



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**  
Institut National des Sciences Appliquées (INSA Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**  
Systèmes Microbiens et Bioprocédés

---

**Présentée et soutenue par**  
**Abril OCHOA ESTOPIER**  
**Le 29 juin 2012**

**Titre :**  
**Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures  
d'intérêt industriel : application aux bascules du métabolisme lipi-  
dique chez *Yarrowia lipolytica***

---

**JURY**

Ivan MARC	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
Ma. Gpe. AGUILAR USCANGA	Professeur ITV Veracruz (Mexique)	Rapporteur
Jean Marc NICAUD	Directeur de Recherche CNRS	Examineur
Carole JOUVE	Professeur INSA, Toulouse	Président du Jury
Stéphane GUILLOUET	Maître de Conférences, INSA	Directeur de thèse

---

**Ecole doctorale :**  
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**  
Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés  
UMR 5504 et 792 CNRS-INRA-INSA de Toulouse



---

**Nom :** OCHOA ESTOPIER

**Prénom :** Abril

**Titre :** Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel

**Année :** 2012

**Lieu :** INSA Toulouse

---

**Résumé :**

L'objectif de notre travail était d'étudier les bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* d'un métabolisme purement oxydatif vers l'accumulation de lipides puis à l'excretion d'acide citrique.

Le développement d'un procédé D-stat et d'un mode de conduite fed-batch nous a permis, dans un premier temps, de quantifier les ratios N/C caractéristiques pour chacune des bascules étudiées. Nos résultats montrent que les ratios rN/rC critiques aux bascules métaboliques sont de 0,085 molN.Cmol<sup>-1</sup> et de 0,018-0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup> pour l'accumulation de lipides et production de citrate, respectivement.

L'analyse systémique des cultures réalisées nous a permis de mettre en évidence des mécanismes de co-régulation de certaines enzymes du métabolisme lipidique ainsi qu'une prépondérance de mécanismes post-transcriptionnels dans l'établissement des bascules étudiées.

Enfin, l'utilisation de souches génétiquement modifiées au niveau de l'ATP citrate lyase, la malate déshydrogénase et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase a permis d'évaluer l'impact de ces enzymes sur le métabolisme lipidique.

---

**Mots clés :**

*Yarrowia lipolytica*, accumulation lipidique, D-stat, fed-batch, limitation azote, production acide citrique

---



---

**Last Name:** OCHOA ESTOPIER

**Name:** Abril

**Title:** Systematic analysis of the metabolic shifts in yeast of industrial interest

**Year:** 2012

**Place:** INSA Toulouse

---

**Abstract:**

This thesis aimed at studying the metabolic shifts in *Yarrowia lipolytica* from the pure oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid excretion.

The development of a D-stat culture and of a monitoring fed-batch strategy allowed us to determine the N/C ratio characteristic for each of metabolic shifts. rN/rC ratio were determined equal to 0,085 molN.Cmol<sup>-1</sup> and 0,018-0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup> for the lipid accumulation and the citric acid production, respectively.

Systemic analysis of the cultivations showed coregulation phenomena among some enzymes of the lipidic metabolism and post-transcriptional modifications in the onset of the metabolic shifts.

Finally, the impact of enzymes (ATP citrate lyase, malate dehydrogenase and glycérol-3-phosphate dehydrogenase) on the lipidic metabolism was evaluated through systemic analysis of 3 genetically modified strains.

---

**Key words:**

*Yarrowia lipolytica*, lipid accumulation, D-stat, fed-batch, nitrogen limitation, citric acid production

---



---

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Sciences Biologiques et des Procédés (LISBP, INSA Toulouse) sur financement propre. Ma bourse doctorale a été financée par le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT Mexique).

Je remercie Stéphane Guillouet, mon Directeur de Thèse, pour son encadrement pendant mon Master et ma Thèse tout en me laissant la liberté de développer de mes propres idées. Je prends avec moi ton jugement critique à mes idées et tes conseils scientifiques.

Je remercie également les membres du Jury : Madame Ma. Guadalupe Aguilar Us-canga, Madame Carole Jouve, Monsieur Ivan Marc, Monsieur Jean Marc Nicaud pour avoir accepté de juger mon travail de Thèse.

Merci à l'ensemble de l'équipe EAD8 pour avoir contribué de manière directe ou indirecte à la réalisation de cette Thèse.

Un grand merci à mes amis qui m'ont soutenu dans cette aventure avec ses conseils, ses idées et bon humour, tout particulièrement Aurora, Yuriana, Ann, Manuel, Ivanna, Géraldine. Un merci très spécial est pour Danny et Jean Pierre pour toute votre gentillesse et amour vers moi.

Merci du fond du cœur à ma famille pour votre amour inconditionnel. Maman, papa, Lluvia et Eduardo, merci pour toujours être à mes côtés même dans la distance qui nous sépare physiquement.

Finalement je remercie à Johannes, *mein Schatz, vielen Dank für deine Liebe und Worte diese Jahre!*. Ton support m'a beaucoup aidé ces années.



---

Vivir no es sólo existir,  
Sino existir y crear,  
Saber, gozar y sufrir  
Y no dormir sin soñar.  
Descansar es empezar a morir.

Gregorio Marañón

*À ma mère...*

---



---

# Table des Matières

<b>Chapitre 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Etat de l'art</b> .....	<b>1</b>
1.1    Introduction .....	1
1.2    Accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux .....	2
1.2.1    Les microorganismes oléagineux.....	2
1.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	8
1.3.1    Taxonomie .....	8
1.3.2    Physiologie de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	9
1.3.3    Morphologie de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	12
1.3.4    Application de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	15
1.4    Le métabolisme lipidique .....	18
1.4.1    Les lipides .....	18
1.4.2    Classes de lipides .....	19
1.4.3    Synthèse de lipides « <i>de novo</i> » .....	22
1.4.4    Synthèse de lipides « <i>ex-novo</i> » .....	29
1.4.5    Accumulation lipidique.....	35
1.5    Métabolisme du citrate .....	38
1.6    Enzymes clés de l'accumulation des lipides et du citrate.....	40
1.6.1    Isocitrate déshydrogénase NAD <sup>+</sup> -dépendante (ICDH).....	40
1.6.2    Malate déshydrogénase (MD).....	41

---

---

1.6.3	ATP citrate lyase (ACL) .....	42
1.6.4	Acétyl-CoA carboxylase (ACC) .....	43
1.6.5	Enzyme malique .....	44
1.7	Facteurs influençant l'accumulation des métabolites chez <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	46
1.7.1	La source carbonée .....	46
1.7.2	Co-substrats .....	46
1.7.3	Nutriments .....	46
1.7.4	Les vitamines .....	48
1.7.5	L'oxygène .....	48
1.7.6	La température .....	49
1.7.7	Le pH .....	50
1.7.8	Taux de croissance .....	50
1.8	Généralités du procédé de fermentation adapté au modèle d'étude .....	52
1.8.1	Caractéristiques du réacteur biologique .....	52
1.8.2	Discontinu (Batch) .....	52
1.8.3	Discontinu alimenté (Fed-batch) .....	53
1.8.4	Chémostat ou continu à volume constant .....	53
1.8.5	D-stat et A-stat .....	53
<b>Chapitre 2</b>	.....	<b>55</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	.....	<b>55</b>
2.1	Souches .....	57
2.2	Milieux de culture .....	57
2.2.1	Milieu de conservation .....	57
2.2.2	Milieu de préculture .....	58
2.2.3	Milieu de fermentation CFMA .....	58
2.3	Préparation de l'inoculum .....	60
2.4	Préparation du bioréacteur .....	61
2.4.1	Cultures en réacteur en mode chémostat et D-stat .....	61
2.4.2	Culture en réacteur en mode discontinu alimenté (fed-batch) .....	63
2.5	Caractérisation de la biomasse .....	65

---

---

2.5.1	Mesure de la densité optique.....	65
2.5.2	Détermination de la masse sèche totale .....	65
2.6	Dosage de métabolites et substrats du surnageant.....	65
2.6.1	Dosage par HPLC .....	65
2.6.2	Glucose .....	67
2.6.3	Ions ammonium .....	67
2.6.4	Teneur en sucres totaux de la biomasse.....	68
2.6.5	Teneur en lipides de la biomasse .....	68
2.6.6	Détermination de l'activité spécifique en enzyme.....	73
2.7	Analyse des gaz .....	79
2.8	Traitement des données .....	79
2.8.1	Gaz.....	79
2.8.2	Détermination des vitesses et vitesses spécifiques et rendements à partir des bilans matières .....	83
2.8.3	Bilans carbone et des degrés de réduction généralisés (Bilan élémentaire).....	87
<b>Chapitre 3.....</b>		<b>90</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>90</b>
3.1	Introduction .....	90
3.2	Etude de la bascule métabolique chez <i>Yarrowia lipolytica</i> : du métabolisme oxydatif à l'accumulation de lipides et production d'acide citrique .....	91
3.3	Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> W29 en mode fed-batch : validation des résultats obtenus en chémostat et D-stat.....	112
3.3.1	Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch à partir de la connaissance du N/C (rN/rC) critique.....	112
3.3.2	Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch	114
3.3.3	Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch.....	115
3.3.4	Analyse cinétique.....	119
3.3.5	Analyse biochimique enzymatique .....	124
3.3.6	Discussion.....	132
3.4	Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY2046 en mode fed-batch .....	135
3.4.1	Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch.....	135
3.4.2	Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch	136

---

---

3.4.3	Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch.....	136
3.4.4	Analyse cinétique.....	140
3.4.5	Analyse biochimique enzymatique .....	146
3.4.6	Discussion.....	152
3.5	Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY1552 en mode fed-batch .....	154
3.5.1	Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch .....	154
3.5.2	Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch	155
3.5.3	Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch.....	157
3.5.4	Analyse cinétique.....	161
3.5.5	Analyse biochimique enzymatique .....	165
3.5.6	Discussion.....	170
3.6	Culture de <i>Yarrowia lipolytica</i> $\Delta$ gut2 en mode fed-batch.....	173
3.6.1	Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch .....	173
3.6.2	Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch	174
3.6.3	Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch.....	175
3.6.4	Analyse cinétique.....	178
3.6.5	Analyse biochimique enzymatique .....	184
3.6.6	Discussion.....	189
3.7	Discussion générale .....	191
3.8	Conclusion et perspectives .....	203
	<b>Références.....</b>	<b>205</b>

---

---

## Table de Figures

Figure 1. Classification hiérarchique de <i>Y. lipolytica</i> .....	9
Figure 2. Modèle proposé pour la régulation de la morphologie chez <i>Y. lipolytica</i> à partir du pH extracellulaire. Le pH modulerait l'utilisation des sources azotées critiques à la formation des hyphes Modifié d'après Szabo et Stofanikova 2002. AEP : protéinase alcaline extracellulaire, XPR2 : gène codant pour AEP, Opt1 : gène homologue codant pour un transporteur d'oligopéptides chez <i>S. cerevisiae</i> , Ssy5 : gène homologue codant pour une protéine sensorielle d'acides aminés chez <i>C. albicans</i> , Vps28 : gène codant pour une protéine impliquée dans le transport vésiculaire prévacuolaire.....	14
Figure 3. Morphologie de <i>Y. lipolytica</i> W29 lors d'une culture A : accumulation lipidique, B : phase exponentielle, C : conditions semi-anoxiques .....	14
Figure 4. Fonction structurale des lipides chez une cellule levurienne. ....	18
Figure 5. Exemple de la nature d'un acide gras. Modifié d'après Mathews 2002. ....	20
Figure 6. Structure d'une molécule de triacylglycérol. ....	20
Figure 7. Composition générale d'un glucosphingolipide. Modifié d'après Mathews 2002. .	21
Figure 8. Synthèse des acétyl-CoA. 1= ATP citrate lyase, 2= malate déshydrogénase, 3= enzyme malique, 4= pyruvate carboxylase. Modifié d'après Mathews 2002. ....	24
Figure 9. Synthèse de palmitate. Modifié d'après Hiltunen <i>et al.</i> 2005.....	25
Figure 10. Synthèse des triacylglycérols. Modifié d'après Sorger et Daum 2003 .....	28
Figure 11. Voies impliquées dans le métabolisme du glycérol chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . Modifié d'après Springer Images (2011).....	29
Figure 12. Activation des acides gras .....	31
Figure 13. Réactions du cycle du glyoxylate. Modifié d'après Mathews 2002 .....	33
Figure 14. Cycle de la carnitine pour le transport des acétyl-CoA. Modifié d'après Mathews 2002 .....	34
Figure 15. Evénements de l'accumulation lipidique .....	36

---

---

Figure 16. Points principaux de régulation du citrate et d'autres métabolites sur le flux de carbone provenant du glucose aux lipides. Modifié d'après Evans and Ratledge 1985b. A= activation, I=Inhibition .....	39
Figure 17. Réactions de l'enzyme malate déshydrogénase. ....	41
Figure 18. Réactions de l'enzyme ATP citrate lyase.....	42
Figure 19. Réactions de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase.....	43
Figure 20. Réactions de l'enzyme malique.....	44
Figure 21. Effet de la température de culture sur le taux de croissance maximale ( $\mu_{max}$ ) chez <i>Y. lipolytica</i> H222. D'après Moeller <i>et al.</i> 2007. Conditions de culture : T= 30°C, pO <sub>2</sub> = 50%, 1000 rpm, milieu= 100 g.L <sup>-1</sup> glucose, 3 g.l <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> Cl, durée= 48 h .....	50
Figure 22. Schéma général du réacteur en chémostat et D-stat.....	61
Figure 23. Schéma général du réacteur en Fed-batch.....	63
Figure 24. Exemple d'un chromatogramme HPLC (ULTIMATE® 3000 en UV) .....	67
Figure 25. Schéma du fonctionnement d'un microscope à épifluorescence et fixation d'un fluorochrome sur une molécule lipidique. Modifie d'après www.invitrogen.com .....	69
Figure 26. Exemple d'un marquage avec du Bodipy 493/503 (A) 2% d'accumulation lipidique (B) 20% d'accumulation lipidique lors d'une culture de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	69
Figure 27. Programmation de la température du four, d'après Cescut 2009. ....	72
Figure 28. Profils des débits d'alimentation ciblés en glucose et en NH <sub>3</sub> au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29. ....	113
Figure 29. Evolution du profil du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	114
Figure 30. Evolution des profils de biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	115
Figure 31. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	118
Figure 32. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	119
Figure 33. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	119
Figure 34. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, d'accumulation de lipides, de production de citrate et de consommation de glucose au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	120
Figure 35. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	121

---

---

Figure 36. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, d'accumulation de lipides, de production de citrate et de consommation de glucose en fonction du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	122
Figure 37. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	123
Figure 38. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	124
Figure 39. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de <i>Yarrowia lipolytica</i> W29 .....	126
Figure 40. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de <i>lipolytica</i> W29 .....	127
Figure 41. Evolution des vitesses spécifiques de production d'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de <i>lipolytica</i> W29 .....	129
Figure 42. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de <i>lipolytica</i> W29 .....	130
Figure 43. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de <i>lipolytica</i> W29 .....	131
Figure 44. Evolution des profils de la biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046 .....	137
Figure 45. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	138
Figure 46. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	139
Figure 47. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046..	140
Figure 48. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	141
Figure 49. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	143

---

---

Figure 50. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse catalytique, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production de citrate en fonction du ratio N/C au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	144
Figure 51. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046.....	145
Figure 52. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> 2046.....	146
Figure 53. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY2046 .....	147
Figure 54. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> JMY2046 .....	149
Figure 55. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> JMY2046 .....	149
Figure 56. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> JMY2046 .....	150
Figure 57. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> JMY2046 .....	150
Figure 58. Profils des débits d'alimentation en glucose et en NH <sub>3</sub> au cours de la culture en fed-batch avec <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	155
Figure 59. Evolution du profil du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	156
Figure 60. Evolution des profils de biomasse totale, de citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552 .....	157
Figure 61. Zoom de l'évolution du profil d'azote résiduel au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	158
Figure 62. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	159
Figure 63. Evolution de la production d'acides organiques au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	160
Figure 64. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolítica</i> JMY1552..	161

---

---

Figure 65. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse et d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552 .....	162
Figure 66. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	163
Figure 67. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	164
Figure 68. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	165
Figure 69. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552 .....	166
Figure 70. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	167
Figure 71. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	168
Figure 72. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	168
Figure 73. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> JMY1552.....	169
Figure 74. Situation de la délétion de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase chez <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 au niveau du nœud métabolique glycérol-3-phosphate. D'après Cescut (2009).....	173
Figure 75. Profils de débits d'alimentation du glucose en du NH <sub>3</sub> au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	174
Figure 76. Evolution des profils de biomasse totale, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	175
Figure 77. Zoom de l'évolution de l'azote résiduel au cours de la culture de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	176
Figure 78. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	177
Figure 79. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	178
Figure 80. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	179

---

---

Figure 81. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	180
Figure 82. Evolution de l'accumulation lipidique évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	181
Figure 83. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au en fonction du ratio N/C avec <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	182
Figure 84. Evolution des rendements de conversion de substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	183
Figure 85. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	184
Figure 86. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> $\Delta$ gut2 .....	185
Figure 87. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	186
Figure 88. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	186
Figure 89. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	187
Figure 90. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de <i>lipolytica</i> $\Delta$ gut2.....	188
Figure 91. Schéma représentatif du métabolisme chez les microorganismes oléagineux .....	194
Figure 92. Schéma représentatif des flux métaboliques étudiés chez <i>Y. lipolytica</i> .....	196
Figure 93. $\Phi$ Citrate intra/ $\Phi$ Acétyl-CoA et $\Phi$ NADPH <sub>2</sub> / $\Phi$ Citrate intra en fonction du ratio rN/rC au cours des cultures D-Stat et fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	197
Figure 94. $\Phi$ NADPH <sub>2</sub> / $\Phi$ Citrate intra en fonction du ratio rN/rC au cours des cultures des souches génétiquement modifiées. Les flèches indiquent les excrétions d'acide citrique chez la souche $\Delta$ gut2.....	198

---

---

Figure 95. $\Phi$ Citrate intra fonction de l'activité spécifique enzymatique de l'ATP citrate lyase lors des cultures D-stat et fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	200
Figure 96. $\Phi$ NADPH <sub>2</sub> lipides totaux fonction de l'activité spécifique enzymatique de l'enzyme malique lors des cultures D-stat et fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29.....	201

---

---

## Table de Tableaux

Tableau 1. Contenu lipidique de certaines espèces de microalgues d'après Feofilova <i>et al.</i> 2010 .....	3
Tableau 2. Contenu lipidique de certaines espèces de champignons oléagineux. D'après Feofilova <i>et al.</i> 2010.....	4
Tableau 3. Levures, conditions de culture et rendement de lipides rapportés par différentes références. Modifié d'après Ageitos <i>et al.</i> , 2010, (Ageitos, Vallejo <i>et al.</i> 2010). T: température ; t : temps ; X: biomasse ; MM: milieu minimim ; F: fermenteur ; f :fiole ; F-b: fed-batch ; CF: culture continue ; SL: sophorolipides ; SF: fermentation solide ; MEL : lipide mannosylerythritol ; OP : optimal .....	5
Tableau 4. Paramètres de croissance chez <i>Y. lipolytica</i> dans un milieu minéral avec différents acides carboxyliques (0,1 % m.v <sup>-1</sup> ) à 26 °C. D'après Rodrigues and Pais 2000 .....	10
Tableau 5. Impact de la nature de la source azotée sur la morphologie de <i>Y. lipolytica</i> . D'après Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002.....	13
Tableau 6. Classification, caractéristiques et exemples d'acides gras.....	19
Tableau 7. Effet des quelques métabolites sur l'activité de l'ICDH-NAD <sup>+</sup> -dépendante chez <i>Y. lipolytica</i> VKM Y-2373. D'après Morgunov 2004 .....	40
Tableau 8. Effets généraux des conditions de culture sur le contenu et composition lipidique chez les levures. Modifié d'après Rattray <i>et al.</i> 1975. + amélioré ; - diminué ; 0 généralement non affecté .....	51
Tableau 9. Génotype des souches utilisées au cours de l'étude .....	57
Tableau 10. Composition du milieu de conservation YPD .....	57
Tableau 11. Composition du milieu PCA.....	58
Tableau 12. Composition du milieu de fermentation CFMA (Sels principaux).....	58
Tableau 13. Composition du milieu de fermentation CFMA (Oligo-éléments).....	58

---

---

Tableau 14. Composition du milieu de fermentation CFMA (Vitamines).....	59
Tableau 15. Volumes de préculture et de culture en fed-batch .....	60
Tableau 16. Caractéristiques des chromatographes HPLC utilisés .....	66
Tableau 17. Temps de rétention des composants analysés par HPLC .....	66
Tableau 18. Composition du tampon ISA .....	68
Tableau 19. Paramètres pour la prise d'images au microscope à fluorescence.....	70
Tableau 20. Paramètres pour la lecture de fluorescence au lecteur à microplaques.....	70
Tableau 21. Composition du tampon PBS.....	71
Tableau 22. Conditions d'opération de la CG .....	72
Tableau 23. Composition du tampon d'extraction .....	73
Tableau 24. Réactifs du dosage de l'enzyme ATP citrate lyase.....	74
Tableau 25. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme ATP citrate lyase .....	75
Tableau 26. Réactifs du dosage de l'enzyme malate déshydrogénase .....	75
Tableau 27. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme malate déshydrogénase.....	76
Tableau 28. Réactifs du dosage de l'enzyme malique.....	76
Tableau 29. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme malique .....	77
Tableau 30. Réactifs du dosage de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase .....	78
Tableau 31. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase ....	78
Tableau 32. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le chémostat.....	84
Tableau 33. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le D-stat et le chémostat en régime transitoire .....	85
Tableau 34. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le fed-batch.....	85
Tableau 35. Paramètres cinétiques obtenus lors de cultures D-stat et fed-batch de <i>Y. lipolytica</i> W29 .....	133
Tableau 36. Acides organiques détectés pendant les différents phases de culture fed-batch chez <i>Y. lipolytica</i> W29 et JMY2046.....	140
Tableau 37. Paramètres cinétiques obtenus lors de cultures en fed-batch avec les souches de <i>Y. lipolytica</i> W29 et JMY2046 .....	152
Tableau 38. Paramètres cinétiques obtenus lors des cultures en fed-batch avec les souches W29 et JMY1552.....	171
Tableau 39. Paramètres cinétiques obtenus lors des cultures en fed-batch avec les souches W29 et $\Delta$ gut2.....	189

---

---

## Abréviations

°C	:	dégrées Celsius
$\mu$	:	vitesse spécifique de production de biomasse
$\mu$ l	:	microlitre
$\mu$ m	:	micromètres
A	:	concentration de la variable d'état A dans le réacteur
ACC	:	acétyl-CoA carboxylase
ACL	:	ATP citrate lyase
ACP	:	protéine porteuse d'acyle
ADP	:	adénosine diphosphate
$A_{\text{entrée}}$	:	fraction molaire du composé A dans le gaz entrant du réacteur
AEP	:	protéinase alcaline extracellulaire
$A_{\text{liq}}$	:	fraction molaire du composé A dans le liquide
AMP	:	5' adénosine monophosphate
$A_{\text{resC}}$	:	concentration de la variable d'état A dans le réservoir apportant la source carbonée
$A_{\text{resN}}$	:	concentration de la variable d'état A dans le réservoir apportant la source azotée
$A_{\text{sortie}}$	:	fraction molaire du composé A dans le gaz sortant du réacteur
ATP	:	adénosine triphosphate
BSA	:	bovine serum albumin
C	:	carbone
CAT	:	carnitine acyltransférase
CO <sub>2</sub>	:	dioxyde de carbone
CoA	:	coenzyme A
$c_{\text{pacc}}$	:	teneur en composé dans la biomasse
DAG	:	diacylglycérol
DHAP	:	dihydroxyacétone phosphate
EM	:	enzyme malique
FABPs	:	protéines de liason des acides gras

---

---

FAS	:	acide gras synthétase
g	:	grammes
g.L <sup>-1</sup>	:	grammes par litre
G3P	:	glycérol-3-phosphate
GAP	:	glycéraldéhyde-3-phosphate
GC	:	chromatographie en phase gazeuse
h	:	heures
H	:	hydrogène
HPLC	:	chromatographie liquide à haute performance
ICDH	:	isocitrate déshydrogénase
IMP	:	inosine 5' monophosphate
IR	:	index de refraction
K PEP	:	potassium phosphoenolpyruvate
Ki	:	constant d'inhibition
Km	:	constant de Michaelis
L	:	litre
L-Dopa	:	3,4-dihydroxyphénylalanine
LPA	:	acide lyophosohatidique
M	:	molaire
MAPK	:	protéine kinase activé par mitogènese
MD	:	malate déshydrogénase
mg	:	milligramme
mg.mL <sup>-1</sup>	:	milligramme par litre
min	:	minutes
mL	:	millilitre
Mlip*	:	masse de lipides catalytiques
mM	:	milli molaire
MX*	:	masse de biomasse catalytique
N	:	azote
NAD	:	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
N/C	:	ratio azote/carbone
O <sub>2</sub>	:	dioxygène
OAA	:	oxaloacétate
P	:	Phosphate
PA	:	acide phosohatidique
PdtCho	:	phosohatidylcholine
PEP	:	phosphoenolpyruvate

---

---

PFK	:	phosphofructokinase
pH	:	potentiel hydrogène
PK	:	pyruvate kinase
PKA	:	protéine kinase
pO <sub>2</sub>	:	pression partielle d'oxygène
P <sub>pi</sub>	:	Pyrophosphate
PtdEtn	:	phosphatidyléthanolamine
PtdSer	:	phosphatidylsérine
q* <sub>cp acc</sub>	:	vitesse spécifique d'accumulation du composé
q <sub>Citrate</sub>	:	vitesse spécifique de production de citrate
qCO <sub>2</sub>	:	vitesse spécifique de production de CO <sub>2</sub>
Q <sub>entrée_gaz</sub>	:	débit de gaz entrant dans le réacteur
q <sub>glucose</sub>	:	vitesse spécifique de consommation de glucose
q <sub>Lipides</sub>	:	vitesse spécifique de production de lipides
qO <sub>2</sub>	:	vitesse spécifique de consommation d'O <sub>2</sub>
q <sub>Polys</sub>	:	vitesse spécifique de production de polysaccharides
q <sub>Pyruvate</sub>	:	vitesse spécifique de production de pyruvate
QR	:	coefficient respiratoire
Q <sub>resC</sub>	:	débit d'alimentation de la source carbonée
Q <sub>resN</sub>	:	débit d'alimentation de la source azotée
Q <sub>sortie</sub>	:	débit de soutirage du réacteur
Q <sub>sortie_gaz</sub>	:	débit de gaz sortant dans le réacteur
q <sub>Succinate</sub>	:	vitesse spécifique de production de succinate
r <sub>A</sub>	:	vitesse de production ou de consommation du composé A dans la phase liquide
rCO <sub>2</sub>	:	vitesse nette de production de CO <sub>2</sub>
r <sub>cp acc</sub>	:	vitesse de réaction du composé
r <sub>N</sub>	:	vitesse nette de consommation d'azote
r <sub>N</sub> /r <sub>C</sub>	:	ratio de la vitesse de consommation azote et la vitesse de consommation de carbone
rO <sub>2</sub>	:	vitesse nette de consommation d'O <sub>2</sub>
rpm	:	révolutions par minute
r <sub>produits</sub>	:	vitesse nette de production de produit carboné
r <sub>S</sub>	:	vitesse nette de consommation de substrat carboné
r <sub>X</sub>	:	vitesse nette de production de biomasse
sp.	:	spèces
T	:	température
t	:	temps
TAG	:	triacylglycérol
TCA	:	cycle des acides tricarboxyliques
TMSH	:	trimethylsulphonium
UV	:	ultra violetes

---

---

V : volume  
V<sub>gaz</sub> : volume gazeux du réacteur  
V<sub>liq</sub> : volume liquide du réacteur  
X : biomasse

---

---

## Introduction Générale

L'industrie de l'aviation utilise normalement des carburants à base de kérosène pour alimenter leurs moteurs, le JET A-1 étant le carburant le plus répandu. Le kérosène est un mélange d'hydrocarbures contenant des alcanes de formule chimique allant de  $C_{10}H_{22}$  à  $C_{14}H_{30}$ . Le kérosène est issu du raffinage du pétrole et donc sa production est dépendante de la disponibilité de ce carburant fossile.

L'Institut Américain du Pétrole a estimé en 1999 que l'approvisionnement mondial en pétrole serait épuisé entre les années 2062 et 2094, en supposant que les réserves totales en pétrole se situent entre 1,4-2 billions de barils et une consommation de 80 millions de barils par jour. Néanmoins, en 2004 après une nouvelle estimation des réserves totales en pétrole égale à 1,25 billions de barils et une consommation de 85 millions de barils par jour l'épuisement en pétrole pourrait arriver en 2057.

Cette estimation est critique en considérant que la consommation du pétrole continue à augmenter notamment dans le secteur des transports et stimulé par la croissance économique du fait de la demande de mobilité individuelle et du transport de marchandises. A cela s'ajoute l'augmentation des coûts d'extraction du pétrole lié à la nécessité de trouver de nouveaux champs de forage plus coûteux. En parallèle, les coûts de production du pétrole augmentent parce que les compagnies pétrolières doivent se tourner vers des champs plus coûteux et plus difficiles à exploiter pour remplacer les capacités épuisées et faire face à la demande croissante (International Energy Agency, 2011).

C'est dans ce cadre que plusieurs études se tournent vers la recherche d'une source énergétique alternative. A nos jours, nous parlons de biocarburants de première, deuxième et troisième générations qui sont simplement des carburants issus de la transformation de biomasse végétale (céréales à usage alimentaires), de biomasse à usage non alimentaire

---

---

(ligno-cellulosiques ou déchets agricoles) et de sources autres que biomasse (CO<sub>2</sub>, lumière), respectivement. Toutes ces productions possèdent des avantages et inconvénients qui sont listées ci-dessous.

Tout d'abord, les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération sont directement dépendants des produits alimentaires contribuant de manière directe à l'insécurité alimentaire en terme de pénuries alimentaires et hausse de prix des aliments. Leur production a un impact aussi i) sur l'utilisation de la terre en terme de contrainte de déforestation ou perte de zones habitables ; ii) sur les autres ressources naturelles tels que l'approvisionnement en eau ou la contamination issue de l'utilisation de fertilisants, en grandes quantités.

La production de biocarburants de troisième génération par transformation du CO<sub>2</sub> et de l'énergie lumineuse par les microalgues est attractive mais possède encore de nombreux désavantages notamment liés à la croissance lente des algues, aux risques élevés de contamination et à la maintenance des équipements.

L'alternative la plus intéressante reste, à l'heure actuelle, et sur le moyen terme, la production de biocarburants de deuxième génération. Elle permet une production à base de biomasse végétale non comestible, c'est-à-dire une dissociation des cultures alimentaires et énergétiques pouvant être obtenue par des procédés enzymatiques et microbiens. Un autre avantage est donc la possibilité d'un approvisionnement du carburant indépendamment des contraintes saisonnières ou géographiques.

Parmi les molécules pouvant être intégrées dans une filière de production de carburants avec des caractéristiques intéressantes pour l'industrie aéronautique se trouvent les lipides. Il existe différents microorganismes capables de produire et d'accumuler des teneurs élevées en lipides. Certaines bactéries telles que *Rhodococcus opacus* ou champignons tels que *Cunninghamella echinulata* ou levures telles que *Rodotorula glutinis* et *Yarrowia lipolytica* sont considérés comme des microorganismes oléagineux grâce à leur capacité à accumuler des quantités importantes de lipides d'au moins 20 % de leur masse sèche.

Parmi ces microorganismes oléagineux, *Yarrowia lipolytica* se caractérise par sa capacité à accumuler des teneurs élevées en huile (triacylglycérol) proche, par sa composition, de l'huile de *Jatropha* et possédant des caractéristiques, en terme de degré d'insaturation et donc de point de fusion intéressantes pour un carburant aéronautique. D'autre part, les outils génétiques disponibles chez cette levure permettent de modifier génétiquement les souches, contrairement à d'autres levures oléagineuses.

*Yarrowia lipolytica* trouve diverses applications grâce à la flexibilité de son métabolisme à produire différents métabolites tels que protéines hétérologues, composés aromatiques, acides organiques ou lipides. *Yarrowia lipolytica* est principalement présente

---

---

dans un environnement riche en lipides ou alcanes et possède un métabolisme performant pour la croissance sur ces substrats. De ce fait, produire des lipides à partir de matières premières amylacées est en lui-même un challenge nécessitant de modifier son activité métabolique. De ce fait, la production de lipides à partir de glucose comme source carbonée est peu décrite. La majorité des études décrites chez *Y. lipolytica* concerne la production d'acide citrique à partir de glycérol ou d'alcools comme source de carbone.

Chez *Yarrowia lipolytica*, la production et l'accumulation des métabolites d'intérêt sont déclenchées sous condition de limitation nutritionnelle, l'azote étant le nutriment le plus couramment étudié. Sous limitation azotée, le métabolisme bascule très rapidement vers la production d'acide citrique. Néanmoins, le degré de la limitation nutritionnelle peut conduire à ce que le flux de carbone soit dirigé vers l'accumulation de lipides au détriment de la production d'acide citrique.

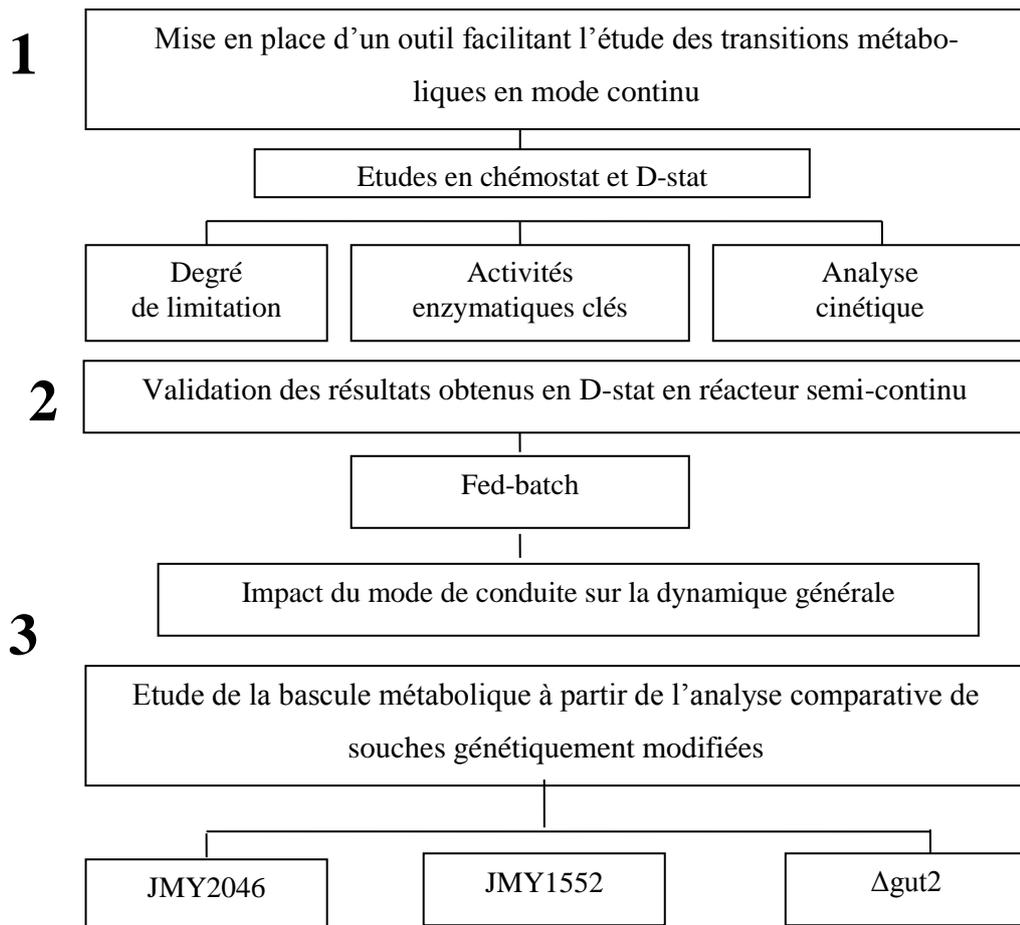
La production de citrate représente un problème en termes de rendement d'accumulation de lipides et de productivité et, il est donc essentiel de comprendre les mécanismes qui gouvernent la transition métabolique chez cette levure afin de diriger le flux de carbone vers l'accumulation des lipides.

Dans notre étude nous avons voulu répondre aux questions suivantes :

- quel est le degré de limitation nutritionnelle caractéristique du déclenchement de chacune des deux transitions métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* vers l'accumulation de triacylglycérols et vers l'excrétion de citrate ?
- est-il possible de figer le métabolisme de *Yarrowia lipolytica* dans un état d'accumulation lipidique sans la production concomitante d'acide citrique afin de faciliter l'étude des mécanismes contrôlant, à partir de souches génétiquement modifiées ?
- quels sont les mécanismes qui contrôlent ces bascules métaboliques d'un métabolisme oxydatif à l'accumulation de lipides puis à l'excrétion d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica* ?
- peut-on expliquer simplement la bascule vers l'excrétion d'acide citrique par une saturation de la voie de synthèse des triacylglycérols ? Quelle en serait l'étape saturante ?

Afin de répondre aux questions précédentes, nous avons envisagé une stratégie d'étude complète comprenant quatre étapes principales :

---



Les souches génétiquement modifiées, fournies par le Laboratoire BIMLip (INRA, Miccalis) ont été choisies afin de moduler spécifiquement des enzymes localisées au carrefour métabolique entre l'acide citrique et la synthèse des acides gras :

- souche délétée pour la malate déshydrogénase peroxysomale (souche JMY2046),
- souche surexprimant l'ATP citrate lyase (souche JMY1552),
- souche délétée pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (souche  $\Delta$ gut2).

Cette étude comparative a pour objectif d'évaluer l'importance de l'ATP citrate lyase, enzyme caractéristique des microorganismes oléagineux) et de la disponibilité du glycérol-3-phosphate sur la bascule métabolique vers l'excrétion de l'acide citrique.

Finalement, la dernière étape de la stratégie est :

**4** Proposer des nouvelles cibles génétiques afin de retarder/diriger le flux de carbone vers la seule production de lipides sans la production concomitante d'acide citrique

---

---

Toute la démarche envisagée pendant cette étude est basée sur une approche systématique à différentes échelles combinant génie microbiologique, analyse biochimique et transcriptomique.

Cette thèse est divisée en quatre parties principales. Une première partie concernant l'étude bibliographique faisant l'état de l'art autour de l'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux, spécifiquement chez *Yarrowia lipolytica* et la bascule métabolique vers l'acide citrique sous une limitation nutritionnelle. Seront également abordés les différents modes de conduite considérés pour cette étude.

La deuxième partie concerne les différents matériels et méthodes utilisés au cours de ces travaux. Dans une troisième partie nous présenterons les différents résultats obtenus avec la souche sauvage et les souches mutantes en termes de caractérisation des différents paramètres cinétiques. Finalement, une discussion générale sur le sujet débouchera sur les conclusions et perspectives à envisager.

---

---

## Chapitre 1

# Etat de l'art

### 1.1 Introduction

Dans ce chapitre sera montré l'état de l'art actuel sur les processus d'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux, plus particulièrement sur le métabolisme lipidique de *Yarrowia lipolytica*. Nous traiterons aussi le rôle du citrate sur la production de lipides ainsi que les enzymes clé de ce métabolisme de la bascule métabolique et les principaux facteurs influençant l'accumulation de métabolites chez cette levure. Finalement, une dernière partie fera l'état de différentes conduites de culture existantes pour l'analyse métabolique de microorganismes.

---

## 1.2 Accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux

### 1.2.1 Les microorganismes oléagineux

Un microorganisme dit « oléagineux » est défini comme un microorganisme capable d'accumuler au moins 20 % de sa masse en lipides. Ces lipides sont majoritairement composés de triacylglycérols et constituent la principale réserve d'énergie du fait que leur oxydation dans le métabolisme produit plus d'énergie que l'oxydation des sucres. Récemment, un nouvel intérêt de ces molécules est lié au fait qu'elles pourraient représenter une alternative énergétique aux carburants fossiles. Une alternative énergétique est le biodiesel, produit par transestérification des triacylglycérols générant ainsi des esters monoacylés. Ce biodiesel possède un bilan favorable en terme de rejet de CO<sub>2</sub> ou du soufre à l'atmosphère et génère moins de polluants gazeux que les carburants fossiles utilisés couramment (Lang, Dalai *et al.* 2001; Antolin, Tinaut *et al.* 2002; Vicente, Martinez *et al.* 2004).

La production mondiale de biodiesel inclut l'utilisation des huiles végétales, des graisses animales et des huiles de déchets, néanmoins leur production nécessite de grandes surfaces agricoles et d'énergie (huiles végétales) ou des quantités considérables d'aliments et des coûts de l'élevage, dans les cas des animaux, pour générer ce biodiesel.

Diverses études portent leur recherche sur des méthodes d'obtention du biodiesel à partir de méthodes moins chères et donc la possibilité d'un approvisionnement de biodiesel indépendante des contraintes saisonnières ou autres. Sur ce sujet, l'utilisation de microorganismes pour la production de biodiesel semble être une option viable due aux avantages qu'elle représente. Dans cette section seront expliquées les caractéristiques des microorganismes oléagineux et des exemples des souches productrices seront aussi donnés.

#### 1.2.1.1 Les bactéries oléagineuses

Certaines bactéries tels que *Rhodococcus opacus* PD630 et *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 peuvent accumuler des lipides jusqu'à 87 % et 26 % de leur masse sèche, respectivement (Uthoff *et al.* 2009). Les bactéries ont la capacité de synthétiser des acides gras du fait qu'ils sont les précurseurs pour la synthèse de leurs membranes cellulaires. Les principaux lipides produits chez les bactéries sont des : polyhydroxybutyrate, polyalkanoates, alcools gras, glyco-, sulfo-, phospho- et peptidolipides (Leman 2009).

La production lipidique chez les bactéries oléagineux implique des défis à résoudre, par exemple, une modification génétique pour atteindre des rendements élevés ainsi que la

diminution de la production de glycérol principal sous-produit de biosynthèse et finalement les conséquences de la toxicité des lipides chez les bactéries (Lu *et al.* 2008). Le principal problème de la production lipidique chez les bactéries est la difficulté à extraire les lipides car ils sont produits sur la membrane externe (Steinbuechel and Fuchtenbusch 1998) résultant en une co-extraction des produits non souhaités avec des propriétés allergéniques et antinutritionnelles.

### 1.2.1.2 Les algues oléagineuses

Les microalgues sont capables d'utiliser le CO<sub>2</sub> comme source carbonée et la lumière comme source d'énergie pour l'accumulation lipidique dans des conditions environnementales très spécifiques (Li *et al.* 2008) sous la forme d'acides gras polyinsaturés (PUFA) (Feofilova *et al.* 2010). L'accumulation lipidique chez les microalgues varie entre espèces et peut être influencée par les conditions de culture telles que le pH, la salinité et les sources azotées. L'azote et l'intensité de la lumière sont les facteurs critiques de l'accumulation lipidique (Solovchenko *et al.* 2008).

Les microalgues sont des microorganismes potentiels pour produire différents biocarburants tels que biogaz, bioéthanol, hydrogène, esters méthyliques des acides gras (FAME) et hydrocarbures (Posten and Schaub 2009). Néanmoins leur culture semble être un des principaux problèmes dûs au fait que leur croissance est normalement réalisée en bioréacteurs tubulaires étant dépendante de l'approvisionnement en CO<sub>2</sub> et en lumière (Azocar, Ciudad *et al.* 2010). Un autre risque est le risque d'une contamination bactérienne (Feofilova *et al.* 2010). D'après Samori *et al.*, 2010, (Samori *et al.* 2010), les principaux problèmes de la production de lipides chez les microalgues sont les coûts élevés par rapport aux carburants fossiles, la méthodologie de production, la récolte des algues ainsi que l'extraction des lipides. Des exemples de microalgues capables d'accumuler des lipides sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 1. Contenu lipidique de certaines espèces de microalgues d'après Feofilova *et al.* 2010.

Nom	% Lipides	Référence
<i>Chlorella sp.</i>	28-32	Chisti 2007
	23-63	Illman <i>et al.</i> 2000
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35	Chisti 2007
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68	Chisti 2007
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	Chisti 2007
	69	Chen <i>et al.</i> 2008
<i>Neochloris oleoabundans</i>	54	Metting 1996
	35-54	Chisti 2007
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	Meng <i>et al.</i> 2009

---

### 1.2.1.3 Les champignons oléagineux

Le contenu et la composition des acides gras chez les champignons oléagineux dépendent de l'espèce, de l'étape de développement et de croissance ainsi que des conditions de culture (Rose 1989) et peut atteindre jusqu'à 86 % de leur masse sèche sous la forme de triacylglycérols (Meng *et al.* 2009). Les champignons filamenteux peuvent synthétiser des acides gras saturés et insaturés à 10-24 atomes de carbone, le C16:0, C18:1 et C18:2 étant les principaux acides gras produits (Gunstone 2007). Chez les champignons oléagineux, la température est un facteur important qui contrôle le profil lipidique. Les champignons thermophiles produisent des acides gras plus saturés que les champignons mesophiles (Bruszevs *et al.* 1972). Des exemples de champignons capables d'accumuler de lipides sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 2. Contenu lipidique de certaines espèces de champignons oléagineux. D'après Feofilova *et al.* 2010.

Nom	% Lipides	Référence
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Zygomycetes)	48	Sergeeva <i>et al.</i> 2008
<i>C. japonica</i> (Zygomycetes)	50	Sergeeva <i>et al.</i> 2008
	60	Ratledge et Wynn 2002
<i>Mortierella isabellina</i> (Zygomycetes)	50	Li <i>et al.</i> 2008
	86	Meng <i>et al.</i> 2009
<i>M. alpina</i> (Zygomycetes)	50	Ratledge et Wynn 2002
<i>M. vinacea</i> (Zygomycetes)	66	Meng <i>et al.</i> 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> (Deuteromycetes)	57	Meng <i>et al.</i> 2009
<i>A. niger</i> (Deuteromycetes)	11	Lsel 1988
<i>Agaricus bisporus</i> (Homobasidiomycetes)	4	Lsel 1988
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Homobasidiomycetes)	5	Lsel 1988

### 1.2.1.4 Les levures oléagineuses

Des 600 espèces des levures connues, seul 30 (5 %) ont été identifiées comme oléagineuses (Beopoulos, *et al.* 2009).

Les levures oléagineuses possèdent des avantages par rapport aux autres microorganismes oléagineux, par exemple, leur temps de duplication est inférieur à 1 heure, elles ne sont pas affectées par des conditions saisonnières comme les plantes, et leur modes de culture sont moins compliqués que ceux pour les microalgues. Exemples des levures oléagineuses incluent *Cryptococcus albidus*, *Lipolyces lipofera*, *Rhodotorula glutinis* et *Yarrowia lipolytica*.

