, dans la phase de bioconversion, le milieu de culture comprend de la peptone.
- 10 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que, dans la phase de bioconversion, le milieu de culture comprend un apport de substrat énergétique secondaire consistant en au moins un composé polyhydroxylé.
12. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit composé polyhydroxylé est le glycérol ou un sucre.
- 15 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que, dans la phase (c), l'acide dicarboxylique est récupéré par précipitation sous forme de sel de calcium.
- 20 14. Procédé d'obtention d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 auxotrophe, Leu- Ura-, à partir du mutant MTLY37 prototrophe, et utilisable pour la transformation avec, comme marqueurs de sélection, les gènes LEU2 et URA3, caractérisé en ce que l'on met en œuvre les opérations de transformation des étapes 1 à 3 du tableau suivant :

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Transformation avec	Mutant transformé
1	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-PUT	Fragment de PCR ura3-41, sélection 5FOA	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T
2	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T	Cassette PHTleu2, sélection hygromycine	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Leu2::Hyg
3	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Leu2::Hyg	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ leu2

15. Procédé d'obtention, à partir du mutant MTLY66, d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74 Leu+ Ura- qui surexprime le gène CPR codant pour la NADPH-cytochrome réductase dans les conditions de bioconversion, par transformation du vecteur JMP21-CPR contenant le marqueur de sélection LEU2 et la cassette d'expression avec le gène CPR sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles.
16. Procédé d'obtention, à partir de la souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74, d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY79 qui surexprime les gènes codant pour la NADPH-cytochrome réductase et pour la cytochrome P450 monooxygénase dans les conditions de bioconversion, par transformation du vecteur JMP61-ALK1 contenant le marqueur de sélection URA3 et la cassette d'expression avec le gène ALK1 sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles.
17. Procédé d'obtention, à partir de la souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74, d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY80 surexprimant

- 5 les gènes codant pour la NADPH-cytochrome réductase et pour la cytochrome P450 monooxygénase *ALK2* dans les conditions de bioconversion, par transformation du vecteur JMP61-*ALK2* contenant le marqueur de sélection URA3 et la cassette d'expression avec le gène *ALK2* sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles.
- 10 18. Procédé d'obtention d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY81 à partir du mutant MTLY74 qui surexprime le gène *CPR* codant pour la NADPH-cytochrome réductase dans les conditions de bioconversion, en l'exprimant sous le contrôle du promoteur pPOX2 induit par les substrats de bioconversion, du type acide gras, ester d'acide gras ou huile naturelle et qui est prototrophe, en rendant le mutant MTLY74 prototrophe par transformation avec le plasmide JMP61 portant le marqueur URA3.
- 15 19. Procédé d'obtention, à partir de la souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66, d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT120 Leu- Ura-, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre les opérations de transformation des étapes 1 à 4 du tableau suivant :

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	MTLY66, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T	POX1-PHT	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PHT
2	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PHT	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY85 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT
3	MTLY85 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT	POX6-PHT	MTLY92 Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PHT
4	MTLY92 Leu-, Ura-, Hyg+, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PHT	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Hyg-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	MTLY95 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT
5	MTLY95 Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT	Cassette d'expression pPOX2-CPR de JM21-LEU2ex-CPR	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR-LEU2ex
6	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR-LEU2ex	Vecteur pUB4-CRE, sélection Hyg+, vérification Leu-, perte du plasmide pUB4-CRE sur YPD, isolement de Hyg-	FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR

puis en ce qu'on réalise la construction de la souche mutante FT101 Leu+ Ura-, à partir de la souche *Yarrowia lipolytica* MTLY95, qui surexprime le gène (*CPR*) codant pour la NADPH-cytochrome réductase dans les conditions de bioconversion, par transformation du vecteur JMP21-LEU2ex-CPR, contenant le marqueur de sélection LEU2 excisable et le gène *CPR*

5 sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les acides gras, les esters d'acide gras ou les huiles naturelles, la souche FT120 étant obtenue à la suite de l'excision du marqueur LEU2ex par transformation avec le plasmide pUB4-CRE, sélection Hyg+, perte du plasmide sur YPD et enfin isolement d'un clone Leu-.

20. Procédé d'obtention, à partir de la souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT120, d'une souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT130 caractérisé en ce qu'on met en oeuvre l'étape de transformation suivante :

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR	DGA1-PUT	FT130, Leu-, Ura+, Hyg-, Δ 5-PT, Δ 2-PT, Δ 3-PT, Δ 4-Pura3-41T, Δ 1-PT, Δ 6-PT, CPR, Δ dga1-PUT

- 10 21. Nouvelle souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66.
22. Nouvelle souche *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY81.
23. Nouvelle souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT120.
24. Nouvelle souche *Yarrowia lipolytica* mutante FT130.

1/1

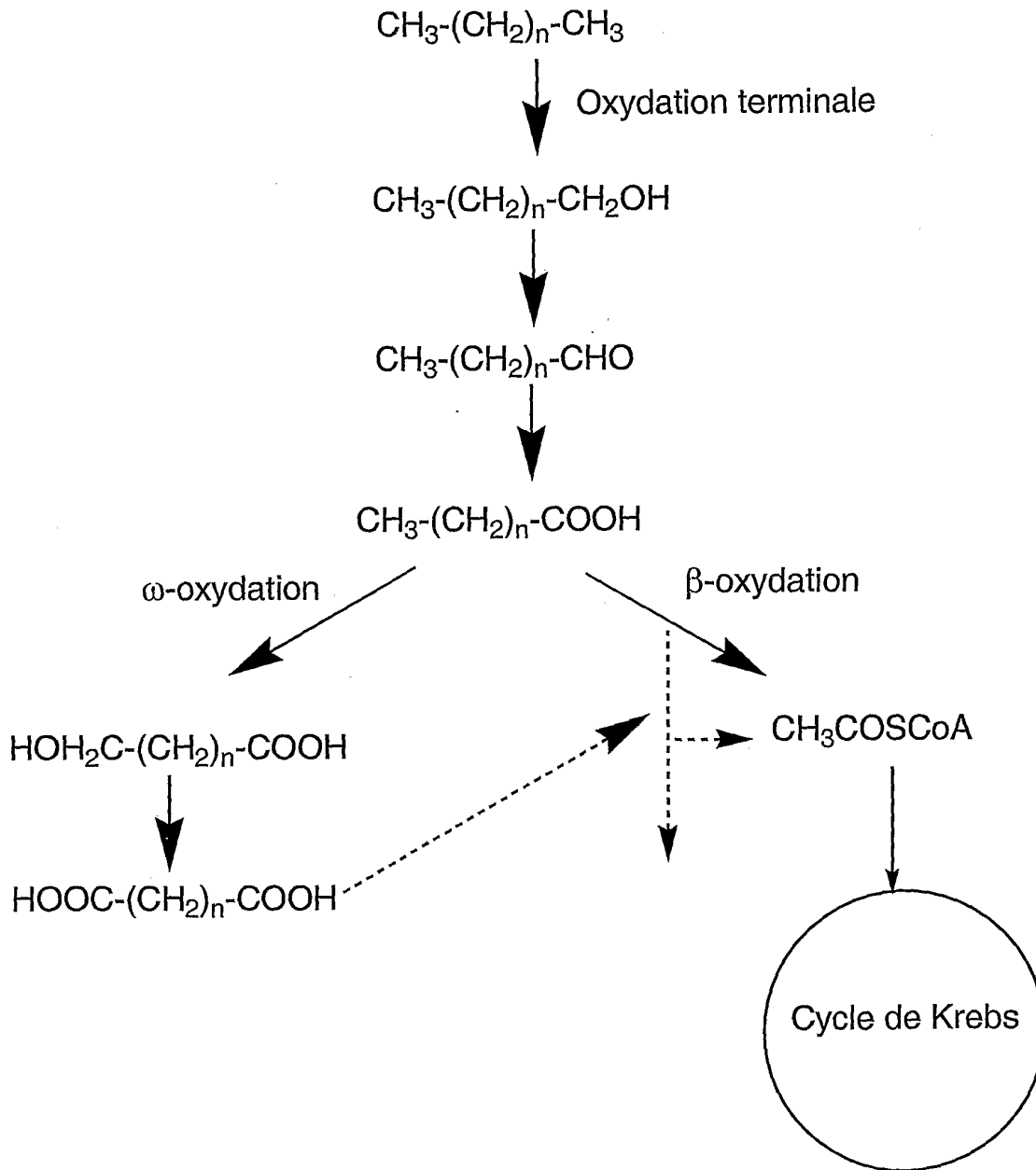


FIG. 1

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	5260/LD	Demande internationale n°
---	---------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>1-3</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (<i>y compris le code postal et le pays</i>) INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 25.11.2005	n° d'ordre CNCM I-3527
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (<i>le cas échéant</i>) Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
D. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (<i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i>)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (<i>le cas échéant</i>)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (<i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i>)	

Réservé à l'office récepteur
<input type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé

Réservé au Bureau international
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	5260/LD	Demande internationale n°
---	---------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>1-3</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (<i>y compris le code postal et le pays</i>) INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt <u>25.11.2005</u>	n° d'ordre <u>CNCM I-3528</u>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (<i>le cas échéant</i>) Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (<i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i>)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (<i>le cas échéant</i>) Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (<i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i>)	

Réservé à l'office récepteur
<input type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé

Réservé au Bureau international
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ,	5260/LD	Demande internationale n°
---	---------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13 bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>1-3</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (<i>y compris le code postal et le pays</i>) INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17.11.2004	n° d'ordre CNCM I-3319
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (<i>le cas échéant</i>) Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (<i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i>)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (<i>le cas échéant</i>)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (<i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i>)	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	5260/LD	Demande internationale n°
---	---------	---------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>1-3</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (<i>y compris le code postal et le pays</i>) INSTITUT PASTEUR 25, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17.11.2004	n° d'ordre CNCM I-3320
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (<i>le cas échéant</i>) Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (<i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i>)	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (<i>le cas échéant</i>)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (<i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i>)	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003140

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P7/40</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ</p>												
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td> <p>WANG HUIJIE J ET AL: "Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 17, September 1999 (1999-09), pages 5140-5148, XP002336152 ISSN: 0021-9193 abstract page 5142, left-hand column, paragraph 4 - page 5144, right-hand column, paragraph 2; figures 1,5,6; table 1</p> <p align="center">----- --/--</p> </td> <td>1-24</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	<p>WANG HUIJIE J ET AL: "Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 17, September 1999 (1999-09), pages 5140-5148, XP002336152 ISSN: 0021-9193 abstract page 5142, left-hand column, paragraph 4 - page 5144, right-hand column, paragraph 2; figures 1,5,6; table 1</p> <p align="center">----- --/--</p>	1-24				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	<p>WANG HUIJIE J ET AL: "Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 17, September 1999 (1999-09), pages 5140-5148, XP002336152 ISSN: 0021-9193 abstract page 5142, left-hand column, paragraph 4 - page 5144, right-hand column, paragraph 2; figures 1,5,6; table 1</p> <p align="center">----- --/--</p>	1-24										
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p> <p>* Special categories of cited documents :</p> <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>* & * document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* & * document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
E earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* & * document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report											
3 April 2006	10/04/2006											
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mateo Rosell, A.M.											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003140

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WACHE YVES ET AL: "Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 67, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 5700-5704, XP002336153 ISSN: 0099-2240 abstract page 5701, right-hand column, paragraph 2 - page 5702, right-hand column, paragraph 2; table 1</p>	1-24
A	<p>----- WANG HUIJIE ET AL: "Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>" YEAST, vol. 14, no. 15, November 1998 (1998-11), pages 1373-1386, XP008049873 ISSN: 0749-503X abstract page 1373, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, last paragraph page 1379, left-hand column, last paragraph - page 1381, right-hand column, paragraph 1 page 1384, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, last paragraph</p>	1-24
A	<p>----- FICKERS P ET AL: "New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>." JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, vol. 55, no. 3, December 2003 (2003-12), pages 727-737, XP002336154 ISSN: 0167-7012 cited in the application abstract; table 1 page 737, left-hand column, paragraph 2</p>	1-24
A	<p>----- US 5 648 247 A (PICATAGGIO ET AL) 15 July 1997 (1997-07-15) cited in the application abstract figures 1,2 column 2, line 60 - column 3, line 10 column 5, line 12 - column 6, line 60; examples 8,18-24</p>	1-24
A	<p>----- WO 03/100013 A (COGNIS CORPORATION) 4 December 2003 (2003-12-04) abstract page 1, line 15 - page 10, line 16 page 10, lines 10-23; examples 1-6 -/--</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003140

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& US 2004/014198 A1 (CRAFT DAVID L) 22 January 2004 (2004-01-22) cited in the application -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2005/003140

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5648247	A	15-07-1997	US	5620878 A	15-04-1997
WO 03100013	A	04-12-2003	AU	2003247411 A1	12-12-2003
			EP	1506302 A2	16-02-2005
			US	2004014198 A1	22-01-2004
US 2004014198	A1	22-01-2004	AU	2003247411 A1	12-12-2003
			EP	1506302 A2	16-02-2005
			WO	03100013 A2	04-12-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003140

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE C12P7/40		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WANG HUIJIE J ET AL: "Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 17, septembre 1999 (1999-09), pages 5140-5148, XP002336152 ISSN: 0021-9193 abrégé page 5142, colonne de gauche, alinéa 4 - page 5144, colonne de droite, alinéa 2; figures 1,5,6; tableau 1 <div style="text-align: center;">----- -/--</div>	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
3 avril 2006	10/04/2006	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Mateo Rosell, A.M.	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003140

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WACHE YVES ET AL: "Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 67, no. 12, décembre 2001 (2001-12), pages 5700-5704, XP002336153 ISSN: 0099-2240 abrégé page 5701, colonne de droite, alinéa 2 - page 5702, colonne de droite, alinéa 2; tableau 1</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>WANG HUIJIE ET AL: "Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase AC03 gene from the alkane-utilizing yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>" YEAST, vol. 14, no. 15, novembre 1998 (1998-11), pages 1373-1386, XP008049873 ISSN: 0749-503X abrégé page 1373, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, dernier alinéa page 1379, colonne de gauche, dernier alinéa - page 1381, colonne de droite, alinéa 1 page 1384, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, dernier alinéa</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>FICKERS P ET AL: "New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>." JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, vol. 55, no. 3, décembre 2003 (2003-12), pages 727-737, XP002336154 ISSN: 0167-7012 cité dans la demande abrégé; tableau 1 page 737, colonne de gauche, alinéa 2</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>US 5 648 247 A (PICATAGGIO ET AL) 15 juillet 1997 (1997-07-15) cité dans la demande abrégé figures 1,2 colonne 2, ligne 60 - colonne 3, ligne 10 colonne 5, ligne 12 - colonne 6, ligne 60; exemples 8,18-24</p>	1-24
A	<p>-----</p> <p>WO 03/100013 A (COGNIS CORPORATION) 4 décembre 2003 (2003-12-04) abrégé page 1, ligne 15 - page 10, ligne 16 page 10, ligne 10-23; exemples 1-6 -/--</p>	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/003140

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	& US 2004/014198 A1 (CRAFT DAVID L) 22 janvier 2004 (2004-01-22) cité dans la demande -----	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2005/003140

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5648247	A	15-07-1997	US 5620878 A	15-04-1997
WO 03100013	A	04-12-2003	AU 2003247411 A1	12-12-2003
			EP 1506302 A2	16-02-2005
			US 2004014198 A1	22-01-2004
US 2004014198	A1	22-01-2004	AU 2003247411 A1	12-12-2003
			EP 1506302 A2	16-02-2005
			WO 03100013 A2	04-12-2003

ANNEXE III



Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization

F. Thevenieau^{a,b}, M.-T. Le Dall^a, B. Nthangeni^{a,1}, S. Mauersberger^c,
R. Marchal^b, J.-M. Nicaud^{a,*}

^a *Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, UMR2585-INRA-CNRS-INAP-G, INRA Centre de Grignon, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France*

^b *Institut Français du Pétrole, Département Biotechnologie et Chimie de la Biomasse, 1 & 4 avenue de Bois-Préau, F-92852 Rueil-Malmaison cedex, France*

^c *Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Dresden, D-01062 Dresden, Germany*

Received 2 August 2006; accepted 12 September 2006

Abstract

In order to get deeper insights into oxidative degradation of the hydrophobic substrates (HS) triglycerides and alkanes by yeasts, tagged mutants affected in these pathways were generated by random insertion of a mutagenesis cassette MTC into the genome of *Yarrowia lipolytica*. About 9.600 Ura⁺ transformants were screened in plate tests for utilization of alkanes (C10, C16), oleic acid and tributyrin. HS degradation mutants were recovered as unable to grow on alkane or on intermediates of the pathway (AlkA–AlkE phenotype classes). To identify the disrupted genes, insertion points of the MTC were sequenced using convergent and divergent PCR. Sequence analysis evidenced both known and new genes required for HS utilization, e.g. for AlkD/E mutants MTC insertion had occurred in genes of thioredoxin reductase, peroxines *PEX14* and *PEX20*, succinate-fumarate carrier *SFC1*, and isocitrate lyase *ICL1*. Several mutants were affected in alkane utilization depending on chain length. Mutant Z110 (AlkAb: C10⁻ C16⁺) was shown to be disrupted for *ANTI* encoding a peroxisomal membrane localized adenine nucleotide transporter protein, providing ATP for the activation of short-chain fatty acids by acyl-CoA synthetase II in peroxisomes. Mutants N046 and B095 (AlkAc: C10⁺ C16⁻) were disrupted for the ABC transporter encoded by *ABC1* gene, thus providing first evidence for its participation in chain length dependent alkane transport processes.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; Hydrophobic substrate; Alkane; Fatty acid; Tagged mutants; ABC transporter; ORF YPR128c/*ANTI* gene; *PDR5*

1. Introduction

The alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica* very efficiently degrades hydrophobic substrates (HS), like triglycerides (fats, oils), alkanes and fatty acids, and exhibits a well developed yeast-to-hypha transition (Barth et al., 2003; Barth and Gaillardin, 1996, 1997; Dominguez et al., 2000; Fickers et al., 2005). Therefore, this yeast is a good model organism to investigate HS metabolic pathways and mor-

phogenesis, the genes involved and their regulation, and especially the transport processes of HS, which are generally poorly understood.

In order to get a more detailed insight into these pathways, classical and reverse genetics have been used. First attempts to identify genes involved in HS utilisation were initiated by isolation of chemical or UV-mutants affected in alkane (Bassel and Mortimer, 1982, 1985; Iida et al., 1998, 2000; Mauersberger, 1991), fatty acid (Nuttley et al., 1993) or triglyceride utilization pathways (for reviews see (Barth et al., 2003; Barth and Gaillardin, 1996, 1997; Mauersberger et al., 1996; Titorenko and Rachubinski, 2001)).

Screening of UV-mutants affected in alkane utilization was initially performed in Mortimer's group using decane

* Corresponding author. Fax: +33 1 30 81 54 57.

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

¹ Present address: CSIR, Biosciences, Private Bag X2, Modderfontein 1645, South Africa.

as the substrate (Bassel and Mortimer, 1982, 1985). Several of these mutants exhibited pleiotropic phenotypes in addition to alkane non-utilization (Alk) such as loss of mating function, inability to sporulate and changes in colony and cellular morphology. Based on the relative frequencies of alk and auxotrophic mutants, about 80–90 genes were suggested to be involved in alkane assimilation (Bassel and Mortimer, 1985). The Alk mutants were classified into the five phenotypic classes AlkA–AlkE depending on the intermediates of the alkane degradation pathway (fatty alcohol, fatty aldehyde, fatty acid, acetate or ethanol) they could use (Bassel and Mortimer, 1982, 1985; Kujau et al., 1992; Mauersberger, 1991; Mauersberger et al., 1996). Among at least 26 loci involved in uptake and primary alkane oxidation to fatty acids, mutations in 16 loci resulted in a significant reduction of alkane uptake (Bassel and Mortimer, 1985). For *Y. lipolytica* and *Candida maltosa* three subtypes of AlkA mutants were described when using different alkane chain lengths (C8–C16) as substrates in the screening. Mutants were unable to utilize either all chain-length of alkanes (AlkAa), or only the short-chain (C10; AlkAb), or only long-chain (C16; AlkAc) alkanes (Mauersberger, 1991; Mauersberger et al., 1996). These AlkA mutant subtypes were regarded as hints for the existence of chain-length specific alkane uptake, intracellular substrate transport systems, or alkane oxidizing enzymes, like the cytochrome P450-dependent monooxygenases, catalyzing terminal hydroxylation as a first step in the primary alkane oxidation to fatty acids. Subsequent evidence was obtained in *C. maltosa* for the presence of up to 12 cytochrome P450 genes (*ALK1–ALK12*), all belonging to the CYP52 gene family (Mauersberger et al., 1996; Ohkuma et al., 1998; Scheller et al., 1998; Zimmer et al., 1998), and later in *Y. lipolytica* (Fickers et al., 2005; Iida et al., 1998, 2000). Alkane chain length-specific mutants have been used leading to the identification of first genes involved in the AlkAa (C10⁻ C16⁻) and AlkAb (C10⁻ C16⁺) phenotypes in *Y. lipolytica*. Thus, a *Y. lipolytica* strain disrupted for *ALK1*, encoding a short-chain-specific cytochrome P450, was unable to grow on decane while it grew normally on dodecane and hexadecane (Iida et al., 1998), whereas a double-disruptant *alk1KO alk2KO*, was unable to grow on both alkanes (AlkAa), indicating the role of these cytochromes P450 as alkane monooxygenases in terminal alkane hydroxylation (Iida et al., 2000). Other genes involved in chain-length specific utilization of alkanes were subsequently identified. A decane-inducible peroxisomal acetoacetyl-CoA thiolase gene *PAT1* (*ScERG10* related), essential for decane utilization, was isolated by complementing an AlkAb mutant (Yamagami et al., 2001), although the specific function of this thiolase in decane oxidation is not clearly understood. A search for genes encoding *ALK1* regulators using AlkAb mutants identified *PEX10* encoding peroxisomal integral membrane protein involved in peroxisomes biogenesis (Takagi et al., 1999; Takewaka et al., 1999). In a previous study, we identified an AlkAb mutant affected in *UGT51/ATG26*, encoding an

UDP-glucose: sterol glucosyltransferase (Stasyk et al., 2003). This suggested the existence of link between decane uptake or endocytosis and the ergosterol glucoside content of membranes.