Tableau 3. Levures, conditions de culture et rendement de lipides rapportés par différentes références. Modifié d'après Ageitos *et al.*, 2010, (Ageitos, Vallejo et al. 2010). T: température ; t : temps de culture ; X: biomasse ; MM: milieu minimim ; F: fermenteur ; f :fiole ; F-b: fed-batch ; CF: culture continue ; SL: sophorolipides ; SF: fermentation solide ; MEL : lipide mannosylerythritol ; OP : optimal

Nom	X (g.l <sup>-1</sup> )	% Lipides	T (°C)	t (h)	pH	Source C	Source N	Mode	Référence
<i>Apiotrichum curvatum UfaM3</i>	15	45	30	-	5.5	Glucose	MM	CF	Hassan <i>et al.</i> 1993
<i>A. curvatum Ufa25</i>	15	40	30	150	5	Lactosérum	NH4Cl	F	Ykema <i>et al.</i> 1989
<i>A. curvatum ATCC 20509</i>	85	35	30	70	4.8	Permeate lactique	MM	F	Ykema <i>et al.</i> 1988
<i>A. curvatum ATCC20509</i>	15.11	47	32	145	5.5	Lactose	MM + vitamines	f	Park <i>et al.</i> 1990
<i>Candida 107</i>	18.1	37	30	3.528	5.5	Glucose	MM	CF	Gill <i>et al.</i> 1977
<i>C. bombicola ATCC 22214</i>	-	SL 21 g.l-1	26	120	6	Glucose + molasse soja +huile	Extrait de levure + urea	F	Solaiman <i>et al.</i> 2004
<i>C. bombicola</i>	29	SL 41 gl-1	30	190	7	C. curvatus + lactose	MM + C. curvatus	F	Daniel <i>et al.</i> 1999
<i>C. curvata D</i>	10.6	27	28	72	5.5	Glucose	MM	CF	Heredia et Ratledge 1988
	8.2	30	28	72	5.5	Xylose	MM	CF	
<i>Cryptococcus curvatus</i>	91	33	28	75	5.5	Glycérol	MM	Surer	Meesters <i>et al.</i> 1996b
<i>C. albidus var. aerius IBPhM y-229</i>	-	63	OP	-	5	Ethanol	MM	F	Evans <i>et al.</i> 1983
<i>C. albidus var. albidus CBS 4517</i>	26.78	46	20	90	5.5	Glucose	MM	CF	Hansson and Dostalek 1986
<i>C. curvatus ATCC 20509</i>	118	25	28	50	5.5	Glycérol	MM	F F-b	Meesters <i>et al.</i> 1996a
<i>C. curvatus ATCC 20509</i>	18.4	49	30	24+72	5.4	Lactose + huile de poisson	MM	f	Iassonova <i>et al.</i> 2008
	16.1	68	30	24+72	5.4	Lactose + claritol	MM	F	
<i>C. terricolus</i>	16	39	25	184	5.5	Glucose	MM	F	Boulton et Ratledge 1984
<i>Lypomyces lipofer IBPhM y-693</i>	-	51	OP	-	5	Ethanol	MM	F	Evans <i>et al.</i> 1983
<i>L.starkeyi</i>	20.5	61	30	120	6	Glucose + Xylose	Variable	f	Zhao, Kong et al. 2008
<i>L. starkeyi DSM 70295</i>	13.3	56	30	220	5	Glucose	Basal M	f	Angerbauer <i>et al.</i> 2008
	9.3	72	30	220	5	Glucose	Eaux usées	f	
<i>L. starkeyi AS 2. 1390</i>	18	30	28	96	5.8	Glucose	MM	f	Li Y-h 2005

Nom	X (g.l <sup>-1</sup> )	% Lipides	T (°C)	t (h)	pH	Source C	Source N	Mode	Référence
<i>Pseudozyma aphidis</i>	20.9	20	28	96	5.8	Xylose	MM	f	Rau <i>et al.</i> 2005
	14	24	28	96	5.8	L-arabinose	MM	f	
	33	MEL 75 g.l-1	27	288	6.5	Huile de soja	MM	F F-b	
	30	MEL 110 g.l-1	27	228	6.5	Huile de soja + Glucose	MM	F F-b	
<i>Rhodospidium toruloides</i>	18.2	76	30	120	6	Glucose	MM	f	Zhao, Kong <i>et al.</i> 2008
<i>R. toruloides Y4</i>	151.5	48	30	600	5.6	Glucose	MM	f F-b	Li <i>et al.</i> 2007
	106.5	67	30	134	5.6	Glucose	MM	F F-b	
<i>R. toruloides AS 2. 1389</i>	6.9	42	28	96	5.8	Glucose	MM	f	Li Y-h 2005
	7.2	26	28	96	5.8	Xylose	MM	f	
	4.8	16	28	96	5.8	L-arabinose	MM	f	
<i>R. toruloides ACT 10788</i>	-	79	27	168	5	Sels des acides gras	Maïs	f	Picataggio 1979
<i>R. toruloides Y4</i>	127.4	61	30	140	5.6	Glucose	MM	F F-b	Zhao 2010
<i>Rodotorula glutinis IIP-30</i>	22.3	66	30	120	4	Glucose	MM	F	Jacob 1992
<i>R. glutinis IIP-30</i>	17.2	39	30	120	4	Molasse + glucose + sucrose	MM	F	Johnson <i>et al.</i> 1995
	25	42	30	120	4	Molasse + glucose + sucrose	MM	F F-b	
	130	72	30	66	5.6	Gucose	MM	F-b	
<i>R. glutinis CECT 1137</i>	130	72	30	66	5.6	Gucose	MM	F-b	Cescut 2009
<i>R. glutinis NRRL y-1091</i>	185	40	-	-	5.5	Glucose + air enrichi d'O <sub>2</sub>	MM	F F-b	Pan <i>et al.</i> 1986
<i>R. glutinis AS 2. 703</i>	5	30	28	96	5.8	Glucose	MM	f	Li Y-h 2005
	6.9	12	28	96	5.8	Xylose	MM	f	
	4.3	5	28	96	5.8	L-arabinose	MM	f	
<i>R. gracilis CFR-1</i>	10	68	28	120	5	Glucose	MM	f	Jacob and Krishnamurthy 1990
	13.7	59	-	-	5	Molasses	MM	S F	
<i>R. minuta IIP-33</i>	13.9	60	-	-	5	Glucose	MM	SF	Saxena <i>et al.</i> 1998
	15	48	30	80	4.5	Glucose	MM	F F-b	
<i>Trichosporon cutaneum AS 2. 571</i>	3.2	65	28	96	5.8	Glucose	MM	f	Li Y-h 2005
	4.2	13	28	96	5.8	Xylose	MM	f	
	5.6	8	28	96	5.8	L-arabinose	MM	f	

---

<b>Nom</b>	<b>X (g.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Lipides</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Source C</b>	<b>Source N</b>	<b>Mode</b>	<b>Référence</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM S(7)1	8.7	40	28	240	6	Lipides industriels + glycérol	MM	F	Papanikolaou and Aggelis 2002
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109	15	44	28	120	6	Graisse animal	MM	F	Papanikolaou <i>et al.</i> 2002a
<i>Y. lipolytica</i> W29	70	37	30	75	5.6	Glucose	MM	F-b	Cescut 2009
<i>Zygodomyces lactosus</i>	-	66	OP	-	5	Ethanol	MM	F	Evans <i>et al.</i> 1983

---

### 1.3 *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* est une des levures « non-conventionnelles » les plus étudiées couramment isolée des environnements riches en acides gras ou huiles tels que sols pollués, volailles crues ou produit laitiers (Sinigaglia, Lanciotti *et al.* 1994; Deak 2001; Lanciotti, Gianotti *et al.* 2005; Yalcin et Ucar 2009). Elle est classée par la Food and Drug Administration (FDA) comme un microorganisme GRAS (generally recognized as safe).

Cette levure est devenue un microorganisme d'importance industrielle grâce à la versatilité de son métabolisme à produire des métabolites tels que des protéines hétérologues (Destain, Roblain *et al.* 1997; Nicaud, Madzak *et al.* 2002), des lipides (Papanikolaou, Muniglia *et al.* 2003; Bankar, Kumar *et al.* 2009; Beopoulos *et al.* 2009) ou de l'acide citrique (Papanikolaou, Muniglia *et al.* 2002; Moeller, Strehlitz *et al.* 2007; Rymowicz, Rywinska *et al.* 2007).

*Yarrowia lipolytica* présente des grands avantages comparés aux autres microorganismes dites « oléagineux », tels que les champignons ou les microalgues (Papanikolaou 1998) ;

- elle peut utiliser une grande variété de substrats tels que les substrats osidiques, lipidiques ou paraffines
- elle a une bonne tolérance aux fortes concentrations en substrat
- elle a une productivité élevée en lipides ou en acide citrique
- due à sa nature unicellulaire, il est plus facile de maîtriser le procédé contrairement aux champignons

Les caractéristiques rendant *Yarrowia lipolytica* une levure convenable pour cette étude sont décrits dans cette section.

#### 1.3.1 Taxonomie

*Yarrowia lipolytica* fut isolée premièrement dans les années 1940 par Diddens et Lodder et classifiée comme *Candida* étant donné qu'aucun état sexué n'était décrit à l'époque.

La forme parfaite de cette levure a été identifiée dans les années 1960 par Wickerham au Northern Regional Research Laboratory des Etats-Unis à Petoria et reclassifiée comme *Endomycopsis lipolytica* (Wickerha *et al.* 1970), après comme *Saccharomycopsis lipolytica*

---

et finalement comme *Yarrowia lipolytica* (Yarrow 1972). La classification hiérarchique de *Yarrowia lipolytica* est décrite dans la figure suivante :

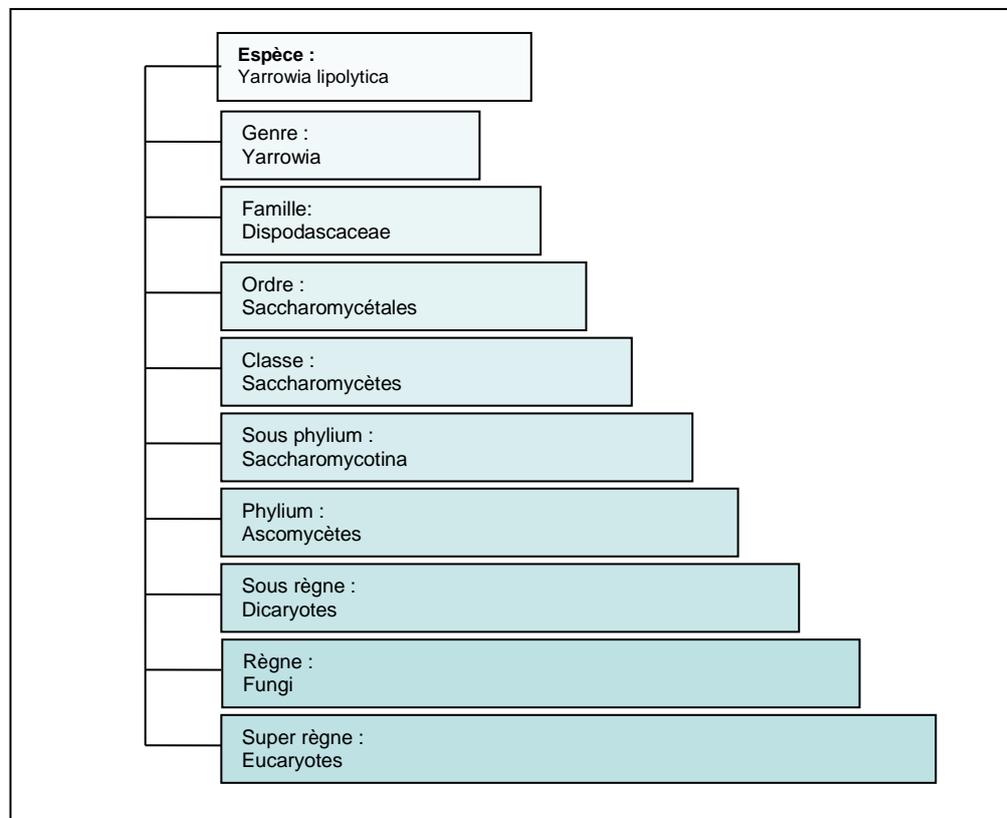


Figure 1. Classification hiérarchique de *Y. lipolytica*

### 1.3.2 Physiologie de *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* possède un profil d'accumulation lipidique défini : C16:0 = 11 %, C18:0 = 28 % et C18:2 = 51 % (Beopoulos *et al.* 2009). Elle a la capacité d'accumuler des lipides saturés tels que la stéarine (Papanikolaou *et al.* 2001) dans certaines conditions. Sa production en acides polyinsaturés C22:6 peut être obtenue après manipulation génétique (Beopoulos *et al.* 2009). La physiologie de cette levure est décrite dans cette section.

#### 1.3.2.1 Assimilation de la source carbonée

*Yarrowia lipolytica* est capable de dégrader différents hexoses tels que le glucose, le fructose et le mannose (Moeller *et al.* 2007 ; Yalcin *et al.* 2009 ; Lazar *et al.* 2011) néanmoins elle n'est pas capable de dégrader le saccharose dû à un manque d'invertase (Pereira-Meirelles *et al.* 1997). La dégradation de ces hexoses est réalisée grâce à la présence des hexokinases et glucokinases (Hirai *et al.* 1976). Petit et Gancedo (Petit and Gancedo 1999)

ont suggéré que la capacité de phosphorylation de ces hexoses et leur assimilation seraient majoritairement liées à l'action des glucokinases puisqu'une délétion du gène Y1HXX1 codant pour l'hexokinase n'affecte pas la croissance de *Yarrowia lipolytica* sur glucose. D'après Flores *et al.* 2000, chez *Yarrowia lipolytica* l'hexokinase présenterait l'inhibition la plus élevée, connue pour la tréhalose 6-phosphate ( $K_i = 3,6 \text{ mM}$ ).

Le transport à travers la membrane est réalisé par des transporteurs spécifiques de type perméases (Flores *et al.* 2000). Chez *Yarrowia lipolytica*, il existe deux systèmes de transport avec des  $K_m$  de l'ordre de 3 à 10 mM (Does et Bisson 1989).

### 1.3.2.1.1 Acides organiques

Plusieurs études montrent la capacité de *Y. lipolytica* à dégrader les acides organiques tels que acétate, lactate, propionate, malate, succinate ou citrate (Venter *et al.* 2004 ; Mansour *et al.* 2008). Ces acides peuvent être utilisés comme seule source carbonée dans certaines limites puisqu'ils peuvent devenir toxiques pour la croissance ou la viabilité (Rodrigues et Pais 2000).

Tableau 4. Paramètres de croissance chez *Y. lipolytica* dans un milieu minéral avec différents acides carboxyliques (0,1 % m.v<sup>-1</sup>) à 26 °C. D'après Rodrigues et Pais 2000.

Acide	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{) à pH 3}$	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{) à pH 5}$
Citrique	$0,30 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$
Acétique	$0,19 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,04$
Propionique	$0,29 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
Lactique	$0,08 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$
Malique	$0,03 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,03$
Succinique	$0,23 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,04$
Sorbique	Non mesurable	Non Mesurable
Oléique	$0,24 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
Palmitique	Non mesurable	Non mesurable

En ce qui concerne la croissance sur acétate comme seule source de carbone, *Yarrowia lipolytica* peut tolérer des concentrations autour de 0,4 % (m.v<sup>-1</sup>) d'acétate de sodium, cependant des concentrations plus élevées ralentissent la croissance jusqu'à son inhibition à une concentration de 1 % (m.v<sup>-1</sup>) (Barth et Gaillardin 1997).

---

### 1.3.2.1.2 Alcools

*Yarrowia lipolytica* est capable de tolérer une concentration maximale de 3 % (m.v<sup>-1</sup>) en éthanol (Barth et Gaillardin 1997). Cette levure possède plusieurs alcools déshydrogénases NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>-dépendantes (Barth et Kunkel 1979) et diffèrent entre elles par leur spécificité pour le substrat. La synthèse de ces deux enzymes ne semble pas être répressible par le glucose ou inductible par l'éthanol. Barth et Gaillardin (Barth et Gaillardin 1997) ont détecté trois alcool déshydrogénases NADP<sup>+</sup>-dépendantes dont la présence est liée à la phase de croissance et à la source carbonée.

Le glycérol peut aussi être dégradé par *Y. lipolytica* (Papanikolaou et Aggelis 2002 ; Levinson, Kurtzman *et al.* 2007 ; Rywinska, Juszczak *et al.* 2011). Il est assimilé par la voie du glycérol-3-phosphate ou de la dihydroxyacétone. Dans cette dernière, le glycérol est d'abord oxydé en dihydroxyacétone par l'enzyme glycérol-déshydrogénase et ensuite phosphorylé en dihydroxyacétone phosphate par l'enzyme dihydroxyacétone kinase (Wang, Zhuge *et al.* 2001).

### 1.3.2.1.3 Substrats hydrophobes

*Yarrowia lipolytica* dégrade très efficacement les substrats hydrophobes tels que les alcanes, les paraffines, les acides gras ou les lipides (Whitworth et Ratledge 1975 ; Crolla et Kennedy 2001 ; Fukui *et al.* 2009).

Pour entrer dans la cellule, les substrats hydrophobes doivent interagir avec la surface cellulaire. Il existe deux hypothèses concernant leur transport : i) les substrats hydrophobes peuvent être solubilisés ou pseudo-solubilisés sous la présence de tensio-actifs produits par la souche elle-même tels que le lyposan et les lipases extracellulaires (transport médié) (Cirigliano et Carman 1984 ; Nicaud, Madzak *et al.* 2002; Zinjarde et Pant 2002) ou ii) ils peuvent adhérer directement à la membrane (transport interfacial directe).

D'après Kim *et al.* (2000), l'adhésion entre les cellules et les substrats hydrophobes serait liée à une augmentation des propriétés apolaires de la surface cellulaire grâce à la présence des structures connues comme les protubérances. Ces structures permettent une liaison de l'extérieur de la membrane cellulaire à l'intérieur de la cellule, sa présence étant dépendante de la phase de croissance.

Ces substrats sont ensuite incorporés par la voie de la  $\beta$ -oxydation ou la voie de la  $\omega$ -oxydation.

---

### 1.3.3 Morphologie de *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* est l'une des espèces levuriennes « non conventionnelles » la plus étudiée dû à ses diverses applications en biotechnologie (Barth et Gaillardin 1997 ; Bankar *et al.* 2009) ainsi qu'à ses différences avec les autres levures tels que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe* en termes d'évolution phylogénétique, physiologie ou biologie moléculaire (Verduyn, Postma *et al.* 1990 ; Yanagida 2002).

Une de ces différences est sa particularité de présenter un dimorphisme. Le dimorphisme est la capacité d'un microorganisme de former des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction des conditions environnementales. Cette morphologie variable peut affecter considérablement la culture puisqu'elle peut induire un changement rhéologique et par conséquent une altération du transfert de matière et de chaleur dans le bioréacteur dû à la large distribution de taille et de forme des cellules.

#### 1.3.3.1 Facteurs influençant la morphologie de *Yarrowia lipolytica*

Chez *Yarrowia lipolytica*, les hyphes peuvent présenter une longueur de 3 à 5  $\mu\text{m}$  et un largeur de plusieurs millimètres sous la forme de mycélium, dépendant de la souche utilisée, les cellules apicales excèdent les 100  $\mu\text{m}$  de largeur, tant que leurs segments mesurent entre 50-70  $\mu\text{m}$ . L'étape de croissance peut néanmoins présenter un comportement intermédiaire (Kawasse *et al.* 2003).

La morphologie de *Yarrowia lipolytica* est déterminée par des conditions environnementales tels que la source azotée, la source carbonée, le pH, la température, etc.) (Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002; Kawasse, Amaral *et al.* 2003 ; Lobao, Facanha *et al.* 2007), ainsi que par la génétique de la souche (Richard, Quijano *et al.* 2001) mais ces conditions peuvent varier en milieu liquide ou solide (Barth et Gaillardin 1997).

La nature et la concentration de la source azotée dans le milieu de culture est critique à la formation des hyphes lors d'une culture. Ruiz-Herrera et Sentandreu (Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002) ont montré que la formation des hyphes chez *Yarrowia lipolytica* W29 est favorisée par l'utilisation d'une concentration élevée de sels d'ammonium comme source azotée transformant une morphologie bourgeonnante à une morphologie filamenteuse jusqu'à 62-90 % de la totalité des cellules, tandis qu'utiliser des sources azotées organiques en faibles concentrations tels des acides aminés ou protéines, permet le seul développement de bourgeons (tableau 5).

Tableau 5. Impact de la nature de la source azotée sur la morphologie de *Y. lipolytica*. D'après Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002

Source azotée	pH final	Masse sèche (mg.mL <sup>-1</sup> )	Morphologie % Ronde	Morphologie % Mycélium
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,07	1,15	38	62
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,45	1,90	10	90
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	7,12	1,90	93	7
KNO <sub>3</sub>	7,09	-	-	-
Glutamate	7,31	0,75	100	0
Glutamine	6,55	2,55	100	0

D'après Ruiz-Herrera et Sentandreu (Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002), l'influence de la source azotée sur le dimorphisme peut être expliquée en regardant le dimorphisme comme un processus de développement cellulaire et de différenciation dépendant des conditions nutritionnelles. Au contraire des cellules rondes, les hyphes possèdent une organisation interne plus différenciée et un volume cellulaire plus important, ce qui se traduit par un besoin énergétique et nutritionnel plus élevé assuré par une concentration élevée en azote dans le milieu de culture.

Le pH du milieu de culture joue aussi un rôle important sur la morphologie chez *Yarrowia lipolytica*. Un pH proche de la neutralité dans le milieu de culture impacte aussi la formation des hyphes chez certaines levures tels que *Candida albicans* (Kaur, Mishra *et al.* 1988 ; Stewart, Gow *et al.* 1988), *Mucor raixii* (Bartnickigarcia et Nickerson 1962) et *Yarrowia lipolytica*.

Szabo et Stofanikova (Szabo et Stofanikova 2002) ont montré que le pH régule la morphologie de manière indirecte en modulant la disponibilité des sources azotées critiques à la formation et à la maintenance des hyphes. Ils proposent un modèle où le pH exercerait un effet à deux niveaux : i) par la voie Rim101p en régulant la production de protéinases extracellulaires, essentielles à la production des acides aminés et peptides, et ii) affectant la polarité de la membrane cellulaire et donc l'utilisation de ces mêmes acides aminés et peptides nécessaires à la formation des hyphes (Figure 2). Il existe une évidence que les signaux externes qu'influencent la transition de morphologie chez les levures sont dus à deux mécanismes de transduction de signaux : i) par la protéine kinase activée par mitogénèse (MAPK) et par la voie de la protéine kinase (PKA) AMP-dépendante (Martinez-Espinoza *et al.* 2004).

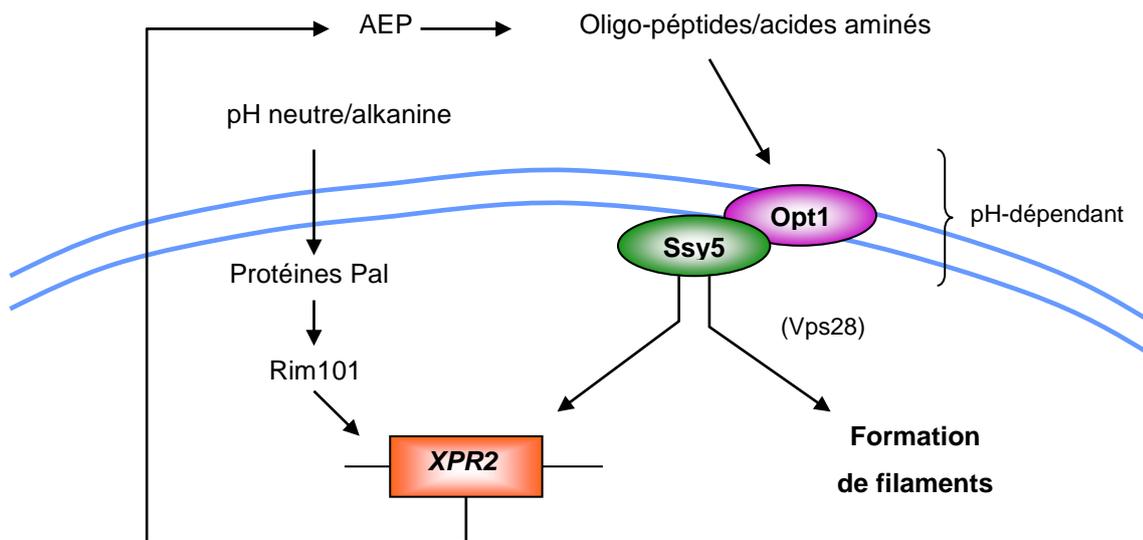


Figure 2. Modèle proposé pour la régulation de la morphologie chez *Y. lipolytica* à partir du pH extracellulaire. Le pH modulerait l'utilisation des sources azotées critiques à la formation des hyphes Modifié d'après Szabo et Stofanikova 2002. AEP : protéinase alcaline extracellulaire, XPR2 : gène codant pour AEP, Opt1 : gène homologue codant pour un transporteur d'oligopéptides chez *S. cerevisiae*, Ssy5 : gène homologue codant pour une protéine sensorielle d'acides aminés chez *C. albicans*, Vps28 : gène codant pour une protéine impliquée dans le transport vésiculaire prévacuolaire

Il existe d'autres facteurs favorisant le dimorphisme chez *Yarrowia lipolytica*. Il a été démontré que l'utilisation de sérum de veau comme source de carbone stimule la formation de mycélium chez cette levure (Perez-Campo et Dominguez 2001).

*Yarrowia lipolytica*, étant une levure aérobic stricte, n'est pas capable de croître dans de conditions anoxiques ou anaérobies. Des conditions semi-anoxiques entraînent une formation d'hyphes extrêmement longs dans le milieu de culture liquide ou solide (Zinjarde, Pant *et al.* 1998 ; Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002).

Des conditions de stress thermique et oxydative occasionnent aussi une formation des hyphes chez *Yarrowia lipolytica* (Kawasse *et al.* 2003) résultant en une augmentation jusqu'à 25 % d'élongation par rapport aux cellules non stressées (Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002).

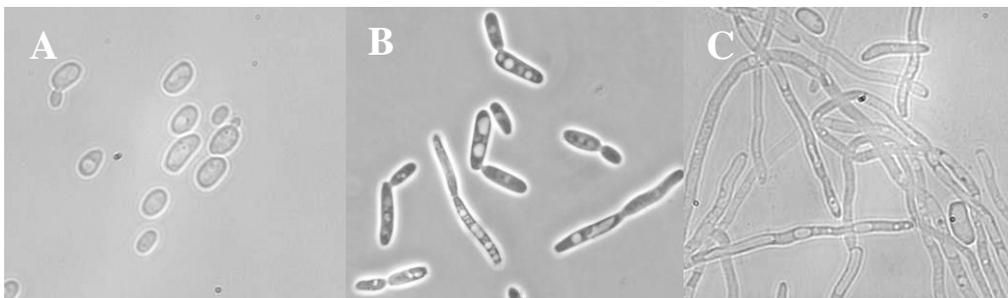


Figure 3. Morphologie de *Y. lipolytica* W29 lors d'une culture A : accumulation lipidique, B : phase exponentielle, C : conditions semi-anoxiques

---

### **1.3.4 Application de *Yarrowia lipolytica***

La versatilité de *Yarrowia lipolytica* a encouragé l'étude de son métabolisme vers la production de divers produits d'application biologique et biotechnologique. Ces applications incluent la production de lipases, des arômes, des acides organiques, des huiles et la biorémediation. Les diverses utilisations de *Y. lipolytica* sont décrites dans cette section.

#### **1.3.4.1 Production de lipases**

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases EC 3.1.1.3) catalysent plusieurs réactions d'intérêt industriel tels que hydrolyses, estérification, interestérification et transestérification (Osorio, Ferreira-Dias *et al.* 2001 ; Guvenc, Kapucu *et al.* 2002). Ces propriétés sont appliquées pour fabriquer des détergents afin de substituer les tensio-actifs chimiques (Hemachander et Puvanakrishnan 2000), pour la production des composés optiquement actifs dans l'industrie pharmaceutique (Akin *et al.* 2003) (tels que pour la production de L-Dopa à partir de L-alanine, un médicament utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson), ou dans les industries alimentaires et cosmétiques ainsi que pour le traitement des eaux usées huileuses (Cammarota et Freire 2006).

D'après divers auteurs, les substrats lipidiques tels que acides gras, tweens, triacylglycérols ou glycérol (Sharma, Chisti *et al.* 2001 ; Gupta, Gupta *et al.* 2004) favorisent des hautes productivités par rapport au glucose qui semble réprimer la production des lipases (Novotny, Dolezalova *et al.* 1988 ; Pereira-Meirelles, Rocha-Leao *et al.* 1997; Corzo et Revah 1999).

La quantité d'oxygène disponible pendant la croissance est un paramètre important pour une haute productivité (Chen *et al.* 1999).

#### **1.3.4.2 Production d'arômes**

La demande d'arômes et d'additifs alimentaires est en constante augmentation. L'industrie chimique a commencé à synthétiser ces composés autour des années 1850 en utilisant le méthyle salicylate, aldéhyde cinnamique, benzaldéhyde et vanilline, néanmoins l'intérêt de consommer des produits dits naturels a augmenté considérablement. Une substance dite naturelle doit provenir de plantes, animaux ou microorganismes à travers d'un procédé physique, microbien ou enzymatique. Dans ce cadre, *Yarrowia lipolytica* peut produire des composés aromatiques tels que l'arôme d'abricot, noix de coco ou pêche

---

(Romero-Guido, Belo *et al.* 2010) provenant de la production de  $\gamma$ -decalactone par l'oxydation de l'acide de ricin (Pagot, Le Clainche *et al.* 1998).

Certaines souches de *Yarrowia lipolytica* ont été rapportées pour avoir un effet positif dans les profils volatils et propriétés sensorielles des saucisses séchées fermentées (Lucci *et al.* 2007; Treichel *et al.* 2010) ou dans le fromage Cantal (De Freitas, Pinon *et al.* 2009) ou Feta (Bintsis et Robinson 2004).

#### **1.3.4.3 Production d'acides organiques**

Le métabolisme de *Yarrowia lipolytica* permet de sécréter une grande variété d'acides organiques incluant les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques tels que l'acide citrique, l'acide isocitrique, l'acide  $\alpha$ -cetoglutarique et l'acide pyruvique (Kamzolova, Shishkanova *et al.* 2003; Rymowicz, Rywinska *et al.* 2008). Ces acides sont sécrétés sous une limitation nutritionnelle, par exemple sous une limitation azotée et en excès de carbone, *Y. lipolytica* produit de l'acide citrique et de l'acide isocitrique (Finogenova *et al.* 2005), tandis que sous une limitation en thiamine et un pH faible *Y. lipolytica* produit de l'acide  $\alpha$ -cetoglutarique et de l'acide pyruvique (Il'chenko *et al.* 2002).

#### **1.3.4.4 Production d'huiles d'organismes unicellulaires (Single cell oil)**

*Yarrowia lipolytica* est considéré comme un microorganisme oléagineux grâce à sa capacité à accumuler des lipides sous la forme de triacylglycérols au-delà de 20 % de sa masse sèche.

A partir des années 60 cette levure a été utilisée pour produire des protéines à grande échelle à partir d'alcanes obtenant de cultures à hautes densités cellulaires (Barth et Gaillardin 1997). Récemment les mêmes technologies ont été utilisées pour la production d'huiles d'organismes unicellulaires (Single Cell Oil, en anglais) incluant la production d'un substitut du beurre de cacao pour l'industrie alimentaire (Papanikolaou *et al.* 2003). La capacité à produire ces composés trouve des applications potentielles tels que la production des cérébrosides à partir de la fraction de sphingolipides quand la levure est cultivée sur glucose (Rupcic et Maric 2004).

#### **1.3.4.5 Biorémediation**

*Yarrowia lipolytica* peut dégrader des substrats hydrophobes et c'est grâce à cette caractéristique qu'elle est utilisée pour la biorémediation des sols contaminés et des

---

environnements marins contaminés (Zinjarde and Pant 2002). *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 est une souche capable de dégrader les n-alcanes, isoprenoïdes et hydrocarbures aromatiques tels que les naphthales ou phenanthrenes. Avec ces sources carbonées elle est capable de modifier la composition de sa membrane cellulaire et donc les composants responsables de son hydrophobie (Ferreira 2009). Néanmoins la majorité des études sur la dégradation des substrats hydrophobiques a été réalisée à l'échelle laboratoire nécessitant donc des études *in situ*.

---

## 1.4 Le métabolisme lipidique

De la même façon que les sucres, les lipides participent aussi au métabolisme énergétique. Pour les lipides, ces processus incluent aussi les fonctions comme composants de la membrane cellulaire, régulateurs biologiques entre autres. Dans cette section seront détaillés les types de lipides, leur fonctions, leur synthèse et accumulation ainsi que leur dégradation.

### 1.4.1 Les lipides

Les lipides sont des molécules constituées principalement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène mais peuvent aussi contenir du phosphore, du soufre et de l'azote. Les lipides ont des fonctions très importantes pour la cellule levurienne :

- Stockage énergétique : sous la forme de triacylglycérols, ils représentent une forme de stockage d'énergie pour la cellule (Sorger et Daum 2003)
- Structurale : ils constituent diverses structures dans la cellule et servent comme barrière entre l'intérieur de la cellule et son environnement extérieur (Kopp 1972) ainsi comme barrière entre le lumen des organelles et le cytosol grâce à son caractère hydrophobe (Daum, Lees *et al.* 1998) (Figure 4)
- Catalytique : ils abritent des protéines qui catalysent certaines réactions des voies métaboliques ou de régulation (Daum, Lees *et al.* 1998)
- Transport : modulent le transport des acides aminés (Calderbank *et al.* 1984)

Les lipides peuvent constituer plus du 20 % de la masse sèche de la cellule chez les microorganismes dits oléagineux. Les lipides principaux chez la levure sont les acides gras, les triacylglycérols, les phospholipides, les sphingolipides et les stérols.

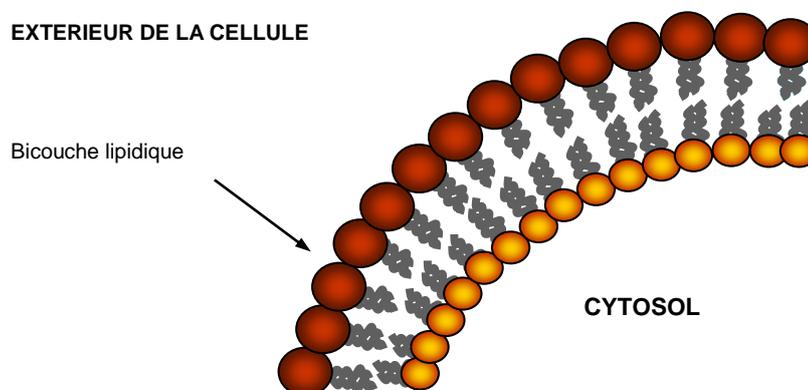


Figure 4. Fonction structurale des lipides chez une cellule levurienne.

## 1.4.2 Classes de lipides

Les lipides effectuent diverses fonctions et présentent une grande tendance à s'associer grâce aux forces non covalentes. Généralement les lipides se caractérisent pour présenter une tête hydrophile polaire et une queue hydrocarbonée hydrophobe apolaire. Une deuxième force de stabilisation des lipides provient des forces de Van der Waals entre les zones hydrocarbonées des molécules. D'un point de vue biologique, une des caractéristiques les plus importantes est la capacité des lipides à former des micelles et des bicouches membranaires. Les principaux lipides biologiques sont dans les sections suivantes.

### 1.4.2.1 Les acides gras

Les acides gras sont des groupes d'acide carboxylique à chaîne aliphatique hydrophobe (Figure 5). Les acides gras des lipides levuriens sont constitués essentiellement de C:16 et C:18, le C18:1 étant le composé principal (Ratray *et al.* 1975). Une des caractéristiques les plus importantes est que le point de fusion augmente avec le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne et diminue avec le nombre de doubles liaisons présentes. Sa classification est résumée dans le tableau suivant montrant aussi quelques exemples (Tableau 6) :

Tableau 6. Classification, caractéristiques et exemples d'acides gras.

Classification		Caractéristique		
Saturés		Acides gras sans double liaisons C-C qui forment des chaînes allongées. Ils sont sous-classifiés en « courte-chaîne » et « longue-chaîne »		
Insaturés		Acides gras avec double liaisons C=C. Ils sont sous-classifiés selon le nombre de doubles liaisons présentes dans la molécule : monoinsaturés et polyinsaturés		
Nom commun	Nom systématique	Abréviature		T fusion (°C)
<b>Acides gras saturés</b>				
Palmitique	n-hexadecanoïque	16 :0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63,1
Stéarique	n-octadecanoïque	18 :0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69,6
<b>Acide gras insaturés</b>				
Palmitoléique	cis-9-hexadécénoïque	16 :1cΔ9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	1
Oléique	cis-9-octadécénoïque	18 :1cΔ9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13,4
Linoléique	cis,cis-9,12-octadécadiénoïque	18 :2cΔ9,12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5
Linoléique	all-cis-9,12,15-octadécatriénoïque	18 :3cΔ9,12,15	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-11

Les acides gras insaturés sont les lipides mitochondriaux permettant le transport d'électrons dans la phosphorylation oxydative (Proudloc, Haslam *et al.* 1969) et le transport actif (Haslam *et al.* 1973).

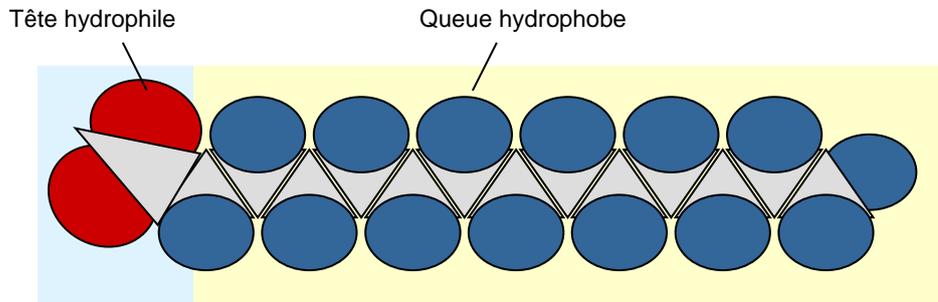


Figure 5. Exemple de la nature d'un acide gras. Modifié d'après Mathews 2002.

Eletr *et al.* 1974, ont démontré que la température affecte les fonctions physiologiques membranaires telles que la consommation d'oxygène du fait qu'elles sont dépendantes de l'état physique des lipides membranaires influencé par la température.

#### 1.4.2.2 Les triacylglycérols

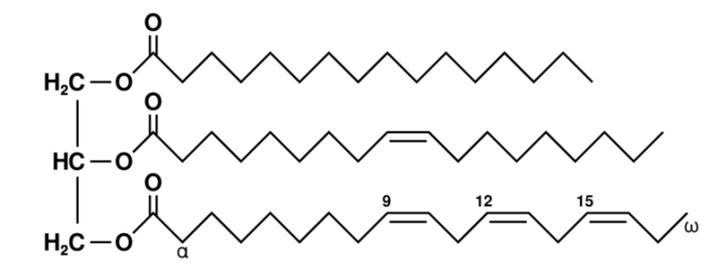


Figure 6. Structure d'une molécule de triacylglycérol.

Les triacylglycérols, ce sont des glycérides dont les trois groupes hydroxylés du glycérol sont estérifiés par des acides gras (Figure 6). Ils jouent un rôle essentiel dans le stockage et la balance d'énergie chez les eucaryotes. Grâce à sa faible toxicité pour la cellule (Dodds 1995 ; Lehner et Kuksis 1996) ils peuvent être utilisés comme source d'acides gras pendant la biogénèse membranaire quand la synthèse des acides gras est bloquée (Daum et Paltauf 1980 ; Leber, Zinser *et al.* 1994).

Les triacylglycérols peuvent constituer plus du 15 % des lipides totaux de la levure hors du phénomène d'accumulation. Les quatre principaux triacylglycérols qui forment la

---

membrane sont les glycérolphospholipides, esphingolipides, glucoesphingolipides et glucoesphingolipides.

### 1.4.2.3 Les phospholipides

Ils consistent en une molécule de glycérol estérifiée avec deux acides gras et un phosphate, en positions sn-1, sn-2 et sn-3, respectivement (Daum, Lees *et al.* 1998). Le groupe phosphate est estérifié à un autre groupe contenant généralement de l'azote. Ce dernier apporte les propriétés physiques à la molécule.

La fonction principale des phospholipides est comme composant essentiel de la membrane cellulaire, grâce à leurs propriétés amphipathiques ils permettent l'interaction des protéines localisées à l'extérieur de la cellule (tête polaire) avec l'intérieur de la bicouche lipidique de la cellule (queue apolaire).

Cette configuration contribue à une disposition cylindrique permettant de se compacter en parallèle avec leur facilité pour former des lamelles connues comme bicouches membranaires.

L'absence des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des phospholipides tels que les aminoglycérolphospholipides, la phosphatidylsérine (PtdSer), phosphatidyléthanolamine (PtdEtn) et la phosphatidylcholine (PtdCho) cause des changements phénotypiques non létaux en conditions de laboratoire (Nikawa *et al.* 1987).

### 1.4.2.4 Les sphingolipides

Ce sont des lipides dérivés de la sphingosine, un alcool insaturé à 18 carbones. La sphingosine est liée à un acide gras à longue chaîne grâce à une liaison amide, formant une céramide (Figure 7).

Un des premiers rôles décrits pour les sphingolipides, spécifiquement pour la céramide, a été de promouvoir le transport des vésicules de sécrétion du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (Horvath, Sutterlin *et al.* 1994 ; Skrzypek, Lester *et al.* 1997 ; Sutterlin, Doering *et al.* 1997).

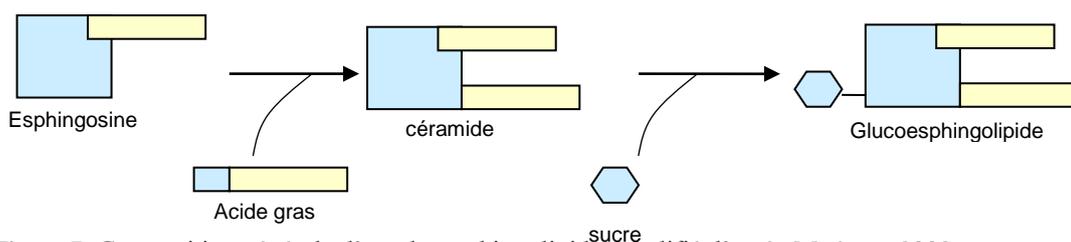


Figure 7. Composition générale d'un glucosphingolipide. Modifié d'après Mathews 2002.

---

Les sphingolipides contenant la céramide ou inositol sont nécessaires pour l'association entre protéines liées au glycosylphosphatidylinositol et la membrane plasmique chez la levure (Watanabe, Funato *et al.* 2002) et sont présents à des concentrations autour de 0,4 % ( $\text{g}_{\text{lipides}} \cdot \text{gX}^{-1}$ ). Les sphingolipides avec les phospholipides et les stérols constituent les lipides primaires des membranes chez les eucaryotes.

#### 1.4.2.5 Les stérols

Ce sont des stéroïdes à 27-29 atomes de carbone. Leur structure chimique est dérivée du stéarate qui est une molécule à 17 atomes de carbone constituée de 3 noyaux hexagonaux et 1 noyau pentagonale. Les carbones 17 et 3 sont estérifiés à une chaîne à 8 atomes de carbone ou plus et à un groupe hydroxylé, respectivement. La proportion d'atomes de carbone dépend des conditions de croissance (Klein 1955; Kovac *et al.* 1967).

Les stérols sont des lipides essentiels de la membrane chez les eucaryotes et sont responsables de certaines caractéristiques physiques. Kleinhans *et al.* 1979, Bard *et al.* 1978 et Lees *et al.* 1979 ont montré les effets régulateurs des stérols sur la fluidité et la perméabilité de la membrane. Les stérols peuvent aussi affecter l'utilisation de la source énergétique (Lees *et al.* 1980) et l'activité des ATPases membranaires (Cobon et Haslam 1973).

Les stérols constituent entre 0,03 % et 4,6 % de la masse sèche de la cellule (Elrefai et Elkady 1968) représentant < 1 à 10 % des lipides totaux.

#### 1.4.3 Synthèse de lipides « *de novo* »

Chez les microorganismes oléagineux, la plupart de l'énergie est stockée sous la forme de lipides contrairement aux autres microorganismes qui accumulent préférentiellement des polysaccharides. Pour réaliser cette conversion toute une série de mécanismes sont déclenchés. Un des métabolites centraux de la conversion des sucres en lipides est l'acétyl-CoA qui provient soit de la réaction de la pyruvate déshydrogénase soit de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

Chez *Yarrowia lipolytica*, les lipides peuvent être accumulés par deux voies différentes : 1) la synthèse « *de novo* » qui implique la formation des précurseurs lipidiques et leur incorporation aux voies métaboliques pour la production de lipides et 2) la synthèse « *ex novo* » qui implique l'incorporation des acides gras, huiles ou triacylglycérols provenant du milieu de culture à la cellule sous les mêmes molécules ou molécules modifiées.

Les mécanismes de la synthèse « *de novo* » et « *ex novo* » sont décrits dans cette section.

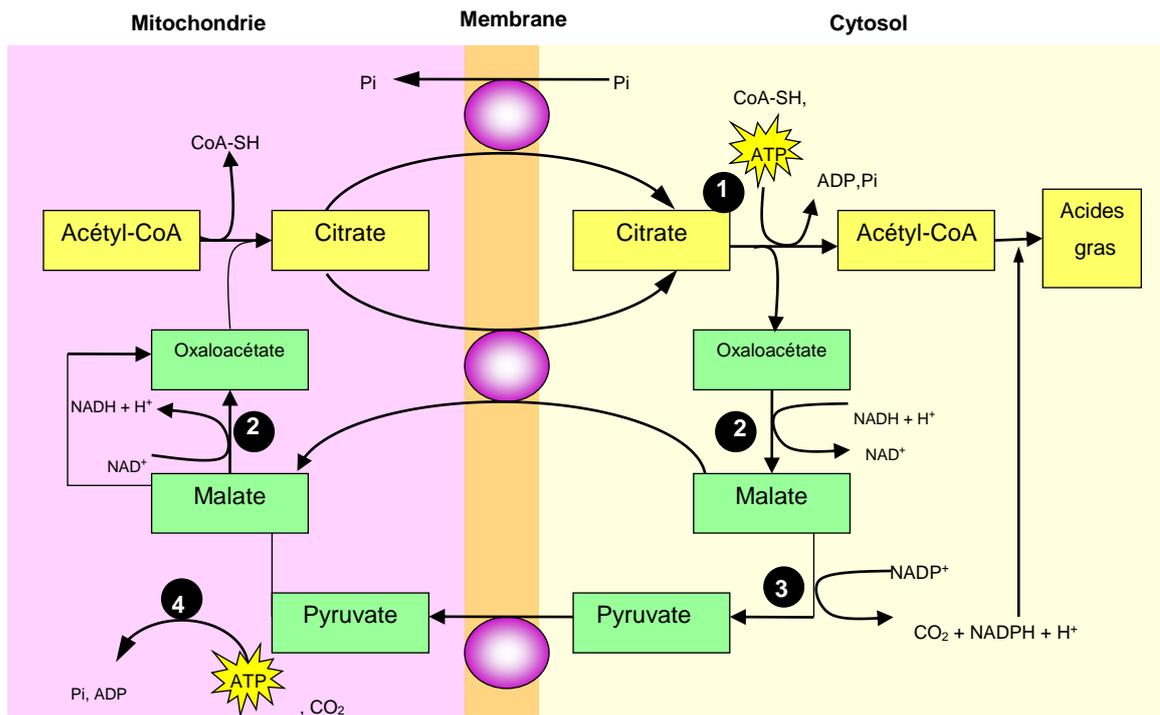
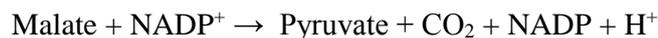
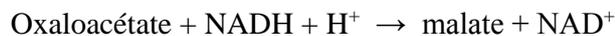
### 1.4.3.1 Synthèse des acides gras

Il existe 3 systèmes enzymatiques qui catalysent le processus : 1) la biosynthèse de palmitate à partir d'acétyl-CoA, 2) l'élongation de la chaîne carbonée à partir de palmitate et 3) la désaturation. Chez les levures le premier est réalisé dans le cytosol, le deuxième dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique et le troisième dans le réticulum endoplasmique.

Du fait que l'acétyl-CoA est généré au niveau des mitochondries, il doit être transporté vers le cytosol pour la synthèse des acides gras. Dans cette étape, le citrate produit par le cycle des TCA est transporté hors de la mitochondrie vers le cytosol et clivé en acétyl-CoA et oxaloacétate par l'action de l'ATP citrate lyase (Figure 8, réaction 1) :



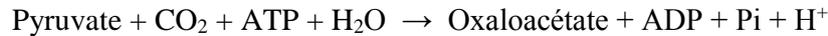
L'oxaloacétate est ensuite decarboxylé en malate par la malate déshydrogénase qui retourne à nouveau vers la mitochondrie (Figure 8, réaction 2). Une fraction du malate est decarboxylé par l'enzyme malique en pyruvate fournissant ainsi partiellement les  $\text{NADPH}_2$  nécessaires à la synthèse des acides gras (Figure 8, réaction 3):



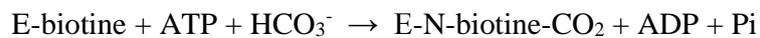
---

Figure 8. Synthèse des acétyl-CoA. 1= ATP citrate lyase, 2= malate déshydrogénase, 3= enzyme malique, 4= pyruvate carboxylase. Modifié d'après Mathews 2002.

Le pyruvate retourne dans la mitochondrie pour sa conversion en oxaloacétate par la pyruvate décarboxylase (Figure 8, réaction 4) :



Les acétyl-CoA formés pendant cette étape fourniront les 2 premiers atomes de carbone pour la synthèse des acides gras. L'acétyl-CoA est ensuite transformé en malonyl-CoA par l'action de l'acétyl-CoA carboxylase, biotine-dépendante et constitué de deux chaînes polypeptidiques identiques d'un poids moléculaire de 230 000 daltons. La réaction est la suivante :



Le malonyl-CoA est ensuite converti en palmitoyl-CoA par un complexe multi-enzymatique appelée Acide gras synthétase (FAS) en utilisant des résidus acyl préexistants et une protéine spécifique appelée protéine porteuse d'acyle (ACP). Dans un premier temps, le malonyl-CoA, provenant de la synthèse des acétyl-CoA dans le cytosol, réagit avec l'ACP pour former le malonyl-ACP, de la même manière un acétyl-CoA préexistant réagit avec l'ACP pour former l'acétyl-ACP.

Ensuite, une molécule de malonyl-ACP et d'acétyl-ACP réagissent pour commencer le premier cycle. Le groupe acétyl est transféré de l'ACP à un thiol cystéine de l'enzyme, catalysée par la  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthétase (Figure 9).

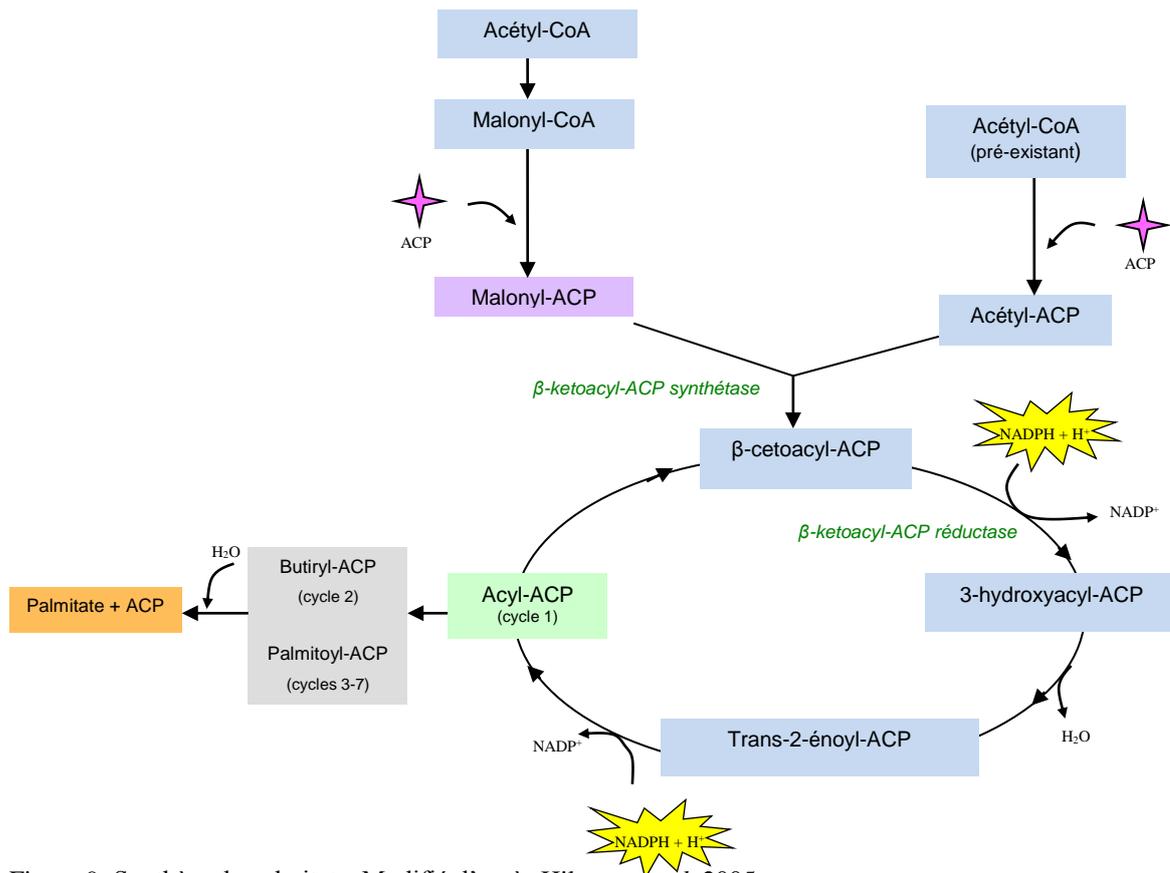


Figure 9. Synthèse de palmitate. Modifié d'après Hiltunen *et al.* 2005.

Le produit de cette condensation, le  $\beta$ -cetoacyl-ACP est ensuite réduit à 3-hydroxyacyl-ACP, par l'action de la  $\beta$ -cetoacyl-ACP réductase.

Le 3-hydroxyacyl-ACP est déshydraté en trans- $\Delta^2$ -énoyl-ACP qui suit une deuxième réduction en Acyl-ACP, un butyryl-ACP dans le premier cycle.

Dans le deuxième cycle, le butyryl-ACP réagit avec autre molécule de malonyl-ACP, produisant l'énoyl-ACP. Ce même processus continue 7 fois pour former le palmitoyl-ACP qui subit une hydrolyse pour produire du palmitate et de l'ACP libre.

La différence la plus importante du complexe de l'acide gras synthétase est la spécificité de l'enzyme initiale et la nature de la liaison du complexe des élongases (Ratledge et Wynn 2002).

D'après Tehlivet *et al.*, 2007 (Tehlivets, Scheuringer *et al.* 2007), il existe deux types d'acide gras synthétase (FAS). La première, la FAS I est cytosolique et composé de 2 sous-unités : Fas1 (sous-unité  $\beta$ ) et Fas2 (sous-unité  $\alpha$ ) organisées comme un complexe hexamérique  $\alpha_6\beta_6$ . Le Fas1 porte les fonctions d'acétyl-transférase, énoyl-réductase, déshydratase et malonyl-palmitoyl transférase, tandis que la Fas2 porte les fonctions de protéine transporteur d'acyle, 3-réductase, 3-cétosynthétase et phosphopanthéine transférase (Schweizer et Hofmann 2004). La FAS II est mitochondriale menant des activités enzymatiques spéci-

---

fiques pour divers polypeptides : Acp1, la protéine porteuse d'acyle ; Cem1,  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthétase ; Oar1, 3-oxoacyl-[protéine porteuse d'acyle]-réductase ; Htd2, 3-hydroxyacyl-thioester déshydratase ; Etr1, énoyl-ACP réductase et finalement Ppt2 fonctionnant comme phosphopanthéine-protéine transférase.

#### 1.4.3.1.1 Elongation et désaturation des chaînes des acides gras

Chez les eucaryotes comme *Y. lipolytica*, l'élongation de la chaîne carbonée est réalisée dans les mitochondries et aussi dans le réticulum endoplasmique. La première réaction est la condensation entre un malonyl-CoA et une molécule acyl-CoA à longue chaîne carbonée.

Le  $\beta$ -cétoacyl-CoA résultant subit une réduction NADPH-dépendante, une déshydratation de l'hydroxyacyl-CoA et une dernière réduction NADPH-dépendante à fin de produire un acyl-CoA saturé avec 2 atomes de plus que le substrat original.

Pour la majorité des microorganismes, la synthèse des acides gras finit avec la formation des acides gras saturés à 16 ou 18 atomes de carbone. Ces acides gras sont ensuite modifiés par l'action des désaturases.

Les désaturases des acides gras sont des protéines de liaisons membranaires hydrophobiques comprenant au moins 2 fonctions différentes correspondant à l'activité de désaturation : cytochrome b5-réductase et cytochrome b5-réductase terminale et elles utilisent les acyl-CoA ou résidus d'acyls comme substrats (Ratledge et Wynn 2002). Ces enzymes sont  $O_2$  et NADPH-dépendantes (Bloomfield et Bloch 1960).

Chez les levures oléagineuses, les acides gras produits en majeure quantité sont les acides oléique (18:1), linoléique (18:2), palmitique (16:0), ou palmitoléique (16:1) (Ratledge 2004). L'acide linoléique quand il est produit constitue moins de 10 % sous la forme isomère n-3 (Ratledge 1989).

La  $\Delta 9$  désaturase catalyse l'insertion de la première double liaison d'un acide gras saturé entre les carbones 9 et 10 de la chaîne carbonée (Fox *et al.* 2004), permettant ainsi la formation de palmytoléate (16:1) à partir de palmitate (16:0) ou stérate (18:1) à partir de oléate (18:1) (Ratledge et Wynn 2002). D'autre part, la  $\Delta 12$  désaturase catalyse la conversion de l'acide oléique (18:1) en acide linoléique (18:1,2) par l'insertion d'une double liaison entre les carbones 12 et 13 de la chaîne monoinsaturée de l'acide gras.

---

### 1.4.3.2 Synthèse des triacylglycérols (TAG)

La majorité des lipides chez les levures oléagineuses se trouve sous la forme des triacylglycérols qui sont formés à partir des acides gras par la voie de l'acide phosphatidique (Ratledge et Wynn 2002 ; Sorger et Daum 2003). La synthèse des triacylglycérols (TAG) consiste en deux étapes. La première étape comprend les différentes réactions menant à la formation des diacylglycérols (Sandager *et al.* 2002) et dans un deuxième temps l'acylation des diacylglycérols (Sandager *et al.* 2002) aux triacylglycérols (TAG) (Figure 10).

La synthèse des TAG nécessite de l'acyl-CoA et du glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate peut être produit à partir du glycérol par l'action de la glycérol kinase cytosolique (codée par GUT1 chez *Yarrowia lipolytica*) ou à partir de dihydroxyacétone (DHAP).

Le glycérol-3-phosphate est oxydé en dihydroxyacétone phosphate par l'action de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (codée par GUT2 chez *Yarrowia lipolytica*), le DHAP peut être ensuite intégré à la glycolyse. La première étape de la synthèse des TAG est l'acylation du glycérol-3-phosphate à la position sn-1 par l'action de la glycérol-3-phosphate acyltransférase à fin de générer de l'acide lyophosphatidique (LPA). Le LPA suit une acylation à la position sn-2 par l'action de l'acide lyophosphatidique acyltransférase à fin de générer de l'acide phosphatidique (PA) (Czabany, Athenstaedt *et al.* 2007).

Le diacylglycérol de l'acide phosphatidique est libéré au travers d'une déphosphorylation par l'action de l'acide phosphatidique phosphohydrolase, codée par YALI0D27016g chez *Yarrowia lipolytica*, (Genolevures).

En plus, les DAG peuvent être formés par la dégradation des phospholipides catalysés par un phospholipase et par la désacylation des TAG catalysés par les lipases des triacylglycérols (Athenstaedt et Daum 1999 ; Sorger et Daum 2003 ; Coleman et Lee 2004).

Dans la dernière étape de la synthèse des TAG, le diacylglycérol est acylé à la position sn-3. Chez les levures, cette acylation peut être réalisée par deux mécanismes différents, soit par une acylation acyl-CoA dépendante soit par un acyl-CoA indépendante.

Le mécanisme d'acylation acyl-CoA indépendante, nécessite d'un glycérolphospholipide comme donneur pour l'estérification des DAG (Czabany, Athenstaedt *et al.* 2007).

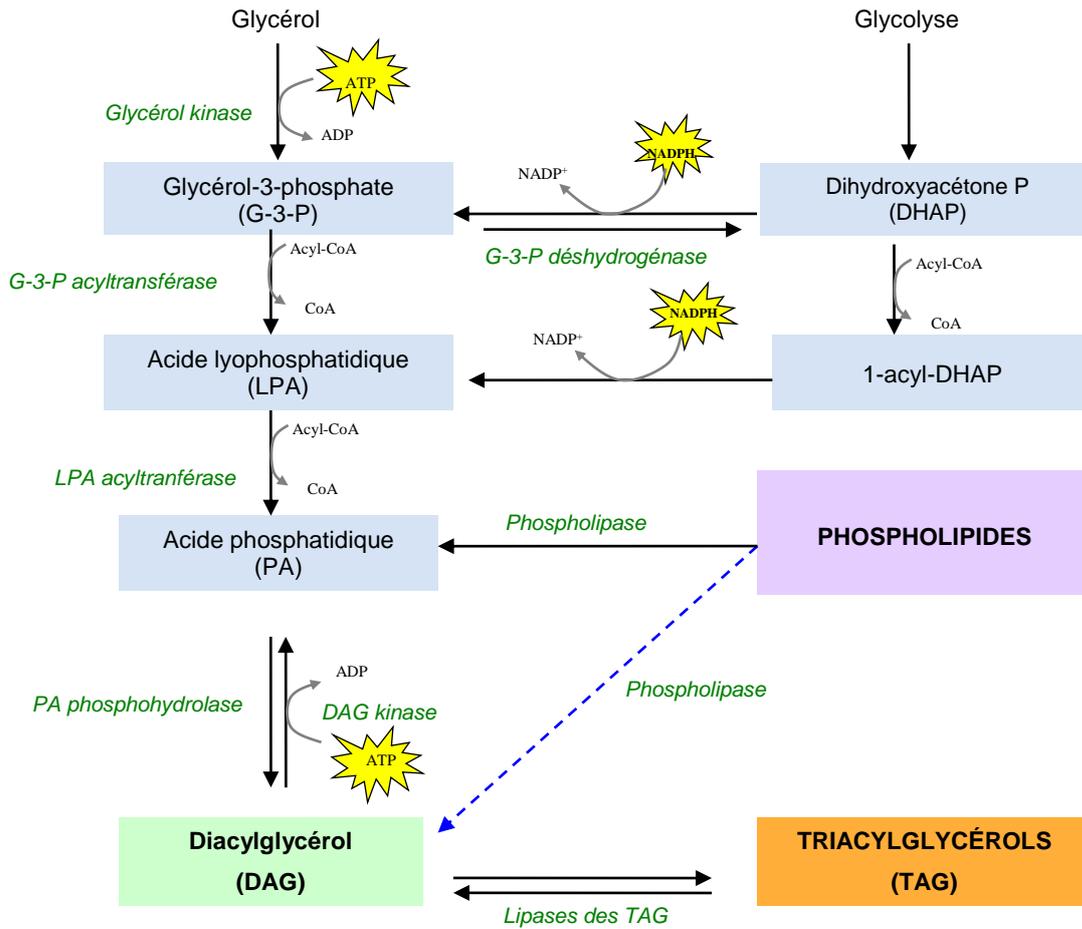


Figure 10. Synthèse des triacylglycérols. Modifié d'après Sorger et Daum 2003

Les voies impliquées dans le métabolisme du glycérol chez la levure sont montrées dans la figure suivante :

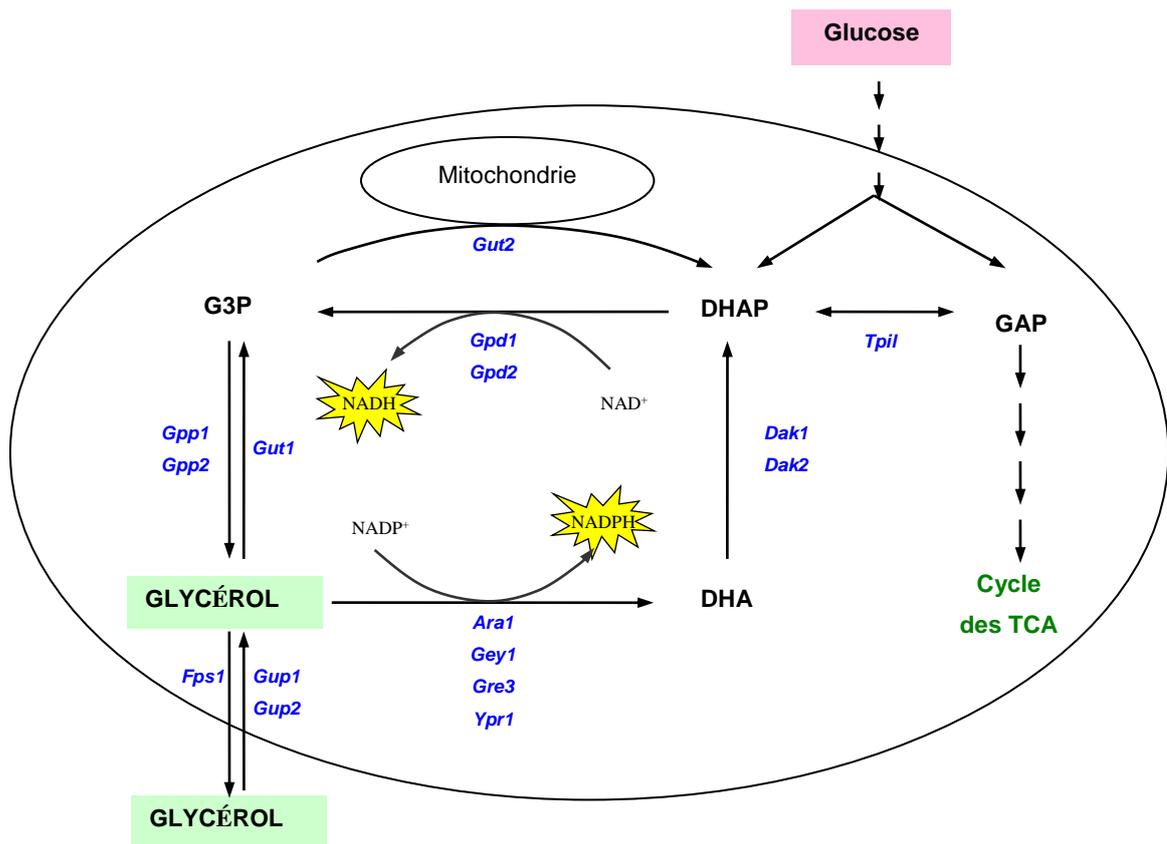


Figure 11. Voies impliquées dans le métabolisme du glycérol chez la levure *S. cerevisiae*. Modifié d'après Springer Images (2011).

Le glycérol est formé à partir de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en deux étapes catalysées par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (codée par *Gpd1* et *Gpd2*) et la glycérol-3-phosphate-phosphatase (codé par *Gpp1* et *Gpp2*). En plus, chez la levure le glycérol peut être catabolisé par la voie des transporteurs *Gup1* et *Gup2* ou le glycérol est converti à dihydroxyacétone (Kapoor 1982) par la glycérol déshydrogénase  $\text{NADP}^+$ -dépendante (codée par *Ara1*, *Gcy1*, *Gre3*, *Ypr1*), en glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et glycérol-3-phosphate (G3P).

#### 1.4.4 Synthèse de lipides « *ex-novo* »

*Yarrowia lipolytica* a développé des mécanismes qui lui facilitent l'incorporation des substrats hydrophobes tels que les acides gras, les huiles ou les triacylglycérols.

Les phases intervenant dans la synthèse de lipides « *ex novo* » ou dégradation chez *Y. lipolytica* sont :

1. l'activation des acides gras en esters-CoA

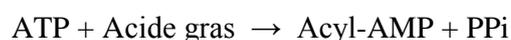
- 
2. la  $\beta$ -oxydation, où les esters-CoA subissent soit une dégradation en acétyl-CoA (pour des acides gras à chaîne paire) et propionyl-CoA (pour des acides gras à chaîne impaire) soit une incorporation directe des acyls gras aux lipides cellulaires après une élongation et désaturation de la chaîne carbonée
  3. la  $\omega$ -oxydation, où les alcanes afin d'être dégradés, subissent une oxydation par le système cytochrome P450 monooxydase situé au réticulum endoplasmique et aux peroxysomes
  4. une synthèse des intermédiaires du cycle de TCA à partir des acétyls-CoA par la voie du cycle de glyoxylate suivi de la gluconéogenèse et l'activation du cycle du méthyle citrate pour l'utilisation du propionyl-CoA (Ota, Gomi *et al.* 1982 ; Fickers, Benetti *et al.* 2005)

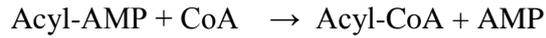
#### 1.4.4.1 Activation des acides gras

Chez les levures, il existe deux sources d'approvisionnement d'énergie à partir des acides gras : les triacylglycérols stockés dans les corps lipidiques et les acides gras extérieurs. L'oxydation des acides gras s'effectue dans les peroxysomes et cette biogénèse est induite par la croissance des levures dans des acides gras (Hiltunen, Wenzel *et al.* 1992; Hiltunen, Mursula *et al.* 2003). L'utilisation de ces acides gras représente, en quelque sorte, un problème du fait qu'ils doivent être transportés aux peroxysomes pour leur dégradation. La levure a développé différents systèmes pour effectuer ce transport :

1. au travers du transport de surface, réalisé par des surfactants tels que les lipases et émulsifiants permettant ainsi une réduction de la taille des gouttes lipidiques (Ota, Gomi *et al.* 1982; Pereira-Meirelles, Rocha-Leao *et al.* 2000)
2. au travers du transport interfaciale direct qui implique la formation de protubérances permettant la fixation des substrats hydrophobes à la surface cellulaire (Fickers, Benetti *et al.* 2005; Beopoulos, Chardot *et al.* 2009)
3. par l'action de protéines membranaires telles que les acyl-CoA synthétases

Les enzymes acyl-CoA synthétases activent les acides gras au travers d'un mécanisme ATP/CoA-dépendant qui commence par la formation d'un intermédiaire acyl-AMP (Bartana, Shapiro *et al.* 1972; Bartana, Rose *et al.* 1973 ; Jandrositz, Petschnigg *et al.* 2005) :





La première réaction est favorisée vers l'acyl-ATP par l'hydrolyse du pyrophosphate inorganique (Dujon, Sherman *et al.*) à phosphate organique (2Pi). Chez *Yarrowia lipolytica* l'acyl-CoA synthétase est codée par le gène FAT1 (Beopoulos, Nicaud *et al.* 2011).

En plus de l'action acyl-CoA synthétase, les acides gras sont pris en charge par d'autres systèmes de transport tels que les protéines de liaison des acides gras (FABPs), les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) ou les systèmes PXA et PEX11 (Lida, Sumita *et al.* 2000; Beopoulos, Nicaud *et al.* 2011). Une fois que les acides gras sont activés, ils peuvent ensuite être dégradés par la voie de la  $\beta$ -oxydation pour la production d'énergie. Dans le cas des alcanes, ils doivent suivre des autres modifications au travers de la  $\omega$ -oxydation avant de pouvoir être utilisés comme source d'énergie.

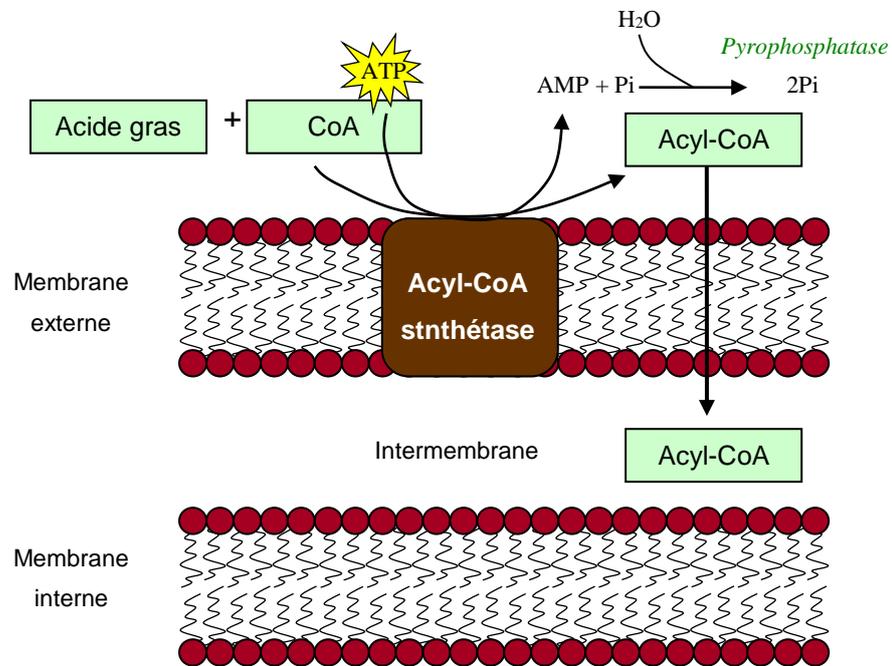


Figure 12. Activation des acides gras

#### 1.4.4.2 $\beta$ -oxydation

La  $\beta$ -oxydation est la voie principale de dégradation des acides gras et est un processus de plusieurs étapes nécessitant l'action de quatre enzymes différentes. Un tour de cycle amène à la libération des 2 atomes de carbone de l'acide gras ( $C_n-2$ ) et ce cycle peut être répété jusqu'à l'obtention de la molécule d'acétyl-CoA. Les étapes faisant partie de la  $\beta$ -oxydation, après l'activation de l'acide gras par l'acyl-CoA synthétase, sont :

1. L'oxydation de l'acyl-CoA entre les carbones  $\beta$  et  $\alpha$  (positions 2 et 3) en trans- $\Delta^2$ -énoyl-CoA. Chez *Y. lipolytica*, cette réaction est catalysée par 6 diffé-

---

rentes acyl-CoA oxydases (codées par POX1 à POX6) spécifiques à la longueur de la chaîne carbonée (Nicaud, Le Clainche *et al.* 1998 ; Wang, Le Dall *et al.* 1999 ; Luo, Nicaud *et al.* 2002). L'acyl-CoA oxydase 2 et 3 sont spécifiques aux acides à chaîne longue et courte, respectivement (Wang *et al.* 1999)

2. Conversion du trans- $\Delta^2$ -énoyl-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA et ensuite en 3-ketoacyl-CoA. Cette réaction est réalisée par une même enzyme NAD<sup>+</sup>-dépendante possédant les fonctions de 2-énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et elle est codée par le gène FOX2 (MFE1)
3. Clivage final du 3-ketoacyl-CoA conduisant à la formation un acyl-CoA (Cn-2) et acétyl-CoA. Réaction catalysée par une  $\beta$ -ketoacyl-CoA thiolase peroxy-somale (codée par POT1). D'après Yamagami *et al.* 2001, il existerait un deuxième ketoacyl-CoA thiolase (codée par PAT1) qui participe elle aussi dans cette dernière réaction

Les cycles de la  $\beta$ -oxydation peuvent être interrompus suivant la nature de l'acyl-CoA, la disponibilité de substrat, CoA, acétyl-CoA ou la disponibilité de NADH (Minard et McAlister-Henn 1999 ; Smith, Brown *et al.* 2000).

L'acétyl-CoA produit doit être transporté des peroxysomes à la matrice mitochondriale pour être métabolisé. Il existe 2 voies permettant ce transport : par le cycle du glyoxylate et par la voie de l'acétyl-carnitine acyl-transférase.

Le cycle du glyoxylate est une voie permettant la conversion des 2 unités d'acyl sous la forme d'acétyl-CoA en une molécule de succinate (Figure 13). Cette voie utilise quelques enzymes du cycle de l'acide citrique mais évite les réactions de perte de carbone. Une deuxième molécule d'acétyl est introduite dans cette voie permettant ainsi l'incorporation de 2 atomes de carbone à chaque tour de cycle résultant à la formation d'une molécule à 4 atomes de carbone. Le succinate généré est transporté vers la mitochondrie où il est converti en oxaloacétate. D'après Duntze *et al.* 1969, les enzymes isocitrate lyase, malate synthase et la malate déshydrogénase seraient réprimées quand *S. cerevisiae* est cultivé sur glucose et induites sur d'autres sources carbonées.

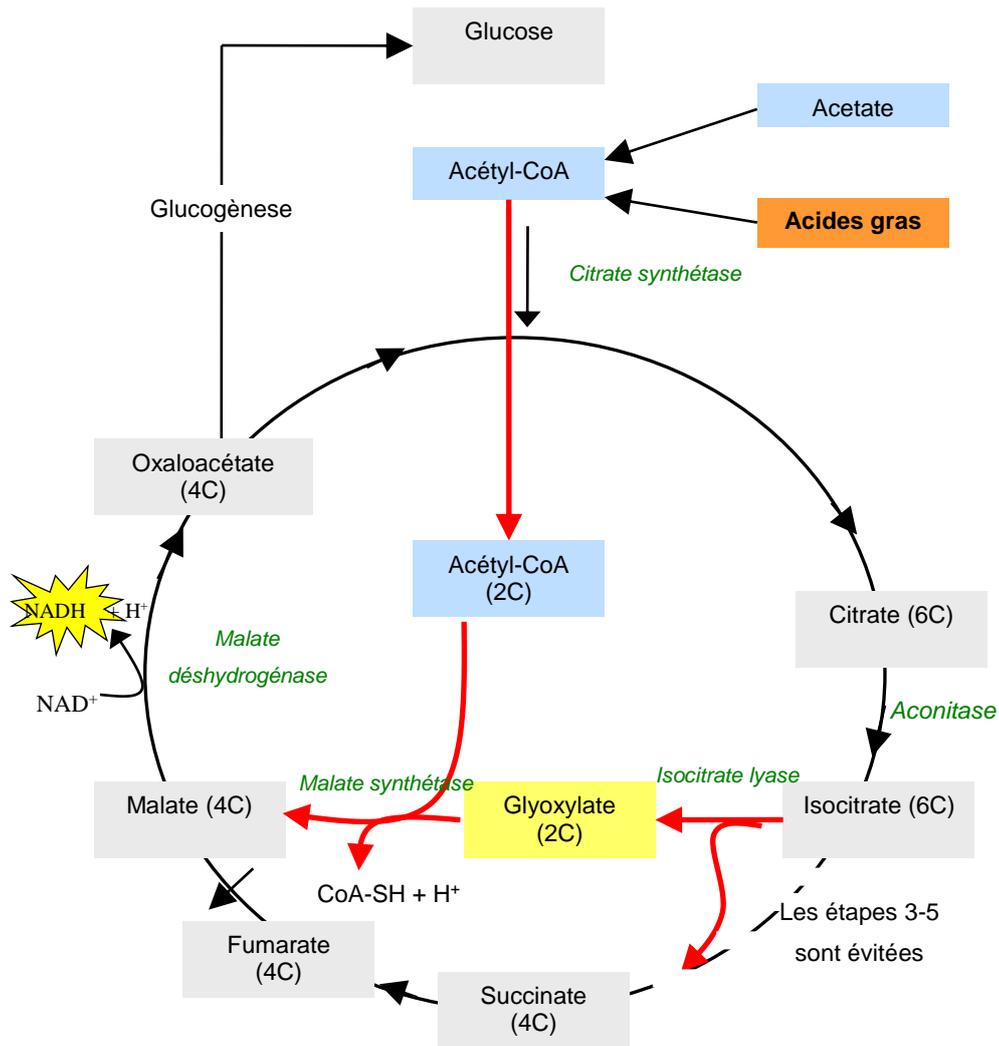


Figure 13. Réactions du cycle du glyoxylate. Modifié d'après Mathews 2002

La deuxième voie implique la conversion peroxysomale de l'acétyl-CoA en acétyl-carnitine et le transport aux mitochondries, réaction catalysée par l'acétyl-carnitine acyl-transférase, codée par CAT2 et localisée dans les peroxysomes et les mitochondries.

Le produit final de l'oxydation des acides gras, l'acétyl-CoA, doit être transporté en tant qu'acétyl-carnitine du fait qu'il ne peut pas traverser la membrane, réaction catalysée par l'acétyl-carnitine acyl transférase (Van Roermund, Hetteema *et al.* 1999) (Figure 14) :

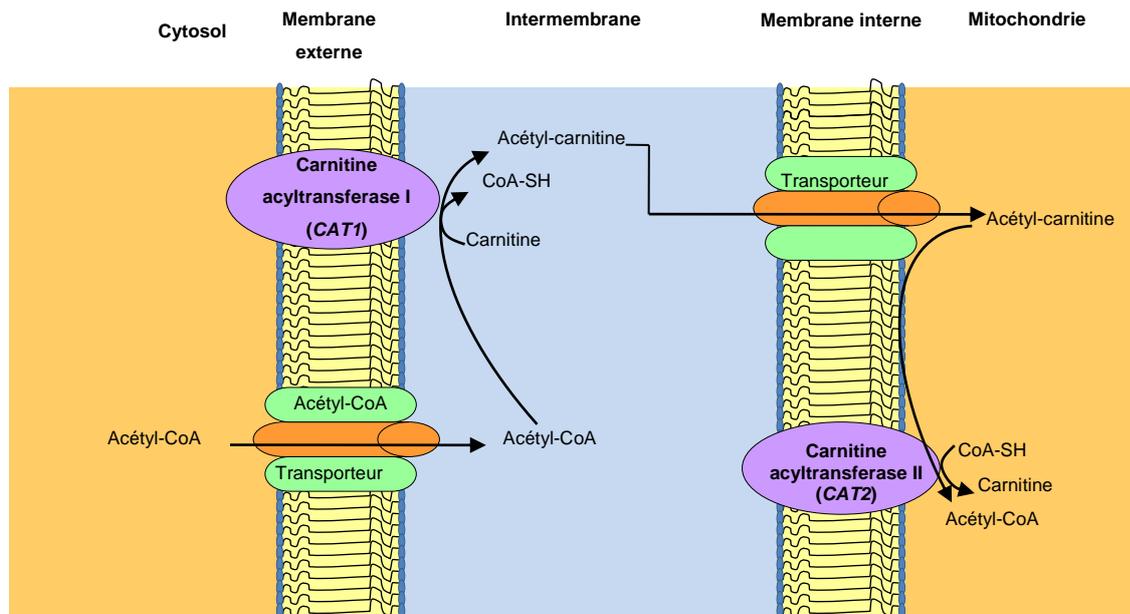


Figure 14. Cycle de la carnitine pour le transport des acétyl-CoA. Modifié d'après Mathews 2002

### 1.4.4.3 $\omega$ -oxydation

L'oxydation monoterninale aussi appelée oxydation primaire des alcanes ou  $\omega$ -oxydation et inclut 3 étapes :

1. Hydroxylation terminale par l'action d'une mono-oxydase d'alcanes cytochrome P450-dépendante (codée par ALK) ou par l'action d'une  $\omega$ -hydroxylase acide gras-dépendante. Cette étape permet la formation d'un alcool gras ou un acide gras  $\omega$ -hydroxylé, respectivement (Coelho M.A.Z. 2010). Chez *Y. lipolytica*, ALK est constitué par 12 gènes différents (Lida, Sumita *et al.* 2000 ; Dujon, Sherman *et al.* 2004)
2. Conversion du groupe terminal hydroxylé (1-alkanol, 1, $\omega$ -diols ou de l'acide gras  $\omega$ -hydroxylé) en ses aldéhydes gras correspondants, catalysée par l'action d'une alcool déshydrogénase  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -dépendante (codée par ADH) ou par une alcool oxydase (codée par FAO)
3. Oxydation des aldéhydes gras en acides gras ou production des acides dicarboxyliques à partir des acides gras. Etape catalysée par une aldéhyde déshydrogénase  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -dépendante (codée par ALD) localisée au réticulum endoplasmique et aux peroxysomes (Fickers, Benetti *et al.* 2005).

---

### 1.4.5 Accumulation lipidique

L'accumulation lipidique a lieu normalement quand la levure est cultivée en présence des grandes quantités de la source carbonée tandis que la source azotée est limitée. Dans ces conditions, l'excès de la source carbonée est dirigé vers l'accumulation des lipides sous la forme de triacylglycérols dans le réticulum endoplasmique et les corps lipidiques.

#### 1.4.5.1 Rôle de l'AMP

Dans les années 70, les premières études sur la concentration intracellulaire des nucléotides adénine ont été réalisés afin de pouvoir différencier en termes énergétiques les microorganismes oléagineux des microorganismes non-oléagineux (Atkinson *et al.*, 1977). Il a été observé que la concentration d'adénosine monophosphate (AMP) diminue de 5% après un épuisement d'azote chez les microorganismes oléagineux ; chez les microorganismes non-oléagineux la concentration d'AMP ne varie pratiquement pas (Botham et Ratledge, 1997).

L'enzyme responsable de cette diminution est l'AMP désaminase (Evans and Ratledge 1985c) catalysant la réaction suivante :



Cette enzyme pourrait être aperçue comme le mécanisme permettant d'atténuer la déficience d'azote nécessaire à la synthèse des protéines et des acides nucléiques pour la prolifération cellulaire à court-terme lorsqu'une limitation nutritionnelle s'impose. D'après Wynn *et al.*, 2001 (Wynn, Hamid *et al.* 2001), ce mécanisme engendre aussi un ralentissement de la consommation d'oxygène après l'épuisement d'azote dans le milieu de culture chez les microorganismes oléagineux.

#### 1.4.5.2 Événements de l'accumulation lipidique

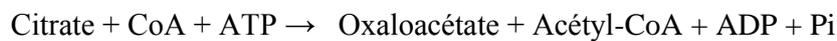
Lorsque la concentration d'AMP intracellulaire diminue drastiquement, toute une série d'événements est déclenchée, fournissant ainsi les précurseurs pour l'accumulation lipidique :

1. Ralentissement de la croissance cellulaire et de la production de biomasse catalytique durant la phase transitoire d'accumulation lipidique dû à la répression de certaines voies métaboliques tels que la synthèse des acides nucléiques et des protéines entraînées par la limitation nutritionnelle

- 
2. Inhibition de l'enzyme  $\text{NAD}^+$  isocitrate déshydrogénase, AMP-dépendante, bloquant ainsi le cycle des acides tricarboxyliques au niveau de l'isocitrate (Botham et Ratledge 1979)
  3. Equilibre entre l'isocitrate et le citrate par action de l'enzyme aconitase, capable de demeurer stable sous une limitation carbone ou azote (Evans et Ratledge 1983 ; Evans, Scragg *et al.* 1983) :



4. Efflux du citrate de la mitochondrie grâce au complexe citrate/malate translocase pour être ensuite clivé dans le cytosol par l'action de l'enzyme ATP citrate lyase, présente dans tous les microorganismes oléagineux (Ratledge 2002 ; Ratledge 2004) catalysant la réaction suivante :



5. L'oxaloacétate est converti en malate par l'enzyme malate déshydrogénase et continue son flux vers la mitochondrie dans le cycle de TCA. L'oxaloacétate initial débutant la réaction provient de la carboxylation du pyruvate de la glycolyse par la pyruvate carboxylase
6. L'acétyl-CoA est converti en malonyl-CoA par l'action de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (codée par ACC1, Al-feel *et al.*, 1992) au travers de la condensation d'un acétyl-CoA et un anion carbonate :

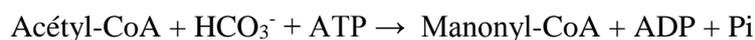
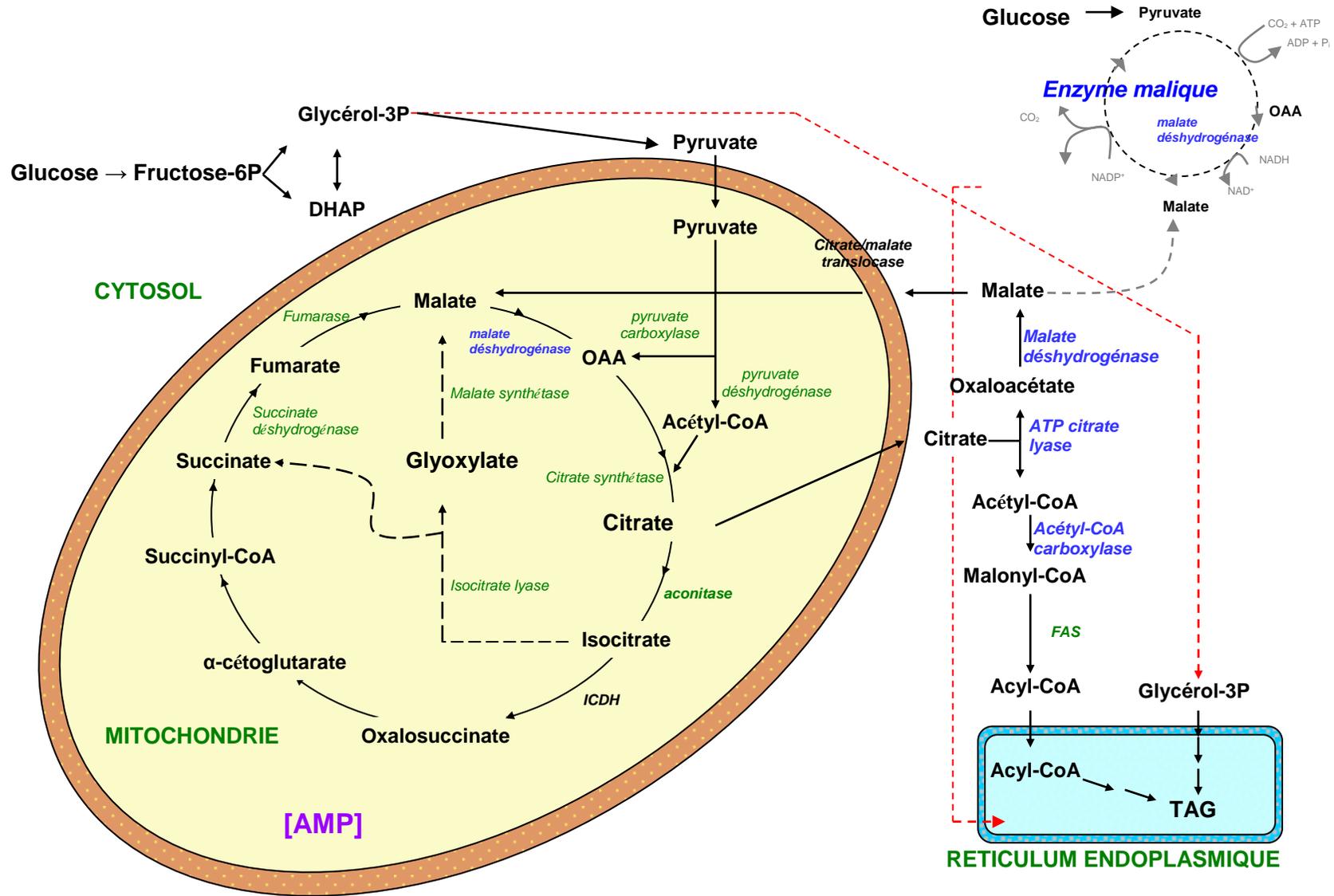


Figure 15. Evénements de l'accumulation lipidique



---

## 1.5 Métabolisme du citrate

Le cycle du citrate, cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs, a été identifié par Hans Krebs en 1937 (Krebs 1937). Le cycle des TCA implique la conversion des sucres, acides gras ou protéines en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O.

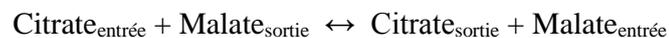
Les levures possèdent deux mécanismes de métabolisme du citrate : le premier par oxydation mitochondriale et le deuxième par clivage cytosolique.

Le mécanisme par lequel *Y. lipolytica* produit un excès d'acide citrique est encore un problème de grand intérêt. En général, la croissance de *Y. lipolytica* en milieu riche n'entraîne pas une production élevée d'acide citrique (Crolla et Kennedy 2001), néanmoins cette production peut augmenter dans des conditions très contrôlés.

Botham et Ratledge (Botham et Ratledge 1979) ont proposé que le rôle oxydatif du cycle de l'acide citrique serait interrompu par l'inactivation de l'enzyme isocitrate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante :



D'après Evans et al. 1983 (Evans, Scragg et Ratledge 1983a), un point important de la régulation du cycle des TCA est le système citrate/malate translocase, présentant une spécificité pour le citrate, isocitrate, cis-aconitase et L-malate, permettant l'échange suivant :



Cet échange est stimulé par le pyruvate et le phosphate (Evans et Ratledge 1985a) et le transport d'un proton dans la même direction que le citrate pendant l'échange (McGivan and Klingenberg 1971 ; Robinson, Williams *et al.* 1971).

Le rôle plus important attribué au citrate chez les microorganismes oléagineux est l'effet inhibiteur sur la phosphofructokinase (PFK) (Evans et Ratledge 1984b) qui est un point de contrôle important du flux de carbone à travers la glycolyse chez la majorité des microorganismes oléagineux ainsi que l'effet inhibiteur sur la pyruvate kinase (Evans et Ratledge 1985a) entraînant ainsi une accumulation de citrate dans la cellule (Figure 16) :

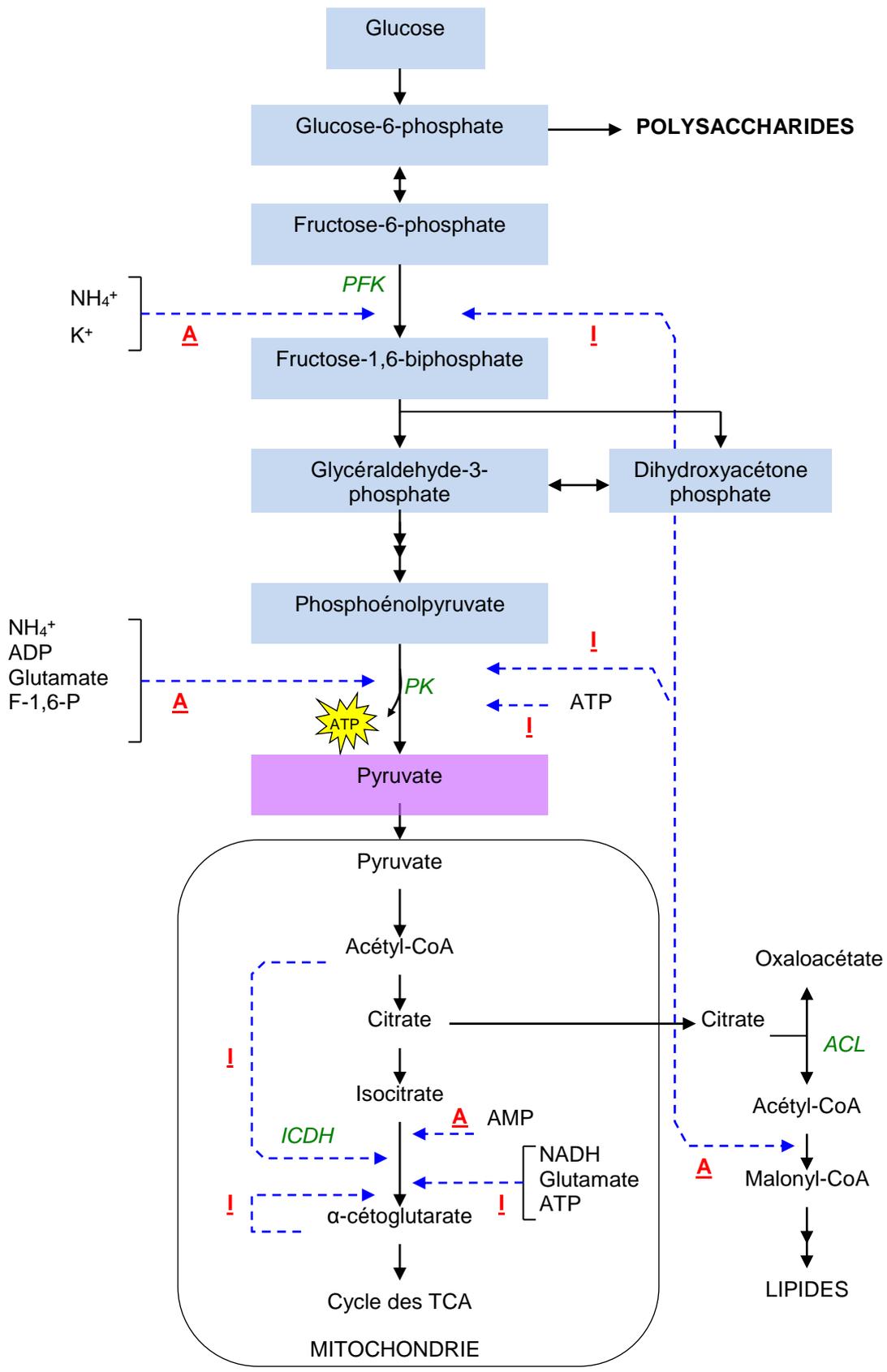


Figure 16. Points principaux de régulation du citrate et d'autres métabolites sur le flux de carbone provenant du glucose aux lipides. Modifié d'après Evans and Ratledge 1985b. A= activation, I=Inhibition

---

## 1.6 Enzymes clés de l'accumulation des lipides et du citrate

### 1.6.1 Isocitrate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante (ICDH)

Cette enzyme consiste en huit sous-unités identiques d'une masse molaire de 52 kDa (Morgunov *et al.* 2004a). L'isocitrate déshydrogénase NAD<sup>+</sup> dépendante, (EC 1.1.1.4) joue un rôle important dans la production des lipides et la surproduction de citrate. Elle catalyse la réaction de décarboxylation oxydative de l'isocitrate. Kornber et Pricer (Kornberg et Pricer 1951), ont montré que l'isocitrate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante nécessite de l'AMP pour exhiber l'activité du fait qu'elle possède qu'un site allostérique pour sa fixation, cette interaction augmente l'affinité de l'enzyme pour l'isocitrate (Hathaway et Atkinson 1963 ; Evans et Ratledge 1985 ; Gabriel et Plaut 1991).

L'ATP et le NADH inhibent l'activité de l'ICDH-NAD<sup>+</sup>dépendante chez *Yarrowia lipolytica* (Barnes, Atkinson *et al.* 1972 ; Sokolov, Solodovnikova *et al.* 1995). D'après Morgunov *et al.*, 2004 (Morgunov *et al.* 2004b), cette inhibition provient du fait qu'après une limitation nutritionnelle en azote, la biosynthèse des composants azotés tels que les protéines et nucléotides est interrompue, et afin d'améliorer l'approvisionnement d'énergie dans la cellule les ratios ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup> augmentent bloquant ainsi le cycle des TCA au niveau de l'ICDH-NAD<sup>+</sup>-dépendante; en conséquence la réaction d'équilibre de l'aconitase permet d'excréter l'excès d'acide citrique de la mitochondrie. Les intermédiaires du cycle des TCA impactent très faiblement l'activité de l'enzyme (Tableau 7) :

Tableau 7. Effet des quelques métabolites sur l'activité de l'ICDH-NAD<sup>+</sup>-dépendante chez *Y. lipolytica* VKM Y-2373. D'après Morgunov 2004.

Métabolite (10 mM)	Activité enzymatique (%)
Test contrôle sans l'ajout de métabolites	100
Oxaloacétate	86,5
Citrate	91,1
Succinate	97,2
Fumarate	93,2
Malate	93,2
Glyoxylate	79,0
$\alpha$ -Ketoglutarate	91,3
Glutamate	99,8

## 1.6.2 Malate déshydrogénase (MD)

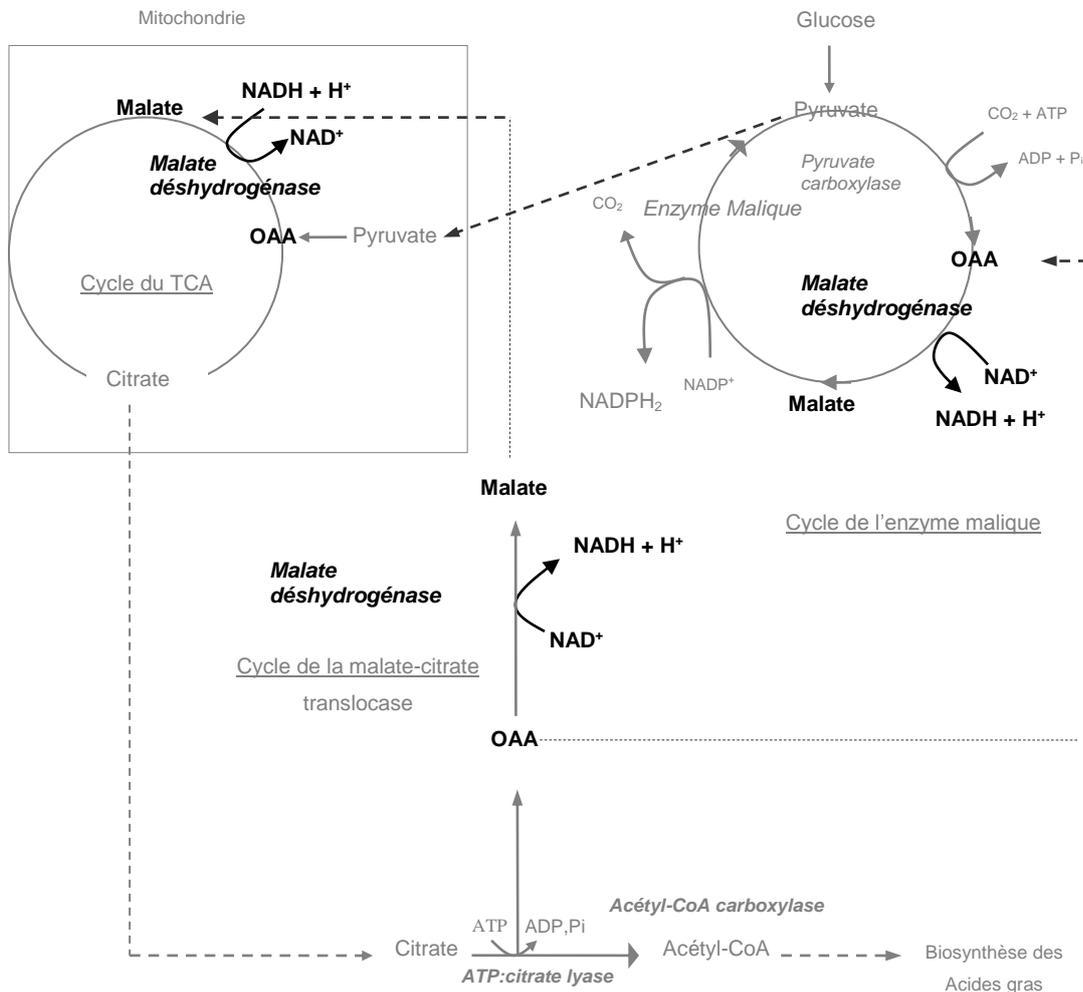


Figure 17. Réactions de l'enzyme malate déshydrogénase.