To deepen our understanding of alkane utilization in *Y. lipolytica*, the generation of tagged mutants affected in HS degradation pathways and/or peroxisome biogenesis has been initiated in our group. We devised a simple scheme of mutagenesis cassette (MTC) insertion (Mauersberger and Nicaud, 2003; Mauersberger et al., 2001). The insertion mutants were screened by classical techniques using up to nine different media including HS as carbon sources. The MTC insertion was shown to occur predominantly at random by non-homologous recombination and mutant phenotypes were linked to MTC integration. Subsequently the tagged genes were analyzed by PCR amplification and sequencing of the MTC insertion site borders which permitted identification of the disrupted ORF in the complete genome of *Y. lipolytica* (Dujon et al., 2004). Insertional mutagenesis was successfully applied to isolate the first pexophagy mutants in this yeast (Nazarko et al., 2002, 2004, 2005).

Here we report on the generation and analysis of *Y. lipolytica* insertional mutants affected in alkane, fatty acid or triglyceride utilization. We identified several new genes involved in hydrophobic substrate utilization pathways, and particularly *ANTI* and *ABCI*, two genes specific for the chain-length dependent degradation and transport of alkanes.

2. Materials and methods

2.1. Strains, media, and growth conditions

Escherichia coli strains DH5 α and Mach1-T1 were used for transformation and amplification of recombinant plasmid DNA. Cells were grown on LB medium (Sambrook et al., 1989). Ampicillin (100 μ g/ml), kanamycine (40 μ g/ml) or tetracycline (40 μ g/ml) were used for plasmid selection. The *Y. lipolytica* and *E. coli* strains used in this study are listed in Table 1.

The yeasts were grown at 28 °C in the complete media YPD (Barth and Gaillardin, 1996) or YNBcas (YNBD with 0.2% casamino acids). Morphology phenotype was tested on YPD (phenotype Fil). Substrate utilization was tested on modified minimal medium YNB with different carbon sources (1%) as follows: glucose utilisation was tested on YNBD and YNBcas, ethanol utilisation was tested on YNBE (phenotype Eth), fatty acid utilisation was tested using oleic acid (YNBO, phenotype Fa) and tributyrin (YNBT, phenotype Tb), alkane utilisation (phenotype Alk) was analyzed with decane (YNBC10) and hexadecane (YNBC16), as previously described (Mauersberger and Nicaud, 2003; Mauersberger et al., 2001). For solid media agar (2 g/l) was added. For plate tests, the alkanes were supplied by gas phase feeding. For drop test, exponentially growing cells in YPD were centrifuged, washed twice with

Table 1
Yarrowia lipolytica and Escherichia coli strains used in this study

Name (Collection name)	Genotype and remarks	References
<i>Y. lipolytica</i> strains		
W29 (JMY399)	<i>MATA</i> , wild-type	Barth and Gaillardin (1996)
H222 (JMY142)	<i>MATA</i> , wild-type	Barth and Gaillardin (1996)
H222-41 (JMY322)	<i>MATA ura3-41</i>	Mauersberger et al. (2001)
N001–N257	H222-41 transformed with JMP5 digested by <i>NotI</i> with selected phenotypes	Mauersberger et al. (2001)
Z001–Z132	H222-41 transformed with PCR amplified MTC fragment with selected phenotypes	This work
B002–B320	H222-41 transformed with PCR amplified MTC fragment with selected phenotypes	This work
JMY1227	H222-41 disrupted for <i>ABC1: MATA ura3-41, Δabc1::URA3</i>	This work
JMY1229	H222-41 disrupted for <i>ABC1: MATA ura3-41, Δabc1::URA3</i>	This work
Z110-1–Z110-3	Z110 transformed with JMP61His-Z110: <i>MATA ura3-41 ant1::MTC URA3-pPOX2-ANTI</i>	This work
<i>E. coli</i> strains		
Mach1-T1 (JME689)	pABC1-PT: 2.7 kb PCR Fragment containing <i>yABC1</i> PT cassette in pCR4 [®] Blunt-TOPO	This work
Mach1-T1 (JME712)	pABC1-PUT: <i>URA3</i> cassette in pABC1-PT cassette, PUT-ABC1 cassette	This work
DH5α (JME485)	JMP106	Fickers et al. (2004)
DH5α	JMP106-Z110 containing the <i>yLANT1</i> gene expressed under the <i>POX2</i> promoter	This work
DH5α (JME514)	JMP121 containing the <i>I</i> SceI fragment carrying <i>URA3</i> marker	Fickers et al. (2003)
DH5α (JME257)	JMP5 containing the mutagenesis cassette (MTC)	Pignede et al. (2000)

Table 2
Primers used in this study

Primers	Sequence (5' → 3') ^a	Restriction site, utilization
MTC1	GGCCGCTGTCGGGAACCGGTTTCAGG	MTC amplification
MTC2	GGCCGCACTGAAGGGCTTTGTGAGAG	MTC amplification
Ap2	GTCGGCGACAGGAAACAGC	Convergent PCR
Zeta1	CCCCACTATGAATACATCAG	Convergent PCR, left border
Zeta3	CACTACCGAGGTTACTAGAG	Convergent PCR, left border
Zeta10	GACGGTCCGTTTTGCGTTTAAGCC	Convergent PCR, left border
Zeta11	CCGAGTGAATGTTGCCTGCCG	Convergent PCR, right border
Zeta21	CACTACCGAGGTTACTAGAGTTGGG	Convergent PCR, right border
Zeta22	GGGAAAGCGATACTGCCTCGG	Convergent PCR, right border
Zeta30	CGGACTTGTGGACGTTAGCTCG	Divergent PCR, left border
Zeta31	CGTAGGAGGGCATTGTTGGTGGTG	Divergent PCR, left border
Zeta40	GGGAGATTAGAGTTACCCTGTCCG	Divergent PCR, right border
Zeta41	GTCGGATGACTAACTCTCCAGAGC	Divergent PCR, right border
Z110-H6F	CATGAAGCTTATTCCAAAGACTATGTTCTGT	<i>HindIII</i>
Z110-H6R	CTATTCGGATCCCTTGATCAAGGTGGGGGCC	<i>BamHI</i>
ABC1-ver1	GTGTCAGCGTCGTAATATCGTATC	
ABC1-P1	GGGGGGTTGTACCCTAGC	
ABC1-P2	GCATTACCCCTGTTATCCCTAGCGTGTGCGATAGCTTCTGGAG	<i>I</i> sceI
ABC1-T1	GCTAGGGATAACAGGGTAATGCGAGGGTCTGGGATTCGAGC	<i>I</i> sceI
ABC1-T2	GGGAGAGAACATTTGCTGACCG	
ABC1-ver2	GGCGTCATCATTTGCTGACCG	

^a Underlined sequences correspond to introduced restriction sites.

water and re-suspended at an optical density OD₆₀₀ of 1. Successive 10-fold dilutions were performed and 5 μl of each dilution were spotted onto the indicated media.

Liquid cultures were performed at 28 °C with 100 ml of minimal YNB medium plus carbon source in 500 ml Erlenmeyer baffled shaking flasks. Cells from overnight YPD cultures were centrifuged, washed twice with minimal medium without a carbon source, and used to inoculate the cultures at an initial OD₆₀₀ of 0.5. Growth was followed by measuring the OD₆₀₀.

To monitor growth according to alkane chain length, cells were grown in minimal media supplemented with 1.5 g/l yeast extract (YNBY). These YNB-derived media contained 1.7 g/l of yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco, Paris, France), 5 g/l of NH₄Cl, 1.5 g/l of yeast extract, 10 g/l of alkane, and

50 mM phosphate buffer (pH 6.8). The alkanes used were decane (C10), undecane (C11), dodecane (C12), tridecane (C13), tetradecane (C14), pentadecane (C15), and hexadecane (C16).

2.2. Insertion mutagenesis of *Y. lipolytica*

The 2 kb MTC fragment was obtained by amplification with primers MTC1 and MTC2 (Table 2) using JMP5 as template (Pignede et al., 2000). Strain H222-41 (JMY322, *MATA ura3-41*, containing a 10 bp deletion in *URA3*) was transformed by the lithium acetate method as previously described (Barth and Gaillardin, 1996) with 100–700 ng of amplified MTC fragment yielding 2000–3000 transformants per μg of fragment. Ura⁺ transformants were selected on YNBcas with glucose as carbon source and

tested by replica plating for growth on different HS as carbon sources using YNBC10, YNBC16, YNBO, YNBT, and for comparison YNBD. Candidate mutants were streaked for single colonies on YPD and re-tested on these different media. Mutants were confirmed by a drop test on the same media, which was more discriminating than replica plating.

2.3. Amplification of the MTC borders and sequence analysis

The MTC borders were amplified either by convergent PCR or by divergent PCR following digestion and religation of genomic DNA (see Fig. 2). Fragments were purified and sequenced as previously described (Mauersberger et al., 2001) using a second primer close to the primers used for amplification (for example Zeta11 when amplification was performed with Zeta10, see Table 2 and Fig. 2A) or primers designed for primer walking.

2.4. Complementation of Z110 mutant (*ant1::MTC*)

The nearly 950 bp fragment corresponding to *ANT1* ORF was amplified by PCR using primers pairs Z110-H6F/Z110-H6R (Table 2) and *Y. lipolytica* W29 genomic DNA as a template. These primers contained *Hind*III and *Bam*HI sites to facilitate the cloning (Table 2). The purified PCR products were then cloned as a *Hind*III–*Bam*HI fragments into JMP106 plasmid (Fickers et al., 2004). The resulting construct, designated JMP61-Z110 was verified by sequencing using primers 61start/61stop as described previously (Fickers et al., 2004). This vector was used for the expression of the *ylANT1* gene under the control of the strong inducible *POX2* promoter. Mutant Z110 was transformed by the lithium acetate method with plasmid JMP61-Z110 digested by *Not*I. Transformants were selected directly by complementation on YNBC10. Plasmid insertion was verified by Southern blot with *ANT1* as a probe.

2.5. Construction of the *ylABC1* deletion cassette

We deleted the *ABC1* gene by replacing the coding region of this genes by a cassette containing the *URA3* gene as previously described (Fickers et al., 2003). First, the promoter (P) and terminator (T) regions of *ABC1* were obtained by PCR amplification using *Y. lipolytica* W29 genomic DNA as a template and ABC1-P1/ABC1-P2, ABC1-T1/ABC1-T2 oligonucleotides as primer pairs (Table 2). ABC1-P2 and ABC1-T1 primers were designed to introduce an *ISce*I restriction site at the 3'-end of the P fragment and at the 5'-end of the T fragment. The corresponding P-*ISce*I and *ISce*I-T fragments were pooled and used as templates for the amplification of the P-*ISce*I-T cassette with primers ABC1-P1/ABC1-T2. These cassettes were then cloned as blunt ended fragments into pCR4[®]Blunt-TOPO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and transformed into Mach1-T1 strain (Invitrogen) giving rise to pABC1-PT (JME689). The *ISce*I fragment carrying

URA3 marker isolated from JMP121 (Fickers et al., 2003) was inserted at the *ISce*I site of pABC1-PT giving rise to pABC1-PUT (JME712).

2.6. Nucleotide sequence analysis

Sequence comparisons were done by BLAST search (Altschul et al., 1997) against the *Y. lipolytica* RST and genome databases at the Genolevures site (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>) and at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). We used the gene family classification available from the Genolevures site (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/>) and the transport classification database TCBD (<http://www.gena.ucl.ac.be/yeti/>).

3. Results

3.1. Isolation of new tagged mutants affected in HS utilization by insertion mutagenesis

Mutagenesis was performed by transformation of strain H222-41 with the mutagenesis cassette (MTC) as described in Section 2. We screened two times approximately 4800 Ura⁺ transformants (Z- and B-set, respectively). Transformants were analyzed by replica plating on YNBCas, YNBD, YNBO, YNBT, YNBC10, and YNBC16 giving rise to the Z- and B-mutants sets (Tables 1 and 3). For the Z-set, 132 clones affected in HS utilization were purified on YPD and tested again on the same media. Phenotypes were confirmed by a drop test and 28 clones were kept for further analysis. Examples of phenotypes observed for these mutants grown on glucose (YNBD), tributyrin (YNBT) and on the *n*-alkanes decane (YNBC10) and hexadecane (YNBC16) are shown in Fig. 1. For the B-set, 139 mutants were shown to be affected in HS utilization but only B095 presenting a defect depending on alkane chain-length will be shown here. Phenotypes of selected mutants are summarized in Table 3 including some of the N-set (Mauersberger and Nicaud, 2003). Some mutants, like Z011, Z103, and Z104, which exhibited a growth defect on all carbon sources, including glucose, were not studied further (Fig. 1). Mutants Z024, Z104, Z120, Z121, Z122, and Z123 were clearly affected in hydrophobic substrate utilization, as unable to grow on alkanes (Alk⁻), the fatty acid oleic acid (Fa⁻), tributyrin (Tb⁻) and ethanol (Eth⁻) representing AlkE phenotype class (Fig. 1 and Table 3). Mutants N002, N040, N078, N220, Z003, Z027 and Z093 were affected for growth on both C10 and C16 alkanes and oleic acid (Alk⁻ Fa⁻ Tb⁺ Glu⁺), corresponding to the AlkD or AlkE phenotype classes depending on ethanol utilisation. Mutants N032, N046, N155, Z077, Z080, Z083, Z110, and B095 were affected in alkane utilization depending on chain length (Fig. 1 and Table 3). Indeed, Z077, Z080, N046, and B095 were able to grow on C10 but not on C16 (AlkAc phenotype), while on the contrary mutants Z083, Z110, N032, and N155 grew on C16 but not on C10 (AlkAb

Table 3
Phenotype of *Yarrowia lipolytica* mutant strains used in this study and locus of MTC insertion

Collection name	Mutant name	Phenotypes YNBD	YNBO	YNBC10	YNBC16	YNBT	Mutant characteristics (Alk phenotype classes)	Disrupted gene
JMY401	N002	++	–	–	–	+/-	HS minus (AlkD) Fil ⁻ (Sm)	ND, not amplified
JMY406	N032	+/-	++	+/-	++	++	C10 leaky (AlkAb leaky) Fil ⁺	YALI0C06347g, unknown function
JMY408	N040	++	+/-	+/-	+/-	+/-	HS leaky (AlkD) Fil ⁻ (Sm)	YALI0D27126g, thioredoxine reductase, <i>TRR1/TRR2</i>
JMY410	N046	++	++	++	–	++	C16 minus (AlkAc) Fil ⁺	YALI0E14729g, <i>yABC1</i> , ABC transporter, <i>PDR5</i> like protein
JMY417	N078	++	–	–	–	+/-	HS minus (AlkD) Fil ⁻ (Sm)	YALI0E09405g, <i>yPEX14</i> , peroxine PEX14
JMY435	N155	++	++	–	++	++	C10 minus (AlkAb) Fil ⁺	YALI CDS119-1, <i>yUGT51 (ATG26)</i> , sterol glucosyltransferase
JMY436	N156	–	–	+/-	+/-	–	Alk leaky Glu minus Fil ⁺	YALI0F04095g, <i>IDP2</i> , NADP ⁺ -isocitrate dehydrogenase
JMY448	N220	++	–	–	–	+/-	HS minus (AlkD/E) Fil ⁻ (Sm)	ND, not amplified
JMY450	N222	++	++	+/-	+/-	++	Alk leaky Fil ⁺⁺	YALI0E25135g, Ser/Thr protein kinase of MAP kinase family
	Z003	++	–	–	–	++	HS minus (AlkD) Fil ⁻ (Sm)	YALI0E09405g, <i>yPEX14</i> , peroxine PEX14
	Z021	++	–	–	++	+/-	C10 and O minus Fil ⁺	YALI0C21582g, pyruvate dehydrogenase kinase
	Z024	++	–	–	–	–	HS minus (AlkE) Fil ⁻ (Sm)	YALI0E34672g, <i>ySFC1</i> , succinate-fumarate transporter, P33.2.f7.1
	Z026	++	+/-	++	++	+/-	O and T minus Fil ⁺	YALI0B13970g, glycerol-3-phosphate dehydrogenase
	Z027	++	–	–	–	++	HS minus (AlkD) Fil ⁻ (Sm)	YALI0E06831g, <i>yPEX20</i> , peroxine PEX20
	Z077	++	++	++	–	++	C16 minus (AlkAc) Fil ⁺	ND, multiple insertions
	Z080	++	++	++	–	++	C16 minus (AlkAc) Fil ⁺	ND, multiple insertions
	Z083	++	++	–	++	++	C10 minus (AlkAb) Fil ⁺	ND, multiple insertions
	Z108	++	+/-	+/-	++	++	C10 and O leaky Fil ⁻ (Sm)	YALI0F18216g, <i>DEG1</i> , depressed growth-rate protein
	Z110	++	+	–	++	++	C10 minus (AlkAb) Fil ⁻ (Sm)	YALI0E03058g, <i>yANTI</i> , peroxisomal ATP transport protein PMP34
	Z123	++	–	–	–	–	HS minus (AlkE) Fil ⁺	YALI0C16885g, <i>yICL1</i> , isocitrate lyase
JMY931	B095	++	++	++	–	++	C16 minus (AlkAc) Fil ⁺	YALI0E14729g, <i>yABC1</i> , ABC transporter, <i>PDR5</i> like protein

Abbreviations: Fil⁻ (Sm), smooth colonies; Fil⁺⁺, hyperfilamentous, very rough colonies; HS, hydrophobic substrates (alkanes, fatty acids, triglycerides); Alk, alkanes both C10 and C16; C10, decane; C16, hexadecane; O, oleic acid for Fa-phenotype; T, tributyrin, ND, not determined. For classification into AlkD/AlkE phenotypes additional utilisation tests for ethanol (Eth) were performed for selected mutants (not shown).

phenotype according to Mauersberger and coworkers (Mauersberger, 1991; Mauersberger and Nicaud, 2003; Mauersberger et al., 1996).

3.2. Amplification of the insertion borders and identification of the interrupted gene

To identify the interrupted gene in the tagged mutants, the MTC borders were amplified and sequenced with primers described in Section 2 and in Fig. 2A and B. Since multiple integration of the MTC could occur (Mauersberger and Nicaud, 2003), we first checked mutants for single insertion by Southern blot. Multiple insertions occurred in mutants Z077, Z080, and Z083 (Table 3), which were therefore not analyzed further. Examples of amplified borders obtained with the different strategies are presented in Fig. 2. Phenotypes of mutants and the loci of MTC insertion are depicted in Table 3.

3.2.1. Mutants affected in alkane and fatty acid utilization

Mutants N002, N040, N078, N220, Z003, Z027, and Z093 did not grow on alkanes or on oleic acid (Alk⁻ Fa⁻ Tb⁺ Glu⁺), corresponding to phenotype classes AlkD or AlkE. To discriminate between both classes, selected mutants were

tested for ethanol utilization Eth (Eth⁺, class AlkD: Eth⁻, class AlkE). Additionally, these mutants were not filamenting (Fil⁻) and formed smooth colonies (Sm) (Table 3). For the mutant N078 (AlkD: Alk⁻ Fa⁻ Tb⁺ Eth⁺ Glu⁺ Fil⁻), we obtained only the right border by convergent PCR, while for Z003, both borders were obtained. Sequence revealed that for both mutants, the MTC was inserted into *PEX14* gene, not previously isolated in *Y. lipolytica* (Titorenko and Rachubinski, 2001). Mutant Z027 (AlkD: Alk⁻ Fa⁻ Tb⁺ Eth⁺ Glu⁺ Fil⁻) was shown to be interrupted for *PEX20* which codes for Pex20p, a peroxine involved together with Pex8p in thiolase import into peroxisome in *Y. lipolytica* (Smith and Rachubinski, 2001). Some of the mutants affected in alkane (Bassel and Mortimer, 1982) and oleic acid (Nuttley et al., 1993) utilization were also shown to be affected in the dimorphic transition from the yeast to the mycelium form. This was particularly true for the mutant disrupted in the *PEX* genes (Titorenko and Rachubinski, 2001). It was shown that a number of peroxisome-associated peroxins are required for the delivery of mycelial-specific proteins to the plasma membrane and cell envelope (Titorenko et al., 1997).

Mutants Z024 and Z123 were unable to growth on alkanes and fatty acids, and also unable to utilize tributyrin.