L'enzyme malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37) codé par YALI0D16753g chez *Yarrowia lipolytica* (Genolevures, 2011) est une oxydoréductase catalysant la conversion du malate en oxaloacétate, réaction réversible utilisant les cofacteurs  $\text{NAD}^+$  et  $\text{NADH}$ , respectivement (Minarik, Tomaskova *et al.* 2002).

Elle existe sous trois isoformes chez la levure. Le premier isoforme est une des enzymes principales du cycle des TCA localisée dans la mitochondrie. Le deuxième isoforme est localisé dans les peroxysomes catalysant la production du malate à partir du glyoxylate dans le cycle du glyoxylate (Minard et McAlisterhenn 1991). La troisième isoforme participe dans la voie malate/aspartate au cytosol permettant l'échange des équivalents réducteurs à travers de la membrane mitochondriale sous la forme de malate/oxaloacétate plutôt que sous la forme de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Minarik, Tomaskova *et al.* 2002).

La malate déshydrogénase mitochondriale est régulée allostériquement par le malate, l'oxaloacétate et le citrate du fait qu'ils se lient au même site allostérique (Mullinax, Mock *et al.* 1982 ; Mullinax, Mock *et al.* 1982 ; Fahien, Kmiotek *et al.* 1988). Cependant, sous une forte concentration de malate et de  $\text{NAD}^+$  ( $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  et  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ , respectivement) le citrate augmente l'activité de l'enzyme (Gelpi *et al.* 1992).

### 1.6.3 ATP citrate lyase (ACL)

L'ATP citrate lyase (EC 2.3.3.8) a été découverte dans le foie de poulet par Srere et Lipmann en 1952 (Srere et Lipmann 1953). Cette enzyme est directement corrélée au phénomène d'oléaginité. Elle est présente chez tous les microorganismes dits « oléagineux » capables d'accumuler au-delà du 20% des lipides (Boulton et Ratledge 1981). L'ATP citrate lyase converti le citrate qui efflux de la mitochondrie au cytosol en acétyl-CoA et en oxaloacétate, fournissant ainsi les précurseurs pour la lipogénèse (Srere 1975).

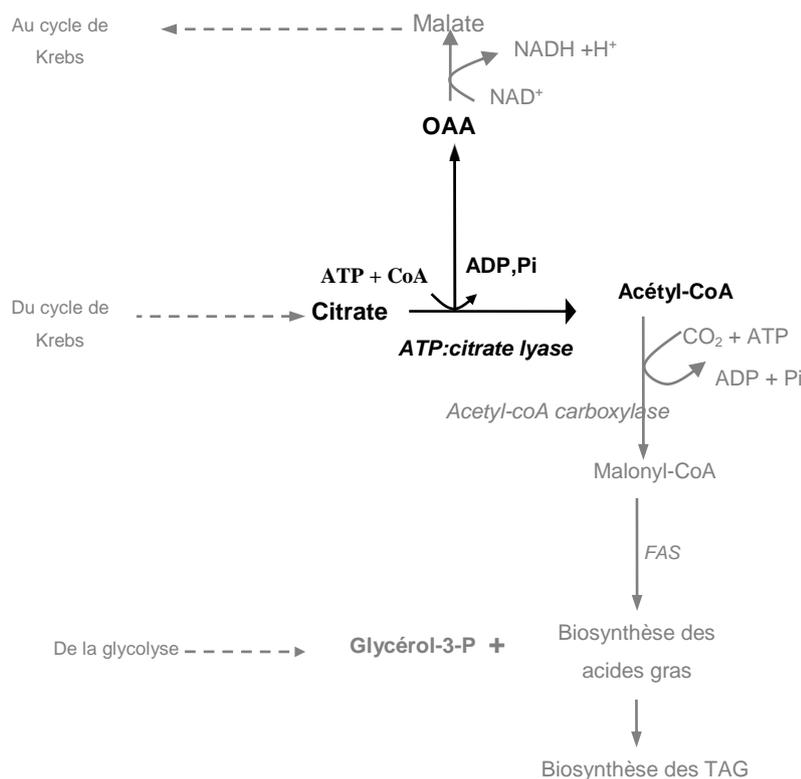


Figure 18. Réactions de l'enzyme ATP citrate lyase.

Son activité est maximale pendant l'accumulation lipidique (Holdsworth *et al.* 1988) et à un pH entre 8,2 et 8,6, elle est stimulée par la présence des ions ammonium et dépendante de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  (Boulton et Ratledge 1983). Holdsworth *et al.* 1988, ont observé que son activité

diminue quand la levure utilise des lipides endogènes ou exogènes. Elle est inhibée par les esters d'acides gras (Boulton and Ratledge 1981) qui sont les premiers produits lors de la dégradation des triacylglycérols. Chez *Yarrowia lipolytica*, l'ATP citrate lyase consiste en deux sous-unités, Aclap et Aclbp, codés par les gènes ACL1 (YALI0E34793g) et ACL2 (YALI0D24431g), respectivement (Beopoulos, Cescut *et al.* 2009).

#### 1.6.4 Acétyl-CoA carboxylase (ACC)

L'enzyme acétyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2) a été identifiée par la première fois en 1958 par Formica et Brady (Formica et Brady 1959) et par Bressler et Wakil (Bressler et Wakil 1961) observant une carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl CoA pendant la formation de malonyl CoA.

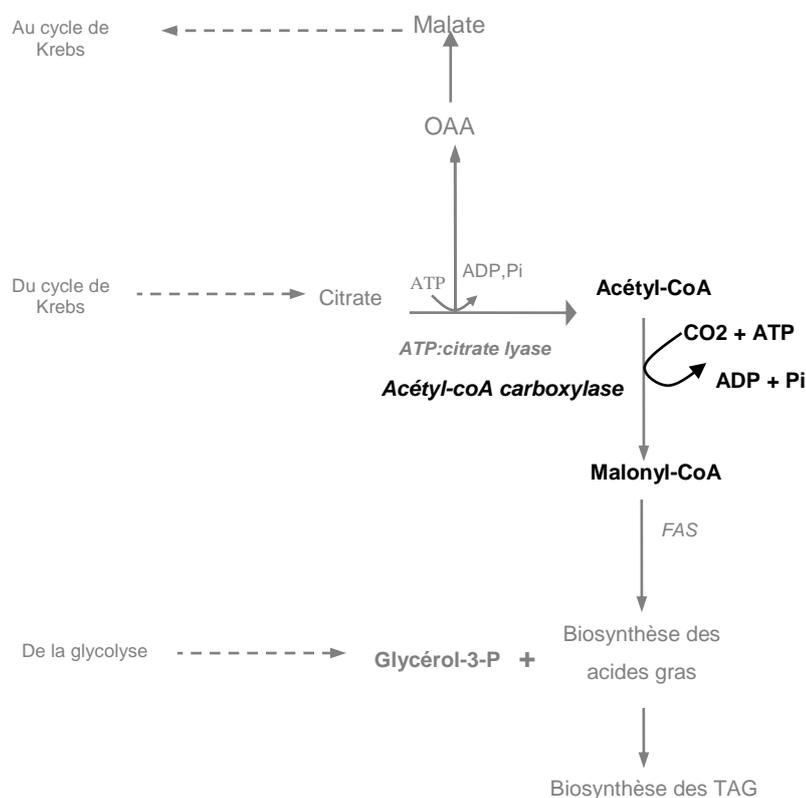


Figure 19. Réactions de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase

D'après plusieurs auteurs l'acétyl CoA carboxylase serait la principale enzyme impliquée dans la biosynthèse des lipides (White et Klein 1966 ; Gill et Ratledge 1973 ; Volpe et Vagelos 1973).

Chez la levure, l'enzyme consiste en 4 sous unités d'une masse molaire de 265 kDa (Witters et Watts 1990) et elle est active sous forme d'un complexe tetramérique (Obermayer et Lynen 1976). Son activité est régulée allostériquement et stimulée par le citrate (Botham et Ratledge 1979) et par le  $Mg^{2+}$  (Gill et Ratledge 1973) et elle est dépendante de l'étape de croissance.

L'activité de l'enzyme est fortement stimulée par le polyéthylène glycol de masse molaire élevée (Mishina *et al.* 1976a) due à la capacité des polymères à précipiter les protéines (Polson *et al.* 1964). D'après Chun *et al.*, 1967 (Chun *et al.* 1967), la précipitation des protéines par le polyéthylène glycol implique une déshydratation locale et en conséquence un changement de la constante diélectrique du milieu entourant la protéine.

Chez *Yarrowia lipolytica*, l'activité enzymatique de l'acétyl-CoA carboxylase est réduite quand elle est cultivée sur n-alkanes par rapport aux cultures sur glucose, exerçant un impact majeur le n-heptadecane, le n-octadecane, l'acide oléique et l'acide linoléique, respectivement (Mishina *et al.* 1976b). Les n-alkanes à courte chaîne ainsi que les acides gras saturés impactent aussi l'activité mais à un degré moindre.

Chez *Y. lipolytica*, cette enzyme est codée par le gène ACC (YALI0C11407g) (Genolevures, 2011).

### 1.6.5 Enzyme malique

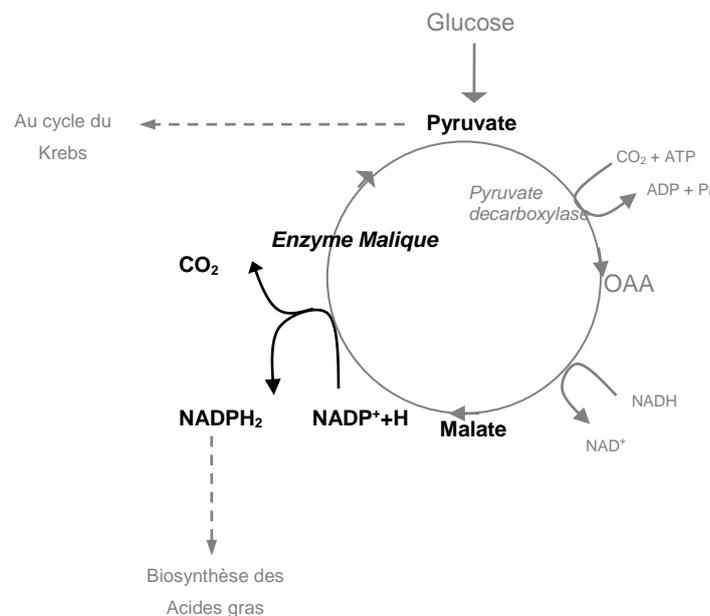


Figure 20. Réactions de l'enzyme malique

---

L'enzyme malique est responsable de la décarboxylation irréversible du malate en pyruvate avec la formation de NADPH<sub>2</sub> à partir de NADP<sup>+</sup>. Divers auteurs ont rapporté que la fonction principale de l'enzyme malique serait le métabolisme du pyruvate (Zink et Katz 1973 ; McCullough 1974) tandis que d'autres ont mis en évidence que le rôle principal de cette enzyme serait d'être la source principale de NADPH<sub>2</sub> pour la synthèse de lipides « *de novo* » et la désaturation (Evans et Ratledge 1985 ; Kendrick et Ratledge 1992), néanmoins d'après Ratledge (Ratledge 2002), l'enzyme malique fournirait moins de 15 % des besoins en NADPH chez *M. circinelloides*.

D'autres enzymes portent aussi le rôle de fournir les NADPH<sub>2</sub> nécessaires à la synthèse de lipides et la désaturation telles que l'isocitrate déshydrogénase NADP<sup>+</sup>-dépendante, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase.

---

## 1.7 Facteurs influençant l'accumulation des métabolites chez *Yarrowia lipolytica*

### 1.7.1 La source carbonée

Les propriétés des particules lipidiques dépendent de la source de carbone utilisée. Les particules lipidiques de *Yarrowia lipolytica* cultivée sur glucose sont sous la forme principalement de triacylglycérols et en moindre proportion de steryls esters pouvant avoir un diamètre interne de 650 nm. Quand cultivé sur acide oléique, le contenu en triacylglycérols et steryl esters diminue drastiquement et le contenu d'acide oléique dans la cellule augmente ainsi que la taille des particules lipidiques d'un facteur 3,8 (Athenstaedt *et al.* 2006).

La concentration de la source de carbone est aussi un facteur clé pour l'accumulation des métabolites chez *Y. lipolytica* influençant directement le rapport N/C dans le milieu de culture (Antonucci, Bravi *et al.* 2001 ; Crolla et Kennedy 2001). Par exemple, d'après Kapoor 1982 une concentration de 15-18 % de sucre induirait la production de citrate en mode batch ; Xu *et al.* 1989 indiquent que la concentration optimale pour la production de citrate serait 10 % tandis que Honecker *et al.* 1989 ont rapporté une production de citrate maximale en utilisant une concentration de 20 %.

L'utilisation d'éthanol comme seule source de carbone entraîne principalement une production d'acide isocitrique (Finogenova *et al.* 1991) tandis que l'utilisation de glycérol comme seule source de carbone entraîne une production d'acide citrique (Rywinska, Rymowicz *et al.* 2010).

### 1.7.2 Co-substrats

Le glucose est le substrat utilisé couramment pour la production de citrate. Parallèlement, l'utilisation de co-substrats est aussi étudiée par divers auteurs. Papanikolaou *et al.* 2006 ont étudié l'impact d'utiliser le glucose et la stéarine comme co-substrats sur la production de lipides et d'acide citrique. Ils ont observé que la présence de stéarine n'influence pas la vitesse maximale de production de citrate ou le rendement citrate sur glucose, néanmoins la quantité de lipides produits a varié de 4 à 20 % (en masse). D'après Papanikolaou 1998, *Y. lipolytica* aurait préférence à consommer le glycérol parmi des mélanges de glycérol, glucose, oléate et stéarine.

### 1.7.3 Nutriments

L'accumulation lipidique chez les levures oléagineuses nécessite une limitation nutritionnelle pour pouvoir être déclenchée. Diverses études avec des limitations en phosphore, zinc, fer

---

ou magnésium ont été réalisées permettant que l'excès de carbone soit dirigé vers l'accumulation de lipides (Granger *et al.* 1993). Les meilleurs rendements d'accumulation de lipides sont obtenus en réalisant une limitation en azote (Yamauchi *et al.* 1983). Dans ces conditions, l'augmentation du contenu des acides gras provient de la synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés (Choi, Ryu *et al.* 1982; Hansson et Dostalek 1986). Les nutriments exerçant l'impact le plus important sur la production de métabolites chez les levures oléagineuses sont décrits à continuation.

### **1.7.3.1 L'azote**

La nature de la source azotée peut influencer les caractéristiques de croissance de *Y. lipolytica* ainsi que la production des lipases (PereiraMeirelles, RochaLeao *et al.* 1997 ; Fickers, Nicaud *et al.* 2004). Utiliser une source d'azote organique augmente le contenu lipidique chez certaines levures telles que *Rhodosporidium toruloides* CBS 14 quand elle est cultivée sous la présence de urée, thréonine, aspartate, asparagine, glutamate et arginine (Evans et Ratledge 1984a). Une limitation de cet élément est associée au phénomène d'accumulation lipidique (Ratray, Schibeci *et al.* 1975 ; Granger, Perlot *et al.* 1993; Ratledge et Wynn 2002) et à la production d'acide citrique (Anastassiadis *et al.* 2002).

Greshnykh (Greshnykh 1968) a comparé l'influence d'utiliser  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  comme sources d'azote chez *C. tropicalis*, il a montré que l'utilisation d'une source azotée plus oxydée entraîne un ralentissement de la croissance avec une augmentation de la production de TAG.

### **1.7.3.2 Le phosphore**

Le phosphore est essentiel pour la croissance chez les levures (Suomalainen 1971). Une limitation en phosphore permet aussi de déclencher le phénomène d'accumulation lipidique chez les levures oléagineuses, néanmoins les rendements de production sont moins importants par rapport à une limitation en azote (Gill *et al.* 1977). Par contre une double limitation azote-phosphore améliore l'accumulation par rapport à une limitation simple en azote ou en phosphore (Gill *et al.* 1977).

### **1.7.3.3 Le magnésium**

Une limitation en magnésium augmente la production d'acide mystirique (C14:0) chez les levures oléagineuses (Gill *et al.* 1977). D'après Papanikolaou (Papanikolaou 1998), une limitation en magnésium inhibe l'enzyme acétyl-CoA carboxylase, Mg-dépendante.

---

#### 1.7.3.4 Le fer

Le fer est essentiel pour la production d'acide citrique du fait qu'il active la production d'acétyl-CoA essentiel pour la production de citrate (Milsom 1985). Néanmoins un excès de cet élément active la production de l'aconitase, l'enzyme qui catalyse la conversion d'acide isocitrique en acide citrique (Crolla and Kennedy 2001).

#### 1.7.4 Les vitamines

Différentes espèces levuriennes ont des besoins spécifiques en vitamines et sa limitation peut influencer le contenu et composition des lipides cellulaires. Par exemple, une déficience en inositol augmente l'accumulation lipidique sous la forme de triacylglycérols chez *Saccharomyces carlsbergensis* (Lewin 1965 ; Johnston et Paltauf 1970).

Une carence en acide pantothénique dans le milieu de culture diminue la production des lipides totaux chez *H. valbyensis* (Haskell et Snell 1965). D'après Hosono et Aida (Hosono et Aida 1974) ce comportement pourrait être lié au développement des mitochondries du à la diminution de diphosphatidyl glycérol et phosphatidyl éthanolamine.

Chez *H. valbyensis*, une carence de pyridoxine diminue la production lipidique, notamment la production de C16:1 (Haskell et Snell 1965) néanmoins la production de phospholipides reste inaltérée et la production de phosphatidyl inositol et phytolipides reste partiellement remplacée par une production de phosphatidyl choline et phosphatidyl éthanolamine. D'après Nagai (Nagai *et al.* 1974), ce comportement serait directement liée à la thiamine sous une déficience de pyridoxine.

Selon la source de carbone utilisée, *Y. lipolytica* peut également sécréter de l'acide pyruvique et de l'acide  $\alpha$ -ketoglutarique sous une limitation de thiamine (Finogeno, Illarion.Vi *et al.* 1973 ; Finogenova, Illarion *et al.* 1973 ; Chernyavskaya, Shishkanova *et al.* 2000). Quand cultivé sur glucose, *Y. lipolytica* nécessite 3 fois plus de thiamine par rapport a sa culture sur n-alkanes comme source carbonée (Finogenova *et al.* 2005).

#### 1.7.5 L'oxygène

Chez *Yarrowia lipolytica*, la disponibilité d'oxygène est un paramètre important pour la croissance, le métabolisme en général, la composition lipidique et la production d'acide citrique.

Une augmentation de la valeur de pO<sub>2</sub> de 20 % à 80 % de saturation occasionne une augmentation de la vitesse spécifique de production d'acide citrique de 17 à 29 mg.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> chez *Candida lipolytica* Y 1095 (Rane et Sims 1993). Varier la pO<sub>2</sub> de 90-95 % à 28-30 % de saturation altère aussi visiblement le métabolisme de *Y. lipolytica* 704, souche productrice d'acide

---

citrique, du fait qu'aux valeurs élevées de pO<sub>2</sub> (60-95 % de saturation) la souche montre ses valeurs maximales de taux de croissance ainsi qu'en vitesse spécifique de production d'acide citrique, tandis qu'aux valeurs de pO<sub>2</sub> de 28-30 % de saturation, le taux de croissance diminue d'un facteur 2 sans accumuler de l'acide citrique.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une régulation dans la synthèse de métabolites dépendante de l'apport d'oxygène dans le milieu de culture.

Kamzolova et al., (Kamzolova *et al.* 2003) ont observé que les besoins en oxygène chez *Y. lipolytica* N1 étaient dépendants de la concentration de fer dans le milieu. Dans cette étude à une valeur relativement faible de pO<sub>2</sub> et une haute concentration de fer la production d'acide citrique a été maximale à 120 g.L<sup>-1</sup>. L'addition composants perfluorocarbonés au milieu de culture semble augmenter la consommation d'oxygène chez *Y. lipolytica* (Amaral *et al.* 2006) du fait que la perméabilité de l'oxygène est plus importante avec la solubilité d'un facteur 10-20 fois par rapport à l'eau.

La consommation d'oxygène est modérée par deux oxydases terminales, le système cytochrome monooxydase et l'oxydase alternative appelée aussi oxydase alternative cyanure-résistante mais qui interviennent à divers degrés pendant les différentes phases de croissance (Wang, Le Dall *et al.* 1999 ; Medentsev, Arinbasarova *et al.* 2002). D'après Medentsev *et al.* 2002, l'oxydase alternative serait moins efficace que la chaîne respiratoire, ce pour cela que l'oxydase alternative transfère seulement les électrons non utilisés par la chaîne respiratoire.

### **1.7.6 La température**

Le contenu lipidique augmente lorsque la température diminue au-delà de la température optimale pour la croissance ainsi que le degré d'insaturation (Rattray *et al.* 1975; Turcotte and Kosaric 1989). Kates et Baxter (Kates et Baxter 1962) ont étudié l'impact de diminuer la température de croissance de 25 à 10 °C chez *Y. lipolytica* et ils ont observé que ce changement permet d'augmenter la quantité de lipides accumulés ainsi que la proportion C18:2/C18:1.

La même tendance fut observée chez *Candida utilis* cultivé en batch (Farrell et Rose 1971) ou en chémostat (Brown et Rose 1969 ; McMurrou et Rose 1971) permettant une production majeure de C16:1 et C18:3 à 10 °C par rapport à 30 °C.

Le fait d'augmenter la température lors d'une culture diminue de manière significative le pH intracellulaire et induit des variations des activités des ATPases (Weitzel *et al.* 1987).

La température influence aussi la production d'acide citrique, 26-35 °C étant la température optimale pour sa production (Miall 1974) néanmoins cette condition est dépendante de la souche utilisée.

---

### 1.7.7 Le pH

La valeur du pH dans le milieu de culture est un facteur important qui contrôle plusieurs fonctions cellulaires. L'information disponible dans la littérature indique qu'une faible altération du pH du milieu de culture influence plutôt la composition lipidique que la quantité accumulée.

La réponse aux variations du pH varie entre chaque espèce de levures. *Yarrowia lipolytica* est capable de pousser aux pH faibles, aux alentours de 4, sa croissance est ralenti à un pH de 7 et inhibée à un pH supérieur à 8 (Barth et Gaillardin 1997; Moeller, Strehlitz *et al.* 2007) :

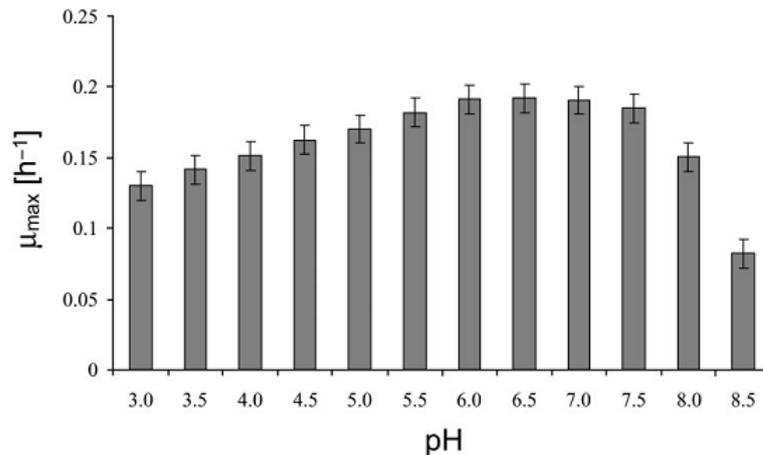


Figure 21. Effet de la température de culture sur le taux de croissance maximale ( $\mu_{\max}$ ) chez *Y. lipolytica* H222. D'après Moeller *et al.* 2007. Conditions de culture : T= 30°C,  $pO_2= 50\%$ , 1000 rpm, milieu= 100 g.L<sup>-1</sup> glucose, 3 g.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, durée= 48 h

En ce qui concerne la production d'acide citrique, chez *Yarrowia lipolytica* les meilleurs rendements de production ont été obtenus avec un pH autour de 6 (Moeller *et al.* 2007) sur glucose.

### 1.7.8 Taux de croissance

Yoon et Rhee (Yoon et Rhee 1983), ont étudié le métabolisme de *Rhodotorula glutinis* en chémostat, ils ont trouvé que la quantité de lipides totaux diminuait lorsqu'une augmentation du taux de dilution de 0,02 h<sup>-1</sup> à 0,30 h<sup>-1</sup> était imposée, dans ces conditions la fraction des lipides neutres a diminué de 83,6 à 54,7 % (masse sèche) tandis que les fractions de glycolipides et phospholides ont augmenté de 5,7 à 21,2 % et de 10,7 à 24,2 %, respectivement.

Le tableau suivant résume les principaux facteurs affectant le contenu lipidique ainsi que la composition chez les levures oléagineuses.

Tableau 8. Effets généraux des conditions de culture sur le contenu et composition lipidique chez les levures. Modifié d'après Rattray *et al.* 1975. + amélioré ; - diminué ; 0 généralement non affecté.

Facteur	Condition	Lipides totaux	Phospho lipides	Stérol	Degré de saturation	Référence
Taux de croissance	Diminution	+	+	+	+, 0	Hunter and Rose 1972 McMurrou et Rose 1971
Phase de croissance	i) Phase de latence et phase d'accélération	-	+	0	+	Castelli, Barbares <i>et al.</i> 1969
	ii) Phase exponentielle et phase de décélération	+	-	0	-	(Nyns, Chiang <i>et al.</i> 1968; Castelli, Barbares <i>et al.</i> 1969; McMurrou et Rose 1971; Thorpe and Ratledge 1972)
	iii) Sporulation	+	+	+	+	Chassang, Roger <i>et al.</i> 1972; Henry and Halvorso 1973; Illingwo, Rose <i>et al.</i> 1973)
Source d'azote	Limitation	+				Ratledge 1968
Source de phosphate	Haute concentration	+	0		0	Suomalainen 1971
Vitamines	Limitation en inositol ou acide nicotinique	+	0			Haskell et Snell 1965; Lewin 1965; Shafai et Lewin 1968; Johnston et Paltauf 1970
	Limitation en biotine, acide pantothénique ou pyridoxine	-			-	Haskell et Snell 1965; Furukawa et Kimura 1971; Hosono et Aida 1974
pO <sub>2</sub>	Elevé	+	+	+	+	Kovac, Subik <i>et al.</i> 1967; Jollow, Kellerma <i>et al.</i> 1968; Babij, Moss <i>et al.</i> 1969; Castelli, Barbares <i>et al.</i> 1969; Hunter and Rose 1972
	Limitant	-	-	-	-	Kovac, Subik <i>et al.</i> 1967; Jollow, Kellerma <i>et al.</i> 1968; Brown et Rose 1969
pCO <sub>2</sub>	Elevé	+			+	Castelli <i>et al.</i> 1969
pH	Acide	0, -	0	0	+	Castelli <i>et al.</i> 1969
Température	Diminuer de 25 à 10°C ou à 12°C	+	+	-	+	Kates et Baxter 1962; Brown et Rose 1969; McMurrou et Rose 1971; Hunter et Rose 1972; Jang, Lin <i>et al.</i> 2005)

---

## 1.8 Généralités du procédé de fermentation adapté au modèle d'étude

La mise en œuvre d'une culture biologique doit prendre en considération plusieurs aspects tels que les caractéristiques du réacteur, les besoins spécifiques du microorganisme ainsi que le produit d'intérêt. Les détails sont décrits dans cette section.

### 1.8.1 Caractéristiques du réacteur biologique

Dans le réacteur biologique a lieu la formation des métabolites et sa principale fonction est de proportionner les conditions optimales pour la croissance cellulaire. Ce réacteur peut varier en forme, taille et mode opératoire selon les besoins du microorganisme à cultiver et du métabolite souhaité à produire (Gonzalez-Valdés, 2000). La conception d'un réacteur doit considérer divers aspects tels que :

- fournir les conditions aseptiques durant le temps de fermentation,
- obtenir une distribution spatiale homogène en nutriments et en oxygène dissous dans le liquide sans affecter physiquement les cellules cultivées,
- fournir un système adéquat pour l'élimination de la chaleur lors d'une fermentation et maintenir la température optimale pour la croissance cellulaire ainsi qu'un système de contrôle de pH,
- faciliter un échantillonnage aseptique,
- réduire la perte d'évaporation au maximum,
- être construit avec des matériels compatibles au milieu de culture afin d'éviter la libération des substances toxiques pour la culture,
- être extrapolable en termes de configuration au changement d'échelle,

Un réacteur biologique peut opérer sous divers modes opératoires ; ne sont listés dans cette section que les plus couramment utilisés.

### 1.8.2 Discontinu (Batch)

Le réacteur est chargé avec du milieu frais etensemencé avec le microorganisme. La culture commence en système fermé avec une période défini dépendant de la souche et de produit d'intérêt selon le rendement ou productivité maximale.

---

En ce qui concerne l'étude de la transition métabolique chez *Y. lipolytica*, nous avons considéré que ce modèle est le moins convenable du fait qu'il ne permet pas d'avoir un contrôle strict sur les conditions microbiologiques et donc sur la transition du métabolisme par rapport aux autres modèles tels que le chémostat, décélérostat ou accélérostat. Celle-ci est une technique couramment utilisée avec *Y. lipolytica* pour la production d'acide citrique (Yalcin *et al.* 2009) ou acides gras (Papanikolaou *et al.* 2002a).

### **1.8.3 Discontinu alimenté (Fed-batch)**

Ce mode opératoire est un système semi-ouvert. Le réacteur est alimenté en continu ou semi-continu avec des nutriments sans sortie de milieu ; dans ces conditions le volume est variable. Il existe plusieurs variations de ce mode de fonctionnement tels que la culture cyclique ou par batch répété.

### **1.8.4 Chémostat ou continu à volume constant**

Le réacteur est alimenté de manière continue avec du milieu frais et parallèlement le milieu fermenté est soutiré au même débit. Un régime permanent est atteint généralement admis après au moins 5 temps de résidence ( $1/D$ ) passés.

Le mode continu peut se diviser en une ou plusieurs étapes avec des volumes de culture identiques ou différents. Ce mode permet aussi d'alimenter un milieu de culture de composition variée.

Ce modèle a été utilisé avec *Y. lipolytica*, afin d'étudier l'impact du taux de dilution et du milieu de fermentation sur la production d'acide citrique (Rywinska *et al.* 2011), ainsi que l'influence de la concentration de certains nutriments ou paramètres de culture tels le zinc, le fer, l'éthanol ou l'oxygène (Finogenova *et al.* 2002).

### **1.8.5 D-stat et A-stat**

Ces deux techniques sont une variation du chémostat et ont été créées par Paalme *et al.* 1997 afin d'étudier l'utilisation de co-substrats chez *S. cerevisiae*. Cette technique permet d'obtenir une culture en conditions quasi permanentes (notion de pseudo-état stationnaire) lorsqu'on fait varier un paramètre de culture de manière contrôlée. L'intérêt de cette technique est de permettre au microorganisme de modifier graduellement l'environnement et en conséquence d'étudier les transitions du métabolisme.

---

La différence entre ces deux techniques est que dans D-stat, la variation du paramètre d'étude suit une décélération graduelle de la dynamique alors que dans l'A-stat le paramètre d'étude suit une accélération de la dynamique imposée.

Ces modes de culture ont été utilisés par divers auteurs afin de caractériser ou d'étudier des transitions métaboliques chez certains micro-organismes tels que *Saccharomyces sp.*, *Lactococcus lactis* ou microalgues (Kasemets, 2003 ; Barbosa, 2005 ; Feria-Gervasio, 2008).

De fait, cette technique semble être appropriée à l'objectif de ce travail de thèse.

---

## Chapitre 2

# Matériel et méthodes



## 2.1 Souches

Quatre souches de *Yarrowia lipolytica* ont été utilisées au cours de ces travaux : *Yarrowia lipolytica* W29, JMY1552, JMY2046 et  $\Delta$ gut2, toutes fournies par le Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire (France) (Tableau 9).

Les conditions optimales de croissance de la souche sauvage sont 28 °C, pH 5,6 dans un milieu salin optimisé. La composition élémentaire de la biomasse utilisée pour les calculs ultérieurs est  $\text{CH}_{1,744}\text{O}_{0,451}\text{N}_{0,132}$  avec une masse molaire de 24,67 g.Cmol<sup>-1</sup> considérant 8 % de cendres.

Tableau 9. Génotype des souches utilisées au cours de l'étude.

Souche	Génotype	Caractéristique
W29	MATa WT	Souche sauvage prototrophe
JMY1552	MATa JMP62- URA3ex-pPOX2- ACL1 JMP62- LEU2ex-pPOX2- ACL2	Surexpression des gènes codant pour l'ATP citrate lyase ACL1 et ACL2 Souche prototrophe
JMY2046 (Kabran, 2010) JMY2416 (nouveau n° de collection)	MATa MDH-04-1	Délétion de la malate déshydrogénase peroxyso- male (YALIOE14190) par modification du site d'épissage Souche prototrophe
$\Delta$ gut2	MATa gut2 :URA3 ura3-302 xpr- 320	Délétion du gène GUT2 codant pour la glycérol-3- phosphate déshydrogénase Souche prototrophe

## 2.2 Milieux de culture

### 2.2.1 Milieu de conservation

La souche est conservée à -80 °C sur milieu YPD après l'ajout de 30 % (v.v<sup>-1</sup>) de glycérol pur stérile. La composition du milieu de conservation est la suivante :

Tableau 10. Composition du milieu de conservation YPD

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
Extrait de levure	10
Bactopeptone	10
Glucose	10

### 2.2.2 Milieu de préculture

La souche est étalée sur boîte de Petri contenant du milieu PCA (Tableau 11) ou du milieu de même composition que le milieu de conservation complémenté avec 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar. La culture est mise à incuber à 30 °C pendant 72 h. La composition du milieu PCA est la suivante :

Tableau 11. Composition du milieu PCA.

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
Peptone	5
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	10
pH à 7	

### 2.2.3 Milieu de fermentation CFMA

Le milieu de culture est un milieu synthétique basé sur celui décrit par Mouret (2007) mais adapté aux besoins nutritionnels de *Yarrowia lipolytica* et au mode opératoire (cultures continues, D-stat) de cette étude nécessitant un milieu de culture stable pendant de longues périodes de culture évitant notamment la précipitation des composants.

Le milieu de fermentation CFMA a la composition suivante :

Sels principaux (pH final 5,6) :

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
* (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6
MgSO <sub>4</sub>	2

Tableau 12. Composition du milieu de fermentation CFMA (Sels principaux)

\* précultures et batch

Oligo-éléments :

Tableau 13. Composition du milieu de fermentation CFMA (Oligo-éléments)

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
EDTA	0,0375
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0281
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00075
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00075

---

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O,	0,00005
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0125
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00875
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0025

Vitamines (pH final ajusté à 6,5 avec NaOH 5 M):

Tableau 14. Composition du milieu de fermentation CFMA (Vitamines)

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
D-biotine	0,00025
D-L acide pantothénique	0,001
Acide nicotinique	0,001
Myo-inositol	0,00625
Thiamine	0,001
Pyridoxine	0,001
Acide para-aminobenzoïque	0,0002

Glucose : solution concentrée à 700 g.L<sup>-1</sup> et préparée à partir de cérélose

Réactif	Concentration finale (g.L <sup>-1</sup> )
* Glucose	18

\* Concentration finale utilisée pour les précultures et batch.

Les sels principaux et le glucose sont stérilisés séparément à 120 °C pendant 20 min tandis que les oligo-éléments et vitamines sont filtrés sur membrane de polyamide à 45 µm de porosité.

---

## 2.3 Préparation de l'inoculum

Pour la procédure en chémostat et D-stat, une colonie est prélevée d'une boîte de Pétri pour ensemençer un tube contenant 5 mL de milieu YPD et mise à incuber à 28 °C et 100 rpm. 24 h lus tard, ces 5 mL sont introduits dans une fiole d'Erlenmeyer bafflée de 100 mL contenant 17 mL de milieu CFMA et mise à incuber dans les mêmes conditions. Enfin après 18 h, ces 17 mL sont introduits dans une deuxième fiole d'erenmeyer de 1 L contentant 170 mL de milieu CFMA et mise à incuber 18 h à 28 °C et 100 rpm.

Cette dernière préculture sert à ensemençer le réacteur contenant 1,53 l de milieu CFMA ce qui correspond à un ensemençement à 10 % (v.v<sup>-1</sup>).

Pour la procédure en fed-batch, les volumes de précultures sont :

<b>Etape</b>	<b>Volume final (mL)</b>
1 <sup>ère</sup> étape : Préculture en tube contenant milieu YPD	8
2 <sup>ème</sup> étape : Préculture en fiole d'erenmeyer bafflée	23
3 <sup>ème</sup> étape : Préculture en fiole d'erenmeyer bafflée	230
4 <sup>ème</sup> étape : Réacteur	2300

Tableau 15. Volumes de préculture et de culture en fed-batch

Toutes les précultures sont réalisées en double afin de vérifier la reproductibilité et comme mesure préventive de contamination.

---

## 2.4 Préparation du bioréacteur

### 2.4.1 Cultures en réacteur en mode chémostat et D-stat

Le réacteur contenant 1,53 L de milieu synthétique CFMA est stérilisé à 120 °C pendant 20 min. Les oligo-éléments et vitamines sont ajoutés dans le réacteur après stérilisation ainsi que le glucose à une concentration finale de 18 g.L<sup>-1</sup>, 1,7 L étant le volume final du réacteur.

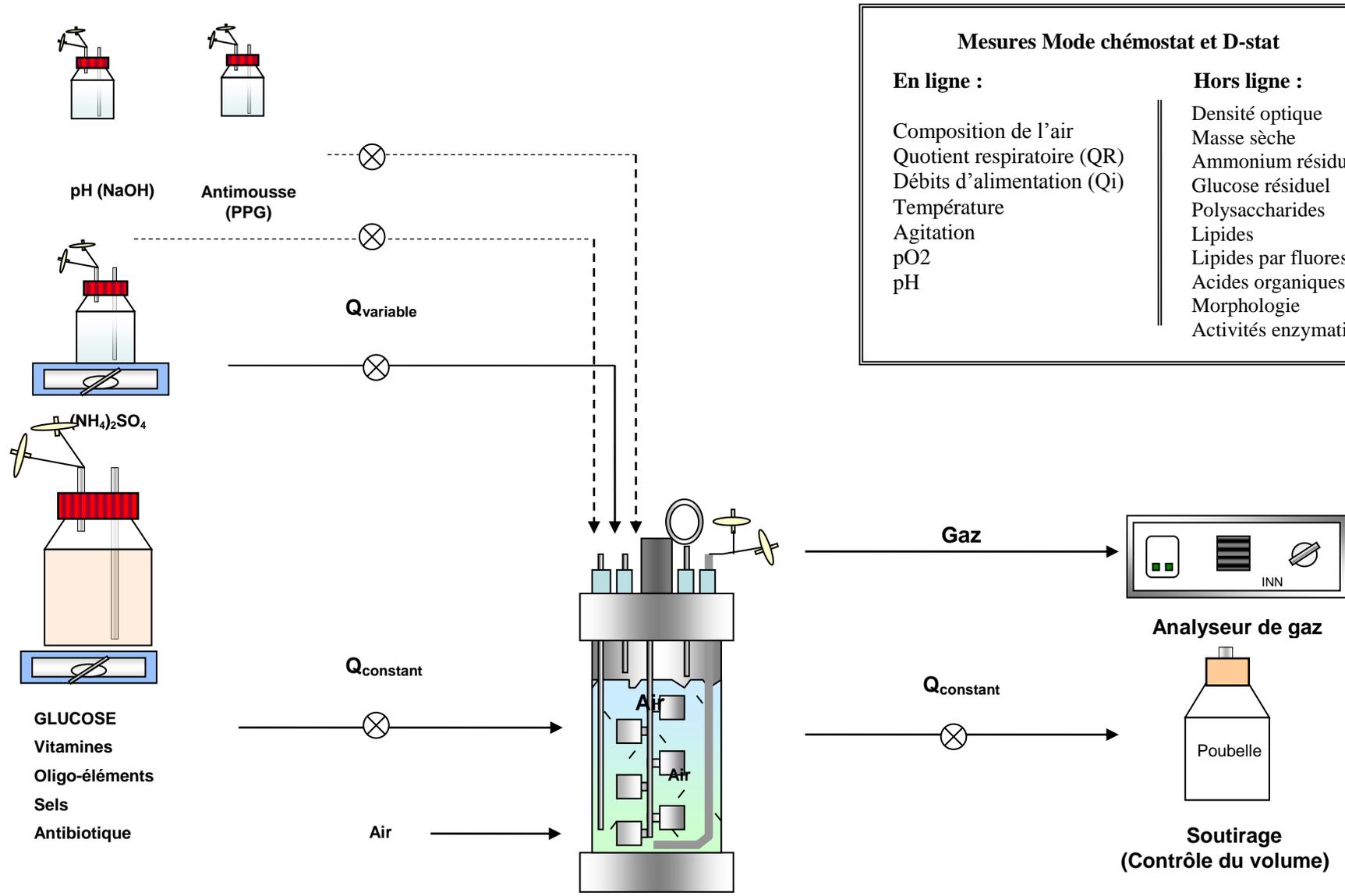
Le réacteur utilisé pour ces expériences est un réacteur B. Braun Biotech International® commandé par le logiciel MFCS/win 2.0. Le réacteur est régulé à 28 °C grâce à une double enveloppe et maintenu à un pH de 5,6 par l'ajout de NaOH à 5 M. Pour ces expériences, la fermentation débute en batch en conditions aérobies. La pression partielle d'oxygène dissous est maintenue à une valeur supérieure de 20 % de saturation par le contrôle du débit d'air entrant et la vitesse d'agitation du réacteur afin d'éviter toute limitation d'O<sub>2</sub> pendant la culture.

La culture en chémostat est initiée une fois que la concentration en glucose résiduel dans le réacteur est nulle. A ce moment, le réacteur est alimenté de manière continue par deux alimentations différentes. La première alimentation provient d'un bidon de 40 L contenant le milieu synthétique CFMA sans (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> complété avec 20 g.L<sup>-1</sup> de glucose et 10 mg.L<sup>-1</sup> de chloramphénicol (Eurobio, réf. 018043). Le débit automatisé d'entrée de cette première alimentation est de 0,108 L.h<sup>-1</sup>. La deuxième alimentation provient d'un bidon de 5 L contenant du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 60 g.L<sup>-1</sup> avec un débit automatisé constant de 0,0117 L.h<sup>-1</sup>. Le taux de dilution (D) est égal à 0,08 h<sup>-1</sup> correspondant à un ratio N/C de 0,129 molN.Cmol<sup>-1</sup>. Pendant cette étape les échantillons sont soutirés toutes les 8 h.

Une fois le régime permanent atteint (après au moins 5 temps de séjour,  $\tau = \frac{1}{D}$ ), le D-stat débute par une diminution linéaire de l'apport en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,0117 L.h<sup>-1</sup> à 0,0003 L.h<sup>-1</sup> correspondant à une diminution du ratio N/C<sub>chem</sub> de 0,129 molN.Cmol<sup>-1</sup> à 0,0028 molN.Cmol<sup>-1</sup> en 50 heures. Pendant cette étape les échantillons sont soutirés toutes les 2 h.

Le contrôle de mousse dans le réacteur est assuré par l'ajout automatisé de polypropylène glycol (PPG 2000, Aldrich, réf. 81380) à raison de 5-6 gouttes toutes les 40 min.

Figure 22. Schéma général du réacteur en chémostat et D-stat



---

## 2.4.2 Culture en réacteur en mode discontinu alimenté (fed-batch)

Cette procédure est adaptée de celle de Cescut (2009). Le réacteur contenant 2,3 L de milieu synthétique CFMA (sauf  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) est stérilisé à 120 °C pendant 20 min. Les oligo-éléments et vitamines sont ajoutés dans le réacteur après stérilisation. Le réacteur utilisé pour ces expériences est un réacteur B. Braun Biotech International® commandé par le logiciel MFCS/win 2.1. Le réacteur est régulé à 28 °C grâce à une double enveloppe. Le pH est contrôlé à 5,6 par ajout d'une solution d'ammoniaque à 5 M qui assure également l'apport d'azote pendant la croissance cellulaire.

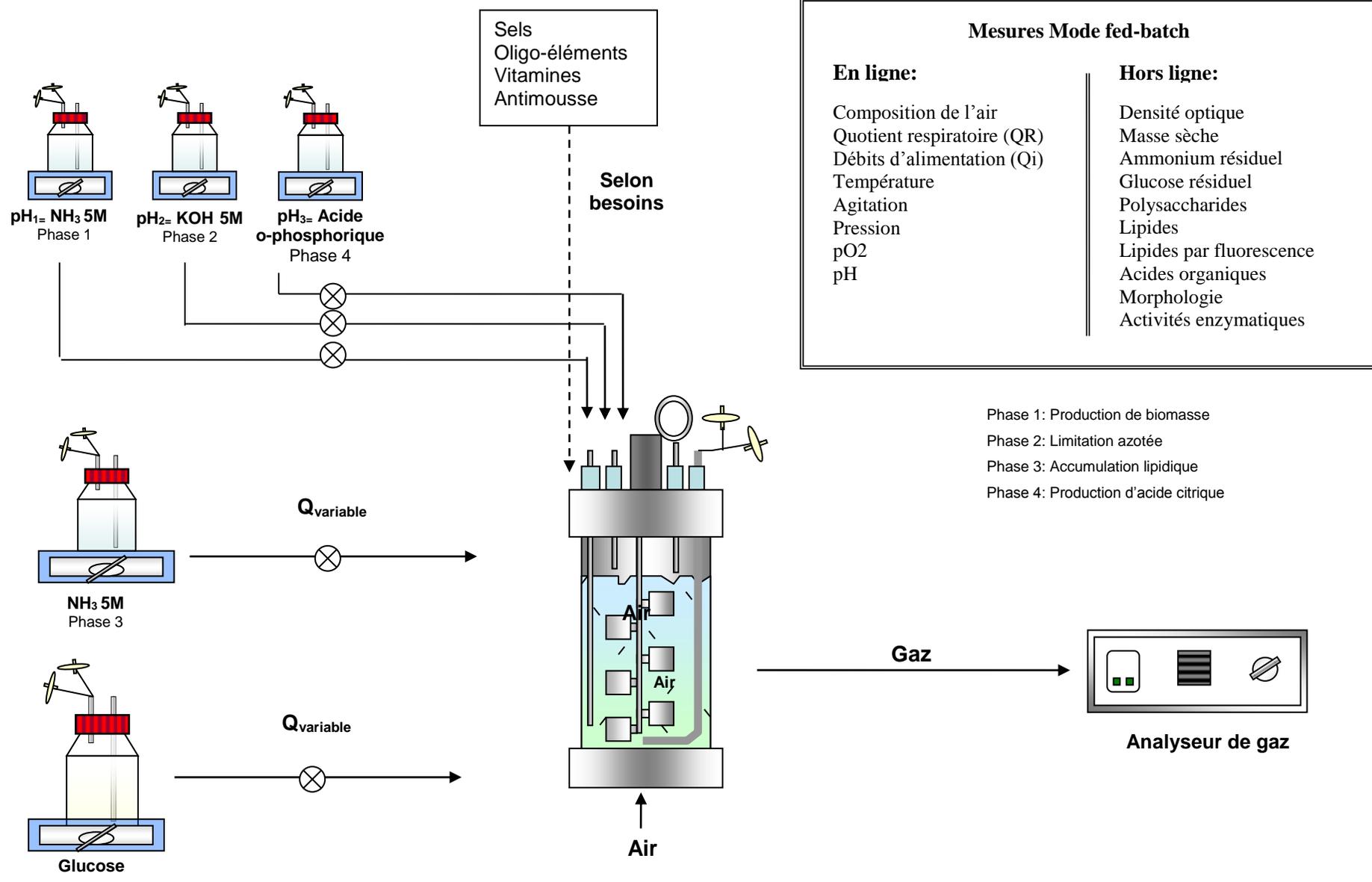
La première phase consiste en une alimentation contrôlée exponentielle en glucose calculée pour obtenir un taux de croissance constant ( $\mu_{\text{expo}}$ ) de 0,22 h<sup>-1</sup>. Pendant cette étape, les échantillons sont prélevés toutes les 2,5 h.

Lorsque la concentration en biomasse atteint 15 g.L<sup>-1</sup>, le liquide correcteur du pH (ammoniaque) est remplacée par une solution de KOH à 5 M afin d'atteindre un épuisement de l'azote dans le moût de fermentation. Une deuxième phase démarre après l'épuisement de l'azote dans le milieu. La culture est contrôlée par un apport d'azote (sous forme d'une solution d'ammoniaque 5 M) limitant selon un profil linéaire décroissant de débit permettant la transition entre la phase de croissance et la phase d'accumulation lipidique et d'accumulation de citrate tout en conservant le ratio N/C constant. Pendant cette étape les échantillons sont soutirés environ toutes les 2 h.

La troisième phase est réalisée en imposant une alimentation d'azote constante et un apport en glucose suivant une accélération en 50 heures. Pendant cette étape les échantillons sont prélevés environ toutes les 2 h.

Pendant toutes les phases de ce mode opératoire, la pression partielle d'oxygène dissous est maintenue à une valeur supérieure à 20 % de saturation par le contrôle du débit d'air entrant et de la vitesse d'agitation du réacteur afin d'éviter toute limitation d'O<sub>2</sub>. Tout au long de la culture, des vitamines (2 mL.L<sup>-1</sup>), des oligo-éléments (6,5 mL.L<sup>-1</sup>) et de sels du milieu CFMA (6,5 mL.L<sup>-1</sup>, solution concentrée, sauf  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sont ajoutés pour chaque accroissement de 15 g.L<sup>-1</sup> de biomasse catalytique (biomasse sans accumulation de lipides).

Figure 23. Schéma général du réacteur en Fed-batch



---

## **2.5 Caractérisation de la biomasse**

### **2.5.1 Mesure de la densité optique**

L'évolution de la concentration cellulaire est estimée par spectrophotométrie à 620 nm (spectrophotomètre HITACHI® U-100) dans une cuve en quartz de 2 mm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée soit par un diluteur automatique soit par une dilution manuelle de façon à obtenir une densité optique entre 0,1 et 0,7 unité d'absorbance (Tahoun *et al.* 1986) qui correspond à la zone de linéarité du spectrophotomètre.

### **2.5.2 Détermination de la masse sèche totale**

La biomasse sèche est déterminée par la méthode de gravimétrie et exprimé en g.L<sup>-1</sup>. Un volume connu de culture est prélevé et filtré à l'aide d'une pompe à vide sur une membrane en polyamide de 45 µm (SARTORIUS®, Allemagne) préalablement séchée et pesée. Après filtration, les membranes sont séchées à l'étuve à 60 °C sous vide (200 mm de Hg) pendant 48 h, puis pesées. La différence de masse avant et après filtration de la suspension cellulaire sur la membrane ramenée au volume filtré permet de déterminer la concentration en masse sèche de biomasse. Les corrélations de grammes de masse sèche par unité de densité optique sont : 1,011 pour les souches W29 et JMY2046, 1,308 pour la souche JMY1552 et 1,192 pour la souche Δgut2.

## **2.6 Dosage de métabolites et substrats du surnageant**

### **2.6.1 Dosage par HPLC**

Les métabolites tels que l'acide citrique, l'acide acétique, le glycérol notamment pouvant être produits au cours des cultures sont quantifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La suspension cellulaire est centrifugée pendant 4 min à 4000 g et 4°C. Le surnageant est récupéré et filtré sur une membrane polyamide à 0,45 µm de diamètre de pore (SARTORIUS®, Allemagne).

Les analyses par HPLC sont réalisées soit en utilisant un Chromatographe Dionex ULTIMATE® 3000 (California, USA) soit un chromatographe WATERS® (Massachusetts, USA) de caractéristiques suivantes :

Tableau 16. Caractéristiques des chromatographes HPLC utilisés

<b>Paramètre</b>	<b>Chromatographe ULTIMATE® 3000 / WATERS®</b>
Colonne	Aminex HPX-87H <sup>+</sup> (300 mm x 7,8 mm)
Détecteur 1	Réfractomètre
Détecteur 2	UV à barrette de diode
Phase mobile	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mM
Débit de la phase mobile	0,5 mL.min <sup>-1</sup>
Température du four	50 °C
Volume d'injection	20 µl
Durée d'analyse	40 min
Logiciel acquisition et traitement des données	Chromeleon / Millenium

Une gamme étalon est préparée parallèlement contenant les métabolites d'intérêt à différentes concentrations. Le temps de rétention de chaque composant est fourni dans le tableau (Tableau 17 et Figure 23).

Tableau 17. Temps de rétention des composants analysés par HPLC

<b>Composant</b>	<b>TR (min) IR</b>	<b>TR (min) UV</b>
Acide citrique	10,21 ± 0,30	9,75 ± 0,29
Acide α-ketoglutarique	10,42 ± 0,31	10,01 ± 0,30
Glucose	11,32 ± 0,33	
Acide pyruvique	11,84 ± 0,35	11,38 ± 0,34
Acide malique	12,14 ± 0,36	11,71 ± 0,35
Acide succinique	14,73 ± 0,44	14,32 ± 0,42
Glycérol	16,10 ± 0,48	
Acide fumarique	17,88 ± 0,53	17,46 ± 0,52
Acide acétique	18,79 ± 0,56	18,30 ± 0,55

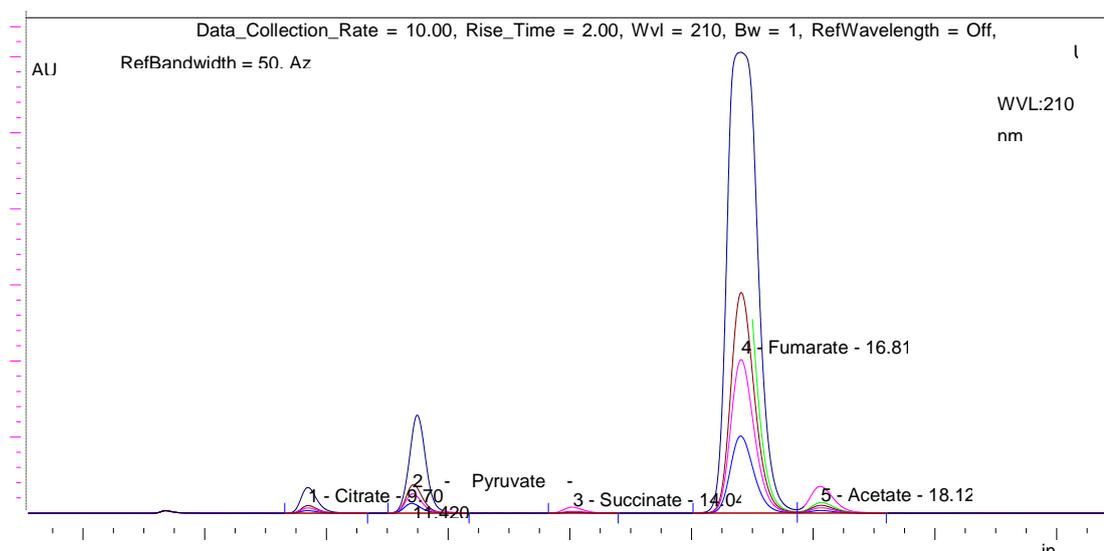


Figure 24. Exemple d'un chromatogramme HPLC (ULTIMATE® 3000 en UV)

## 2.6.2 Glucose

Le glucose est dosé dans les surnageants obtenus comme décrits précédemment au cours de la culture par un analyseur automatique YSI 27A (YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS®). Son principe repose sur la détection de l'eau oxygénée libérée lors de la transformation du glucose en acide gluconique par une glucose oxydase immobilisée sur une membrane. La concentration est donnée en  $\text{g.L}^{-1}$ . La précision de l'appareil est de l'ordre de 2 %. Le glucose est aussi dosé sur les échantillons filtrés à la fin de la culture par HPLC.

## 2.6.3 Ions ammonium

Les ions ammonium dans le milieu de culture sont dosés en utilisant une électrode à ammonium ORION® 9512 (ORION® Research Inc., EU) reliée à un voltmètre (ORION® pH/ISE Meter 710A). La méthode de dosage des ions ammonium repose sur la mesure d'un courant électrique à l'aide d'une électrode sensible à l'ammoniac gazeux provenant de la transformation des ions ammonium en ammoniac par ajout d'un tampon \*ISA (Ionic Strength Adjustor). L'électrolyte de la sonde est constitué d'une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

5 mL de suspension cellulaire sont filtrés sur une membrane polyamide à  $0,45 \mu\text{m}$  (SARTORIUS®, Allemagne), introduits dans un bécher de 50 mL contenant un barreau aimanté et mis à agiter à 400 rpm. La sonde est placée sur la surface du liquide en évitant la formation de bulles d'air, 200  $\mu\text{L}$  de tampon ISA sont ensuite ajoutés. La concentration est

---

déterminée à partir d'une gamme étalon reliant le signal électrique et la concentration de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  comprise entre  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  et  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . L'erreur de cet appareil est de l'ordre de 2 %.

\* La composition du tampon ISA est la suivante :

Tableau 18. Composition du tampon ISA

Réactif	Concentration final
NaOH	$5 \text{ mol.L}^{-1}$
$\text{Na}_2$ EDTA	$0,5 \text{ mol.L}^{-1}$
Méthanol	$1 \text{ g.L}^{-1}$

## 2.6.4 Teneur en sucres totaux de la biomasse

La détermination des sucres totaux est réalisée par la méthode de Dubois et al. (1956).

La suspension cellulaire est lavée trois fois avec de l'eau physiologique glacée (4000 g, 4 min à  $4^\circ\text{C}$ ) et diluée de manière à ramener la valeur de densité optique entre 0,4 et 0,5 UDO à 620 nm (cuve en quartz 2 mm de trajet optique).

Dans un tube en verre sont introduits 1 mL d'échantillon et 1 mL d'une solution de phénol à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  dans de l'eau distillée et vortexé pendant 20 s. 5 min après incubation à température ambiante, 5 mL d'acide sulfurique à 95% sont ajoutés. Le mélange est vortexé pendant 20 s et mis à incuber 5 min à température ambiante. Les tubes sont ensuite introduits dans un bain marie à  $30^\circ\text{C}$ . 20 min après, la réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans la glace pendant 30 min. La densité optique du mélange est mesurée à 486 nm.

La gamme étalon utilise un mélange de glucose et de mannose dans un rapport de 1  $\text{g.g}^{-1}$  (recommandation selon Klils *et al.*, 1997) possédant un coefficient de corrélation supérieur à 0,99. Les concentrations sont données en équivalent de glucose  $\text{g}_{\text{eq glc}}.\text{gX}^{-1}$ .

## 2.6.5 Teneur en lipides de la biomasse

### 2.6.5.1 Observation de l'accumulation de lipides par microscopie à épifluorescence

L'accumulation des lipides au cours d'une culture est observée par microscopie à épifluorescence en utilisant un microscope optique OLYMPUS® BH-2 RFCA relié à une caméra NIKON® (NIKON Digital Sight; Logiciel de traitement NiS-Elements BR v.3.2). Le marquage est effectué par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer et

excité à la longueur d'onde spécifique du fluorochrome. Cette technique permet de distinguer différentes étapes physiologiques de l'accumulation lipidique et possède l'avantage d'être rapide, figures suivantes :

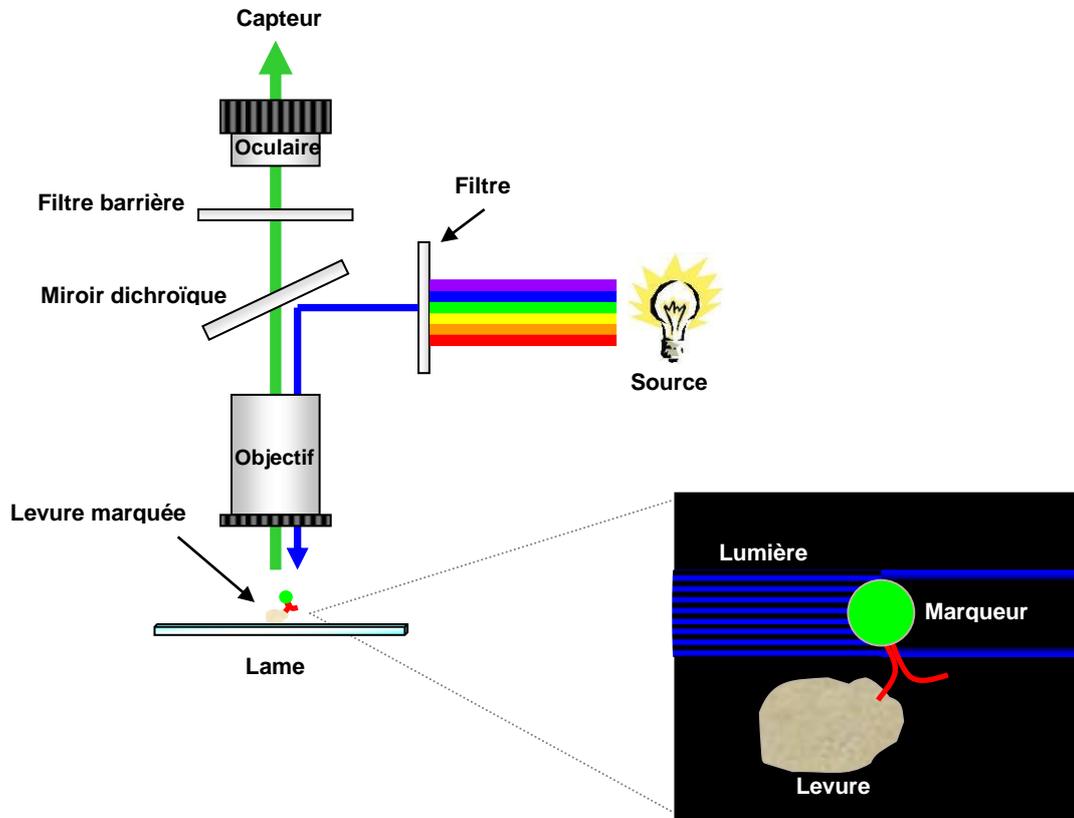


Figure 25. Schéma du fonctionnement d'un microscope à épifluorescence et fixation d'un fluorochrome sur une molécule lipidique. Modifié d'après [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

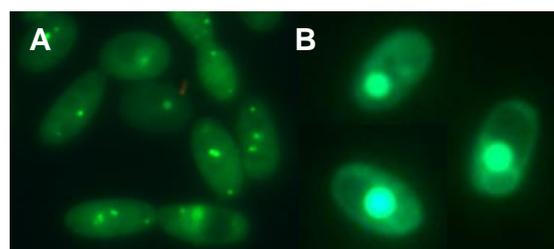


Figure 26. Exemple d'un marquage avec du Bodipy 493/503 (A) 2% d'accumulation lipidique (B) 20% d'accumulation lipidique lors d'une culture de *Y. lipolytica* W29

10  $\mu\text{L}$  de Bodipy 493/503 ( $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  dans du DMSO) sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire. Le mélange est incubé à  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  et à l'abri de la lumière. Après 5 min, l'échantillon est centrifugé (4 min à 13,400 rpm) et resuspendu dans 1 mL d'eau distillée. De 2 à 3 images du marquage sont prises par échantillon avec un microscope à fluorescence et ensuite à la lumière normale avec les conditions suivantes :

Tableau 19. Paramètres pour la prise d'images au microscope à fluorescence

Paramètre	Image à fluorescence	Image à lumière normale
Résolution	1280 x 1024 Fine-Normal	1280 x 1024 Fine-Normal
Qualité	3840 x 3072 -8 bit	3840 x 3072 -8 bit
Exposition	150-300 ms	20-30 ms
Gain analogue	0-0,3	0
Compensation AE	0	0
Contraste	Dynamique	Amélioré
Objectif	x100 oil	x100 oil

### 2.6.5.2 Quantification de la teneur en lipides par fluorescence en microplaques

Les lipides cellulaires sont dosés dans un premier temps par fluorescence permettant ainsi d'estimer la teneur en lipides totaux sans extraction préalable. Cette détermination est réalisée en utilisant un lecteur à microplaques multi-modes Synergy HT (BIOTEK, EU) qui permet de mesurer la fluorescence émise par un marqueur spécifique aux lipides à l'aide du logiciel KC4.

La suspension cellulaire est lavée 3 fois dans du tampon \*PBS à 4000 g, 4 min et 4 °C et diluée ensuite dans le même tampon de manière à ramener la densité optique entre 0,4 et 0,5 UDO à 620 nm (cuve en quartz 2 mm trajet optique). 1 ml d'échantillon est introduit dans un eppendorf de 1,5 mL avec 10 µL de marqueur Bodipy 493/503 (100 µg.mL<sup>-1</sup> dans du DMSO). Après 5 s de vortexage et 5 min d'incubation à 4 °C à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé (3 min à 13,400 rpm) et le culot est resuspendu dans 1 ml du tampon PBS à 4 °C (pour le Bodipy 493/503 l'échantillon est lavé 2 fois dans du tampon PBS, mêmes conditions). 200 µL d'échantillon sont ajoutés à chaque puits et la lecture de la fluorescence est réalisée avec les conditions suivantes :

Tableau 20. Paramètres pour la lecture de fluorescence au lecteur à microplaques

Paramètre	Marquage au Bodipy 493/503
Longueur d'onde d'excitation	485/20 nm
Longueur d'onde de lecture	528/20 nm
Sensibilité de lecture	50
Agitation / Intensité	5 s / 2

La qualification de la méthode est réalisée à l'aide des échantillons de cellules contenant différentes teneur de lipides accumulés variant entre 6 % et 40 %. Les mesures sont

---

répétées 10 fois pour chaque teneur avec une reproductibilité de 99 %. Les résultats sont exprimés en  $\text{g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1}$ .

La bonne corrélation entre la mesure de la fluorescence et la teneur en lipides totaux permet de valider la méthode pour quantifier hors ligne la teneur en lipides totaux au cours d'une culture.

\* La composition du tampon PBS est la suivante :

Tableau 21. Composition du tampon PBS

Réactif	Concentration final ( $\text{g.L}^{-1}$ )
NaCl	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,15
KCl	0,2
pH : 6,9-7,1	

### 2.6.5.3 Détermination de la teneur en lipides cellulaires et de leur composition en acides gras par CPG

#### 2.6.5.3.1 Préparation des échantillons

La suspension cellulaire contenant environ 50 mg de biomasse (poids sec) est centrifugée 4 min à 4000 g et à 4 °C. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée glacée 3 fois. Les culots sont congelés à -80 °C puis subissent une lyophilisation (Martin CHRIST® alpha 2-4, EU) pendant 4 jours à -35 °C et sous vide.

Les lyophilisats sont conservés dans un dessiccateur aux parois opaques contenant une grande quantité de silicagel (Prolabo, réf. 27615.291) sous azote évitant toute altération des lipides. Afin d'éviter l'état de réhydratation, l'humidité du lyophilisat est mesurée grâce au séchage d'une portion de l'échantillon (48 h, 60°C, 200 mm Hg). Les lyophilisats peuvent être conservés plusieurs jours dans ces conditions.

#### 2.6.5.3.2 Extraction par digestion

Cette méthode d'extraction des lipides est basée sur celle de Browse *et al.* (1986). 20 mg de lyophilisats sont placés dans 1 ml d'une solution de méthanol contenant 25  $\text{mL.L}^{-1}$  d'acide sulfurique à 95 % et 1 mL d'étalon interne (C9:0). Ce mélange est mis dans un bain marie à 80 °C pendant 90 min dans des tubes étanches.

Une fois refroidi, 450  $\mu\text{L}$  d'hexane et 1,5 mL d'eau distillée sont ajoutés et vortexés pendant 10 s puis centrifugés afin de récupérer la phase lipidique dans l'hexane pour être analysée par GC.

### 2.6.5.3.3 Analyse par CPG

L'analyse des lipides est réalisée par GC (Gas Chromatography) avec un chromatographe HP 6890 Series GC System avec les conditions d'opération suivantes :

Tableau 22. Conditions d'opération de la CG

Paramètre	Caractéristique
Colonne	CP Select CB for FAME fused silica WCOT 50 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ (VARIAN)
Détecteur	FID (Flame Ionization Detector)
Phase mobile	Azote
Débit de la phase mobile	50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Température du four	Voir figure 27
Température du détecteur	250 $^{\circ}\text{C}$
Volume d'injection	1 $\mu\text{L}$
Durée d'analyse	64 min
Logiciel acquisition et traitement des données	Chromeleon (DIONEX <sup>®</sup> )

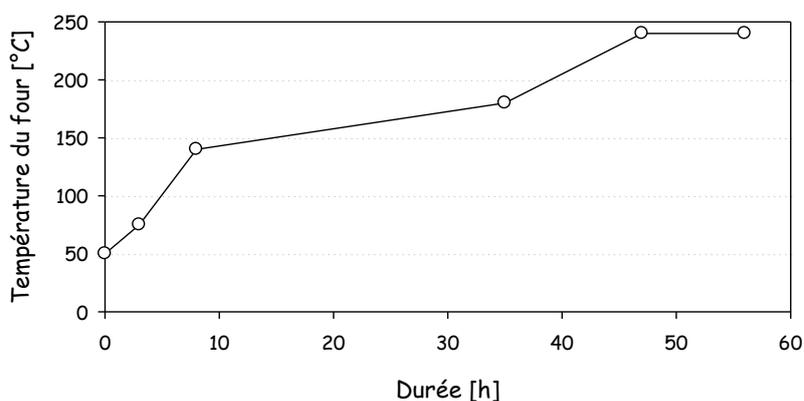


Figure 27. Programmation de la température du four, d'après Cescut 2009.

La préparation des échantillons de la gamme étalon consiste à métyler la fonction carboxylique des acides gras libres ou estérifiés afin de les rendre volatils pour une analyse en phase gazeuse. La réaction doit être totale pour une quantification précise des acides gras.

Le réactif de métylation est le triméthylsulphonium hydroxide à 0,20  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (TMSH) dans du méthanol. L'efficacité de cet agent est testée en utilisant des méthyl esters

---

comme composé de référence et elle est supérieure à 99,5%. De manière séparée, les lipides étalons tels que les C:16 (non méthylés) sont dilués à différentes concentrations. 100 µL des dilutions précédentes sont mélangées avec 50 µL de TMSH. Après 15 min de repos, les échantillons sont mélangés et peuvent être injectés au chromatographe.

Pour les lipides étalons tels que les C:18, (méthylés) on réalise juste des dilutions dans du chloroforme avant l'injection dans le chromatographe.

## 2.6.6 Détermination de l'activité spécifique en enzyme

### 2.6.6.1 Préparation des extraits

Environ 50 mg (poids sec) de cellules sont prélevés et lavés 2 fois à l'eau glacée (4 min, 4000 g). Les culots cellulaires sont introduits dans des tubes en verre (à paroi épaisse et fond plat) contenant 2 g de billes en verre (Sigma, d= 425-600 µm, réf. 68772) préalablement refroidis à 4 °C. Une demi-pastille d'un cocktail inhibiteur de protéases (Roche, réf. 11 836 170 001, EDTA free) est ajouté à chaque tube ainsi que 1 mµL de \*tampon d'extraction à 4 °C. Le mélange est vortexé pendant 10 cycles de 20 s, avec des intervalles des 20 s minimum dans la glace entre chaque cycle. L'extrait est centrifugé à 4000 g pendant 30 min à 4°C. L'activité enzymatique est mesurée dans le surnageant, appelé extrait cellulaire.

\* La composition du tampon d'extraction est la suivante :

Tableau 23. Composition du tampon d'extraction

Réactif	Concentration final (mM)
Tris/HCl	50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100
Na <sub>2</sub> EDTA	1
Benzamidine HCl	1
pH : 7,3	

### 2.6.6.2 Dosage des protéines dans l'extrait cellulaire

Les extraits sont dilués 200 fois dans de l'eau distillée. 1 mL d'échantillon dilué est introduit dans des tubes en verre et additionnée de 1 mL de réactif Bradford à température

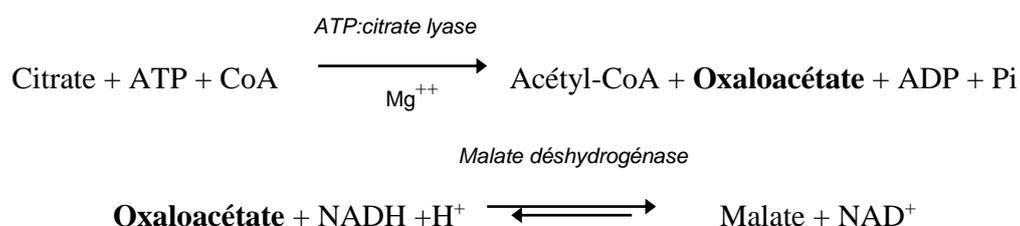
ambiante. Les tubes sont mélangés et mis à incuber pendant 5-45 min à température ambiante. Le complexe est stable jusqu'à 60 min.

La quantité de protéines est estimée par mesure de la densité optique à 590 nm dans des cuves plastiques de 10 mm de trajet optique. La concentration est déterminée à partir d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin) d'une concentration comprise entre 0 et 10 µg.mL<sup>-1</sup> de protéine totale possédant un coefficient de corrélation supérieur à 0,99.

### 2.6.6.3 ATP citrate lyase

Le protocole de dosage de l'enzyme ATP citrate lyase est basé sur celui de Srere et Lipmann (Srere and Lipmann 1953).

La mesure de l'activité ATP-citrate lyase se fait par suivi de l'oxydation du NADH après couplage enzymatique avec une malate déshydrogénase ajoutée en excès dans le milieu réactionnel :



Les réactifs nécessaires pour ce dosage sont les suivants :

Réactif	Concentration
Tris/HCl (pH 7,4)	0,1 M
MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,1 M
Potassium citrate	0,2 M
Coenzyme A	3 mg.mL <sup>-1</sup>
Mercaptoéthanol	0,1 M
NADH	0,005 M
Malate déshydrogénase (Sigma, réf. M9004)	2000-4000 U
ATP	0,049 M

Tableau 24. Réactifs du dosage de l'enzyme ATP citrate lyase

L'essai est réalisé directement dans une cuve de 10 mm de trajet optique à une température de 30 °C fixée par un bain marie. Les composés suivants sont ajoutés de manière successive :

Tableau 25. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme ATP citrate lyase

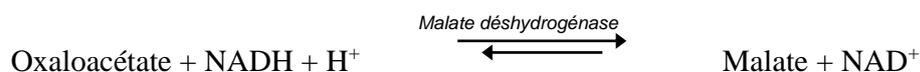
Ordre	Réactif	Quantité (µL)
1	Tris/HCl (pH 7,3)	100
2	MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100
3	Potassium citrate	100
4	Mercaptoéthanol	100
5	Malate déshydrogénase	125,25
6	Coenzyme A	100
7	NADH	30
8	Extrait cellulaire	Différents volumes
9	Eau	Volume final 1000 µL
10	ATP	100

Le blanc contient tous les réactifs précédents sauf le NADH et le Coenzyme A. La réaction commence par l'ajout d'ATP. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm.

Une unité d'activité (U) est égale à la quantité d'extrait oxydant 1 µmole de NADH par minute dans les conditions d'expérimentation décrites. L'activité spécifique est exprimée en milliunités par milligramme de protéine totale (mU.mg protéine<sup>-1</sup>).

#### 2.6.6.4 Malate déshydrogénase

Le dosage de l'enzyme malate déshydrogénase est basé sur le protocole d'Ochoa (Ochoa 1955a). La mesure de l'activité de la malate déshydrogénase se fait par suivi de l'oxydation du NADH en présence d'oxaloacétate :



L'équilibre de cette réaction catalysée par la malate déshydrogénase favorise nettement la réduction de l'oxaloacétate en malate. En excès de substrats, la vitesse d'oxydation du NADH (déterminée par la vitesse de diminution de l'absorbance à 340nm) est proportionnelle à la concentration de malate déshydrogénase.

Les réactifs nécessaires pour ce dosage sont les suivants :

Tableau 26. Réactifs du dosage de l'enzyme malate déshydrogénase

Réactif	Concentration
Tris/HCl (pH 7,4)	0,1 M
NADH	0,005 M

Réactif	Concentration
*Oxaloacétate (pH 7,4)	0,0076 M

\* à préparer juste avant son utilisation pour éviter la présence du pyruvate

L'essai est réalisé directement dans une cuve de 10 mm de trajet optique à une température de 30 °C fixé par un bain marie. Le mélange réactionnel contient :

Tableau 27. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme malate déshydrogénase

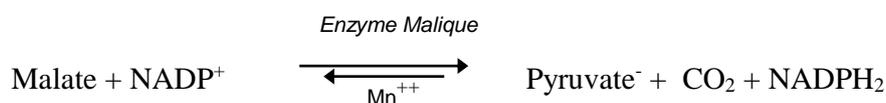
Ordre	Réactif	Quantité (µL)
1	Tris/HCl (pH 7,4)	300
2	NADH	30
3	Oxaloacétate (pH 7,4)	100
4	Enzyme	Différents volumes
5	Eau	Volume final 1000 µL

La réaction commence soit par l'ajout de l'enzyme soit par l'ajout de l'oxaloacétate. Les mesures de d'absorbance sont faites contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le NADH et l'oxaloacétate.

Une unité d'activité (U) est égale à la quantité d'extrait oxydant 1 µmole de NADH par minute dans les conditions d'expérimentation décrites. L'activité spécifique est exprimée en milliunités par milligramme de protéines totales (mU.mg protéine<sup>-1</sup>).

### 2.6.6.5 Enzyme malique

Le dosage de l'enzyme malique est basé sur le protocole d'Ochoa et al., 1955 (Ochoa 1955b). La mesure de l'activité de l'enzyme malique se fait par suivi de la réduction du NADP<sup>+</sup> :



La réduction du NADP<sup>+</sup> en présence de l'enzyme, Mn<sup>++</sup>, et un excès de malate est proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Les réactifs nécessaires pour ce dosage sont les suivants :

Tableau 28. Réactifs du dosage de l'enzyme malique

Réactif	Concentration
Tris/HCl (pH 7,4)	0,1 M

Réactif	Concentration
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03 M
NADP <sup>+</sup>	0,00135 M
Malate (pH 7,4 avec du KOH)	0,015 M

L'essai est réalisé directement dans une cuve de 10 mm de trajet optique à une température de 30 °C fixé par un bain marie. Le mélange réactionnel contient :

Tableau 29. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme malique

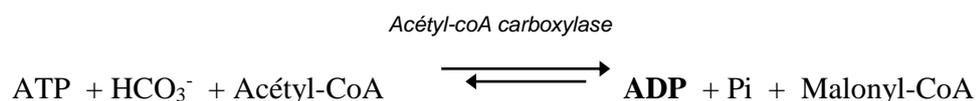
Ordre	Réactif	Quantité (μL)
1	Tris/HCl (pH 7,4)	300
2	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100
3	NADP <sup>+</sup>	100
4	Malate (pH 7,4)	100
5	Eau	Volume final de 1000 μL

La réaction commence par l'ajout de l'enzyme (extrait cellulaire). Les mesures de l'absorbance (340 nm) sont faites contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le NADP<sup>+</sup>. La réduction du NADP<sup>+</sup> est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

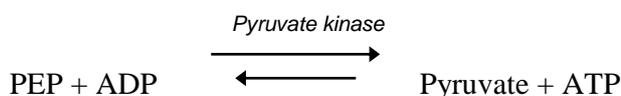
Une unité d'activité (U) est égale à la quantité d'extrait réduisant 1 μmole de NADP<sup>+</sup> par minute dans les conditions d'expérimentation décrites. L'activité spécifique est exprimée en milliunités par milligramme de protéine totale (mU.mg protéine<sup>-1</sup>).

### 2.6.6.6 Acétyl-CoA carboxylase

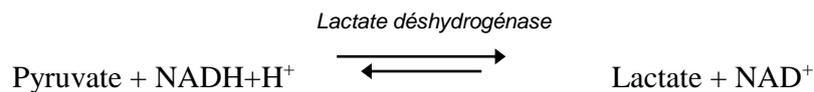
Le dosage de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase est basé sur le protocole de Mishina (Mishina 1971). Le dosage de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase dans l'extrait cellulaire est réalisé in vitro à partir de la détermination de la vitesse d'oxydation du NADH au sein du système enzymatique suivant :



\* dans l'extrait cellulaire



\*\* ajouté en excès



\*\* ajouté en excès

Les réactifs nécessaires pour ce dosage sont les suivants :

Tableau 30. Réactifs du dosage de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase.

Réactif	Concentration
Tris/HCl (pH 7,4)	0,1 M
Glutathionne forme réduit (pH 7,4 avec KOH)	0,03 M
BSA (Bovine Serum Albumin)	6 g.l <sup>-1</sup>
Polyéthylène glycol (mm moyenne 7,500)	50 % (m.v <sup>-1</sup> )
MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,08 M
ATP	0,049 M
Acétyl-CoA	0,01 M
KHCO <sub>3</sub>	1 M
K PEP (Potassium phosphoenolpyruvate)	0,04 M
NADH (pH 8)	0,005 M
Pyruvate kinase	400-800 U.mg protéine <sup>-1</sup> , 10 mg.mL <sup>-1</sup>
Lactate déshydrogénase	662 U.mg protéine <sup>-1</sup> , 5 mg.mL <sup>-1</sup>

L'essai est réalisé directement dans une cuve de 10 mm de trajet optique à une température de 30 °C fixé par un bain marie. Les composants suivants sont ajoutés de manière successive :

Tableau 31. Ordre d'ajout des réactifs du dosage de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase

Ordre	Réactif	Quantité (µL)
1	Tris/HCl (pH 7,3)	395
2	Glutathionne forme réduit	100
3	BSA (Bovine Serum Albumin)	100
4	Polyéthylène glycol	100
5	MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100
6	KHCO <sub>3</sub>	20
7	K PEP (Potassium phosphoenolpyruvate)	10
8	Pyruvate kinase	2
9	Lactate déshydrogénase	2
10	NADH	20

---

Ordre	Réactif	Quantité (µL)
11	Acétyl CoA	100
12	Extrait cellulaire	Différents volumes
13	Eau	qsp Volume final 1500 µL
14	ATP	62

La réaction commence par l'ajout de l'acétyl-CoA. L'oxydation du NADH est suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm. Une unité d'activité (U) est égale à la quantité d'extrait oxydant 1 µmole de NADH par minute dans les conditions d'expérimentation décrites. L'activité spécifique est exprimée en milliunités par milligramme de protéine totale (mU.mg protéine<sup>-1</sup>).

## 2.7 Analyse des gaz

La composition de l'air entrant et sortant du réacteur peut être mesurée par trois systèmes différents. Le premier système (LumaSense Technologies, Europe) combine un échantillonneur multivoies 1309 avec un analyseur de gaz (INNOVA 1313) permettant de mesurer les concentrations d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par spectroscopie acoustique et par spectroscopie magneto-acoustique, le débit de gaz minimum pour une analyse est de 0,15 L.min<sup>-1</sup>.

Le deuxième système consiste en un spectromètre de masse (AMETEK PROCESS INSTRUMENTS®) qui est réglé sur une pression de 500 mbar et étalonné avec un mélange de 20 % d'O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> et QSP de N<sub>2</sub>, l'air sortant du réacteur est analysé toutes les 6 minutes avec un débit minimum de gaz de 0,50 L.min<sup>-1</sup>.

Le troisième système consiste en un spectromètre de masse MGA iScan (Hamilton Instrument Technologies®, logiciel CYPRESS). L'air sortant du réacteur est analysé toutes les minutes avec un débit de gaz minimum pour une analyse de 0,50 L.min<sup>-1</sup>.

## 2.8 Traitement des données

### 2.8.1 Gaz

Le débit de sortie est calculé par bilan de matière sur un gaz inerte (azote) entre l'entrée et la sortie du fermenteur afin de calculer les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (rO<sub>2</sub> en mol.h<sup>-1</sup>) et de production de CO<sub>2</sub> (rCO<sub>2</sub> en mol.h<sup>-1</sup>) à partir du bilan global de la phase gazeuse et la phase liquide :

$$\text{Accumulation} = [\text{Entrée} - \text{Sortie}] + [\text{Production} - \text{Consommation}]$$

---

Soit :

$$\frac{d(A_{liq} \cdot V_{liq})}{dt} + \frac{d(A_{sortie} \cdot V_{gaz})}{dt} = (Q_{entree} \cdot A_{entree} - Q_{sortie} \cdot A_{sortie}) + r_A \cdot V_{liq}$$

Où :

$A_{liq}$	:	Fraction molaire du composé A dans le liquide
$A_{entree}$	:	Fraction molaire du composé A dans le gaz entrant du réacteur
$A_{sortie}$	:	Fraction molaire du composé A dans le gaz sortant du réacteur
$Q_{entree\_gaz}$	:	Débit de gaz entrant dans le réacteur (L.h <sup>-1</sup> )
$Q_{sortie\_gaz}$	:	Débit de gaz sortant du réacteur (L.h <sup>-1</sup> )
$V_{liq}$	:	Volume liquide du réacteur (L)
$V_{gaz}$	:	Volume gazeux du réacteur (L)
$r_A$	:	Vitesse de production ou consommation du composé A dans la phase liquide (mol.h <sup>-1</sup> ) ; negative pour consommation, positive pour production

On regroupe sous le terme de flux de transfert global ( $\Phi_A$ ), le terme d'accumulation dans la phase liquide ainsi que le terme de production ou de consommation nette. :

$$\Phi_A = \frac{-d(A_{liq} \cdot V_{liq})}{dt} + r_A \cdot V_{liq}$$

On obtient :

$$\frac{d(A_{sortie} \cdot V_{gaz})}{dt} = Q_{entree} \cdot A_{entree} - Q_{sortie} \cdot A_{sortie} + \Phi_A$$

L'azote étant un gaz inerte, il ne subit qu'un phénomène de transport dans la phase liquide, il n'est ni consommé, ni produit par les microorganismes. L'azote est de plus très soluble dans la phase liquide (solubilité à 15 °C et à  $P_{atm}$  égal à  $22,10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) et le flux global de transfert d'azote peut être donc négligé :

$$\Phi_{N_2} = 0$$

Ainsi :

$$\frac{d(N_{2,sortie} \cdot V_{gaz})}{dt} = Q_{entree} \cdot N_{2,entree} - Q_{sortie} \cdot N_{2,sortie}$$

A partir de ces hypothèses, le débit de gaz sortant du réacteur peut être calculé :

$$Q_{sortie} = \frac{Q_{entree} \cdot N_{2,entree} - \frac{d(N_{2,sortie} \cdot V_{gaz})}{dt}}{N_{2,sortie}}$$

Avec le débit de sortie, les flux du transfert du CO<sub>2</sub> et de l'O<sub>2</sub> peuvent être exprimés par :

$$\Phi_{CO_2} = \frac{d(CO_{2,sortie} \cdot V_{gaz})}{dt} - Q_{entree} \cdot CO_{2,entree} + Q_{sortie} \cdot CO_{2,sortie}$$

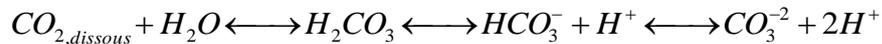
$$\Phi_{O_2} = \frac{d(O_{2,sortie} \cdot V_{gaz})}{dt} - Q_{entree} \cdot O_{2,entree} + Q_{sortie} \cdot O_{2,sortie}$$

Finalement, la vitesse nette de conversion du composé A est donnée par :

$$r_A = \frac{\Phi_A + \frac{d(A_{liq} \cdot V_{liq})}{dt}}{V_{liq}}$$

### 2.8.1.1 Cas du CO<sub>2</sub>

Dans le milieu de culture, le CO<sub>2</sub> présent dans la phase liquide se trouve sous quatre formes :



Comme l'acide carbonique se dissocie de façon pratiquement instantanée, les composés minoritaires sont H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et peuvent être négligés, il reste donc :



La constante d'équilibre de cette dissociation est :

$$K_d = \frac{[HCO_3^-] \cdot [H^+]}{[CO_{2,dissous}]} = 4,71 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

Selon la loi de Henry, la concentration en CO<sub>2,dissous</sub> est proportionnelle à la pression partielle en CO<sub>2</sub> :

$$CO_{2,dissous} = P_{CO_2} \cdot H_{CO_2}$$

P<sub>CO<sub>2</sub></sub> : Pression partielle en CO<sub>2</sub>

H<sub>CO<sub>2</sub></sub> : Constante de Henry pour le CO<sub>2</sub> égal à 0,033 mol.L<sup>-1</sup>

avec cette expression, la quantité totale de CO<sub>2</sub>, dans le liquide est donnée par:

$$CO_{2,liq} = CO_{2,dissous} + HCO_3^- = CO_{2,dissous} + \frac{K_d \cdot [CO_{2,dissous}]}{10^{-pH}} = P_{CO_2} \cdot H_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{K_d}{10^{-pH}}\right)$$

### 2.8.1.2 Cas de l'O<sub>2</sub>

D'autre part, l'O<sub>2,liq</sub> dans le milieu de culture est mesuré par une sonde de pO<sub>2</sub>. A une pression de 1 atm dans le fermenteur et à notre température de culture (28 °C), lorsque la pO<sub>2</sub> est égale à 100 % l'O<sub>2,liq</sub> est égale à 7,75 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Ainsi :

$$O_{2,liq} = \frac{pO_2 \cdot 7,75}{100} \cdot \frac{1}{P_{réacteur}} \cdot \frac{1}{1000 \cdot 32} \text{ mol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$$

O<sub>2,liq</sub> : en mol O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>  
P<sub>réacteur</sub> : Pression du réacteur en atm

Finalement, les vitesses de production de CO<sub>2</sub> (r<sub>CO<sub>2</sub></sub>) et de consommation d'O<sub>2</sub> (r<sub>O<sub>2</sub></sub>) sont calculés par les équations suivantes :

$$r_{CO_2} = \frac{\Phi_{CO_2} + \frac{d(CO_{2,liq} \cdot V_{liq})}{dt}}{V_{liq}} \quad r_{O_2} = \frac{\Phi_{O_2} + \frac{d(O_{2,liq} \cdot V_{liq})}{dt}}{V_{liq}}$$

Les vitesses spécifiques de production de CO<sub>2</sub> (q<sub>CO<sub>2</sub></sub>) et de consommation d'O<sub>2</sub> (q<sub>O<sub>2</sub></sub>) sont calculées par les équations suivantes :

$$q_{CO_2} = \frac{r_{CO_2}}{X} \quad q_{O_2} = \frac{r_{O_2}}{X}$$

r<sub>CO<sub>2</sub></sub> : en mol de CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>  
r<sub>O<sub>2</sub></sub> : en mol de O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>  
q<sub>CO<sub>2</sub></sub> : en mol de CO<sub>2</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>  
q<sub>O<sub>2</sub></sub> : en mol d'O<sub>2</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>  
X : en g<sub>X</sub>.h<sup>-1</sup>

Le quotient respiratoire (QR) défini comme étant par le rapport molaire entre production de CO<sub>2</sub> et consommation d'O<sub>2</sub> est calculé de la manière suivante

$$QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}}$$

---

## 2.8.2 Détermination des vitesses et vitesses spécifiques et rendements à partir des bilans matières

Les vitesses nettes de réaction sont calculées à partir du bilan matière établi sur l'ensemble du réacteur. Les équations sont données dans cette section.

### 2.8.2.1 Bilan matière pour une variable d'état A

Le bilan matière pour une variable d'état A est calculé à partir de l'équation suivante :

$$V_{liq} \cdot \frac{dA}{dt} + A \cdot \frac{dV_{liq}}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} - Q_{sortie} \cdot A + r_A \cdot V_{liq}$$

Avec :

- $Q_{resC}$  : Débit d'alimentation de la source carbonée (L.h<sup>-1</sup>)
- $Q_{resN}$  : Débit d'alimentation de la source azotée (L.h<sup>-1</sup>)
- $Q_{sortie}$  : Débit de soutirage du réacteur (L.h<sup>-1</sup>)
- $A_{resC}$  : Concentration de la variable d'état A dans le réservoir apportant la source carbonée (g.L<sup>-1</sup>)
- $A_{resN}$  : Concentration de la variable d'état A dans le réservoir apportant la source azotée (g.L<sup>-1</sup>)
- $A$  : Concentration de la variable d'état A dans le réacteur (g.L<sup>-1</sup>)
- $r_A$  : Vitesse de conversion de A (<0 si A est consommée, >0 si A est produite) (g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)
- $V_{liq}$  : Volume de liquide dans le réacteur (L)

### 2.8.2.2 Batch

Le bilan matière pendant le batch est calculé de la manière suivante :

$$V_{liq} \cdot \frac{dA}{dt} + A \cdot \frac{dV_{liq}}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} - Q_{sortie} \cdot A + r_A \cdot V_{liq}$$

Le réacteur batch étant un réacteur fermé homogène à volume constant, la vitesse nette de conversion se calcule de la manière suivante :

$$\frac{dA}{dt} = r_A \cdot (\text{négative pour une variable consommée ; positive pour les variables produites})$$

duites)

La vitesse spécifique de conversion de la variable A est calculée en ramenant la vitesse nette de réaction à une unité de biomasse (pour la biomasse, la vitesse spécifique est notée  $\mu$ ):

$$q_A = \frac{r_A}{X}$$

### 2.8.2.3 Chémostat en régime permanent

Le bilan matière pendant le chémostat est calculé de manière suivante :

$$V_{liq} \cdot \frac{dA}{dt} + A \cdot \frac{dV_{liq}}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} - Q_{sortie} \cdot A + r_A \cdot V_{liq}$$

En considérant le volume constant l'équation devient :

$$V_{liq} \cdot \frac{dA}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} - Q_{sortie} \cdot A + r_A \cdot V_{liq}$$

Au régime permanent, le terme d'accumulation s'annule, le calcul de la vitesse nette de réaction s'obtient à partir de :

$$r_A = \frac{1}{V_{liq}} (Q_{sortie} \cdot A - Q_{resC} \cdot A_{resC} - Q_{resN} \cdot A_{resN})$$

Le tableau suivant montre les équations pour le calcul des vitesses en régime permanent des variables indiquées :

Tableau 32. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le chémostat

Variable d'état	Vitesse nette de réaction	Vitesse spécifique de réaction
Substrat carboné : glucose (glc)	$r_{glc} = \frac{1}{V_{liq}} (Q_{sortie} \cdot glc - Q_{resC} \cdot glc_{resC})$	$q_{glc} = \frac{r_{glc}}{X}$
Azote (N)	$r_N = \frac{1}{V_{liq}} (Q_{sortie} \cdot N - Q_{resN} \cdot N_{resN})$	$q_N = \frac{r_N}{X}$
Biomasse (X)	$r_X = \frac{1}{V_{liq}} (Q_{sortie} \cdot X)$	$\mu = \frac{r_X}{X}$
Produit (P)	$r_P = \frac{1}{V_{liq}} (Q_{sortie} \cdot P)$	$q_P = \frac{r_P}{X}$

### 2.8.2.4 D-stat et chémostat en régime transitoire

Pour le D-stat (en considérant le volume constant), le bilan matière s'écrit comme pour le régime transitoire du chémostat puisque le terme d'accumulation ne peut plus être négligé :

$$V_{liq} \cdot \frac{dA}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} - Q_{sortie} \cdot A + r_A \cdot V_{liq}$$

Pour les variables suivantes et au régime permanent, le calcul des vitesses s'obtient par :

Tableau 33. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le D-stat et le chémostat en régime transitoire

Variable d'état	Vitesse nette de réaction	Vitesse spécifique de réaction
Substrat carboné : glucose (glc)	$r_{glc} = \frac{1}{V_{liq}} \left( -Q_{resC} \cdot glc_{resC} + Q_{sortie} \cdot glc + V_{liq} \cdot \frac{dglc}{dt} \right)$	$q_{glc} = \frac{r_{glc}}{X}$
Azote (N)	$r_N = \frac{1}{V_{liq}} \left( -Q_{resN} \cdot N_{resN} + Q_{sortie} \cdot N + V_{liq} \cdot \frac{dN}{dt} \right)$	$q_N = \frac{r_N}{X}$
Biomasse (X)	$r_X = \frac{1}{V_{liq}} \cdot \left( Q_{sortie} \cdot X + V_{liq} \cdot \frac{dX}{dt} \right)$	$\mu = \frac{r_X}{X}$
Produit (P)	$r_P = \frac{1}{V_{liq}} \left( Q_{sortie} \cdot P + V_{liq} \cdot \frac{dP}{dt} \right)$	$q_P = \frac{r_P}{X}$

### 2.8.2.5 Fed-batch

Le bilan matière sur le fed-batch s'écrit de la manière suivante. Dans ce cas, le volume dans le réacteur n'est pas constant :

$$\frac{dAV_{liq}}{dt} = Q_{resC} \cdot A_{resC} + Q_{resN} \cdot A_{resN} + r_A \cdot V_{liq}$$

Pour les variables, le calcul des vitesses s'obtient par :

Tableau 34. Equations modèles pour le calcul des vitesses pendant le fed-batch

Variable d'état	Vitesse nette de réaction	Vitesse spécifique de réaction (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Substrat carboné : glucose (glc)	$r_{glc} = \frac{1}{V_{liq}} \left( Q_{resC} \cdot glc_{resC} - \frac{d(V_{liq} \cdot glc)}{dt} \right)$	$q_{glc} = \frac{r_{glc}}{X}$
Azote (N)	$r_N = \frac{1}{V_{liq}} \left( Q_{resN} \cdot N_{resN} - \frac{d(V_{liq} \cdot N)}{dt} \right)$	$q_N = \frac{r_N}{X}$
Biomasse (X)	$r_X = \frac{1}{V_{liq}} \cdot \left( \frac{d(V_{liq} X)}{dt} \right)$	$\mu = \frac{r_X}{X}$

Variable d'état	Vitesse nette de réaction	Vitesse spécifique de réaction (g.g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Produit (P)	$r_P = \frac{1}{V_{liq}} \left( \frac{d(V_{liq} \cdot P)}{dt} \right)$	$q_P = \frac{r_P}{X}$

Il est donc nécessaire de quantifier la variation du volume dans le réacteur au cours du temps.

Le volume de culture est calculé à chaque intervalle de temps à partir de la connaissance du volume initial de culture, des volumes ajoutés des différentes solutions d'alimentation et du liquide correcteur de pH, ainsi que des volumes de prélèvement des échantillons. Les solutions d'alimentation et de base sont posées sur des balances permettant l'acquisition en ligne de l'évolution des alimentations. Chaque prise par échantillon est mesurée pour connaître avec précision le volume prélevé.

### 2.8.2.6 Détermination des vitesses spécifiques d'accumulation d'un composé de stockage.

On peut calculer la vitesse spécifique d'accumulation en composés de stockage (lipides, polysaccharides) en ramenant la vitesse nette de conversion à une unité de biomasse catalytique (biomasse dédite de ses composés accumulés) :

$$q_{cpacc}^* = \frac{r_{cpacc}}{X - Cp_{acc}}$$

Avec :

- $q_{cpacc}^*$  : Vitesse spécifique d'accumulation du composé (g<sub>cp</sub>. g<sub>MS</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)
- $r_{cpacc}$  : Vitesse de réaction du composé (g<sub>cp</sub>. h<sup>-1</sup>)
- $X$  : Concentration en biomasse totale (g<sub>MS</sub>)
- $Cp_{acc}$  : Teneur en composé dans la biomasse (g<sub>cp</sub>.g<sub>MS</sub><sup>-1</sup>)

#### 2.8.2.6.1 Cas des vitesses spécifiques enzymatiques

Les vitesses spécifiques enzymatiques sont calculées à partir du calcul suivant :

$$q_{Enzyme} = \frac{r_{Enzyme}}{X^*}$$

avec

- $r_{Enzyme}$  : Vitesse nette de production d'enzyme (mU.h<sup>-1</sup>)
- $X^*$  : Biomasse catalytique (g)

---

### 2.8.2.7 Calcul des rendements

Les rendements sont calculés à partir des vitesses nettes de réaction, par les équations suivantes :

$$R_{x,s} = \frac{r_X}{r_S} \quad R_{P_2,S} = \frac{r_P}{r_S} \quad R_{P,X} = \frac{r_P}{r_X}$$

### 2.8.3 Bilans carbone et des degrés de réduction généralisés (Bilan élémentaire)

Les bilans carbone et élémentaire sont calculés à partir des vitesses nettes de réaction exprimées en  $\text{Cmol.h}^{-1}$  pour les composés carbonés et en  $\text{mol.h}^{-1}$  pour les autres composés.