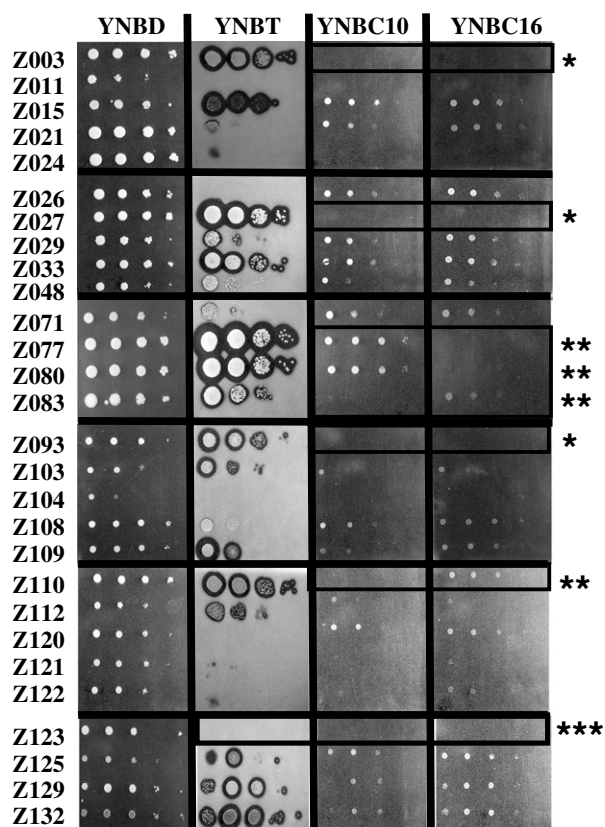


Fig. 1. Phenotypes of selected zeta-URA3-zeta MTC insertion mutants of the Z-series. Mutants were pre-grown overnight in YPD, centrifuged, washed and re-suspended at 1 OD₆₀₀. Ten microlitre aliquots of different dilutions (non diluted, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) of this cell suspension were spotted onto minimal media with glucose (YNBD), tributyrin (YNBT), YNBO (not shown), and the alkanes decane (YNBC10) or hexadecane (YNBC16) as carbon sources. Phenotype of boxed mutants is indicated on the right: * for mutants unable to grow on both alkanes C10 and C16 (AlkAa or AlkD/E), such as Z003, Z027, and Z093; ** for mutants presenting growth defects depending on alkane chain length (AlkAb and AlkAc), such as Z077, Z080, Z083, and Z110; *** for mutants unable to grow on hydrophobic substrates (AlkE), such as Z123.

Z024 (AlkE: Alk⁻ Fa⁻ Tb⁻ Glu⁺ Fil⁻) was interrupted in the gene YALI0E34672g. This gene is homologous to *Saccharomyces cerevisiae* gene *SFC1* (previously known as *ACRI*, YJR095w) which codes for a mitochondrial succinate-fumarate carrier involved in the transport of succinate into the mitochondrial matrix in exchange to fumarate (Palmieri et al., 1997, 2000). Succinate is produced by the glyoxylate cycle from acetyl-CoA resulting from peroxisomal fatty acid β -oxidation. Disruption of succinate exchange thus abolishes growth on HS. Z123 (AlkE: Alk⁻ Fa⁻ Tb⁻ Eth⁻ Glu⁺) was interrupted for gene YALI0C16885g corresponding to *ylI/CLI*, coding for isocitrate lyase (Barth and Scheuber, 1993). This mutant also interferes with the function of the glyoxylate cycle.

3.2.2. Mutants moderately affected in alkane and fatty acid utilization

Five mutants, N040, N156, N222, Z021, and Z108, presented a phenotype of poor or leaky growth on HS (Table 3).

Mutant N040 (AlkD leaky: all HS leaky Eth⁺ Glu⁺ Fil⁻) was interrupted for gene YALI0D27126g, corresponding to a thioredoxine reductase homologous to *TRR1* (YDR353w) and *TRR2* (YHR106w) of *S. cerevisiae*. Growth is probably affected due to hypersensitivity to oxidative stress generated by primary oxidation of alkanes and peroxisomal fatty acid β -oxidation.

Mutant Z021 (C10⁻ C16⁺ Fa⁻ Tb^{+/-} Glu⁺, Alk-phenotype not classified) was interrupted for YALI0C21582g encoding a protein similar to tr|Q8X073 of *Neurospora crassa*, a putative pyruvate dehydrogenase kinase of the ATPase kinase family (Bowker-Kinley and Popov, 1999). Surprisingly, homologues were found in *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces lactis* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/GLR.2845.html>, GLR2845 family), but not in other hemiascomycetous yeasts. This gene was found to be 14-fold induced during growth on oleic acid compared to glucose (F. Thevenieau, unpublished), confirming its involvement in fatty acid utilization.

Mutant Z108 (C10 leaky C16⁺ Fa leaky Tb⁺ Glu⁺, Alk-phenotype not classified) was interrupted for YALI0F18216g, a gene similar to *S. cerevisiae* *DEG1* YFL001w (sp|P31115), encoding pseudouridylyl synthase 3. The phenotype of Z108 therefore reflects a general pleiotropic effect on growth.

Mutant N156 (Alk leaky Fa⁻ Tb⁻ Glu⁻) grew on glucose in the presence of glutamate and was interrupted for YALI0F04095g, a homologue of *IDP* genes from *S. cerevisiae*, with the highest similarity to *IDP2* (YLR174w), encoding a cytosolic NADPH-regenerating isocitrate dehydrogenase. Surprisingly, there is a single *IDP* gene in *Y. lipolytica* while other hemiascomycetous yeasts presented 2–3 orthologous genes in the GLR.2043 family (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/GLR.2043.html>).

Mutant N222 (Alk leaky Fa⁻ Glu⁺) exhibited a Fil⁺⁺ hyperfilamentous morphology phenotype. Sequence revealed that this mutant was interrupted for YALI0E25135g, coding for a Ser/Thr protein MAP kinase (MAPK), highly similar to *S. cerevisiae* *HOG1* product (YLR113w, sp|P32485). In *C. albicans*, Hog1p is a repressor of filamentation and is required for adaptation to oxidative stresses (Monge et al., 2006). This gene may be involved in a MAP kinase cascade required for either adaptation to oxidative stresses, or for the induction of proteins involved in alkane transport such as *ABC1* (see below) or of proteins composing the protrusion observed upon growth on fatty acid and alkanes (Fickers et al., 2005; Mlickova et al., 2004).

3.2.3. Mutants affected in alkane utilization depending on alkane chain length

Eight mutants, N032, N046, N155, B095, Z077, Z080, Z083, and Z110, presented this phenotype (Table 3 and Figs. 1, 3 and 4). Three of them, Z077, Z080 (both AlkAc: C10⁺ C16⁻ Fa⁺ Tb⁺ Glu⁺), and Z083 (AlkAb: C10⁻ C16⁺ Fa⁺ Tb⁺ Glu⁺) presented multiple MTC insertion and were therefore not analyzed further (Table 3).

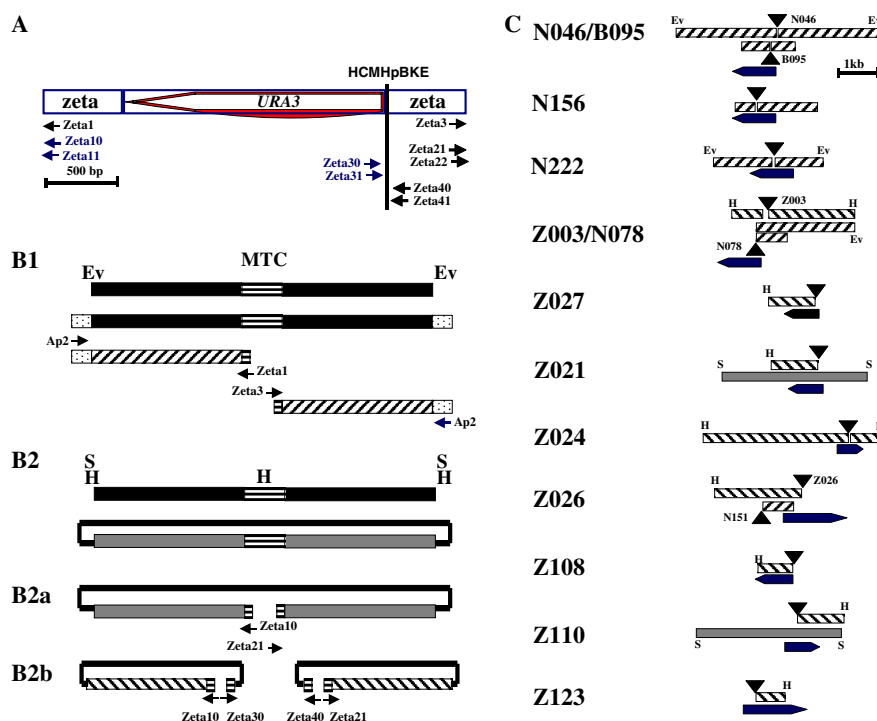


Fig. 2. Amplification and sequencing of the insertion site borders from the tagged mutants. (A) Schematic representation of the zeta-URA3-zeta MTC and localization of primers used for the amplification of border fragments. Localization of primers used for amplification is indicated by an arrow. Restriction sites in the multi-cloning site HCMHpBKE were: H, *Hind*III; C, *Cl*aI; M, *Mlu*I; Hp, *Hpa*I; B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; E, *Eco*RI. (B1) Amplification of the insertion site borders by convergent PCR. Genomic DNA (black box with inserted MTC) of insertion mutants was digested with enzymes giving blunt ends (Ev, *Eco*RV or the mixture of *Eco*RV, *Stu*I and *Pvu*II), and ligated with the specific adapter (dotted box) as previously described (Devic et al., 1997). PCR was performed with a primer specific to the adapter (Ap2) and with a primer specific to the MTC, like Zeta1 and Zeta3, generating left and right border fragments, respectively (right hatched boxes). (B2) Amplification of the insertion site borders by divergent PCR. Genomic DNA (black box) of the MTC mutants was digested with enzymes leaving cohesive ends which did not cut in the MTC (such as S for *Sph*I) and circularized by ligation (thin line). (B2a) PCR amplification was performed with primers specific for the MTC (Zeta10 and Zeta21) indicated by grey boxes. (B2b) Alternatively, DNA was digested with a restriction enzyme that cut in the polylinker of the MTC (such as H for *Hind*III), followed by amplification of the left and right borders with primer pairs Zeta10/Zeta30 and Zeta40/Zeta21, respectively, indicated by left hatched boxes. (C) Schematic representation of amplified fragments and ORF localization for selected insertion mutants. Open grey or left hatched boxes represented the borders amplified by divergent PCR (B2) using primer pairs zeta10-zeta21 (after *Sph*I cutting), or zeta10-zeta30 (left border) and zeta21-zeta40 (right border), after *Hind*III cutting and ligation, respectively. Open right hatched boxes represented the borders amplified by convergent PCR after *Eco*RV cutting (B1) using primer pairs Zeta1-Ap2 (left border) and Zeta3-Ap2 (right border), respectively. MTC insertions were indicated by a triangle, the bold arrow boxes indicating the location of the coding region in the gene. The boxes indicated the fragment locations and sizes with the restriction site used for the genomic DNA digestion (H, *Hind*III; Ev, *Eco*RV; S, *Sph*I).

Mutant N155 (AlkAb: C10⁻ C16⁺ Fa⁺ Tb⁺ Glu⁺) was affected in the UDP-glucose: sterol glucosyltransferase encoding gene, named *ATG26* or *UGT51*, which is strictly required for pexophagy in the methanol-utilizing yeast *Pichia pastoris*, but not in *Y. lipolytica* (Nazarko et al., 2005; Stasyk et al., 2003). The function of the *ATG26/UGT51* gene product (involved in ergosterol glucoside synthesis) in decane metabolism is presently obscure. It might be related to an effect of the sterol glucoside content of the plasma membrane on alkane uptake or endocytosis.