#### 2.8.3.1 Bilan carbone

Le bilan carbone est calculé uniquement avec les composés carbonés à partir de l'expression suivante :

$$\sum_{j=1}^m (r_j^{net}) = 0$$

où  $(r_j^{net})$  est la vitesse nette de réaction du composé j exprimée en  $\text{Cmol h}^{-1}$ .

Le pourcentage de recouvrement du bilan carbone est calculé selon :

$$\% \text{Carbone} = 100 \cdot \frac{r_X + r_{\text{CO}_2} + \sum r_{\text{produits}}}{r_S}$$

avec

- $r_X$  : Vitesse nette de production de biomasse ( $\text{Cmol.h}^{-1}$ )
- $r_{\text{CO}_2}$  : Vitesse nette de production de  $\text{CO}_2$  ( $\text{mol.h}^{-1}$ )
- $r_{\text{produits}}$  : Vitesse nette de production de produit carboné ( $\text{Cmol.h}^{-1}$ )
- $r_S$  : Vitesse nette de consommation de substrat carboné ( $\text{Cmol.h}^{-1}$ )

#### 2.8.3.2 Bilan élémentaire

Le bilan élémentaire est calculé avec tous les composés intervenant dans la réaction comprenant au moins un des éléments C, H, O, N en faisant intervenir les degrés de réduction de chaque composé ( $\gamma$ ), suivant la méthode développé par Roehr (1988), à partir de l'expression suivante :

$$\sum_{j=1}^m (r_j^{net} \cdot \gamma_j) = 0$$

où  $(r_j^{net})$  est la vitesse nette de réaction du composé j .

Les valeurs des degrés de réduction généralisés avec comme source d'azote l'ammonium sont donnés ci-dessous :

Composé	Formule	Formule en Cmol	Masse molaire en g.Cmol <sup>-1</sup>	Coefficient $\gamma$
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	CH <sub>2</sub> O	30	4
Biomasse		CH <sub>1,744</sub> O <sub>0,451</sub> N <sub>0,132</sub>	24,67	4,446
Lipides (TAG de C18:1)	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	CH <sub>1,82</sub> O <sub>0,105</sub>	15,52	5.61
Citrate	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	CH <sub>1,333</sub> O <sub>1,166</sub>	31.989	3
Malate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	CH <sub>1,5</sub> O <sub>1,25</sub>	33,5	3
Pyruvate	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	CH <sub>1,333</sub> O	29,333	3,33
Succinate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	CH <sub>1,5</sub> O	29,5	3,5
CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	44	0
O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	32	-4
NH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>	17	0
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	18	0

En prenant en compte les valeurs des  $\gamma$  nuls pour le CO<sub>2</sub>, l'eau et l'ammonium, le pourcentage de recouvrement du bilan élémentaire peut être calculé de la manière suivante :

$$\% \text{Elémentaire} = 100 \cdot \frac{r_X \cdot \gamma_X + \sum (r_P \cdot \gamma_P)}{r_S \cdot \gamma_S + r_{O_2} \cdot \gamma_{O_2}}$$

### 2.8.3.3 Flux métaboliques

Les flux métaboliques sont calculés de la manière suivante :

Flux	Equation
Acétyl-CoA	$\phi_{\text{Acétyl-CoA}} = q_{\text{Lipides constitutifs}} \cdot 9 \cdot 3 + q_{\text{Lipides accumulés}} \cdot 9 \cdot 2$
Citrate intracellulaire	$\phi_{\text{Citrate intra}} = \phi_{\text{Lipides totaux}} + q_{\text{Citrate excreté}}$
NADPH <sub>2</sub> Lipides totaux	$\phi_{\text{NADPH}_2 \text{ Lipides totaux}} = \phi_{\text{Lipides totaux}} \cdot 9/16$

Où :

---

qLipides constitutifs	:	Cmol phospholipides.CmolX <sup>*-1</sup> h <sup>-1</sup>
qLipides accumulés	:	Cmol TAG.CmolX <sup>*-1</sup> h <sup>-1</sup>
φAcétyl-CoA	:	mole eq. Acétyl-CoA.CmolX <sup>*-1</sup> h <sup>-1</sup>
φCitrate intra	:	mole eq.Citrate.CmolX <sup>*-1</sup> h <sup>-1</sup>
φNADPH <sub>2</sub> Lipides totaux	:	mole eq.NADPH <sub>2</sub> .CmolX <sup>*-1</sup> h <sup>-1</sup>

---

## Chapitre 3

# Résultats

### 3.1 Introduction

L'analyse des bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* a été réalisée dans un premier temps sur la souche sauvage W29. Le travail a démarré par la mise en place de systèmes de culture permettant de balayer une large gamme de ratio Azote/Carbone (N/C) afin de déterminer les valeurs critiques induisant l'accumulation de lipides puis l'induction de l'excrétion d'acide citrique. Une analyse cinétique multi-niveau a été réalisée à partir du suivi des variables d'état du système microbien, des activités spécifiques de certaines enzymes choisies pour leur implication dans le métabolisme lipidique, des profils transcriptomiques. Le premier chapitre concernera donc les résultats obtenus avec la souche sauvage en culture en D-stat et en fed-batch.

Une fois le système d'étude développé et validé sur la souche sauvage, il a été utilisé pour analyser l'impact de modifications génétiques sur certains gènes codants pour des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique sur les bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica*. Nous avons choisi trois souches génétiquement modifiées disponibles au laboratoire du Dr Jean-Marc Nicaud : une souche délétée pour la malate déshydrogénase peroxysomiale (JMY2046), une souche surexprimant l'ATP citrate lyase (JMY1552) et une souche délétée pour une des glycérol-3-phosphate déshydrogénases ( $\Delta$ gut2). Les chapitres suivants détailleront donc les résultats obtenus avec chacune de ces souches en culture en mode fed-batch.

---

## 3.2 Etude de la bascule métabolique chez *Yarrowia lipolytica*: du métabolisme oxydatif à l'accumulation de lipides et production d'acide citrique

Cette partie est présentée sous la forme d'une publication qui a été soumise dans un journal international à comité de lecture.

### Study of the metabolic shifts in *Yarrowia lipolytica*: from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production

A. Ochoa-Estopier<sup>1</sup>, N. Morin<sup>2</sup>, V. Loux<sup>3</sup>, J.M. Nicaud<sup>2</sup> and S. E. Guillouet<sup>1</sup>

(1) Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil F-31077 Toulouse, France

INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

(2) INRA UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France

(3) INRA - Unité MIG (Mathématique, Informatique et Génome), F-78352 Jouy-en-Josas, France

#### 1. Introduction

*Yarrowia lipolytica* is one of the most studied “non-conventional” yeasts isolated from oily environments such as polluted soils, raw poultry or dairy products Sinigaglia *et al.* 1994; Deak 2001; Lanciotti *et al.* 2005; Yalcin and Ucar 2009, classified as generally recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA, USA). It has become an important industrial microorganism due to the versatility of its metabolism to produce metabolites such as heterologous proteins Destain *et al.* 1997; Nicaud *et al.* 2002, lipids Papanikolaou *et al.* 2003; Bankar *et al.* 2009; Beopoulos *et al.* 2009 or citric acid Papanikolaou *et al.* 2002b; Moeller *et al.* 2007; Rymowicz *et al.* 2007.

*Yarrowia lipolytica* belongs to the so-called oleaginous yeasts due to its ability to accumulate high amounts of lipid mainly in the form of Triacylglycérol (TAG) Rattray *et al.* 1975. *Y. lipolytica* is

---

indeed able to accumulate lipids up to 43 % of its dry mass on glycérol Papanikolaou and Aggelis 2002 and over 50 %, wt.wt<sup>-1</sup> of total lipids, on fatty acids Papanikolaou *et al.* 2003.

Lipid accumulation in oleaginous yeasts is triggered by nutrient imbalance in the culture medium between the carbon source (in excess) and the nitrogen source in limiting concentration (although other nutrients can be identically made limiting, such as phosphorus, zinc, iron) (Granger *et al.*, 1993 ; Ratledge, 2002)

Ratledge 2002 proposed, in his review, a general pattern of succession of the metabolic events that take place upon a N-limitation in oleaginous microorganisms (*Candida 107* and *C. utilis*, *Rhodotorula glutinis*, *Mucor circinelloides*) leading to lipid accumulation as follows: drop in the adenosine monophosphate (AMP) concentration due to the activation of the AMP deaminase, inhibition of the isocitrate dehydrogenase (ICDH) by the high AMP content leading to the accumulation of isocitrate and then citrate that can be exported from the mitochondrion by a citrate/malate transporter, citrate is cleaved by the ATP-citrate lyase (ACL) into acetyl coenzyme A and oxaloacetate , the Acetyl-coA is used for fatty acid synthesis by the Acetyl Co carboxylase (ACC). One characteristic that differentiates oleaginous yeasts from non-oleaginous yeasts is the presence of ATP citrate lyase (ACL) Holdsworth *et al.* 1988; Zhang *et al.* 2007, several authors have also considered that Acetyl CoA carboxylase (ACC) Waite and Wakil 1962; Hasslacher *et al.* 1993 and malic enzyme (Zhang *et al.* 2007) are essential for lipid accumulation

Several studies have shown that the metabolic shift in *Yarrowia lipolytica* is related to a nutrient-limited medium such as nitrogen, phosphorus or magnesium Gill *et al.* 1977; Anastassiadis *et al.* 2002 or to the cultivation conditions such as growth rate, oxygen availability, pH or temperature Finogenova *et al.* 1996; Il'chenko *et al.* 1998; Kamzolova *et al.* 2003; Moeller *et al.* 2007. One of the parameter that influences the metabolic shift is the N/C ratio Sattur and Karanth 1989; Anastassiadis *et al.* 2005. However *Yarrowia lipolytica* when cultivated on glucose as the sole carbon source, mainly produces citric acid upon nutrient limitation over lipid accumulation only 5-10 % (wt.wt<sup>-1</sup>) of TAG Papanikolaou *et al.* 2006. Therefore it is legitimate to wonder whether *Yarrowia lipolytica* can accumulate lipids (TAG) without producing citric acid when cultivated on carbohydrate substrates. Developing a bioprocess for the production of triacylglycérol from renewable carbon source as glucose is of first interest as an alternative way to produce synthons for fuel or chemical industry. However the mechanisms controlling the metabolic shift from oxidative to citric acid production over lipid accumulation still need to be elucidated.

Chemostats have been widely used to study microbial metabolism towards numerous nutrient limitations Egli 1991; Guillouet and Engasser 1996; Boer *et al.* 2003; Fgaier and Eberl 2011. Alternative continuous cultivation system were later developed for physiological studies of various microorganisms such as (i) the Accelerostat (A-stat) where the dilution rate was linearly increased at a constant change rate Paalme *et al.* 1995; Paalme *et al.* 1997 (ii) the D-stat where the dilution rate was kept constant while one of the cultivation parameter (Temperature, N/C) was modulated at a constant

---

rate Kasemets *et al.* 2003, (iii) auxostat where a cultivation parameter (pH, pO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) was kept constant by controlling the medium feeding pump Kasemets *et al.* 2003.

We developed, in this study, a slight variant of D-stat cultivation system, where the N/C was linearly decreased using a constant change rate in order to quantify the impact of the modulation of the N/C ratio on the metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on glucose as the sole carbon source. This study aimed at investigating the possibility to accumulate TAG without citric acid production in this yeast on glucose.

## **2. Methods**

### 2.1 Microorganism, media and growth conditions

The strain used in this study was *Yarrowia lipolytica* W29 obtained from the Laboratoire Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, (Paris-Grignon., France) The strain was maintained on YPD/glucose agar medium containing 10 gL<sup>-1</sup> Yeast Extract, 20 gL<sup>-1</sup> Bactopeptone, 20 gL<sup>-1</sup> Glucose and 20 gL<sup>-1</sup> agar. Plates were stored at 4°C. For preparation of glycérol stocks (for cryopreservation of the cells), pure sterile glycérol was added to the culture broth to reach a final glycérol concentration of 30 % (v/v). This cell suspension (glycérol stocks) was then stored at -80 °C.

Precultivations for chemostat were carried out on a 5-ml tube of YPD medium at 28 °C for 16 h at 100 rpm. The culture in growth phase was transferred into a 1-l Erlenmeyer flask containing 170 mL of mineral medium at pH 5.6 prepared as follows (all compounds are expressed in g.L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6; MgSO<sub>4</sub>, 2; EDTA, 0.0375; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0281; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0025; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.00075; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.00075; Na<sub>2</sub>MoSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.00005; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0125; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.00875; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0025; D-biotin, 0.00025; D-L-panthotenic acid, 0.001; nicotinic acid, 0.001; myo-inositol, 0.00625; thiamin, 0.001; pyridoxine, 0.001; para-aminobenzoic acid, 0.0002. Glucose was added to a final concentration of 18 gL<sup>-1</sup> with chloramphenicol at 10 mgL<sup>-1</sup>. After 16 h of growth at 28°C and 100 rpm, 170 ml of the broth were used to inoculate 1.7 L of the same mineral medium in a 3-L bioreactor.

### 2.2 Chemicals used

The chemicals glucose, salts, oligo-elements (Carlo Erba) and EDTA (Qbiogène), orthophosphoric acid were provided by VWR, the vitamins by Sigma. All products had the highest analytical grade available.

### 2.3 Chemostat and D-Stat cultivation in bioreactor.

---

Chemostat and D-Stat experiments were performed in a 3-l stirred tank bioreactor with a working volume of 1.5 L using the Biostat B. Braun Biotech International (Sartorius AG , Germany) with the acquisition software MFCS/win 2.0. The temperature was regulated at 28°C and the pH at 5.6 by the in-line addition of 5 M NaOH. The fermentation started in batch under full aerobic conditions. The Dissolved Oxygen was maintained above 20 % of saturation by modulating the air flow rate or the stirring rate in order to avoid oxygen limitation. 11 h after inoculation, when the glucose was totally consumed, continuous cultivation was started.

For chemostat cultivation, the bioreactor was continuously fed with the mineral medium (except  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) supplemented with 23  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose at 0.108  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . The bioreactor was fed with a second reservoir containing 60  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 0.0117  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  corresponding to a N/C ratio of 0.129  $\text{molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ . The working dilution rate was 0.08  $\text{h}^{-1}$ .

#### 2.4 D-Stat feeding strategy

When the steady state was reached after 5 residence times ( $\tau = 1/D$ ), the D-Stat was set up. The feeding rate of the mineral medium supplemented with glucose was maintained constant at 0.120  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  while the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  feeding rate followed a linear and smooth decrease from 0.0117  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  to 0.0003  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  for 50 h (deceleration factor : 0.00015  $\text{h}^{-2}$ ) corresponding to a decrease in the N/C ratio from 0.129 to 0.0028  $\text{molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ . All other parameters were maintained unchanged.

#### 2.5 Off gas analysis

The inlet and outlet gas compositions in carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and oxygen ( $\text{O}_2$ ) were measured by a fermentation gas monitor system (LumaSense technologies Europe). The system combines a multipoint sampler 1309 with a gas analyzer (INNOVA 1313). Gas analysis was performed every minute during the whole experiment.  $\text{CO}_2$  production rate ( $r_{\text{CO}_2}$ ) and  $\text{O}_2$  consumption rate ( $r_{\text{O}_2}$ ) were calculated as described by Poilpre *et al.* 2002. The Respiratory Quotient (RQ) was calculated as the molar ratio between  $r_{\text{CO}_2}$  and  $r_{\text{O}_2}$ .

#### 2.6 Determination of biomass

Yeast growth was evaluated by spectrophotometric measurements at 620 nm in a spectrophotometer (Biochrom Libra S4, UK) . Growth rates were determined based on time-courses of optical density ( $\text{OD}_{620\text{nm}}$ ).  $\text{OD}_{620\text{nm}}$  was calibrated against dry cell weight measurements. Cells were harvested by filtration using 0.45  $\mu\text{m}$  pore-size polyamide membranes (Sartorius Biolab Product) and dried to a constant weight at 60 °C for 48 h under partial vacuum of 200 mmHg (HERAEUS, France). A change

---

of 1 unit in  $OD_{620nm}$  value corresponded to 1.02 g dry matter per liter. The biomass formula used to convert cell dry weight into molar carbon concentration was  $CH_{1.744}O_{0.451}N_{0.132}$  for a molecular weight of 24.67 gCmol<sup>-1</sup> Cescut 2009.

### 2.7 Metabolite analysis

The culture supernatants were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (DIONEX Ultimate 3000, USA) using an Aminex HPX-87H<sup>+</sup> column (Bio-RAd, US) and the following conditions: a temperature of 50°C with 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as eluant (flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>) and a dual detection (IR and UV at 210 nm). Culture supernatant was obtained by centrifuging (MiniSpin ependorf, USA) the fermentation culture in Eppendorf tubes at 13,000 rpm for 3 min. The supernatant was filtered on Minisart filters 0.45 µm pore-size diameter polyamide membranes (Sartorius AG, Germany). The metabolites searched for detections and quantification were glucose, citrate, isocitrate, alpha-ketoglutarate, pyruvate, malate, succinate, fumarate, lactate and acetate.

The quantification of lipids was carried out by digestion as described by Browse *et al.* 1986 and by epifluorescence after staining the cells with Bodipy 493/503 in a Microplate reader (Synergy HT, Biotek, USA) as follows: the pellets were washed 3 times with PBS buffer solution (in gL<sup>-1</sup>, NaCl, 8; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15; KCl, 0.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2; pH at 6.9-7.1) at 4 °C and resuspended in the same buffer solution to a  $OD_{620nm}$  of 0.5; 1 ml of the cell suspension was mixed with 10 µL of Bodipy 493/503 (100 µg.ml<sup>-1</sup> in DMSO) and incubated 5 min at 4°C; the mixture was then centrifuged 3 min at 13,000 rpm and resuspended into 1 ml of PBS buffer solution; 200 µL of this cell suspension were placed in a 96-well Nunclon™Δ surface Microplate and read at 528 nm with an excitation wavelength value of 428 nm. The measurements were repeated 5 times showing a standard deviation lower than 5 %.

The quantification of residual ammonium in the medium was determined with an Orion ammonium probe (ORION research INC., Boston, USA) and a voltmeter (ORION pH/ISE Meter, USA) as follows: 5 mL of culture broth were filtered on 0.45 µm pore-size diameter polyamide membrane (Sartorius AG, Germany) and mixed with 200 µL of ISA buffer solution (Ionic Strength Adjustor: NaOH, 5 mol.L<sup>-1</sup>; disodium EDTA, 0.05 molL<sup>-1</sup> and methanol 1 g.L<sup>1</sup>). The concentration of NH<sub>4</sub> was determined with a calibration curve correlating the mV and the NH<sub>4</sub> concentration in a range of 10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl.

In all cultivations, considering the extracellular metabolites quantification, the biomass and the composition of off-gas , carbon and degree of reduction balances closed within 5 %.

### 2.8 Enzyme assays

---

Cells were harvested by centrifuging at 4000 rpm for 4 min at 4°C and washed four times by re-suspension in iced water. Around 50 mg of dry cell weight were resuspended in 1000 µl of extraction buffer (in mM, Tris/HCl, 50; KCl, 100; EDTA 1; DTT, 1; Benzamidine HCl, 1; final pH 7.5) and disrupted by vortexing the cell suspension containing 1 g of iced glass beads (d=0.2-0.5 mm, Sigma) for 10 cycles of 30 s vortex and 30 s in ice. Cells debris were removed by centrifuging the suspension at 4000 rpm for 40 min at 4°C. Proteins in the cell-free extracts were quantified by the Bradford assay.

All the enzymatic assays were carried out at 30°C. Activities of the ATP citrate lyase (E.C. 2.3.3.8), Acetyl CoA carboxylase (E.C. 6.4.1.2), Malic dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37), and Malic enzyme were determined as described by Srere 1962, Mishina 1971, Ochoa 1955a and Ochoa 1955b, respectively. Specific activities were expressed in milliunits per milligrams of total protein (mU.mg prot<sup>-1</sup>).

### 2.9 *Yarrowia lipolytica* microarray design

Microarray design was performed on a draft version of the *Yarrowia lipolytica* genome (S. Casaregola, personal communication). Design of the probes was done using PrSto, a newly developed probe designer and selector (Loux et al., to be published). PrSto takes into account a number of parameters to design effective oligonucleotide probes : i) uniqueness among the genome and lack of cross-hybridization, ii) homogeneity of Melting Temperature (T<sub>m</sub>), iii) lack of secondary structures, iv) distance from the 3' end of the gene. We ran PrSto on the 6586 candidate target genes. Our objectives were to obtain two 50-mer probes per target gene with a T<sub>m</sub> around 80°C, preferably located at the 3' end of the gene. On the 6586 protein-coding genes included in the design, 6648 (99%) targets have two or more probes, 674 (1%) one while 53 genes, have no optimal probe, due to their length, repetitions in the genome or composition. A complete description of the microarray can be found in NCBI's Gene Expression Omnibus [1], under accession number GPL15177 [2].

### 2.10 RNA extractions and hybridization

We used 28 sampling points, regularly spaced over the period of D-stat culture, for transcriptomic analysis. Frozen samples were mechanically disrupted with a bead beater (Microdismembrator, Sartorius, Germany) and a tungsten bead (Ø ~ 7 mm), for 2 min, at 2600 rpm. RNA was extracted from the resulting powder with the RNEasy Midi Kit (Qiagen, The Netherlands). The quality and quantity of RNA were assessed by capillary microelectrophoresis, with an RNA 600 Nano LabChips and a Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). Samples have been collected from the bioreactor directly through the sampling septum. For each time point, a volume equivalent to ca. 300 mg dry cell weight was harvested, frozen in liquid nitrogen, and further stored at -80°C until extraction. Frozen samples were treated by mechanical disruption, using a bead beater (Microdismembrator,

---

Braun, Germany) and a tungsten bead ( $\varnothing \sim 7$  mm), for 2 min at 2600 rpm. After disruption, the resulting cell powder was recovered and further processed for RNA purification using the RNEasy Midi Kit (Qiagen, The Netherlands), according to the manufacturer's instruction.

Samples were treated with the Low Input Quick Amp labelling kit (Agilent, USA), according to manufacturer's protocol. Hybridization was performed according to Agilent's general protocol [3]. A first set of 40 samples was hybridized as a preliminary experiment. Scanning was performed using a INNOSCAN 900 Microarray Scanner (INNOSYS, France). Images were further treated using Mapix v5.5.0 (Innopsys, France). To complement the coverage of the transcriptomic timecourse profile, a second set of 40 samples was performed. Due to technical failures, the scanning of the second dataset was performed using an Agilent scanner (Agilent, USA). Images were further treated using Feature Extraction v10.0 (Agilent, USA).

### 2.11 Data filtration, normalization and statistical analyses

Raw transcriptomic data were filtered and normalized using the R software [4] and the Limma package of the Bioconductor library [5, 6]. As the distributions of raw signals appear significantly different between the two datasets, the groups of samples were normalized and treated independently, to avoid the induction of data distortion by a stringent normalization method. Local background estimates were corrected using the “normexp + offset” method, using an offset value of 10 [7]. A « scale » normalization method was applied to normalize background subtracted data between arrays [6].

The normalized data were analyzed further, with MeV software [8]. Two-class unpaired Significance Analysis of Microarrays (SAM) tests [9] were performed between consecutive sampling points. Genes were identified as differentially expressed in cases of significant detection, with an absolute fold change above 2 and a false discovery rate lower than  $1 \times 10^{-5}$ . The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [1] and are accessible through GEO Series accession number GSE35447 [10].

## **3. Results and discussion**

### 3.1 Kinetics parameters during full oxidative metabolism of *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* was grown on glucose as the sole carbon source in the mineral medium under full aeration condition in batch and chemostat bioreactor. A maximal growth rate ( $\mu_{\max}$ ) of  $0.27 \text{ h}^{-1}$  was obtained under batch cultivation. The respiratory quotient (RQ) was constant at  $1.04 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  which is characteristic to a fully oxidative growth, confirmed by the absence of other metabolites

---

produced. The biomass yield on glucose ( $Y_{x/s}$ ) was then  $0.5 \text{ gg}^{-1}$ . This yield was higher than the one reported by Papanikolaou and Aggelis 2002 and Papanikolaou *et al.* 2006 ( $Y_{x/s}$  of 0.20 and 0.45  $\text{g}_{\text{DCW}}\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ , respectively), probably because those experiments were carried out in flasks where the oxygen transfer could be a limiting factor for biomass production.

Chemostat cultivation was carried out under glucose limitation at a dilution rate of  $0.08 \text{ h}^{-1}$ . At steady state, no residual glucose was detected in the medium suggesting a complete uptake of the glucose and no metabolites were detected in the broth. The Respiratory Quotient (RQ) was  $1.04 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  confirming the full oxidative metabolism (Fig. 1). A maximal biomass concentration of  $9.7 \text{ g}_{\text{DCW}}\text{L}^{-1}$  was obtained and remained constant during the whole chemostat cultivation corresponding to a  $Y_{x/s}$  of  $0.52 \text{ g}_{\text{DCW}}\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ .

### 3.2 Impact of the N/C ratio on the lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*

Under glucose-limited chemostat when N/C ratio was set at  $0.129 \text{ molNCmol}^{-1}$ , neither accumulation of lipids nor extracellular citric acid were detected. Lipids were accounted for 12% ( $\text{ww}^{-1}$ ) of the dried biomass, reportedly the amount for catalytic lipid (Ratledge, 1988). Photographs of labeled cells with Bodipy 493/503 fluorescent dye confirmed the absence of lipid accumulation at steady-state of the glucose-limited chemostat (Fig. 3a).

In order to investigate the impact of the N/C ratio on the metabolism of *Yarrowia lipolytica*, a slight variant of a D-stat was set once the steady-state of the chemostat was reached. The feeding rate of the Nitrogen source ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution) was gradually decreased from  $11.7 \text{ mlh}^{-1}$  to  $0.3 \text{ mlh}^{-1}$  in 50h at a constant change rate  $a_{\text{N/C}} = -0.0025 \text{ NmolCmol}^{-1}\text{h}^{-1}$ . The D-stat allowed us to modulate the N/C ratio from of  $0.129$  to  $0.0028 \text{ NmolCmol}^{-1}$  (Fig. 2). The concomitant decrease in the dilution rate was from  $0.08$  to  $0.072 \text{ h}^{-1}$  in 50 h (8% decrease overall) corresponding to a deceleration factor of  $0.00015 \text{ h}^{-2}$ .

The on-line determination of the Respiratory Quotient during the D-stat showed an increase in its value after 140 h from  $1.04 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  to a maximal value of  $1.12 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  reached at 165 h. This increase could be explained by an accumulation of compounds more reduced than the glucose into the cells, such as lipids. This was confirmed by cellular lipid content measurement (Fig. 1) and by Bodipy 493/503 cell staining (Fig. 3b,c,d,e). Therefore *Yarrowia lipolytica* accumulated lipids after N/C ratio reached a value of  $0.085 \text{ NmolCmol}^{-1}$ , however the lipid accumulation was low around 5% ( $\text{ww}^{-1}$ ). No citric acid production was detected before 174 h of culture (Fig. 1) time at which the RQ started to decrease due to the fact that citric acid is a more oxidized compound than glucose (Fig. 2) The N/C ratio for citric acid production was then evaluated equal to  $0.021 \text{ NmolCmol}^{-1}$ . Below this N/C ratio, *Yarrowia* accumulated further more lipids (up to 25% ( $\text{ww}^{-1}$ )) concomitantly with citric acid production (Fig. 3e).

---

### 3.3 Impact of the N/C ratio on the kinetic parameters in *Yarrowia lipolytica*

The decrease in the nitrogen supply caused the transition from a carbon limitation condition to a carbon and nitrogen limitation condition and a concomitant decrease in the specific growth rate was observed from 0.08 to 0.072 h<sup>-1</sup> (Fig.4). Fig.4 clearly shows that *Yarrowia lipolytica* had the ability to accumulate lipids without producing citric acid within a N/C range of 0.021–0.084 molNCmol<sup>-1</sup> where the specific rate of lipid accumulation slightly varied between 0.74 and 1.26 mg<sub>lip</sub>g<sub>DCW</sub><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Above the critical N/C ratio of 0.021 molNCmol<sup>-1</sup>, the specific rate of lipid accumulation strongly increased with a maximal value of 12 mg<sub>lip</sub>g<sub>DCW</sub><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> concomitantly with the increased production of citric acid.

The specific lipid production rate decrease could be linked to the nitrogen depletion or a active regulation system control. On one hand, protein turnover needs a constant nitrogen supplying. Under nitrogen limitation, autophagy could take place according to Kohda, Onodera and Ohsumi Kasemets *et al.* 2003; Onodera and Ohsumi 2005; Kohda *et al.* 2007. Autophagy consists in the degradation of cytoplasmic components including a significant amount of proteins and rRNA. This reduction of catalytic power implies an increase of maintenance value and a decrease of conversion yields. On the other hand, lipid accumulation induces a macromolecular composition upheaval which impact intracellular chemical and physical proprieties: pH, osmotic pressure, steric constraint. Physical accumulation capacity could be reached and a superior regulation system may control lipid accumulation metabolism.

### 3.4 Impact of the N/C ratio on specific enzyme activities

The enzymatic activities of ATP citrate lyase (ACL), acetyl CoA carboxylase (ACC), malic enzyme (ME) and malate dehydrogenase (MD) were determined based on their known involvement on lipid accumulation and citric acid production. The profiles during the chemostat and D-stat are shown in Fig. 5. An pronounced increased in the activity of ACL, ACC and ME was observed during the D-stat, while the activity of MD very slightly increased over the course of the D-stat.

The profile of the ACL specific activity increased when the N/C ratio reached a value of 0.084 molN.Cmol<sup>-1</sup>. ACL supplies the acetyl CoA units needed for the synthesis of lipids Sreere and Lipmann 1953; Boulton and Ratledge 1981. The activity of ACL was maximal during lipid accumulation and sharply decreased with the production of citric acid at 170 h. As shown by Pfitzner *et al.* 1987 the activity of ACL was highly affected by the presence of palmitoyl-CoA, in our study it induced a loss on activity of 60% then the maximal presence of palmitoyl-CoA was detected (data not shown).

Acetyl CoA carboxylase (ACC) has been reported by many authors to be the key enzyme for lipid accumulation Volpe and Vagelos 1976; Davis *et al.* 2000. In our study, ACC showed its maximal activity during lipid accumulation however its activity did not varied as observed for ACL during the

---

production of citric acid. On the other hand, the profile of the malic enzyme (ME) specific activity showed significant increase after 165h when the specific lipid accumulation rate strongly increased. The activity of ME was maximal at 180 h where the lipid accumulation exhibited its highest specific rate. The malic enzyme was reported to be responsible for the supply of NADPH (less than 15%, Ratledge 2002) . Our data pointed out a basal ME abundance able to support low lipid accumulation rate (slightly over  $1 \text{ mg}_{\text{lip}}\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). For higher specific lipid production overexpression of the ME could be needed for further NADPH supply sustaining increasing fatty acid synthesis.

The activity of malate dehydrogenase showed a weak decrease during citric acid production which is in agreement with the results obtained by Mullinax *et al.* (1982) and Fahien *et al.* (1988).

### 3.5 Impact of the N/C ratio on the transcriptome

A detailed list of genes detected as differentially expressed can be found in supplementary tables 1 and 2. 486 and 998 genes were identified as differentially expressed, respectively in data set 1 and 2 (cf. table 1). The larger amount of genes detected in dataset 2 can be partially explained by the sampling design. The introduction of a single comparison between two distant samples (i.e. samples 32 and 47) highlights itself 463 genes, while the analysis of consecutive sampling points is characterized by a rather limited number of differentially expressed genes.

Two different behaviours can be identified through this observation. During the D-stat, some genes appears to be slowly over- or under-expressed. As such, their differential expression can only be detected when comparing distant time points (e.g. comparison between samples 32 and 47, cf table 1 and supplementary table S2). This highlights a continuous adaptation along the slow decrease of N/C within the D-stat. This adaptation is mainly characterized by a decrease in metabolic activities, including amino-acid metabolism, nucleic acid metabolism, and cell cycle.

Meanwhile, the comparisons between consecutive time points allow to identify groups of genes that are strongly responding at a given time to a specific N/C ratio. Following a first set of downregulations, very few genes are responding until the N/C ratio reached ca. 0.066 Nmol/Cmol (ca. half its initial value, cf. table 1 and supplementary table S1). At this stage, an increase in transcriptomic activity could be detected, mainly characterized by a reduction of protein synthesis, and the repression of several genes related to ribosomal subunits, transcription, translation and elongation factors. Two genes involved in the TCA cycle, namely YALI0C24101g encoding for the pyruvate decarboxylase, and YALIOE05137g encoding for the subunit 1 of isocitrate dehydrogenase, appear strongly repressed at this stage, indicating a potential shift towards citrate accumulation.

Gene YALIOD20482g, encoding a Gat1-like transcription factor involved in nitrogen catabolite repression, appears particularly expressed when N/C ratio reaches ca. 0.053 Nmol/Cmol (e.g. sample 42, cf. Table 1 and supplementary table S1). This, along with the many genes detected

---

involved in nitrogen metabolism, reflects upon the transition of the cell metabolism in search for an alternative nitrogen source.

As N/C ratio approaches ca. 0.045 Nmol/Cmol (e.g. sample 44), a first major transcriptomic event could be detected, with 213 genes identified as over-expressed (cf. Table 1 and supplementary table S1). Among these genes involved in various metabolic processes, the over-expression of gene YALI0C11407g, encoding for the enzyme acetyl-CoA carboxylase, appears as the first clue for an increase in fatty acid synthesis activity.

Following this event, another major transcriptomic switch is detected when N/C ratio reaches ca. 0.023 Nmol/Cmol (e.g. sample 49), with 272 genes over-expressed (cf. Table 1 and supplementary table S2). The identification of genes involved in cell cycle, or encoding ribosomal subunits, suggests a restart of the protein machinery. More importantly, this particular step of the D-stat appears to be a turning point in lipid synthesis, with several genes involved in glycolysis (e.g. ), pyruvate metabolism (e.g. YALI0E15708g, encoding for the malate synthase), TCA cycle (YALI0C24101g, YALI0D04741g, YALI0D06303g, YALI0D09361g, YALI0E02684g, YALI0E14190g, YALI0E29667g, YALI0E33517g, respectively encoding pyruvate carboxylase subunit B, succinyl-CoA synthetase beta chain, isocitrate dehydrogenase, aconitase, citrate synthase, malate dehydrogenase, succinate dehydrogenase (ubiquinone) cytochrome b subunit precursor, 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component) and fatty acid synthesis (e.g. YALI0B15059g and YALI0B19382g, encoding for the two subunits of the fatty acid synthetase, and YALI0B20196g encoding a fatty acid elongase) identified as over-expressed. In addition, a significant part of the genes appear to be linked with oxidative phosphorylation, potentially highlighting a modification of the adenine nucleotide pool available.

Following these transcription changes, 133 genes are further repressed as the N/C ratio reaches down to 0.0185 Nmol/Cmol (e.g. sample 40), including 95 genes identified as over-expressed in the previous step (cf. Table 1 and supplementary table S2). The increase transcriptomic activity previously highlighted in protein synthesis, TCA cycle and fatty acid synthesis appears as a transient phenomena. Gene YALI0C11407g, encoding for the enzyme acetyl-CoA carboxylase and previously highlighted as over-expressed in an earlier stage of the D-stat, sees his expression reduced as well.

Later, another large set of genes (#508, cf Table 1 and supplementary table S2) is detected as repressed when N/C ratio reaches ca. 0.0126 Nmol/Cmol (e.g. sample 52). These genes cover various pathways, and their high number is most likely an indication of a global shutdown of the general metabolism of the yeast at this stage of the D-stat. This can be also supported by the limited number of differential expression detected in the subsequent samples.

#### **4. Conclusions**

---

The experiments carried out using chemostat and D-stat cultivation techniques with a smooth controlled change on a cultivation parameter showed the potential of these techniques in the determination of the critical parameters and events involved in the metabolic shift from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* on glucose. Our results showed that one of the most important factors in the metabolic transition is the N/C ratio which was identified to be 0,085 and 0.021 molNCmol<sup>-1</sup> for lipid accumulation and citric acid production, respectively. The accumulation of lipids and production of citric acid seems to be regulated by a coupled interaction between the ATP citrate lyase (ACL) and the malic enzyme (ME) since the activity of both enzymes were highly induced during lipid accumulation and repressed during citric acid production. However further studies should be performed in order to examine the capacities of *Yarrowia lipolytica* mutants strains during the transition of this metabolic shift. Our results show major importance for future industrial bioprocess concerning the production of lipids due to the advantage of having high productivity and yield by using agricultural substrates avoiding the concomitant production of citric acid.

## 5. Acknowledgments

This work was partially supported by the National Agency of Reserch (ANR, Project Lipicaero, France) and by a Doctoral grant from the National Council of Science and Technology, (Conacyt, Mexico).

## 6. References

- Anastassiadis, S., A. Aivasidis and C. Wandrey (2002) Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation, *Applied Microbiology And Biotechnology* 60 (1-2), 81-87.
- Anastassiadis, S., C. Wandrey and H. J. Rehm (2005) Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio, *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21 (5), 695-705.
- Bankar, A. V., A. R. Kumar and S. S. Zinjarde (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (5), 847-865.
- Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J. L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve and J. M. Nicaud (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, *Progress in Lipid Research* 48 (6), 375-387.
- Boer, V. M., J. H. de Winde, J. T. Pronk and M. D. W. Piper (2003) The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur, *Journal Of Biological Chemistry* 278 (5), 3265-3274.
- Boulton, C. A. and C. Ratledge (1981) Correlation Of Lipid-Accumulation In Yeasts With Possession Of Atp-Citrate Lyase, *Journal Of General Microbiology* 127 (NOV), 169-176.
- Browse, J., N. Warwick, C. R. Somerville and C. R. Slack (1986) Fluxes Through The Prokaryotic And Eukaryotic Pathways Of Lipid-Synthesis In The 16-3 Plant *Arabidopsis-Thaliana*, *Biochemical Journal* 235 (1), 25-31.
- Cescut, J. (2009) Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique: physiologie et performance de procédés,

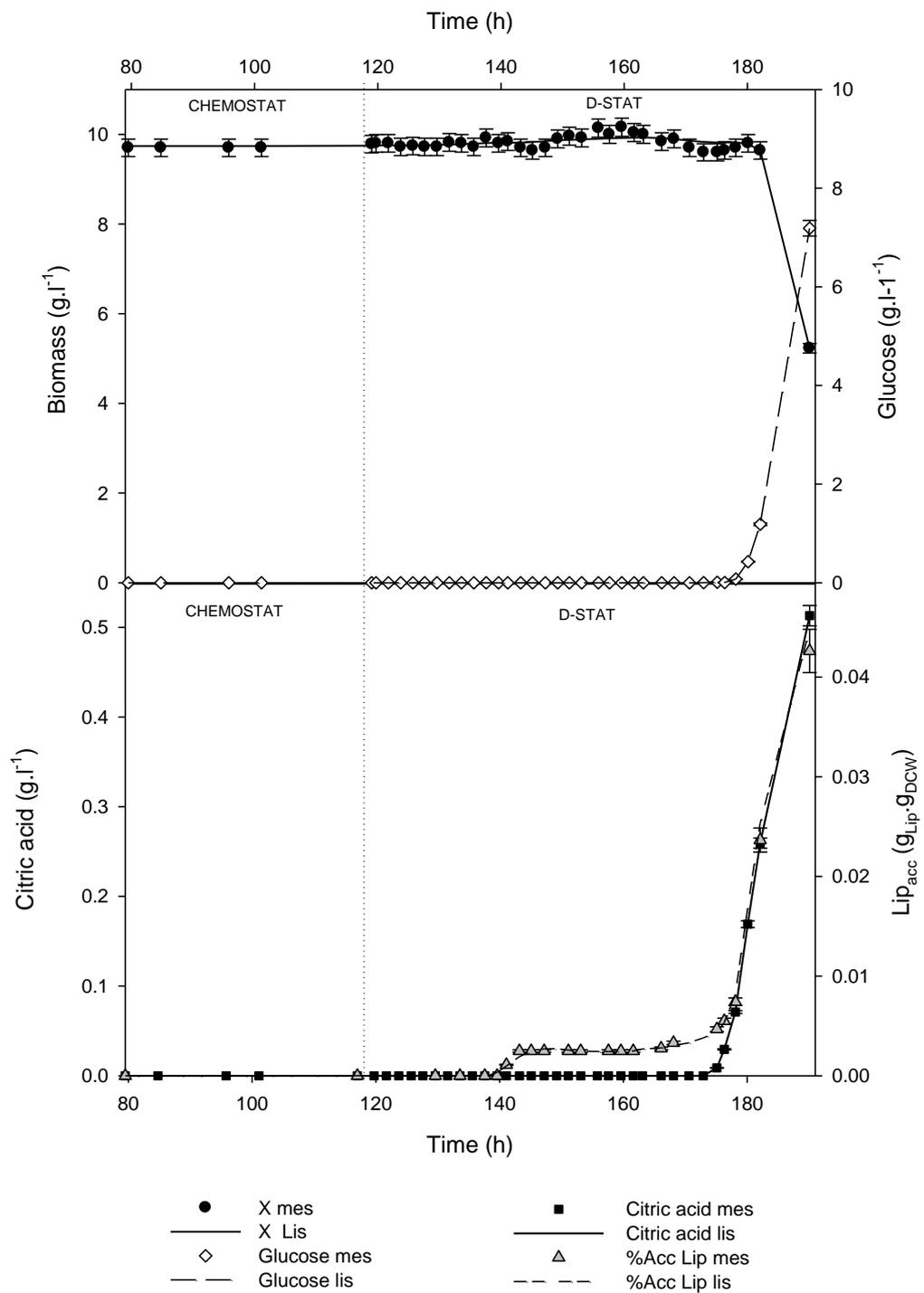
- 
- Davis, M. S., J. Solbiati and J. E. Cronan (2000) Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*, *Journal Of Biological Chemistry* 275 (37), 28593-28598.
- Deak, T. (2001) Identification of yeasts isolated from poultry meat, *Acta Biologica Hungarica* 52 (2-3), 195-200.
- Destain, J., D. Roblain and P. Thonart (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology Letters* 19 (2), 105-107.
- Egli, T. (1991) On Multiple-Nutrient-Limited Growth Of Microorganisms, With Special Reference To Dual Limitation By Carbon And Nitrogen Substrates, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 60 (3-4), 225-234.
- Fahien, L. A., E. H. Kmietek, M. J. Macdonald, B. Fibich and M. Mandic (1988) REGULATION OF MALATE-DEHYDROGENASE ACTIVITY BY GLUTAMATE, CITRATE, ALPHA-KETOGLUTARATE, AND MULTIENZYME INTERACTION, *Journal of Biological Chemistry* 263 (22), 10687-10697.
- Fgaier, H. and H. J. Eberl (2011) Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup, *Journal Of Theoretical Biology* 273 (1), 103-114.
- Finogenova, T. V., S. V. Kamzolova, N. V. Shishkanova, A. P. Ilchenko and E. G. Dedyukhina (1996) Influence of the specific growth rate and zinc ions on the synthesis of citric and isocitric acids and on the biomass composition of *Yarrowia lipolytica* N 1 yeast, *Applied Biochemistry And Microbiology* 32 (1), 30-34.
- Gill, C. O., M. J. Hall and C. Ratledge (1977) Lipid-Accumulation In An Oleaginous Yeast (*Candida* 107) Growing On Glucose In Single-Stage Continuous Culture, *Applied And Environmental Microbiology* 33 (2), 231-239.
- Guillouet, S. and J. M. Engasser (1996) Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium and potassium limited continuous cultures under high osmotic pressure, *Applied Microbiology And Biotechnology* 46 (3), 291-296.
- 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, *Journal of Biological Chemistry* 268 (15), 10946-10952.
- Holdsworth, J. E., M. Veenhuis and C. Ratledge (1988) Enzyme-Activities In Oleaginous Yeasts Accumulating And Utilizing Exogenous Or Endogenous Lipids, *Journal Of General Microbiology* 134 2907-2915.
- Ilchenko, A. P., N. V. Shishkanova, O. G. Chernyavskaya and T. V. Finogenova (1998) Oxygen concentration as a factor controlling central metabolism and citric acid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol, *Microbiology* 67 (3), 241-244.
- Kamzolova, S. V., N. V. Shishkanova, I. G. Morgunov and T. V. Finogenova (2003) Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*, *Fems Yeast Research* 3 (2), 217-222.
- Kasemets, K., M. Drews, I. Nisamedtinov, K. Adamberg and T. Paalme (2003) Modification of A-stat for the characterization of microorganisms, *Journal Of Microbiological Methods* 55 (1), 187-200.
- Kohda, T. A., K. Tanaka, M. Konomi, M. Sato, M. Osumi and M. Yamamoto (2007) Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes, *Genes To Cells* 12 (2), 155-170.
- Lanciotti, R., A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola and M. E. Guerzoni (2005) Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater, *Bioresource Technology* 96 (3), 317-322.
- Mishina, M., Kamiryo, T., Numa, S. (1971) Acetyl-CoA carboxylase from *Candida lipolytica*, *Methods In Enzymology* 71 37-39.
- Moeller, L., B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf and T. Bley (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *Engineering In Life Sciences* 7 (5), 504-511.
- Mullinax, T. R., J. N. Mock and J. H. Harrison (1982) REGULATION OF MALATE-DEHYDROGENASE ACTIVITY BY CITRATE, *Federation Proceedings* 41 (4), 1141-1141.
- 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 Research* 2 (3), 371-379.
- Ochoa, S. (1955a) Malic Dehydrogenase From Pig Heart, *Methods In Enzymology* 1 735-739.
-

- 
- Ochoa, S. (1955b) Malic Enzyme, *Methods In Enzymology* 1 739-753.
- Onodera, J. and Y. Ohsumi (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation, *Journal Of Biological Chemistry* 280 (36), 31582-31586.
- Paalme, T., R. Elken, R. Vilu and M. Korhola (1997) Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat), *Enzyme And Microbial Technology* 20 (3), 174-181.
- Paalme, T., A. Kahru, R. Elken, K. Vanatalu, K. Tiisma and R. Vilu (1995) The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat), *Journal Of Microbiological Methods* 24 (2), 145-153.
- Papanikolaou, S. and G. Aggelis (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycérol in a single-stage continuous culture, *Bioresource Technology* 82 (1), 43-49.
- Papanikolaou, S., M. Galiotou-Panayotou, I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc and G. Aggelis (2006) Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*, *Current Microbiology* 52 (2), 134-142.
- Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycérol, *Journal Of Applied Microbiology* 92 (4), 737-744.
- Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues, *Current Microbiology* 46 (2), 124-130.
- Pfützner, A., C. P. Kubicek and M. Rohr (1987) PRESENCE AND REGULATION OF ATP - CITRATE LYASE FROM THE CITRIC-ACID PRODUCING FUNGUS *ASPERGILLUS-NIGER*, *Archives of Microbiology* 147 (1), 88-91.
- Poilpre, E., D. Tronquit, G. Goma and V. Guillou (2002) On-line estimation of biomass concentration during transient growth on yeast chemostat culture using light reflectance, *Biotechnology Letters* 24 (24), 2075-2081.
- Ratledge, C. (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, *Biochemical Society Transactions* 30 1047-1050.
- Rattray, J. B. M., A. Schibeci and D. K. Kidby (1975) LIPIDS OF YEASTS, *Bacteriological Reviews* 39 (3), 197-231.
- Rymowicz, W., A. Rywinska and B. Zarowska (2007) Biosynthesis of citric acid from crude glycérol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations, *Journal Of Biotechnology* 131 (2), S149-S150.
- Sattur, A. P. and N. G. Karanth (1989) Production Of Microbial Lipids.3. Influence Of C/N Ratio - Experimental-Observations, *Biotechnology And Bioengineering* 34 (6), 872-874.
- Sinigaglia, M., R. Lanciotti and M. E. Guerzoni (1994) Biochemical And Physiological-Characteristics Of *Yarrowia-Lipolytica* Strains In Relation To Isolation Source, *Canadian Journal Of Microbiology* 40 (1), 54-59.
- Srere, P. A. (1962) Citrate-Cleavage Enzyme, *Methods In Enzymology* 5 641-644.
- Srere, P. A. and F. Lipmann (1953) AN ENZYMATIC REACTION BETWEEN CITRATE, ADENOSINE TRIPHOSPHATE AND COENZYME-A, *Journal of the American Chemical Society* 75 (19), 4874-4874.
- Volpe, J. J. and P. R. Vagelos (1976) Mechanisms And Regulation Of Biosynthesis Of Saturated Fatty-Acids, *Physiological Reviews* 56 (2), 339-417.
- Waite, M. and S. J. Wakil (1962) STUDIES ON MECHANISM OF FATTY ACID SYNTHESIS.12. ACETYL COENZYME A CARBOXYLASE, *Journal of Biological Chemistry* 237 (9), 2750-&.
- Yalcin, H. T. and F. B. Ucar (2009) Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses, *Annals Of Microbiology* 59 (3), 477-483.
- Zhang, Y., I. P. Adams and C. Ratledge (2007) Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation, *Microbiology-Sgm* 153 2013-2025.