Mutant N032 (AlkAb leaky: C10^{+/-} C16⁺ Fa⁺ Eth⁺ Glu⁺) resulted from a complex rearrangement after MTC insertion in YALI0C06347g region and was not analyzed further.

Mutants N046 and B095 were able to grow on alkane C10, while they did not grow on C16 (AlkAc: C10⁺ C16⁻ Fa⁺ Tb⁺ Eth⁺ Glu⁺ Fil⁻). In contrast, mutant Z110 presented the opposite phenotype since it grew on C16 but not

on C10 (AlkAb: C10⁻ C16⁺ Fa⁺ Tb⁺ Eth⁺ Glu⁺ Fil⁻). These mutants were analyzed further as detailed below.

3.3. *ANT1* is required for short-chain alkane utilization

Mutant Z110 was able to grow on C16 but failed to grow on C10, corresponding to the AlkAb phenotype (Fig. 1). This mutant was interrupted for YALI0E03058g (Table 3). This gene codes for a 315 amino acid protein similar to *S. cerevisiae* protein trQ06497 (YPR128c/*ANT1*). These proteins belong to the carrier protein family which contains also the human and *Candida boidinii* peroxisomal ATP transport proteins PMP34 and PMP47, respectively (data not shown). Ant1p belongs to the GLC.1419 protein family (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/GLC.1419.html>), and is quite conserved among hemiascomycetous yeasts (data not shown). Evidence has been presented by several authors that *ANT1* (YPR128c) is required for medium-chain

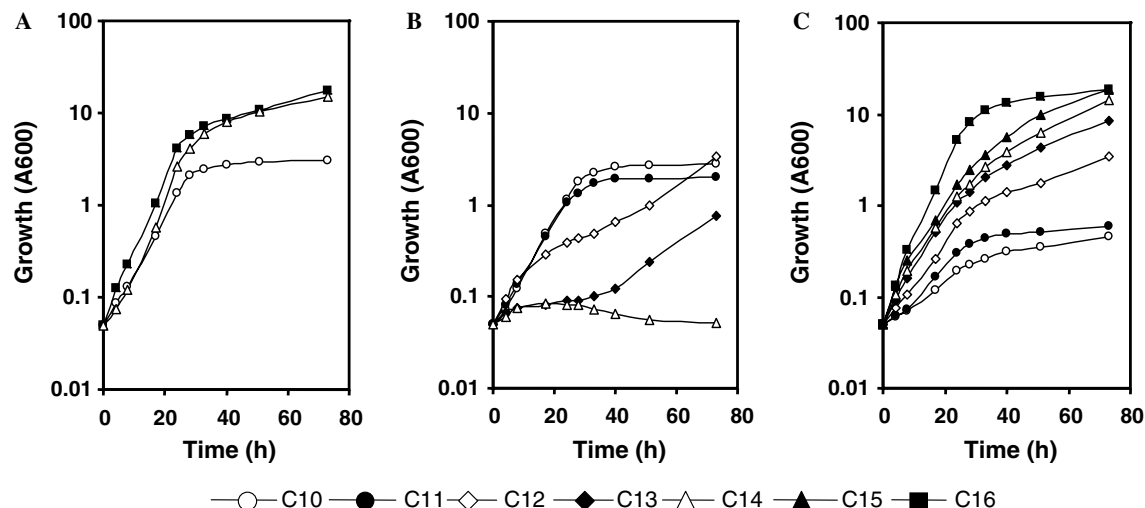


Fig. 3. Growth comparisons of the wild-type *Y. lipolytica* strain H222 (A) and the alkane utilization mutants H222 $\Delta abc1$ (JMY1227) (B) and Z110 *ant1* (C) on alkanes of different chain lengths. Growth was tested in baffled shaking flasks in minimal media YNBY supplemented with 0.15% yeast extract and with 1% alkanes as carbon sources. The alkanes used were decane (C10, \circ), undecane (C11, \bullet), dodecane (C12, \diamond), tridecane (C13, \blacklozenge), tetradecane (C14, \triangle), pentadecane (C15, \blacktriangle), and hexadecane (C16, \blacksquare). Cultures in 50 ml of YNBY in 250 ml baffled flasks were inoculated with washed cells from overnight YPD pre-culture at an initial OD₆₀₀ of 0.05.

fatty acid (MCFA) utilization in *S. cerevisiae*. It mediates the transport of ATP into peroxisomes which is required for the activation of MCFA in peroxisomes to their corresponding coenzyme A esters (Lasorsa et al., 2004; Palmieri et al., 2001; Rottensteiner et al., 2002; van Roermund et al., 2001). Interestingly, in *Y. lipolytica* a second *ANTI* related gene YALI0C06127g of unknown function was found as a second hit in the blast.

To confirm that mutant Z110 was indeed interrupted for gene YALI0E03058g (*ylANTI*), we tested gene complementation. For this, the *ylANTI* gene was amplified and cloned into the integrative JMP106 plasmid (Fickers et al., 2004) as described in Section 2. We placed the *ANTI* behind the *POX2* promoter which is strongly induced by alkanes and fatty acids (Juretzek et al., 2000). The resulting plasmid JMP61-Z110 was used to transform Z110 mutant cells by random integration. Transformants were directly selected by complementation for growth on C10 alkane. Normal transformation frequency was obtained with the plasmid JMP61-Z110, while no transformants were observed with the empty plasmid. Three transformants were isolated and named Z110-1–Z110-3. Presence of *ANTI* gene was confirmed by Southern blot. Genomic DNA from Z110 and from the three transformants Z110-1–Z110-3 was digested by *HindIII* and probed with *ANTI*. A single 2.3 kb fragment was observed in Z110 (disrupted locus), whereas an additional band of different size was observed in each of the three transformants, reflecting random insertion of the plasmid (data not shown). The transformants Z110-1–Z110-3 present normal growth on C10 alkane and present the same morphology phenotype Fil⁺ as the parental strain (data not shown). These results confirmed that the *ANTI* gene could complement both the growth defect of mutant Z110 on decane and the morphology defect, indicating a

direct correlation between *ANTI* hydrophobic substrate utilization and morphology defect.

Growth in liquid culture of the wild-type strain H222 and of the Z110 mutant was followed on alkanes of chain length ranging from C10 to C16 (Fig. 3). The wild-type strain H222 presented similar growth rates on all substrates with a μ_{\max} of $0.249 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3A). In contrast, Z110 grew very poorly on C10 (μ_{\max} lower than $0.027 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) and poorly on C11 (μ_{\max} lower than $0.065 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$). On C12, better growth was observed and growth rates improved with increasing alkane chain lengths up to a normal growth rate with hexadecane (μ_{\max} were: $0.145 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$ for C12; 0.157 h^{-1} for C13; 0.165 h^{-1} for C14; 0.174 h^{-1} for C15 and $0.245 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$ for C16, Fig. 3C). This confirmed that *ant1* defect prevented short-chain alkane utilization (C10 and C11), had a limited effect on C12–C15 and had no effect on C16 utilization.

3.4. *ABC1* is required for long-chain alkane utilization

Mutants N046 and B095 of the phenotype class AlkAc (C10⁺ C16⁻ Fa⁺ Tb⁺ Eth⁺ Glu⁺ Fil⁺) were able to grow on alkane C10 but failed to grow on alkane C16 (Table 3 and Fig. 3). Sequence analysis revealed that those two mutants were interrupted for gene YALI0E14729g. This gene codes for a 1659 amino acid protein similar to *S. cerevisiae* PDR5 encoded protein sp|P33302 (YOR153w). This protein belongs to the pleiotropic drug resistance (PDR) family 3.A.1.250 of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily (De Hertogh et al., 2006).

It belongs to the GLC.1360 Genolevures protein family (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/fam/GLC.1360.html>) which contains four members in *Y. lipolytica* (YALI0E14729g, YALI0C20265g, YALI0B02544g, and YALI0B12980g).

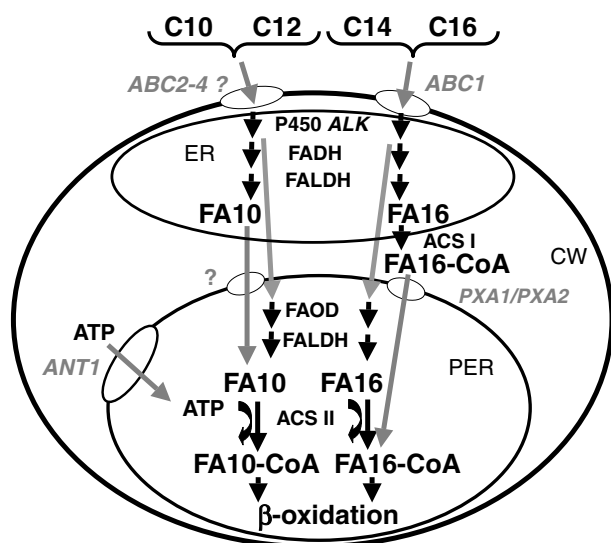


Fig. 4. Schematic representation of alkane degradation pathways in *Y. lipolytica* depending on chain length. Short-chain alkanes (C10–C12) may require *ABC2*, *ABC3* and *ABC4* for either entry into the cells or export to prevent alkane toxicity. Then they are converted to their corresponding fatty alcohol by a cytochrome P450-dependent alkane monooxygenase system (*ALK* genes, like *ALK1*), and then transported into peroxisome to be converted by a peroxisomal hydrogen peroxide-forming fatty-alcohol oxidase (FAOD) to the fatty aldehyde, and subsequently to the corresponding short-chain fatty acid (FA) by a fatty-aldehyde dehydrogenase (FALDH). The short-chain FA will be activated by the peroxisomal acyl-CoA synthetase II (ACS II, active towards short- and long-chain fatty acids), which required ATP provided by the adenine nucleotide transporter Ant1p. Alternatively, the fatty alcohols are oxidized to FA in the ER, and free short-chain fatty acids are transported into peroxisomes and activated there to the corresponding acyl-CoA esters prior β -oxidation. Long-chain alkanes (C14–C16) require *ABC1* for either entry into the cells or export to prevent alkane toxicity. Then they are converted to their corresponding fatty-alcohol by a cytochrome P450-dependent alkane monooxygenase system (*ALK* genes), then to the aldehyde by a fatty-alcohol dehydrogenase (FADH), and to the corresponding long-chain FA by NAD(P)⁺-dependent fatty-aldehyde dehydrogenases (FALDH) in ER or cytosol. After activation by the fatty-acyl-CoA synthetase I (ACS I), which is specific to long-chain FA and localized in ER or cytosol, activated long-chain fatty acid-CoA can be used directly for lipid biosynthesis upon desaturation and elongation (not shown) or they are transported into peroxisomes (ABC transporter *PXA1/PXA2*) to be degraded by β -oxidation. Alternatively, the long-chain fatty alcohols are directly transported into peroxisomes, oxidized there to FA, and activated subsequently to the corresponding acyl-CoA esters by ACS II prior peroxisomal β -oxidation. In case of diminished ATP import into peroxisomes due to *ant1* the first pathway involving long-chain fatty acid activation by ACS I will compensate the defect of the peroxisomal ATP transporter Ant1p. Peroxisomal transporter is designated in accordance with the data published for *S. cerevisiae* (Hiltunen et al., 2003; Palmieri et al., 2001). Transport processes and genes involved are indicated by grey arrows and characters, the metabolic conversion steps in black, respectively.