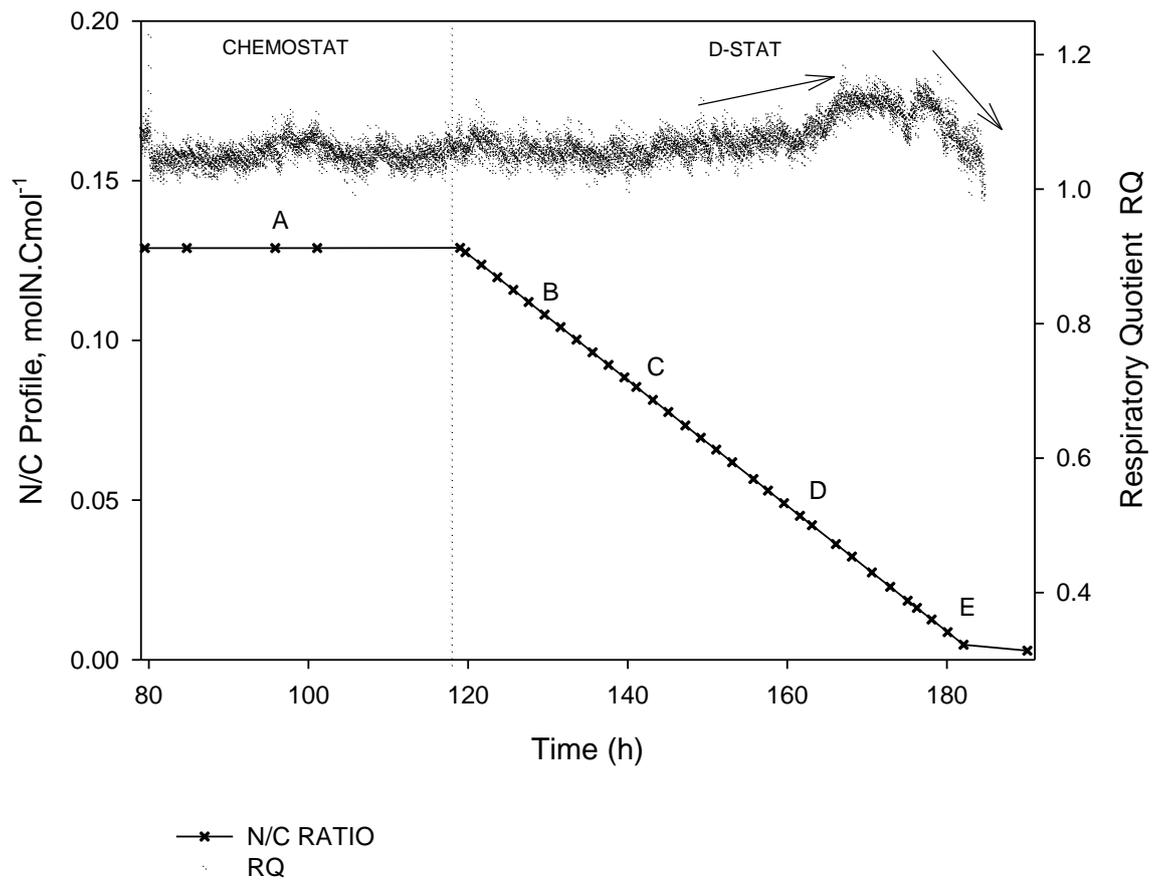
1. Edgar R, Domrachev M, Lash AE : Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucl Acids Res* 2002, 30: 207-210.

2. Microarray platform GPL15177, Agilent-031148 *Yarrowia lipolytica* V2  
[\[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL15177\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL15177)

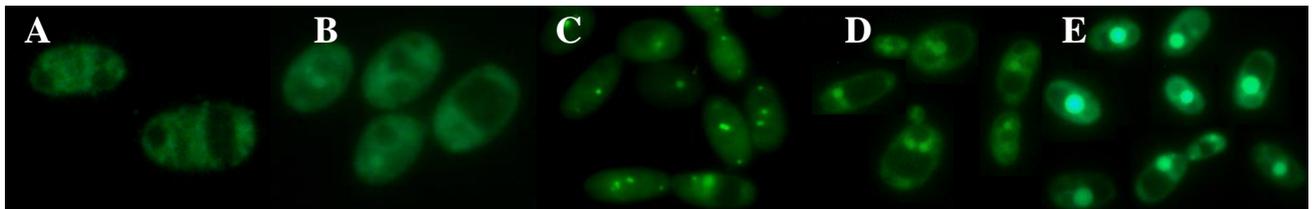
- 
3. Agilent general hybridization protocol [[http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040\\_GeneExpression\\_One-color\\_v6.5.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf)]
  4. R Foundation for Statistical Computing : R: A Language and Environment for Statistical Computing. [<http://www.r-project.org>]
  5. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J : Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004, 5: R80.
  6. Smyth GK : Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Edited by Gentleman RC, Carey VJ, Huber W, Irizarry R, Dudoit S. New York : Springer ; 2005:397-420.
  7. Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, Smyth GK : A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 2007, 23: 2700-2707.
  8. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J : TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotech* 2003, 34: 374-378.
  9. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G : Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 5116-5121.
  10. GEO data series GSE35447, *Yarrowia lipolytica* biolipid production during D-stat setup [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE35447>]



**Figure 1. Biomass, Glucose, Citric acid, Total lipids f(time)**



**Figure 2. N/C ratio and Respiratory Quotient f(time)**



**Figure 3. Lipid detection with Bodipy 493/503 at different moments during the chemostat and D-Stat cultivation**

Reference of the pictures:

A: 101,1 h (E22)

B: 131,6 h (E30)

C: 143,2 h (E36)

D: 166,1 h (E47)

E: 182,1 h (E55)

Figure 4. qLipids, qCitric acid and qPolysaccharids f(N/C ratio)

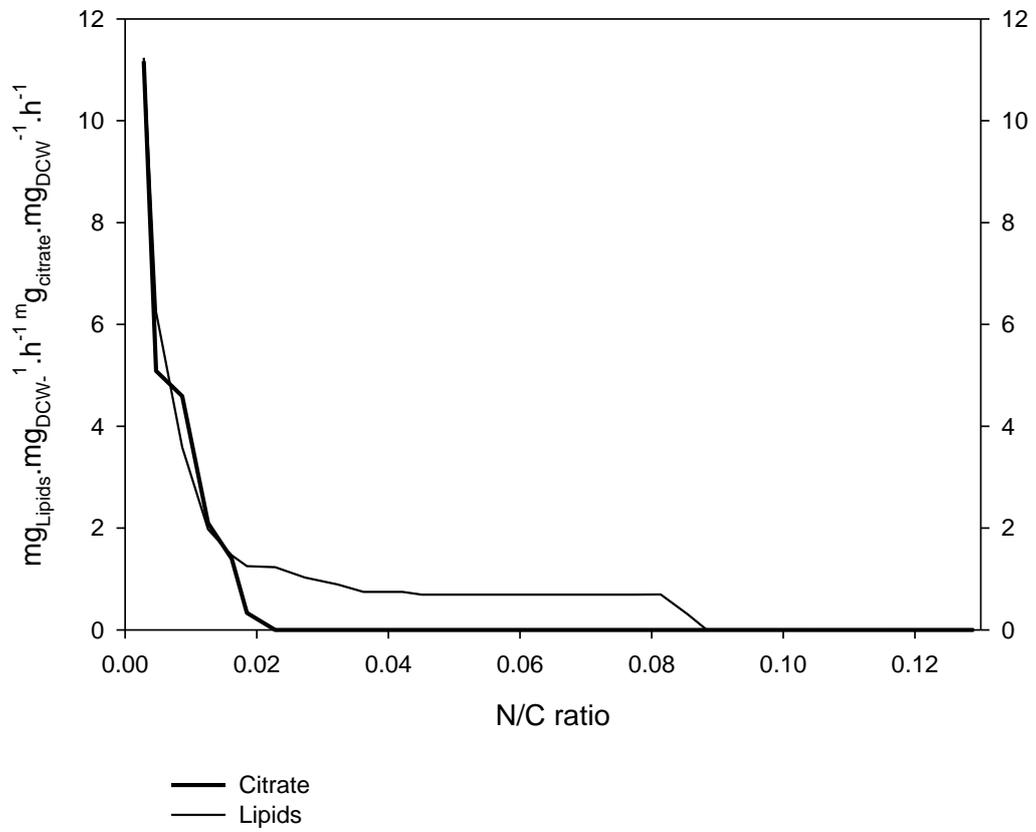
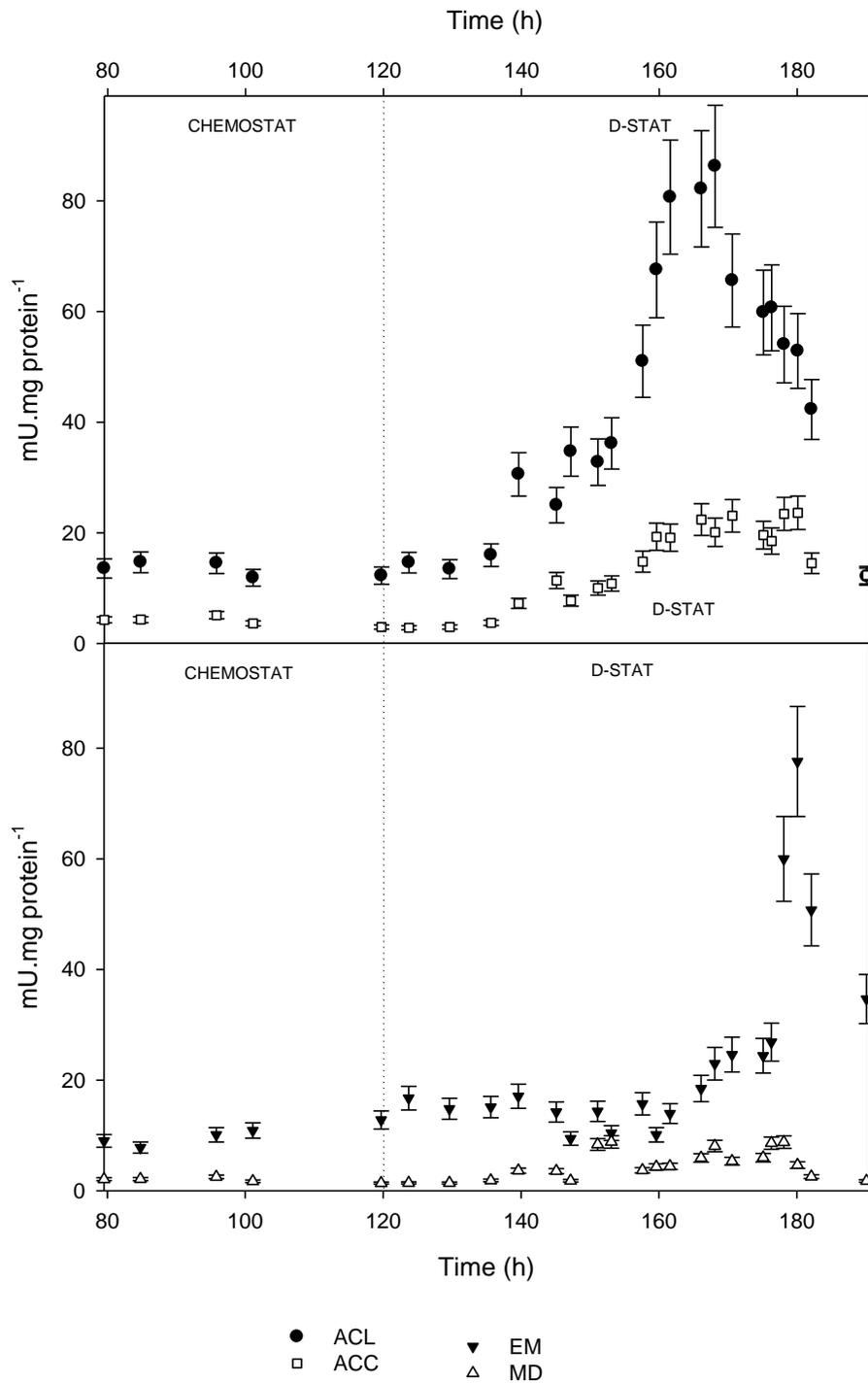


Figure 5. Enzymatic activities



**Table 1 : Sampling time, N/C ratio, and number of differentially expressed genes detected between consecutive microarray samples. Genes are detected as significantly differentially expressed between two consecutive sampling points with a minimum absolute fold-change of 2, and a false discovery rate inferior to 1.10e-5.**

Sample	Dataset	Time (h)	N/C (Nmol.Cmol <sup>-1</sup> )	# Upregulated genes	# Downregulated genes
Chemostat phase					
22	1	101	0.128	n.a.	n.a.
D-Stat initiation					
23	1	119	0.127	n.a.	n.a.
24	1	119.6	0.123	n.a.	n.a.
26	2	123	0.115	n.a.	n.a.
30	2	131	0.100	0	55
32	2	135	0.092	9	2
34	1	139	0.085	2	60
35	1	141	0.081	0	0
36	1	143	0.077	0	10
37	1	145	0.073	0	10
38	1	147	0.069	4	0
39	1	149	0.065	9	66
40	1	151	0.061	10	0
41	1	153	0.056	0	10
42	1	155	0.053	18	31
43	1	157	0.049	12	0
44	1	159	0.045	213	0
45	1	161	0.042	0	79
(47)	(2)	(166)	(0.032)	(112)	(351)
48	2	168	0.027	0	32
49	2	170	0.022	272	14
50	2	172	0.018	1	133

---

<b>Sample</b>	<b>Dataset</b>	<b>Time (h)</b>	<b>N/C (Nmol.Cmol<sup>-1</sup>)</b>	<b># Upregulated genes</b>	<b># Downregulated genes</b>
51	2	175	0.016	10	3
52	2	176	0.012	1	508
53	2	178	0.008	64	32
54	2	180	0.004	0	0
55	2	182	0.002	1	1

---

### 3.3 Culture de *Yarrowia lipolytica* W29 en mode fed-batch : validation des résultats obtenus en chémostat et D-stat

A partir des résultats obtenus en culture continue et notamment en D-stat, les objectifs principaux de ce travail étaient de valider les résultats obtenus avec *Yarrowia lipolytica* W29 en termes de caractérisation cinétique des paramètres clés à la transition métabolique du métabolisme oxydatif à l'accumulation de lipides et la production d'acide citrique. Notamment le D-stat nous a permis de quantifier le ratio  $rN/rC$  critique vers la production de citrate. Les questions auxquelles nous avons voulu répondre ici étaient les suivantes :

- peut-on développer une stratégie de conduite en mode fed-batch pour déterminer ce ratio  $rN/rC$  critique de manière plus rapide que le D-stat ?
- la valeur de  $rN/rC$  critique est-elle indépendante du mode de conduite ?

Dans ce chapitre seront montrés les résultats obtenus en culture fed-batch et une discussion et comparaison avec les résultats obtenus en chémostat et D-stat sera présentée.

#### 3.3.1 Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch à partir de la connaissance du N/C ( $rN/rC$ ) critique

La stratégie suivie ici est une adaptation du protocole de conduite de culture développé par J. Cescut (2009) pour produire des lipides sans produire d'acide citrique. L'adaptation consiste ici à réaliser un gradient décroissant du ratio N/C d'alimentation au cours du fed-batch.

La stratégie de mise en place de la limitation nutritionnelle pendant les cultures en fed-batch a consisté en 4 étapes différentes (figure 28) :

1. Une phase de croissance, où la culture a été maîtrisée pour avoir une croissance exponentielle contrôlée par l'apport du glucose afin de maintenir un taux de croissance ( $\mu_{\text{expo}}$ ) entre 0,20 et 0,22  $\text{h}^{-1}$ . Le contrôle du pH a été assuré par une solution de  $\text{NH}_3$  5 M permettant aussi de subvenir aux besoins en azote de la levure. Durant cette phase les oligo-éléments et vitamines nécessaires à la croissance ont été contenus dans le milieu salin initial avec une concentration suffisante pour produire au moins 15  $\text{g.L}^{-1}$  de biomasse totale sans lipides accumulés, appelée biomasse catalytique ( $X^*$ ). Une fois que la concentration en biomasse totale atteint 12  $\text{g.L}^{-1}$ , la régulation de pH

s'effectue par l'ajout d'une solution de KOH 5 M permettant ainsi l'épuisement en azote dans le moût de culture.

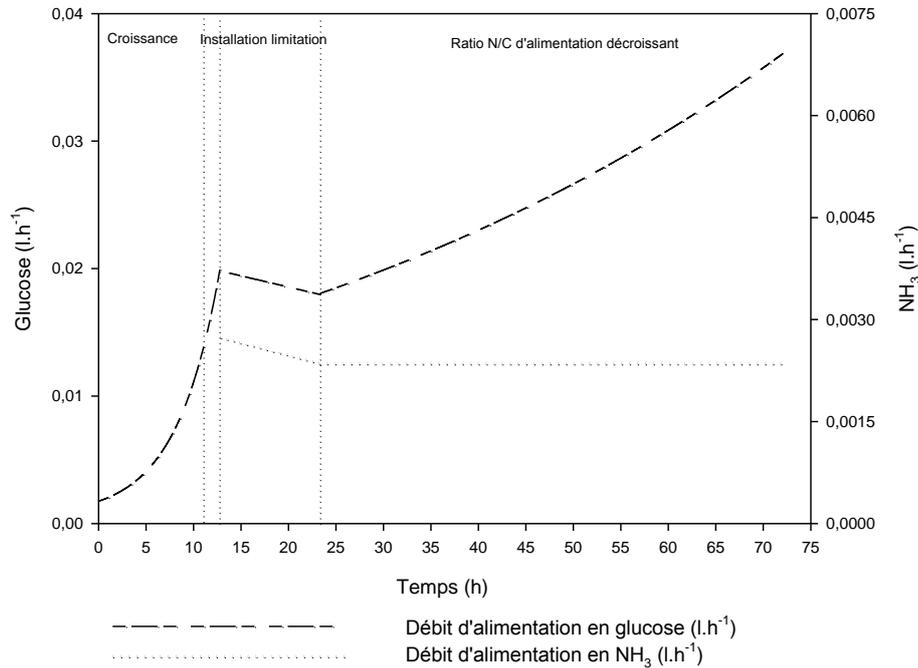


Figure 28. Profils des débits d'alimentation ciblés en glucose et en NH<sub>3</sub> au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29.

2. Une étape de mise en place de la limitation, où les apports en carbone et en azote sont contrôlés afin de maintenir un ratio rN/rC permettant l'accumulation de lipides sans la production simultanée d'acide citrique. La valeur du ratio N/C d'alimentation a été choisie en fonction des résultats obtenus pendant les cultures en D-stat avec la souche sauvage de *Yarrowia lipolytica* W29. La valeur critique du ratio N/C d'alimentation pour l'accumulation de lipides a été identifiée à 0,085 molN.Cmol<sup>-1</sup> tandis que la valeur critique du ratio N/C d'alimentation pour la production d'acide citrique était de 0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup> en D-stat. En se basant sur ces résultats, la valeur choisie pour l'étape de limitation pendant le fed-batch a été de 0,034 molN.Cmol<sup>-1</sup>, une valeur qui devait permettre d'induire une accumulation de lipides sans production d'acide citrique. Pendant l'étape de limitation des ajouts en oligo-éléments, vitamines et sels (hors azote) ont été réalisés tous les 10 g.L<sup>-1</sup> d'accroissement de la biomasse.
3. Une étape où le ratio N/C d'alimentation a été constamment diminué par les ajouts contrôlés d'un flux de glucose et d'azote dans le milieu de culture de manière indépendante. Pour cette dernière étape, l'apport en azote a été main-

---

tenu constant alors que l'apport en glucose a suivi un profil exponentiel accroissant pendant environ 49 h.

### 3.3.2 Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch

Nous avons décidé de démarrer la culture en conditions non limitées en azote (phase de croissance) dans le but de produire une quantité suffisante de biomasse catalytique, et d'étudier par la suite les phénomènes de la transition métabolique chez *Yarrowia lipolytica* W29. Le choix du ratio N/C initial d'étude (phase limitation) a été fixé à  $0,034 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ , valeur qui doit permettre l'accumulation de lipides sans production d'acide citrique en D-stat.

Durant la limitation nutritionnelle comprise entre 13 et 23 h, la valeur du ratio N/C d'alimentation a été graduellement diminuée de  $0,034 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  à  $0,0326 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  correspondant à une dynamique de limitation de  $0,17 \text{ mmolN.Cmol}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Durant la période comprise entre 23 et 72 h, la valeur du ratio N/C d'alimentation a été graduellement diminuée de  $0,0326 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  à  $0,0158 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  correspondant à une dynamique de limitation de  $0,34 \text{ mmolN.Cmol}^{-1}\text{h}^{-1}$ , figure suivante :

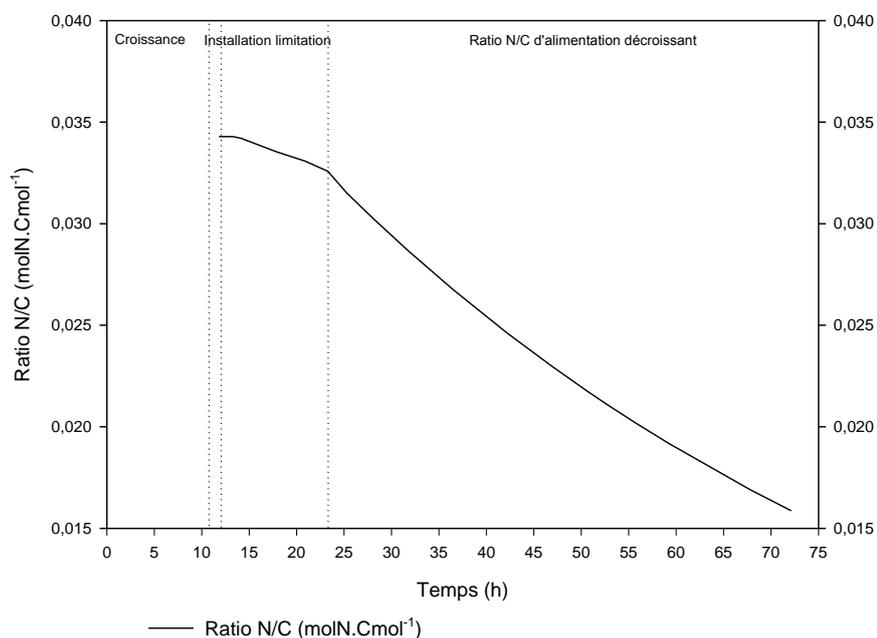


Figure 29. Evolution du profil du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

### 3.3.3 Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch

#### 3.3.3.1 Métabolites majeurs

La figure suivante montre l'évolution des profils des masses en métabolites majeurs tels que la biomasse totale, citrate, glucose et azote résiduels obtenus au cours de la culture :

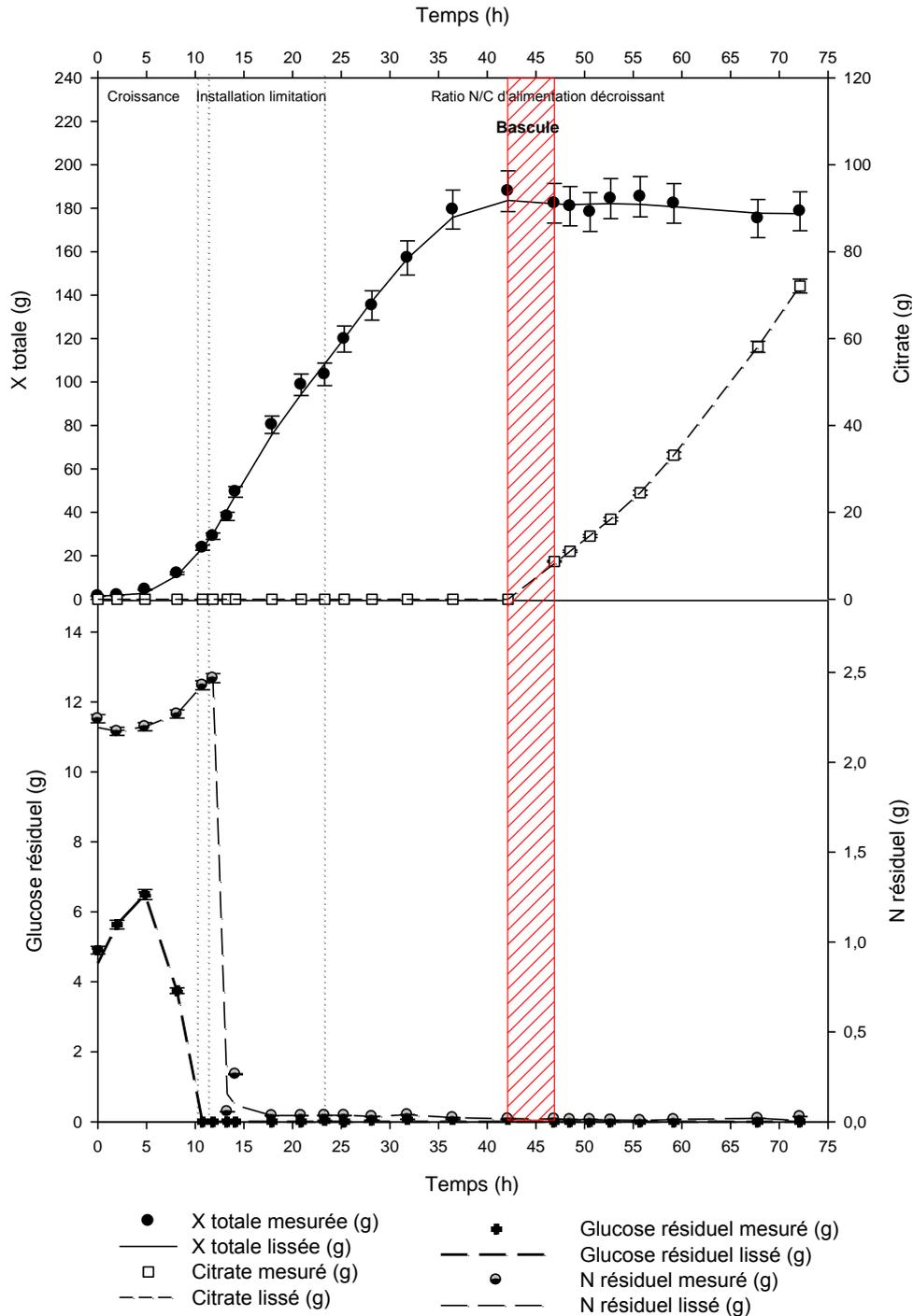


Figure 30. Evolution des profils de biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

---

Grâce à l'apport exponentiel maîtrisé d'une solution de glucose à 700 g.L<sup>-1</sup> comme seule source carbonée, le taux de croissance maximal ( $\mu_{\text{expo}}$ ) a été contrôlé à 0,20 h<sup>-1</sup>.

Pendant la phase de croissance la quantité de biomasse totale obtenue a été de 29 g (12,8 g.L<sup>-1</sup>) correspondant à un rendement de  $Y_{x/s}=0,54 \text{ g}_{X^*} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ , résultat en adéquation avec le rendement obtenu pendant la phase de croissance lors de la culture en chimostat ( $Y_{x/s,\text{chem}}$  de 0,52  $\text{g}_{X^*} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ ). Néanmoins, une quantité maximale de 6,5 g (2,8 g.L<sup>-1</sup>) de glucose résiduel a été détectée 5 h après le début de la culture pouvant être expliqué par un décalage entre le démarrage de la croissance et le profil d'alimentation en glucose dû à l'adaptation de la souche aux nouvelles conditions de culture.

La phase de croissance a été réalisée sous aucune limitation nutritionnelle où l'apport en azote a été assuré par la solution correctrice de pH (NH<sub>3</sub> 5M). La quantité résiduelle en azote a été dosée dans le milieu de culture pendant cette phase indiquant une valeur comprise entre 2,2-2,46 g (0,96-1,0 g.L<sup>-1</sup>). Un métabolisme purement oxydatif a été confirmé par une production très faible d'acides organiques (hors du citrate) ou de lipides accumulés.

La phase de croissance a été précédée par une phase de transition due à l'épuisement en azote dans le milieu de culture où la solution de NH<sub>3</sub> 5 M a été substituée par une solution de KOH 5 M. Ce changement de la solution correctrice de pH a permis de mettre en place les conditions parfaitement maîtrisées d'une limitation azotée lorsque la concentration résiduelle d'azote dans le milieu de culture devient critique par rapport aux besoins anaboliques de la levure. Pendant la phase d'épuisement d'azote, le taux de croissance a diminué de 0,196 à 0,178 h<sup>-1</sup>. Chez *Yarrowia lipolytica* W29 cette étape a duré environ 1 heure (figure 33).

Pendant la transition du métabolisme oxydatif vers la production de lipides, un des premiers phénomènes observés a été l'accumulation transitoire de polysaccharides dès que la concentration en azote dans le milieu de culture est devenue limitante. Une accumulation maximale de 9,5 ( $\text{m}_{\text{Polys}} \cdot \text{m}_{X^*}^{-1}$ ) accumulés a été déterminée à 13 h ce qui correspond à une vitesse spécifique de production de polysaccharides ( $q_{\text{Polys}}$ ) de 15,4  $\text{mg}_{\text{Polys}} \cdot \text{g}_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Cette accumulation a évolué tout au long de la culture passant de phase d'accumulation à chaque changement métabolique suivi de la phase de reconsommation.

Durant la deuxième étape de la culture correspondant à une étape de limitation de la source azotée (de 13 à 23 h), le ratio N/C d'alimentation a été diminué de 0,0343 à 0,0325 molN.Cmol<sup>-1</sup> en imposant des débits d'alimentation des pompes de glucose et d'azote, correspondant à un ratio rN/rC de 0,049 à 0,027 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

A partir de ce moment la biomasse produite est exprimée en terme de biomasse catalytique ( $X^*$ ) afin de caractériser la dynamique fine de l'accumulation de lipides hors des

lipides intrinsèques, comme ceux constituant la membrane cellulaire. Cette biomasse catalytique est évaluée en considérant que la quantité de lipides constitutifs de la membrane cellulaire est constante tout au

long de la culture (Cescut, 2009), c'est-à-dire :

$$\frac{M_{lip^*}}{M_{X^*} - M_{lip^*}} = k$$

Où :

- $k$  : constante
- $M_{lip^*}$  : Masse de lipides catalytiques (hors lipides accumulés) en g
- $M_{X^*}$  : Masse de biomasse catalytique en g

A partir de cette hypothèse la biomasse catalytique exempte de lipides catalytiques est calculée par  $M_{X^*-lip^*} = M_{X^*} - M_{lip^*}$ , les lipides catalytiques par  $M_{lip^*} = k \cdot (M_{X^*} - M_{lip^*})$  et les lipides accumulés par  $M_{lip\_acc} = M_{lip} - k \cdot (M_{X^*} - M_{lip})$ , le tout exprimé en g. Les profils d'évolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et lipides accumulés chez *Yarrowia lipolytica* W29 sont montrés dans la figure suivante :

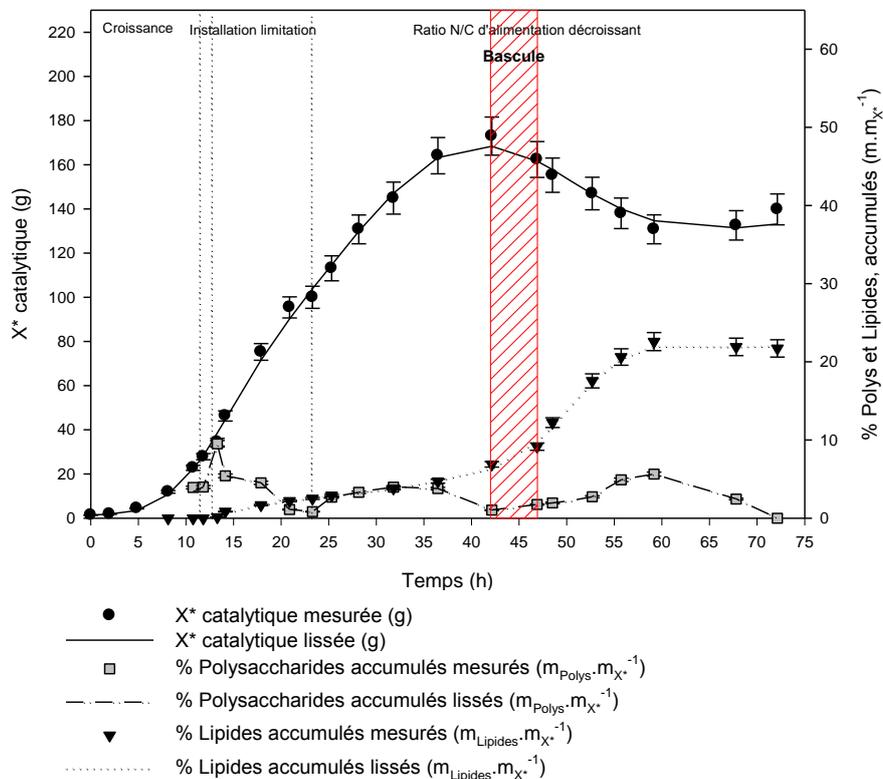


Figure 31. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

La phase de limitation a duré 10 h et a été accompagnée par une série d'événements spécifiques :

- Tout d'abord une forte diminution du taux de croissance de  $0,178 \text{ h}^{-1}$  à  $0,06 \text{ h}^{-1}$  qui a permis d'obtenir une quantité maximale de biomasse totale égale à  $103,5 \text{ g}$  ( $43,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) correspondant à un rendement moyen de  $0,48 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ .
- Une consommation des polysaccharides accumulés lors de la phase d'épuisement de l'azote dans le moût de fermentation, révélée par la diminution de la quantité de polysaccharides accumulés de  $9,5$  à  $0,83 \%$  ( $\text{m}_{\text{Polys}} \cdot \text{m}_X^{-1}$ ).
- Une accumulation de lipides intracellulaires de  $0,2$  à  $2,6 \%$  ( $\text{m}_{\text{Lipides}} \cdot \text{m}_X^{-1}$ ) correspondant à une vitesse d'accumulation de lipides de  $0,78 \text{ mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $2,5 \text{ mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , au début et à la fin de cette étape, respectivement. Durant cette étape, le rendement maximal de conversion du glucose en lipides accumulés a été égal à  $0,048 \text{ g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  et maintenu pendant environ 5 h.

### 3.3.3.2 Métabolites mineurs

Le dosage réalisé par HPLC révèle la présence des métabolites mineurs tels que des acides organiques autres que le citrate, principalement du pyruvate et du succinate. Une quantité maximale de  $0,13 \text{ g}$  ( $0,043 \text{ g.L}^{-1}$ ) de pyruvate et de  $0,34 \text{ g}$  ( $0,13 \text{ g.L}^{-1}$ ) de succinate ont été produites.

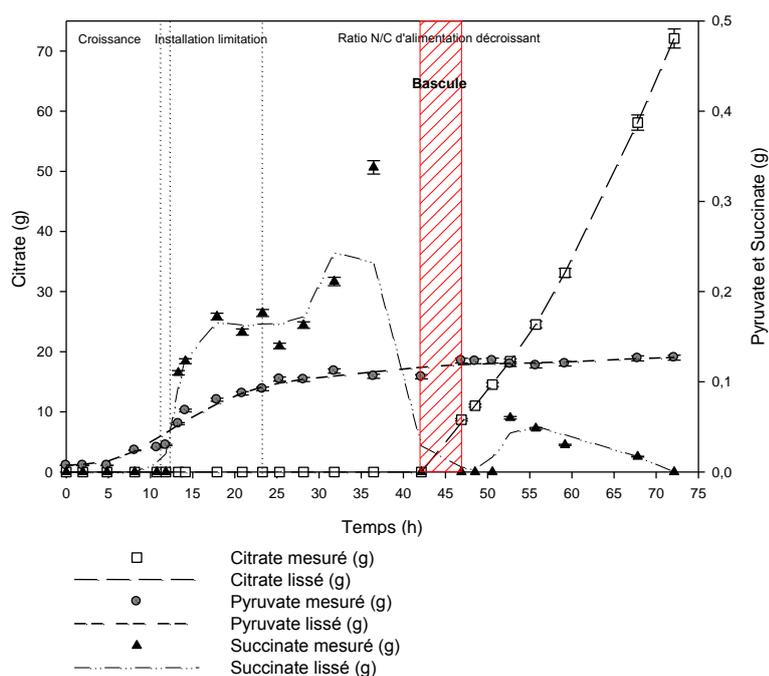


Figure 32. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

La production de succinate a été détectée à 13 h au cours de la phase de limitation. Dans la période comprise entre 42 et 51 h aucune présence de succinate n'a été détectée traduisant une reconsommation de l'acide, cette période correspond à la transition entre la production de lipides et la production de lipides et citrate simultanée.

En ce qui concerne le pyruvate, sa production a été détectée depuis le début de la culture quand les conditions d'apport nutritionnelles n'étaient pas limitantes.

### 3.3.4 Analyse cinétique

#### 3.3.4.1 Le ratio $rN/rC$

Les apports connus en glucose et azote ainsi que leur quantité résiduel dans le milieu de culture ont permis de calculer le  $rN/rC$ , étant le rapport de la vitesse de consommation d'azote ( $rN$ ) et la vitesse de consommation de glucose ( $rC$ ), en  $\text{molN.Cmol}^{-1}$ . La figure suivante montre le profil du  $rN/rC$  au cours de la culture :

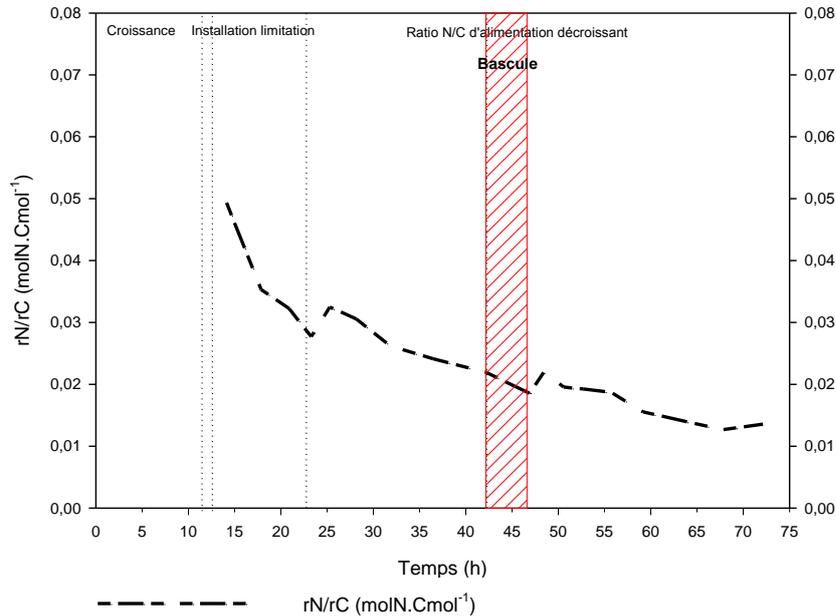


Figure 33. Evolution du  $rN/rC$  au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

D'après l'évolution du  $rN/rC$ , en phase de limitation le  $rN/rC$  a diminué rapidement de 0,049 à 0,027  $\text{molN.Cmol}^{-1}$ , tandis que dans les phases de production de lipides et production de lipides et d'acide citrique cette diminution a été moins abrupte.

### 3.3.4.2 Phase d'accumulation seule de lipides

Afin d'étudier de manière plus détaillée la phase de production, elle a été découpée en phase de production de lipides (23 à 42 h) et phase de production simultanée de lipides et d'acide citrique (42 à 72 h). La phase de production de lipides a démarré après 23 h du début de la culture et a été maintenue pendant 23 h sans aucune production d'acide citrique. Durant cette phase, le débit d'alimentation du glucose a été augmenté de  $0,018 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $0,0237 \text{ h}^{-1}$ , tandis que le débit d'alimentation d'azote a été maintenu constant à une valeur de  $0,0023 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , correspondant à une diminution du ratio d'alimentation N/C de  $0,0343$  à  $0,0246 \text{ molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$  pour la première étape et de  $0,0246$  à  $0,0158 \text{ molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$  pour la deuxième étape (figure 29), Ces changements correspondent à des ratios  $rN/rC$  de  $0,049$ - $0,022 \text{ molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$  et  $0,022$ - $0,0136 \text{ molN}\cdot\text{Cmol}^{-1}$ , respectivement.

Pendant la phase de production de lipides, le taux de croissance a subi une diminution plus sévère devenant pratiquement nulle à la fin de cette phase, mais permettant une production de biomasse totale de  $187,85 \text{ g}$  ( $74,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

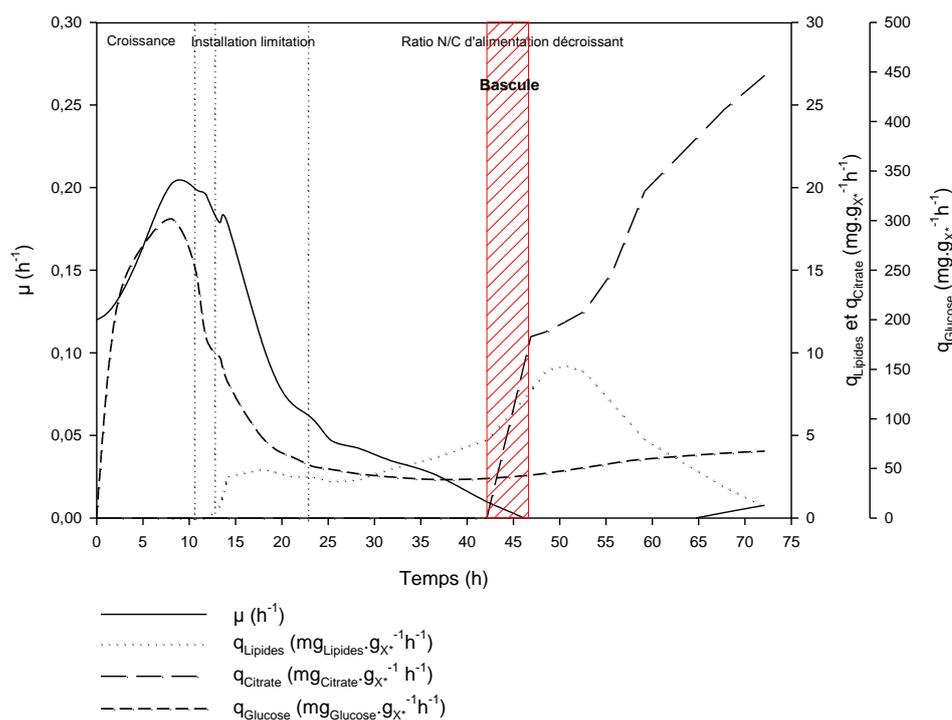


Figure 34. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, d'accumulation de lipides, de production de citrate et de consommation de glucose au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

L'accumulation de polysaccharides a augmenté de  $0,83$  à  $3,97 \%$  ( $m_{\text{Polys}}\cdot m_{\text{X}}^{-1}$ ) à  $32 \text{ h}$  puis ils sont reconsommés jusqu'à atteindre une valeur de  $1,04 \%$  ( $m_{\text{Polys}}\cdot m_{\text{X}}^{-1}$ ) à  $42 \text{ h}$  (figure 31).

En ce qui concerne les lipides, la production de lipides totaux a augmentée de 7,11 g à 19,84 g correspondant à une accumulation de 2,60 à 6,96% (m.m<sup>-1</sup>). Les valeurs des vitesses spécifiques d'accumulation de lipides calculées à partir de ces données sont de 2,51 mg<sub>Lipides</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à 4,78 mg<sub>Lipides</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivement. Les figures suivantes montrent l'évolution de l'accumulation lipidique au cours de la fermentation en fed-batch.

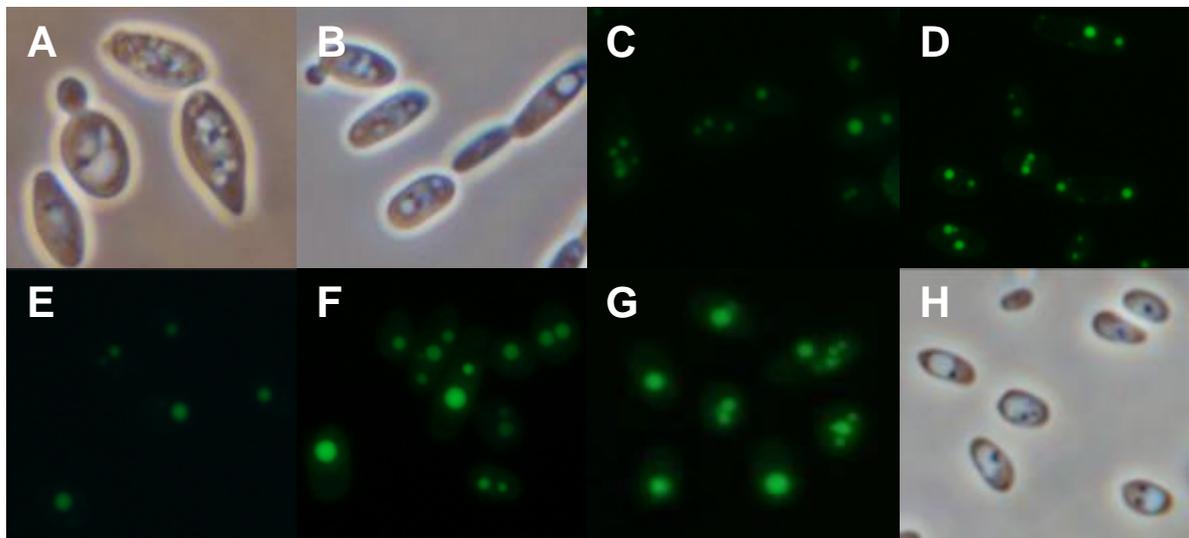
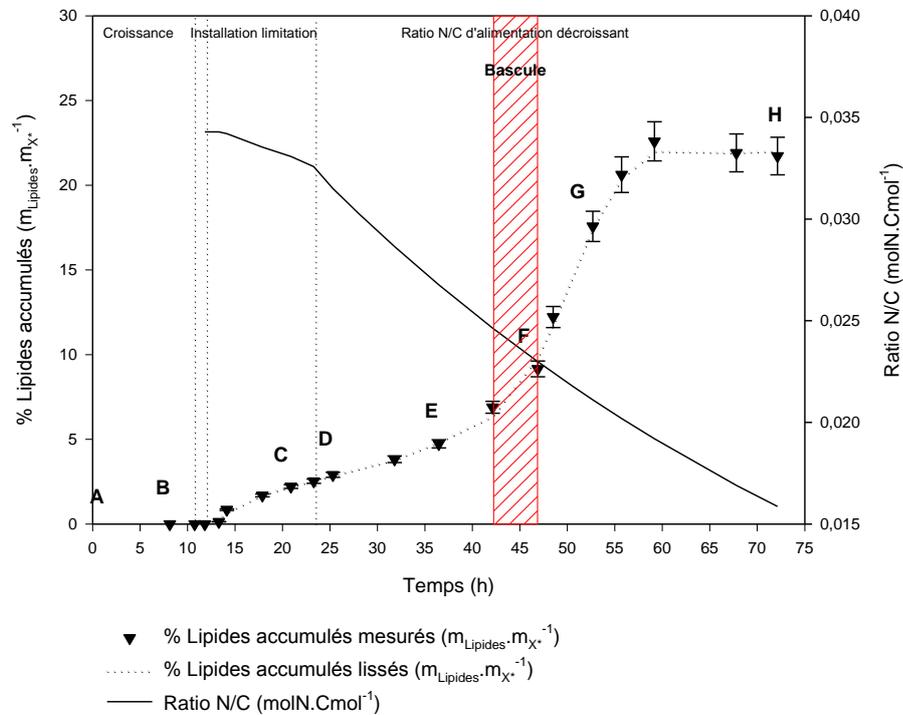


Figure 35. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

L'évolution de l'accumulation lipidique peut être visualisée (figure 34) sur les photographies prises sous microscope à épifluorescence après marquage au Bodipy 493/503. Pour le dernier échantillon, le pourcentage d'accumulation de lipides déterminé a été de

21,8 % ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_{X^*}^{-1}$ ) représentant une vitesse spécifique d'accumulation de lipides égal à  $0,68 \text{ mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Aucune production d'acide citrique n'a été détectée par HPLC pendant la phase de production de lipides de 23 à 42 h.

### 3.3.4.3 Phase d'accumulation de lipides et production d'acide citrique simultanée

La production d'acide citrique est apparue une fois que le ratio N/C d'alimentation a atteint une valeur de l'ordre de  $0,0246\text{-}0,0229 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ , ( $r_{\text{N}}/r_{\text{C}}$  de  $0,022\text{-}0,019 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ ) entre 42 et 46 h. Pendant cette étape de production simultanée de lipides et d'acide citrique, une production maximale de biomasse totale de  $178,6 \text{ g}$  ( $60,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) a été mesurée correspondant à  $139,8 \text{ g}$  ( $47,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) de biomasse catalytique ( $X^*$ ).