We named the gene YALI0E14729g *yABC1* and the others *yABC2* to *yABC4*, respectively. To confirm that N046 and B095 were indeed interrupted for *ABC1*, a $\Delta abc1::URA3$ deletion was introduced into strain H222-41 (JMY322), using the disruption method developed by Fickers et al. (2003), giving rise to two independent deleted strains, JMY1227 and JMY1229 (Table 1). Drop tests with alkanes

C10 and C16 confirmed that they were unable to grow on C16 (AlkAb) as the mutants N046 and B095. We followed growth of JMY1227 on alkanes of chain lengths from C10 to C16 in liquid cultures as for Z110 (Fig. 3B). In contrast to the previous *ant1* mutant Z110 which showed a progressive chain length depending growth defect, H222 $\Delta abc1$ (JMY1227) presented a drastic difference in its capacity to utilize alkanes of different chain lengths. Indeed, the mutant did not grow at all on C14–C16. A long lag phase of 40 h was observed on C13, followed by a slow growth phase (μ_{\max} $0.075 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$). Relatively moderate growth was observed on C12 (μ_{\max} $0.078 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$) and normal growth on C11 and C10 (μ_{\max} $0.245 \pm 0.015 \text{ h}^{-1}$).

This showed that an *ABC1* disrupted strain was able to grow on short-chain alkanes (C10 and C11), grew slowly on medium-chain (C12 and C13), but not on long-chain alkanes (C14–C16). We therefore propose that *ABC1* is implicated either in the uptake of long-chain alkanes into the cell or, alternatively in their export out of the cell in order to keep the intracellular alkane concentration under a toxic threshold. A putative corollary is that at least one of the other members of the ABC family is involved in the uptake or exports of short-chain alkanes (Fig. 4). Indeed, alkane toxicity towards yeast has been previously described (Gill and Ratledge, 1972). Toxicity of chain shorter than C9 prevents growth of all yeast. Toxicity of longer chains is variable depending on microorganisms. This toxicity could be relieved by adding a non-toxic compound which could not be oxidized and which allowed alkane solubilisation such as the branched-chain hydrocarbon pristane. Active excretion of cyclic hydrocarbon has been recently demonstrated on human cell and, similar system was proposed to play a role in protecting microbial cells from high concentration of alkanes (Sikkema et al., 1995).

4. Discussion

Our current model for alkane utilization by *Y. lipolytica* is presented in Fig. 4. Alkanes are transported into the cell by specific transporter, *ABC1* for long-chain alkanes and the three other *ABC2–ABC4* genes may be involved in the transport of the alkanes with shorter chain length. Alternatively, they could regulate the intracellular alkane concentration by exporting the alkane out the cells to avoid alkane toxicity. Those transporters may be one constituent of the protrusion complex observed at the cell surface of yeast grown on alkanes for *C. tropicalis* (Osumi et al., 1975) and *Y. lipolytica* (Fickers et al., 2005; Kim et al., 2000; Mlickova et al., 2004). These may correspond to the observed channels connecting the cell wall to the interior of the cell and probably participating in the transport of alkanes to the endoplasmic reticulum (ER), where the primary alkane hydroxylation to fatty alcohols by cytochrome P450 dependent monooxygenases occurs (Fickers et al., 2005). For the further conversion of the fatty alcohols to their corresponding fatty acids (FA) by NAD(P)⁺-dependent fatty-alcohol dehydrogenases (FADH, in ER) or by fatty-alcohol

oxidases (FAOD, in peroxisomes), followed by NAD(P)⁺-dependent fatty-aldehyde dehydrogenases (FALDH, in ER or peroxisomes) two different routes would be initiated. In the first one, the long-chain FA (C14–C16) formed in the ER are activated to their corresponding acyl-CoA esters by the cytoplasmic ATP-dependent acyl-CoA synthetase I (ACS I, long-chain length specific), which are subsequently transported into peroxisome (probably involving the ABC transporter genes *PXA1/PXA2*; (Hiltunen et al., 2003; Palmieri et al., 2001)), to be finally degraded by β -oxidation. The second route is more specific for the short-chain lengths (C10–C13), which will be first transported into the peroxisome as FA or fatty alcohols, which are oxidized there to FA (Fig. 4). The entry into peroxisomes of free short- or medium-chain FA (MCFA) via an as yet uncharacterized transport system and the uptake of long-chain fatty acyl-CoA (LCFA-CoA) involving the ABC transporters Pxa1p/Pxa2p (YPL147w, YKL188c) was demonstrated for *S. cerevisiae* (Hiltunen et al., 2003; Lasorsa et al., 2004; Palmieri et al., 2001; Rottensteiner et al., 2002; van Roermund et al., 2001). These free MCFA are activated to their corresponding acyl-CoA esters by the peroxisomal acyl-CoA synthetase II (ACS II, with broad chain length specificity, encoded by a homologous gene to *ScFAA2*) in the presence of intra-peroxisomal ATP, which is transported into peroxisomes by *ANT1*. Finally, the short-chain acyl-CoA formed is also degraded by β -oxidation. This short-chain FA-activation could not occur in *ant1* mutant Z110 due to the absence of ATP in peroxisomes, resulting in the observed phenotype AlkAb (C10⁻ C16⁺).

According to these results there should be differences in the localization of the enzymatic steps involved in the oxidation from alkane to fatty acid. Indeed, except for the cytochrome P450-catalyzed alkane hydroxylation in the ER, these steps may be performed either in the ER or in the peroxisome by different enzymes (Fig. 4). From the Z110 mutant phenotype, we can deduce that a peroxisomal ACS, like ACS II, may activate the short-chain FA. We can therefore speculate that the short-chain fatty alcohols may also be transported into peroxisomes to be converted to their corresponding MCFA by the peroxisomal fatty-alcohol oxidase (FAOD) and fatty-aldehyde dehydrogenase (FALDH), thus defining the main pathway of short-chain alkanes utilization (see (Fickers et al., 2005)).

The question arises about the main pathway and involvement of peroxisomal fatty alcohol oxidizing enzymes (FAOD and FALDH) during utilization of only long-chain alkanes, like C16. For the peroxisomal ACS II a broader chain-lengths range including substrates from FA10 up to FA16 was detected (for references see (Fukui and Tanaka, 1981; Tanaka and Fukui, 1989)). Furthermore, the peroxisomal FAOD and FALDH activities were found to be induced also in hexadecane-grown cells of *Y. lipolytica* and *C. maltosa* and showed activities also towards long-chain substrates (Ilchenko et al., 1994; Mauersberger et al., 1992, 1996; Mauersberger, unpublished data). Therefore, the long-chain fatty alcohol can probably

be also transported to peroxisomes (as indicated for short-chain alcohols in Fig. 4), oxidized there to the corresponding FA and, after activation by ACS II to LCFA-CoA, utilized in the β -oxidation (Fickers et al., 2005). The presence of such fatty alcohol transport systems in alkane utilizing yeasts remains to be elucidated.

Nothing was known about the genes involved in the AlkAc (C10⁺ C16⁻) phenotype till now. With our studies on mutants N046 and B095 presenting this phenotype, we provide here the first evidence of the participation of the ABC transporter encoding genes *ABC1* in the alkane transport processes (uptake or export) depending on alkane chain-lengths.

Acknowledgments

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique, and by the Centre National de la Recherche Scientifique (France). F.T. is a recipient of a fellowship from the CIFRE and IFP. S.M. was partially supported by Dresden University of Technology and by DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst—PROCOPE, a German–French exchange program). We thank Colin Tinsley for editing the English version of the text and Claude Gaillardin for fruitful discussions and critical reading the manuscript.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Barth, G., Beckerich, J.-M., Dominguez, A., Kerscher, S., Ogrydzak, D., Titorenko, V., Gaillardin, C., 2003. Functional genetics of *Yarrowia lipolytica*. In: de Winde, J.H. (Ed.), *Functional Genetics of industrial yeasts*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 227–271.
- Barth, G., Gaillardin, C., 1996. *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K. (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg–New York, pp. 313–388.
- Barth, G., Gaillardin, C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 219–237.
- Barth, G., Scheuber, T., 1993. Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol. Gen. Genet.* 241, 422–430.
- Bassel, J.B., Mortimer, R.K., 1982. Genetic and biochemical studies of *n*-alkane non-utilizing mutants of *Saccharomyces lipolytica*. *Curr. Genet.* 5, 77–88.
- Bassel, J.B., Mortimer, R.K., 1985. Identification of mutations preventing *n*-hexadecane uptake among 26 *n*-alkane non-utilizing mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* 9, 579–586.
- Bowker-Kinley, M., Popov, K.M., 1999. Evidence that pyruvate dehydrogenase kinase belongs to the ATPase/kinase superfamily. *Biochem. J.* 344, 47–53.
- De Hertogh, B., Hancy, F., Goffeau, A., Baret, P.V., 2006. Emergence of species-specific transporters during evolution of the hemiascomycete phylum. *Genetics* 172, 771–781.
- Devic, M., Albert, S., Delseny, M., Roscoe, T., 1997. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 331–339.
- Dominguez, A., Ferminan, E., Gaillardin, C., 2000. *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib. Microbiol.* 5, 151–172.

- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, 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., Boismare, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pelenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J.L., 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44.
- Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.M., 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 5, 527–543.
- Fickers, P., Le Dall, M.T., Gaillardin, C., Thonart, P., Nicaud, J.M., 2003. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods* 55, 727–737.
- Fickers, P., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., Destain, J., Thonart, P., 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 742–749.
- Fukui, S., Tanaka, A., 1981. Metabolism of alkanes by yeast. *Adv. Biochem. Eng.* 19, 217–237.
- Gill, C.O., Ratledge, C., 1972. Toxicity of *n*-alkanes, *n*-alk-1-enes, *n*-alkan-1-ols and *n*-alkyl-1-bromides towards yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 72, 165–172.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A., 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 35–64.
- Iida, T., Ohta, A., Takagi, M., 1998. Cloning and characterization of an *n*-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for *n*-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14, 1387–1397.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., Takagi, M., 2000. The cytochrome P450ALK multigene family of an *n*-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* 16, 1077–1087.
- Ilichenko, A.P., Morgunov, I.G., Honeck, H., Mauersberger, S., Vasykova, N.N., Müller, H.G., 1994. Purification and some properties of alcohol oxidase from the yeast *Yarrowia lipolytica* H222. *Biokhimiya (Moscow)* 59, 1312–1319.
- Juretzek, T., Wang, H.J., Nicaud, J.-M., Mauersberger, S., Barth, G., 2000. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5, 320–326.
- Kim, T., Young-Sook, O., Kim, S., 2000. The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil degrading yeast *Yarrowia lipolytica* 180. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 333–337.
- Kujau, M., Weber, H., Barth, G., 1992. Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase. *Yeast* 8, 193–203.
- Lasorsa, F.M., Scarcia, P., Erdmann, R., Palmieri, F., Rottensteiner, H., Palmieri, L., 2004. The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in Delta pH formation across peroxisomal membranes. *Biochem. J.* 381, 581–585.
- Mauersberger, S., 1991. Mutants of alkane oxidation in the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Candida maltosa*. In: Sharyshev, A.A., Finogenova, T.V. (Eds.), *Alkane metabolism and oversynthesis of metabolites by microorganisms*. Center for Biological Research USSR Academy of Sciences, Pushchino, pp. 59–78.
- Mauersberger, S., Drechsler, H., Oehme, G., Müller, H.G., 1992. Substrate specificity and stereoselectivity of fatty alcohol oxidase from the yeast *Candida maltosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 66–73.
- Mauersberger, S., Nicaud, J.M., 2003. Tagging genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf, K., Breunig, K., Barth, G. (Eds.), *Laboratory manual on non-conventional yeast in genetics*. In: *Biochemistry and biotechnology* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 343–356.
- Mauersberger, S., Ohkuma, M., Schunck, W.-H., Takagi, M., 1996. *Candida maltosa*. In: Wolf, K. (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 411–580.
- Mauersberger, S., Wang, H.J., Gaillardin, C., Barth, G., Nicaud, J.M., 2001. Insertional mutagenesis in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *J. Bacteriol.* 183, 5102–5109.
- Mlickova, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T., Nicaud, J.M., 2004. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3918–3924.
- Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C., Pla, J., 2006. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* 152, 905–912.
- Nazarko, T., Huang, J., Nicaud, J.-M., Klionsky, D., Sibirny, A., 2005. Trs85 is required for macroautophagy, pexophagy and cytoplasm to vacuole targeting in *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 1, 37–45.
- Nazarko, T., Mala, M., Nicaud, J.-M., Sibirny, A., 2004. Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* deficient in the inactivation of peroxisomal enzymes. *Visnyk of Lviv University, Biology Series* 35, 128–136.
- Nazarko, T., Mala, M., Sibirny, A., 2002. Development of the plate assay screening procedure for isolation of the mutants deficient in inactivation of peroxisomal enzymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biopolymers Cell (Kiev)* 18, 135–138.
- Nuttley, W.M., Brade, A.M., Gaillardin, C., Eitzen, G.A., Glover, J.R., Aitchison, J.D., Rachubinski, R.A., 1993. Rapid identification and characterization of peroxisomal assembly mutants in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 9, 507–517.
- Ohkuma, M., Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W.H., Ohta, A., Takagi, M., 1998. Isozyme function of *n*-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption. *J. Biol. Chem.* 273, 3948–3953.
- Osumi, M., Fukuzumi, F., Yamada, N., Nagatani, T., Teranishi, Y., Tanaka, A., Fukui, S., 1975. Surface structure of some *Candida* yeast cells grown on *n*-alkanes. *J. Ferment. Technol.* 53, 244–248.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., De Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M.J., Walker, J.E., 1997. Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett.* 417, 114–118.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Voza, A., Agrimi, G., Fiermonte, G., Runswick, M.J., Walker, J.E., Palmieri, F., 2000. Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta—Bioenergetics* 1459, 363–369.
- Palmieri, L., Rottensteiner, H., Girzalsky, W., Scarcia, P., Palmieri, F., Erdmann, R., 2001. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.* 20, 5049–5059.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., Nicaud, J.M., 2000. Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 182, 2802–2810.
- Rottensteiner, H., Palmieri, L., Hartig, A., Hamilton, B., Ruis, H., Erdmann, R., Gurvitz, A., 2002. The peroxisomal transporter gene *ANT1* is regulated by a deviant oleate response element (ORE): characterization of the signal for fatty acid induction. *Biochem. J.* 365, 109–117.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F., Schunck, W.H., 1998. Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to alpha, omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* 273, 32528–32534.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Smith, J.J., Rachubinski, R.A., 2001. A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* 276, 1618–1625.

- Stasyk, O.V., Nazarko, T.Y., Stasyk, O.G., Krasovska, O.S., Warnecke, D., Nicaud, J.M., Cregg, J.M., Sibirny, A.A., 2003. Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biol. Int.* 27, 947–952.
- Takagi, M., Sumita, T., Yamagami, S., Iida, T., Nagata, Y., Ohta, A., 1999. II *Yarrowia lipolytica* International Meeting, 15–18 September, A genetic system for isolation of genes encoding regulators of cytochrome P450 gene expression for *n*-alkane assimilation, Peniscola (Castellon), Spain, pp. 23.
- Takewaka, T., Zimmer, T., Hirata, A., Ohta, A., Takagi, M., 1999. Null mutation in *IRE1* gene inhibits overproduction of microsomal cytochrome P450Alk1 (*CYP 52A3*) and proliferation of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 507–514.
- Tanaka, A., Fukui, S., 1989. Metabolism of *n*-alkanes. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeast. Metabolism and Physiology of Yeasts*. Academic Press, London, pp. 261–287.
- Titorenko, V.I., Ogrydziak, D.M., Rachubinski, R.A., 1997. Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell Biol.* 17, 5210–5226.
- Titorenko, V.I., Rachubinski, R.A., 2001. Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends Cell Biol.* 11, 22–29.
- van 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, 4321–4329.
- Yamagami, S., Iida, T., Nagata, Y., Ohta, A., Takagi, M., 2001. Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for *n*-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 832–838.
- Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W.H., Yoshida, Y., Ohta, A., Takagi, M., 1998. Relation between evolutionary distance and enzymatic properties among the members of the *CYP52A* subfamily of *Candida maltosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 244–247.

Résumé

Les acides dicarboxyliques (DCA) sont des composés de base pour la production de polymères, plastiques, lubrifiants, antibiotiques et parfums. Bien que de grand intérêt, les DCA qui comportent une chaîne aliphatique supérieure à douze atomes de carbone sont difficilement synthétisables par la voie chimique. L'objet de cette étude est de développer un procédé biotechnologique pour produire ces composés par bioconversion de matières premières renouvelables (huile de tournesol oléique) *via* la levure *Yarrowia lipolytica*.

Chez les souches sauvages, les acides gras sont principalement dégradés par la voie de la β -oxydation. Nous avons bloqué la première étape de la β -oxydation par disruption séquentielle des six gènes codant les isozymes d'acyl-CoA oxydases (gènes *POX*) permettant ainsi de réorienter le flux d'acides gras vers une voie alternative, l' ω -oxydation, qui conduit à la production de DCA. L'amélioration de la production des DCA a été obtenue par l'augmentation de l'activité d'hydroxylation, impliquée dans la première étape de l' ω -oxydation, en surexprimant les gènes codant la NADPH cytochrome P450 réductase (1 gène *CPR*) et des cytochromes P450 (12 gènes *ALK*). Ainsi, la surexpression du gène *CPR* améliore la production de DCA de 60%. De plus, l'effet de la surexpression de gènes *ALK* suggère une spécificité fonctionnelle de certains cytochromes P450 vis-à-vis de la longueur de chaîne et du type de substrat (alcanes ou acides gras). Néanmoins, la moitié du substrat de bioconversion n'est pas transformé en DCA, mais s'accumule dans les corps lipidiques sous forme de triglycérides. Ce stockage a été réduit par la disruption de deux gènes, *DGAI* et *LROI*, impliqués dans cette voie, permettant ainsi une augmentation du rendement de bioconversion.

Enfin, l'étude de mutants d'insertion affectés pour l'utilisation des substrats hydrophobes (substrats de bioconversion) a révélé l'implication d'ABC transporteurs de la famille des PDR qui confèrent la résistance pléiotropique aux drogues (5 gènes *ABC*). L'étude fonctionnelle de cette famille a démontré que l'ABC transporteur codé par le gène *ABC1* serait un exporteur membranaire spécifique des alcanes à longue chaîne carbonée. Il constitue, à ce jour, le premier ABC transporteur de type PDR identifié comme étant responsable de l'export de molécules physiologiques.

L'ensemble de ces travaux a permis d'une part une meilleure compréhension du métabolisme des substrats hydrophobes et d'autre part de développer une souche génétiquement modifiée de *Y. lipolytica* pour la production de DCA à longue chaîne carbonée à partir d'huiles végétales.

Mots clefs : *Yarrowia lipolytica*, acides dicarboxyliques, polymères, métabolisme des acides gras, β -oxydation, ω -oxydation, ABC transporteur.

Abstract

Long-chain dicarboxylic acids (DCA) are intermediates of industrial interests (polymers, plastics, lubricants, antibiotics and fragrances) which are difficult to produce by chemical synthesis. The aim of this study is to develop a biotechnological process to produce these compounds by bioconversion of renewable raw material (sunflower oil) by the yeast *Yarrowia lipolytica*. In wild type yeast, fatty acids are degraded mainly through the β -oxidation pathway.

We blocked the first reaction of the β -oxidation pathway by disruption of the six genes which code the isozymes acyl-CoA oxydases (*POX* genes), thus allowing to reorientate the fatty acids flux towards an alternative pathway, the ω -oxidation, which led to the production of DCA. Further, the improvement of DCA production was obtained by increasing the hydroxylation activity, involved in the first stage of ω -oxidation, by overexpression of genes coding the NADPH cytochrome P450 reductase (1 *CPR* gene) and the P450 cytochromes (12 *ALK* genes). Thus, the overexpression of the *CPR* gene improved the DCA production 60%. Moreover, the effect of *ALK* gene overexpression suggests a functional specificity of some P450 cytochromes depending on chain length and type of substrate (alkanes or fatty acids). Nevertheless, half of the bioconversion substrate was not transformed into DCA, but accumulated in the cytoplasmic lipid bodies in the form of triglycerides. This storage was decreased by the disruption of two genes, *DGAI* and *LROI*, involved in this pathway, thus allowing an increase in the bioconversion yield.

Finally, the study of insertion mutants affected in the use of hydrophobic substrates (bioconversion substrates) revealed an involvement of ABC transporter of the PDR type family which confer pleiotropic drug resistance (5 *ABC* genes). The functional study of this family suggested that the ABC transporter coded by *ABC1* gene was a membrane exporter specific for long chain alkanes. To date, it represents the first ABC transporter of the PDR type identified responsible for the export of physiological molecules.

Overall, this work has provided on the one hand a better understanding of the metabolism hydrophobic substrates and on the other hand the development of a genetically modified strain of *Y. lipolytica* to produce long-chain DCA from vegetable oils.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, dicarboxylic acids, polymers, fatty acids metabolism, β -oxidation, ω -oxidation, transporters ABC.