Les profils des vitesses spécifiques de production de biomasse catalytique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique en fonction du ratio N/C d'alimentation sont montrés dans la figure suivante :

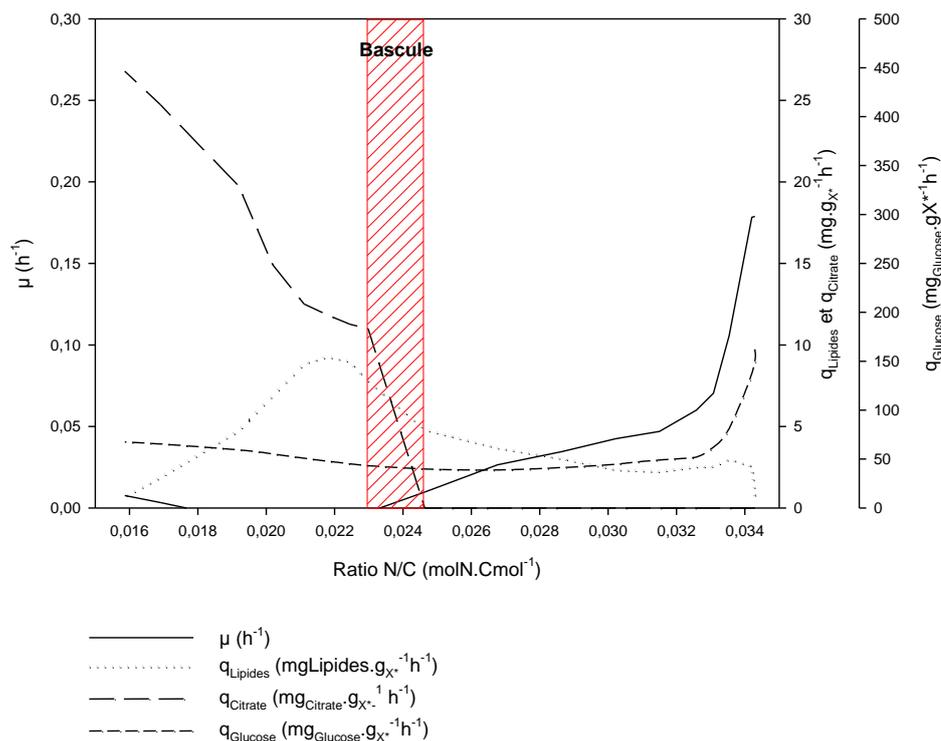


Figure 36. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, d'accumulation de lipides, de production de citrate et de consommation de glucose en fonction du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

Après l'apparition de la production d'acide citrique, la vitesse spécifique d'accumulation de lipides continue d'augmenter pour atteindre sa valeur maximale pour un ratio  $r_{\text{N}}/r_{\text{C}}$  de  $0,019 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ . Au-delà, la vitesse spécifique d'accumulation de lipides

diminue fortement de 8,96 à 0,68  $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , tandis que la vitesse spécifique de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ) augmente de 11,96 à 26,78  $\text{mg}_{\text{Citrate}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 3.3.4.4 Rendements de conversion du glucose en lipides et en citrate

Les rendements de conversion du glucose en lipides ( $R_{S/\text{Lip}}$ ) et en acide citrique ( $R_{S/\text{Cit}}$ ), ont été calculés à partir des vitesses de consommation de glucose ( $r_{\text{Glucose}}$ ) et des vitesses d'accumulation de lipides ( $r_{\text{Lipides}}$ ) et de production de citrate ( $r_{\text{Citrate}}$ ). L'évolution des rendements est montrée dans la figure suivante :

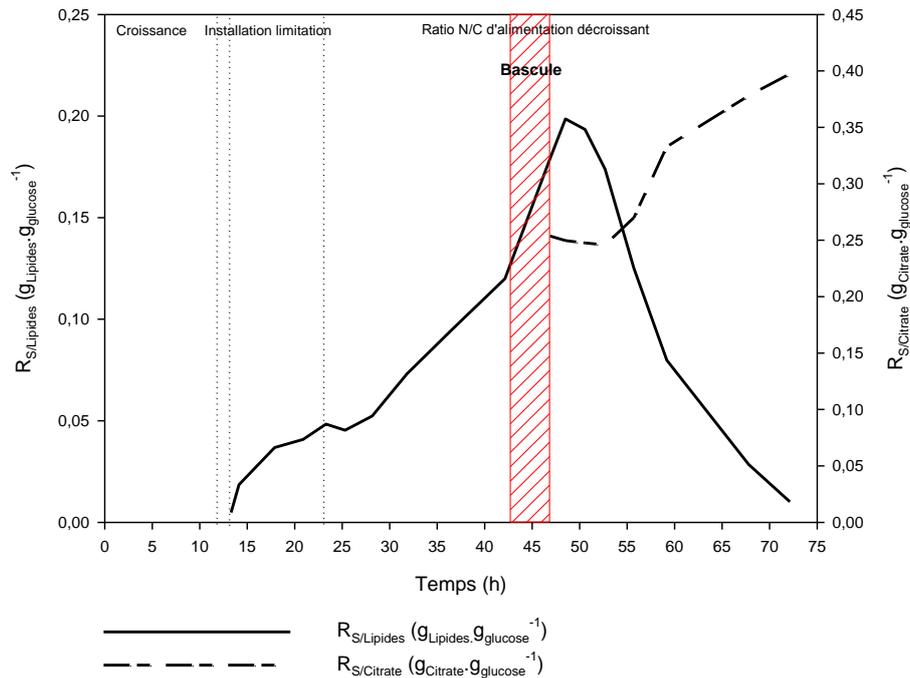


Figure 37. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

Le rendement maximal de conversion du glucose en lipides accumulés est de 0,20  $\text{g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1}$  à 47 h, au-delà de ce temps, le rendement chute drastiquement jusqu'à 0,01  $\text{g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1}$  à 72 h. Ce comportement est lié à la production de citrate détectée à 47 h. Pour le citrate, le rendement maximal de conversion du glucose atteint a été de 0,39  $\text{g}_{\text{Citrate}} \cdot \text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$  à la fin de la culture.

### 3.3.4.5 Acides organiques autres que le citrate

La vitesse spécifique de production de pyruvate a été maximale entre 2 et 8 h. La figure suivante montre l'évolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de cette culture :

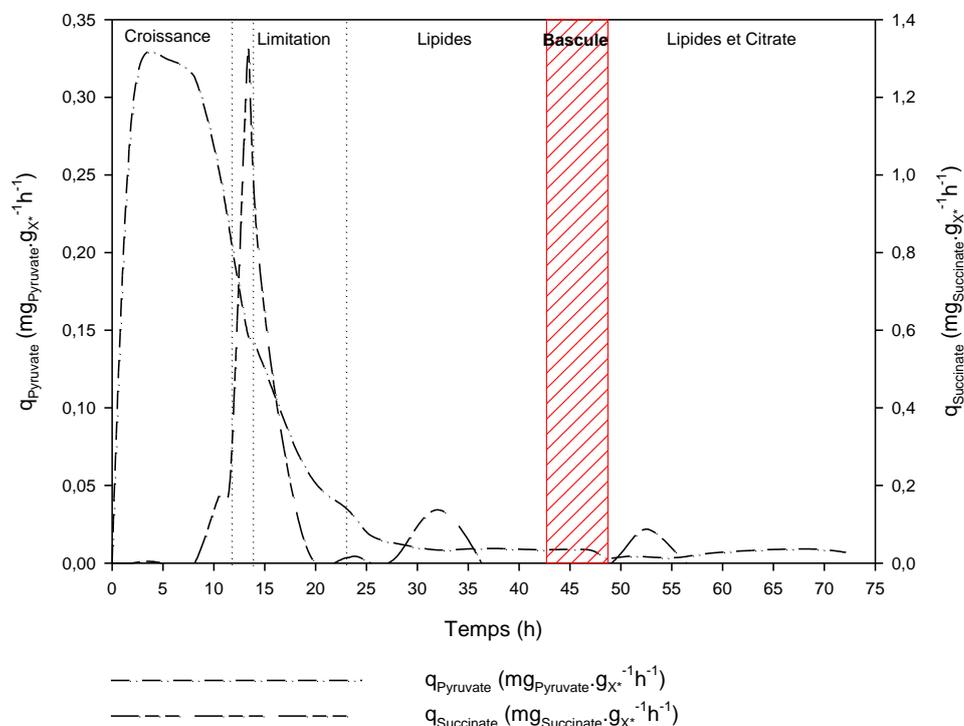


Figure 38. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* W29

D'autres acides organiques tels que le malate, l' $\alpha$ -ketoglutarate, le fumarate, l'acétate, l'oxaloacétate ont été recherchés mais aucun d'entre eux n'a été détecté par HPLC.

### 3.3.5 Analyse biochimique enzymatique

#### 3.3.5.1 Evolution des activités spécifiques enzymatiques

Les activités spécifiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) ont été déterminées au cours de la culture. Ces enzymes ont été choisies sur la base de leur implication dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des acides gras chez les microorganismes oléagineux en prenant en compte les données trouvées dans la littérature (Botham and Ratledge 1979; Boulton and Ratledge 1981; Evans and Ratledge 1985; Ratledge 2002).

---

On remarque une augmentation des activités spécifiques de l'ACL et de la MD pendant la phase d'apparition de l'accumulation de lipides (mise en place de la limitation nutritionnelle) d'un facteur 2,6 et 3,2 respectivement pour une augmentation de la vitesse spécifique d'accumulation de lipides du même ordre de grandeur (3,2).

La seconde phase d'accumulation de lipides (entre 23 et 42h) est caractérisée par une légère augmentation de l'ACL (13%) et de l'EM (5%) et plus importante de la MD (32%) et surtout de l'ACC (facteur 2,9). Au cours de cette période, la vitesse spécifique d'accumulation de lipides a augmenté de 50% (de 2,21 à 3,33  $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Enfin pendant la bascule vers la production de citrate, les activités spécifiques de l'ATP citrate lyase et l'enzyme malique ont presque quadruplé de 42,4 à 164,2  $\text{mU} \cdot \text{mg}$  protéine<sup>-1</sup> et de 37,2 à 133,5  $\text{mU} \cdot \text{mg}$  protéine<sup>-1</sup>, respectivement. L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase a augmenté de 5,2 à 9,8  $\text{mU} \cdot \text{mg}$  protéine<sup>-1</sup> (augmentation de 88%). De son côté, l'activité spécifique de la malate déshydrogénase a peu évolué (augmentation de 9%). Pour cette même période le pourcentage d'accumulation de lipides a augmenté de 4,8 à 9,2 % ( $\text{m}_{\text{Lipides}} \cdot \text{mX}^{-1}$ ) (augmentation d'un facteur 2,1) correspondant à une variation des vitesses spécifiques d'accumulation de lipides de 3,7 à 7,8  $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Il est à observer que l'ACC et l'EM possède leur activité spécifique maximale vers 55 h période pour laquelle la vitesse spécifique d'accumulation de lipides est maximale, alors que l'ACL et la MD lors de la bascule vers l'acide citrique.

Enfin en fin de culture où le métabolisme est majoritairement tourné vers la production de citrate, les activités spécifiques de l'ACL, de l'EM et de l'ACC chutent drastiquement et tendent à retrouver leur niveau basal.

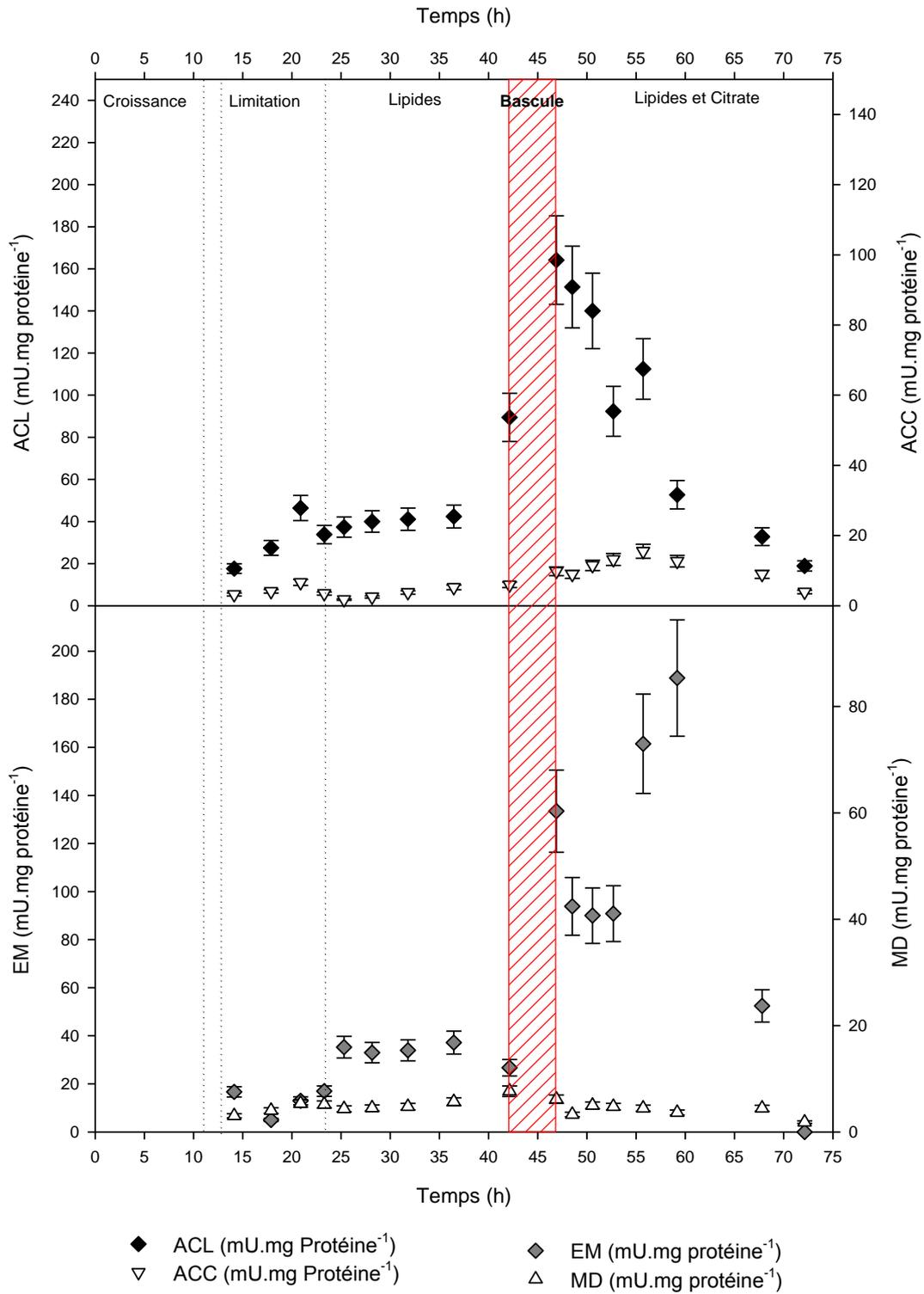


Figure 39. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* W29

### 3.3.5.2 Vitesses spécifiques de production d'enzymes

Nous avons calculé les vitesses spécifiques de production des 4 enzymes mesurées pour les cultures D-stat et fed-batch chez la souche sauvage W29. Dans un premier temps, la figure suivante montre l'évolution de la vitesse spécifique de production de l'ATP citrate lyase ( $q_{ACL}$ ) ainsi que les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides ( $q_{Lipides\ accumulés}$ ) et de production d'acide citrique ( $q_{Citrate}$ ).

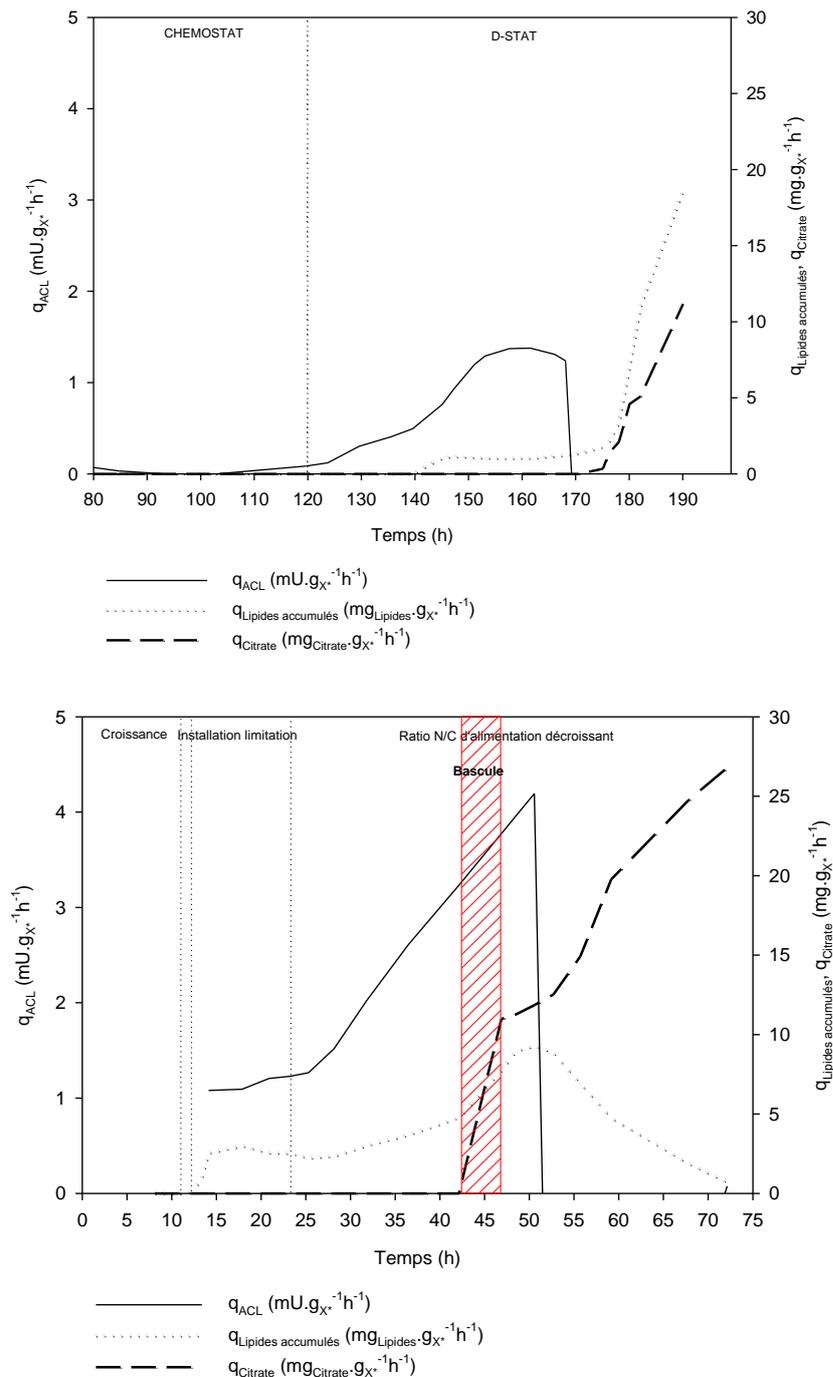
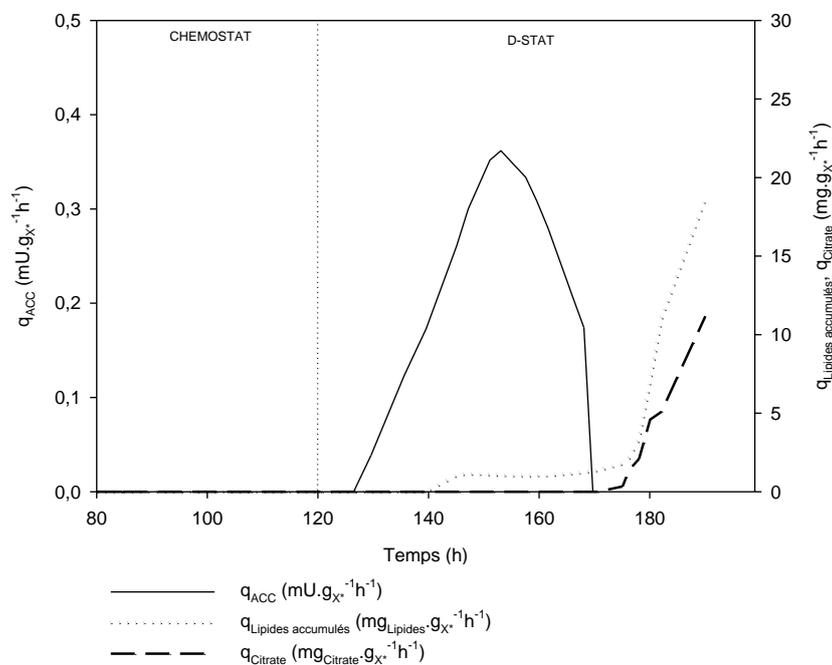


Figure 40. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de *lipolytica* W29

Pour la première culture, on remarque une accélération de  $q_{ACL}$  lors du début du D-stat, étant maximale à un  $q_{Lipides\ accumulés}$  moyen de  $1,10\text{ mg}_{Lipides\ accumulés}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Lors de la production de citrate à 170 h,  $q_{ACL}$  devient négatif pouvant être expliqué par une dénaturation de l'enzyme. Pour la deuxième culture en fed-batch, nous observons que l'enzyme est déjà induite dans l'étape de l'installation de limitation nutritionnelle. Elle suit le profil d'accumulation lipidique et exhibe sa vitesse spécifique maximale à  $q_{Lipides\ accumulés}$  maximale ( $9,26\text{ mg}_{Lipides\ accumulés}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Comme observé pendant la culture D-stat, la  $q_{ACL}$  est fortement affectée lors de la production de citrate.

La vitesse spécifique de production d'acétyl-CoA carboxylase ( $q_{ACC}$ ) semble suivre la tendance du comportement de la  $q_{ACL}$  dans les deux cultures.

Dans la première culture, la  $q_{ACC}$  est induite peu après le début du D-stat et trouve sa vitesse spécifique maximale à  $q_{Lipides\ accumulés}$  moyenne de  $1,10\text{ mg}_{Lipides\ accumulés}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; néanmoins  $q_{ACC}$  diminue aussitôt devenant pratiquement reprimé lors de la production de citrate. D'autre part dans la culture fed-batch,  $q_{ACC}$  suit le profil de l'accumulation lipidique, et elle est maximale à  $q_{Lipides\ accumulés}$  maximale et maintenue pendant 10 heures. Néanmoins,  $q_{ACC}$  est fortement impacté lors de l'étape d'accélération de la vitesse spécifique de production de citrate (figure 41).



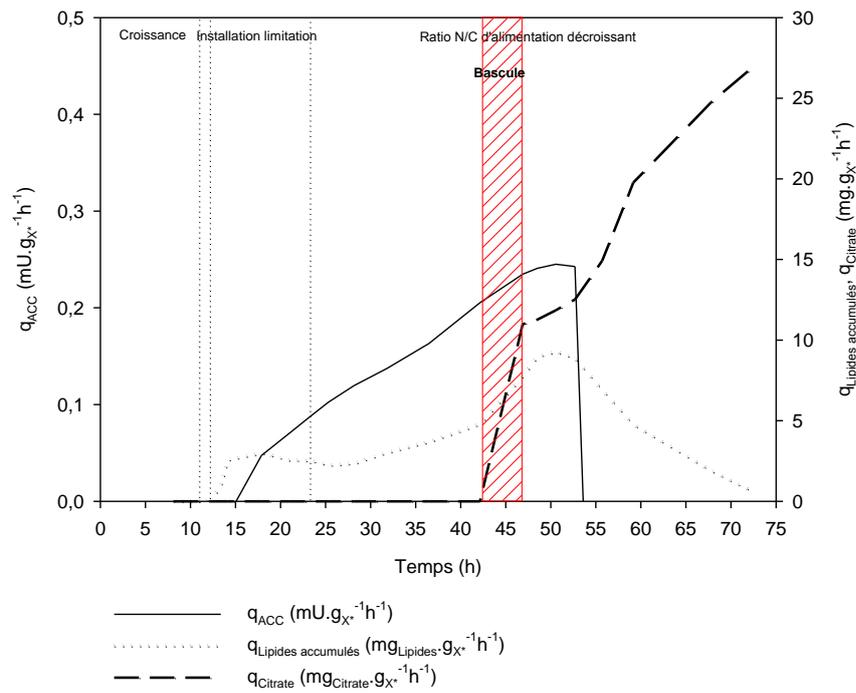
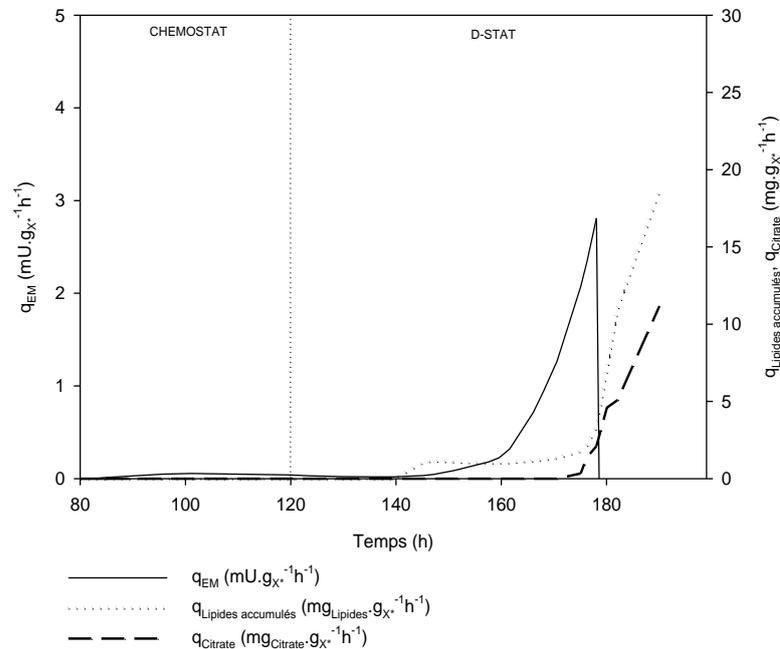


Figure 41. Evolution des vitesses spécifiques de production d'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de *lipolytica* W29

Nous avons également calculé les vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique ( $q_{EM}$ ) pour les deux cultures. La figure suivante montre l'évolution de  $q_{EM}$  ainsi que les évolutions de  $q_{Lipides\ accumulés}$  et  $q_{Citrate}$  chez la souche W29.



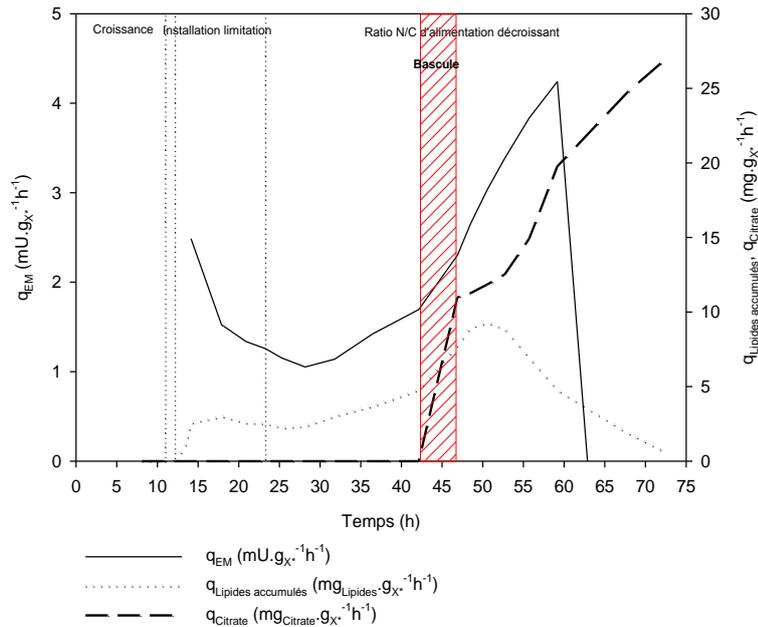


Figure 42. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de *lipolytica* W29

Nous observons que pendant le D-stat, la  $q_{EM}$  est induite un peu après l'accumulation de lipides et atteint sa valeur maximale à la phase initiale de production de citrate et lors de l'accélération de  $q_{Lipides\ accumulés}$ . Cependant, cette vitesse est fortement affectée peu après l'accélération de  $q_{Citrate}$ . La culture fed-batch montre une première diminution de la  $q_{EM}$  dans la période de l'installation de la limitation nutritionnelle et suivant la diminution du taux de croissance. Elle semble également suivre le profil d'accumulation lipidique et atteint sa valeur maximale dans la période d'accélération de la production de citrate. Comme dans la culture D-stat, la  $q_{EM}$  est fortement affecté par une  $q_{Citrate}$  élevée.

Finalement, la figure suivante montre l'évolution de  $q_{MD}$  ainsi que les évolutions de  $q_{Lipides\ accumulés}$  et  $q_{Citrate}$  chez la souche W29.

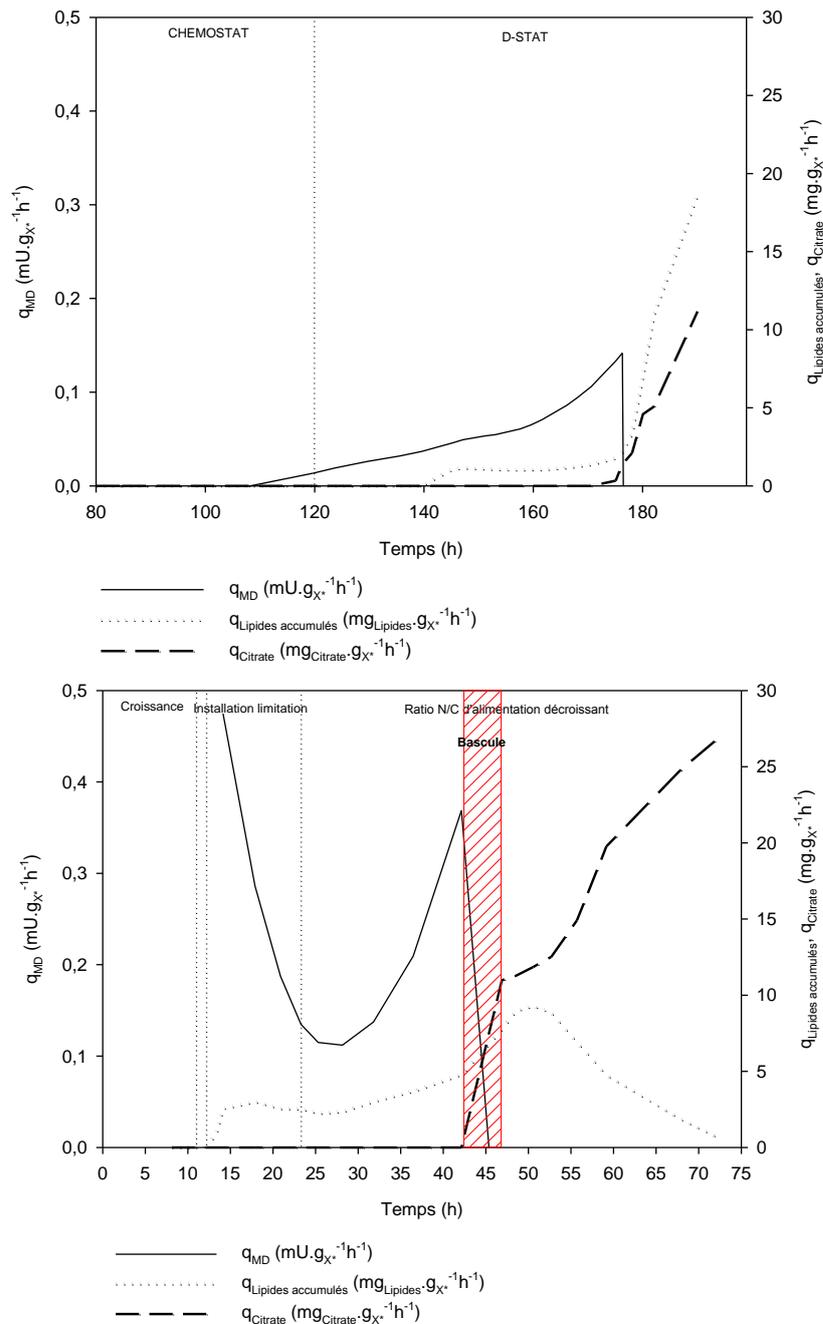


Figure 43. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours des cultures D-stat et fed-batch de *lipolytica* W29

On remarque que la  $q_{MD}$  augmente doucement même avant l'installation du D-stat dans la première culture et atteint sa valeur maximale au début de la phase de production de citrate et accélération de  $q_{Lipides\ accumulés}$ . Pour la deuxième culture, on remarque une première étape où la  $q_{MD}$  diminue drastiquement lors de l'installation de la limitation nutritionnelle. Elle atteint sa valeur maximale au début de la phase de production de citrate et accélération de  $q_{Lipides\ accumulés}$ . Dans les deux cultures, la production d'acide citrique reprime la synthèse de cette enzyme.

---

### 3.3.6 Discussion

L'étude précédente en D-stat nous avait permis de quantifier la dynamique d'accumulation de lipides et d'apparition d'acide citrique en fonction de la valeur du ratio N/C d'alimentation (égale au ratio  $rN/rC$  pour le D-stat) dans un système de culture où le taux de croissance était contrôlé par une double limitation en carbone et en azote. Dans la culture en D-stat les valeurs critiques identifiées du ratio N/C ( $rN/rC$ ) étaient de 0,085 molN.Cmol<sup>-1</sup> pour l'accumulation de lipides et de 0,0228 molN.Cmol<sup>-1</sup> pour la production d'acide citrique ; du fait du côté fastidieux du D-stat qui nécessite de long temps de culture, l'idée était de valider le fait que l'on pouvait obtenir ces mêmes valeurs en réacteur fed-batch qui a l'avantage d'être plus rapide.

Nous avons donc décidé d'étudier la bascule de l'accumulation de lipides vers la production d'acide citrique en fed-batch en balayant le ratio N/C d'alimentation dans une gamme de 0,0343 à 0,0158 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

Nous avons imposé deux dynamiques de limitation nutritionnelle différentes en fed-batch. Pour le D-stat nous avons réalisé une seule dynamique de diminution du ratio N/C d'alimentation à raison de 2,5 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Pour la culture en fed-batch nous avons diminué le ratio N/C d'alimentation en deux phases : à raison de 0,17 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> pendant l'étape de limitation et à raison de 0,34 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> pendant la phase de production.

Du fait du phénomène d'accumulation transitoire en glucose et en azote dans le réacteur, le paramètre de comparaison est donc le  $rN/rC$  qui montre la dynamique de la consommation de glucose et d'azote indépendamment des phénomènes d'accumulation des substrats.

Une autre différence qui doit être mise en évidence est l'effet du taux de croissance. Dans la culture en chimostat et D-stat nous avons imposé un taux de croissance de 0,08 h<sup>-1</sup> étant contrôlé par la double limitation nutritionnelle. En fed-batch le taux de croissance variait dans une gamme comprise entre 0 et 0,08 h<sup>-1</sup> pendant la phase d'accumulation de lipides.

Enfin la quantification de certaines activités enzymatiques montre des similitudes entre les deux systèmes de culture dans les profils d'induction et de répression pour l'ACL, l'ACC, L'EM et la MD.

Le tableau suivant montre les paramètres cinétiques obtenus lors des cultures en D-stat et en fed-batch avec la souche sauvage W29 :

Paramètre	Culture D-stat	Culture fed-batch
$R_{X/S}$ max ( $g_{X^*} \cdot g_{\text{glucose}}^{-1}$ )	0,52	0,51
N/C ratio d'alimentation ( $molN \cdot Cmol^{-1}$ )	0,023	0,034-0,024
Dynamique de la limitation nutritionnelle ( $mmolN \cdot Cmol^{-1}h^{-1}$ )	2,5	0,17 et 0,34
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés max ( $mg_{\text{Lipides}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	11,8	9,3
% Lipides accumulés max ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_{X^*}^{-1}$ )	16,3	22,7
$q_{\text{Polys}}$ accumulés max ( $mg_{\text{Polys}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	0,28	16,6
% Polysaccharides accumulés max ( $m_{\text{Polys}} \cdot m_{X^*}^{-1}$ )	3,86	9,5
$q_{\text{Pyruvate}}$ max ( $mg_{\text{Pyruvate}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	N.D.	0,33
$q_{\text{Succinate}}$ max ( $mg_{\text{Succinate}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	N.D.	1,29
rN/rC bascule citrate ( $molN \cdot Cmol^{-1}$ )	0,023	0,022
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés à la bascule citrate ( $mg_{\text{Lipides}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	1,5	4,8
$\mu$ catalytique à la bascule citrate ( $h^{-1}$ )	Contrôlé à 0,08	0,001
$q_{\text{Glucose}}$ à la bascule citrate ( $mg_{\text{glucose}} \cdot g_{X^*}^{-1} h^{-1}$ )	152,1	39,9

N.D. : Non détecté

Tableau 35. Paramètres cinétiques obtenus lors de cultures D-stat et fed-batch de *Y. lipolytica* W29

Ce tableau comparatif montre que malgré les différences « hydrauliques » entre les deux systèmes (facteur de décélération différent, taux de dilution et taux de croissance différents), on retrouvait la même valeur de rN/rC entraînant la bascule métabolique vers la production d'acide citrique (0,023 en D-stat et 0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup> en fed-batch).

Ces résultats montrent que tant que le degré de limitation (rN/rC) est maîtrisé à une valeur comprise entre 0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup> et 0,085 molN.Cmol<sup>-1</sup>, il est possible d'accumuler des lipides sans produire de citrate quelque soit le mode de culture dans une gamme de taux de croissance inférieure à 0,1 h<sup>-1</sup>.

Outre une accumulation de lipides, il a été observé une accumulation de polysaccharides lors de la mise en place de la limitation nutritionnelle dans les deux cultures. Ces polysaccharides sont ensuite reconsommés dès l'accumulation de lipides intracellulaires.

---

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par J. Cescut (Cescut, 2009) lors de culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* en condition de production intensive de lipides.

Nous avons également pu observer une production d'acides organiques autres que le citrate, (production du pyruvate et du succinate) au cours du fed-batch. L'absence de détection de ces acides au cours du D-stat pourrait s'expliquer simplement par la concentration de biomasse plus importante en fed-batch qu'en D-stat. Le succinate apparaît au moment de l'accumulation des lipides et est reconverti avant l'apparition du citrate. Le pyruvate est produit pendant la phase de croissance et pendant la phase de mise en place de la limitation nutritionnelle puis s'annule dès l'accumulation des lipides.

La quantification des teneurs en certaines enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique montre des similitudes entre les deux systèmes de culture et également entre elles-mêmes. Les teneurs en ATP citrate lyase, l'acétyl-CoA carboxylase et la malate déshydrogénase sont augmentées lors de l'accumulation des lipides et diminuent lors du déclenchement de la production d'acide citrique.

L'activité spécifique de l'enzyme malique présente le même profil dans les deux cultures. Elle augmente fortement dans la phase tardive d'accumulation des lipides et est maximale lorsque la vitesse spécifique d'accumulation des lipides est maximale.

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que le D-stat et le fed-batch sont des outils pertinents pour l'analyse des bascules métaboliques. Pour la suite des travaux, nous avons retenu le système fed-batch puisqu'il permet d'accéder plus rapidement à la détermination des ratios critiques aux bascules, et d'obtenir de plus fortes concentrations de biomasse permettant de détecter des productions de métabolites autres que les produits majoritaires.

---

### 3.4 Culture de *Yarrowia lipolytica* JMY2046 en mode fed-batch

Après avoir effectué une culture en chémostat et D-stat avec *Y. lipolytica* W29 où nous avons identifié les ratios N/C d'alimentation et rN/rC critiques à l'accumulation de lipides et d'acide citrique, nous avons réalisé une culture en mode fed-batch afin de valider les résultats obtenus auparavant en terme de caractérisation des paramètres cinétiques sous une limitation nutritionnelle imposée en azote.

A partir des résultats des activités spécifiques enzymatiques, nous avons décidé d'étudier l'impact de la délétion ou surexpression de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique chez *Yarrowia lipolytica* afin d'étudier leur impact sur les bascules métaboliques.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une culture fed-batch avec la souche modifiée *Yarrowia lipolytica* JMY2046 dans les mêmes conditions de culture décrites pour la souche sauvage. La souche JMY2046 a subi une délétion du gène YALI0E14190 codant pour la malate déshydrogénase peroxysomale impliquée dans la  $\beta$ -oxydation. Cette souche a été choisie afin de limiter la possibilité à la levure de remétaboliser les acides gras accumulés puisque cette souche est avant tout connue pour sa capacité à métaboliser efficacement les substrats lipidiques. Les questions spécifiques auxquelles nous avons voulu répondre ici étaient :

- Les valeurs des ratios N/C d'alimentation et rN/rC critiques aux transitions métaboliques chez la souche sauvage sont-elles identiques pour une souche mutante ayant une voie de la  $\beta$ -oxydation limitée ?
- Le fait de limiter la voie de la  $\beta$ -oxydation a-t-il un effet direct ou indirect sur la dynamique d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica* cultivé sur glucose ?

Dans ce chapitre seront montrés les différents résultats obtenus en culture fed-batch avec *Yarrowia lipolytica* JMY2046 et une discussion et comparaison avec les résultats obtenus avec la souche sauvage sera présentée.

#### 3.4.1 Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch

Pour la culture en fed-batch de *Yarrowia lipolytica* JMY2046, nous avons utilisé la même stratégie d'alimentation nutritionnelle décrite pour la culture en fed-batch de *Yarrowia lipolytica* W29. Trois phases d'alimentation ont constitué cette stratégie :

- 
1. Phase de croissance
  2. Phase de mise en place d'une limitation azotée
  3. Phase ou le ratio N/C d'alimentation a suivi un profil décroissant

Le profil des débits d'alimentation ciblés pour la culture de *Y. lipolytica* JMY2046 en fed-batch sont les mêmes que pour la souche sauvage W29 et sont montrés dans la figure 28.

Nous avons réalisé simultanément les cultures en fed-batch pour *Y. lipolytica* W29 et *Y. lipolytica* JMY2046. Les alimentations en substrats étaient contrôlées par deux pompes péristaltiques différentes : la première contrôlant l'apport de glucose pour les deux réacteurs et la deuxième contrôlant l'apport d'azote à partir de l'étape de limitation aussi pour les deux réacteurs. Les apports des solutions correctrices de pH pendant la phase de croissance ( $\text{NH}_3$  5M) et à partir de la phase de limitation (KOH 5M et acide ortophosphorique) étaient contrôlés indépendamment à 5,6 par le logiciel MFCS/win 2.1 de chaque réacteur.

Les apports en sels du milieu CFMA (hors  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), en vitamines et en oligo-éléments ont été réalisés selon les besoins de chaque culture une fois que la biomasse a atteint  $15 \text{ g.l}^{-1}$  d'accroissement.

### **3.4.2 Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch**

Le ratio N/C d'alimentation à partir de la phase de limitation pour la culture en fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046 a été initialement de  $0,034 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ . L'évolution du profil du ratio N/C d'alimentation pour cette culture correspond au même profil montré pour la souche W29 (Voir section 3.3.2).

### **3.4.3 Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch**

#### **3.4.3.1 Métabolites majeurs**

La figure suivante montre l'évolution des profils des masses en métabolites majeurs tels que la biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel obtenus au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046 :

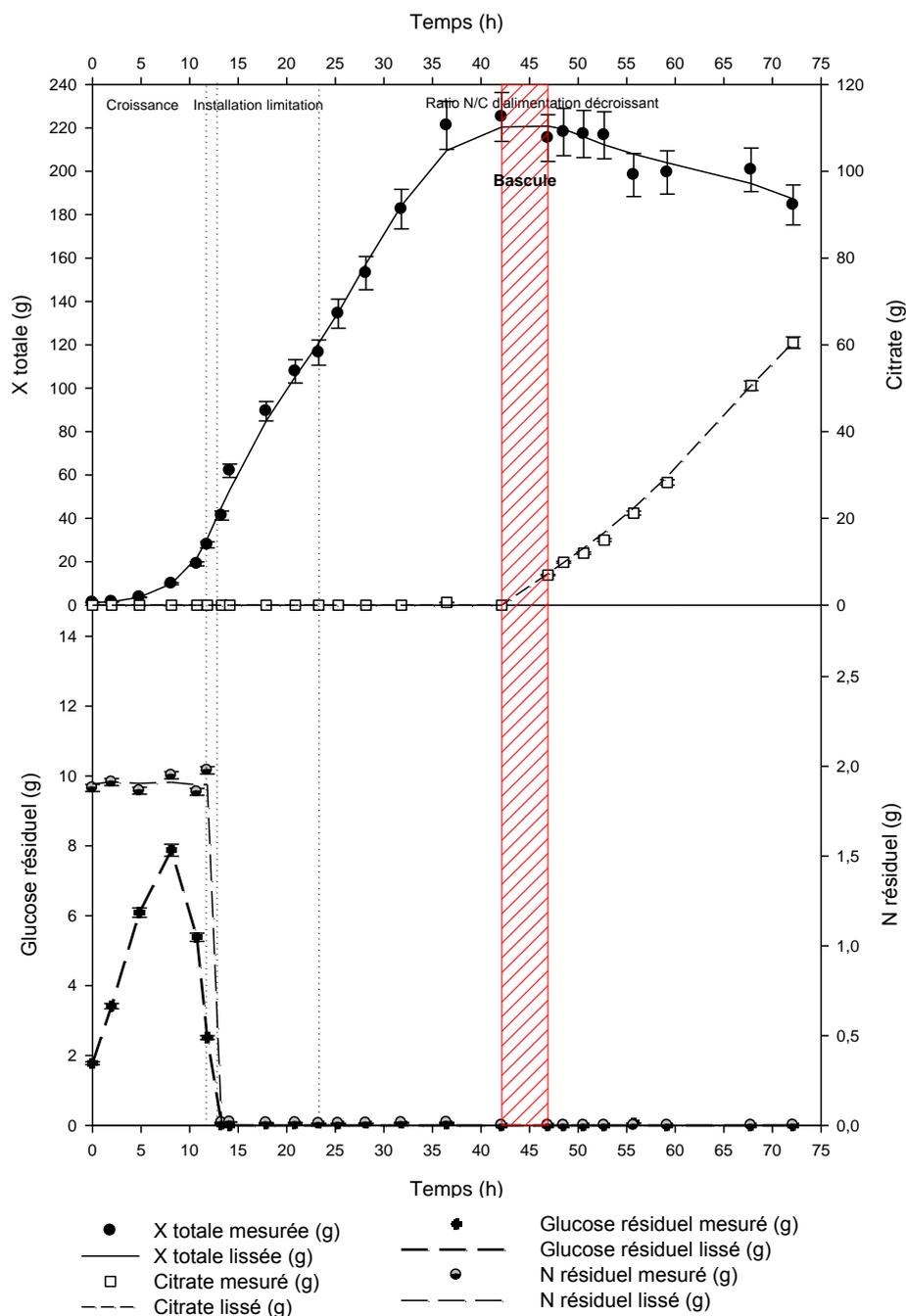


Figure 44. Evolution des profils de la biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

Le taux de croissance était de  $0,216 \text{ h}^{-1}$  pendant la première phase contrôlée par une alimentation exponentielle en glucose dans des conditions de non limitation nutritionnelle.

Pendant la phase de croissance la quantité de biomasse totale obtenue a été de  $27,8 \text{ g}$  ( $11,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) correspondant à un rendement  $Y_{x/s}=0,52 \text{ g}_X.\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ . Néanmoins une quantité maximale de  $7,87 \text{ g}$  ( $3,35 \text{ g.L}^{-1}$ ) de glucose a été détectée par HPLC après 8 h de culture ce qui peut être expliqué par un décalage entre le démarrage de la croissance et le profil

d'alimentation en glucose due à l'adaptation de la souche aux nouvelles conditions de culture.

Dans cette même phase, l'azote résiduel dosé dans le milieu de culture a été compris entre 1,86 et 1,97 g (0,79-0,83 g.L<sup>-1</sup>). Un métabolisme purement oxydatif a été confirmé par une production très faible d'acides organiques (hors du citrate) et par l'absence de lipides accumulés. Pendant la deuxième étape de la culture correspondant à une étape de limitation de la source azotée, le ratio N/C d'alimentation a été diminué de 0,0343 à 0,0326 molN.Cmol<sup>-1</sup> en imposant des débits d'alimentation des pompes de glucose et d'azote. L'échantillonnage pendant cette phase a été réalisée toutes les 3 heures.

Les profils de la biomasse catalytique (X\*), de polysaccharides accumulés et de lipides accumulés chez *Y. lipolytica* JMY2046 sont montrés dans la figure suivante :

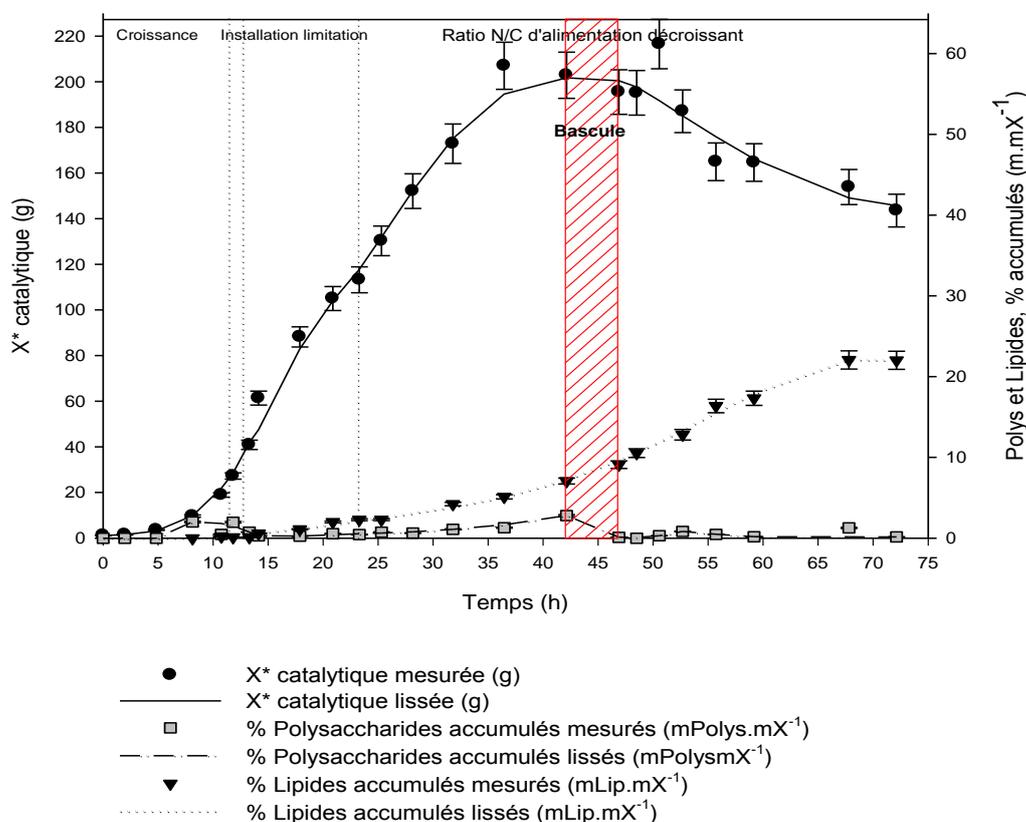


Figure 45. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

La phase de limitation a duré 10 h et a été accompagnée par une série d'événements spécifiques :

- Tout d'abord une forte diminution du taux de croissance de 0,22 h<sup>-1</sup> à 0,062 h<sup>-1</sup> amenant à une production de biomasse totale égale à 116,4 g (42,3 g.L<sup>-1</sup>)

- Une reconsumption des polysaccharides accumulés lors de la phase d'épuisement de l'azote dans le moût de fermentation, révélé par la diminution du pourcentage de polysaccharides accumulés de 0,75 à 0,46 % ( $m_{\text{Polys}} \cdot m_X^{-1}$ )

Une augmentation du pourcentage d'accumulation de lipides intracellulaires de 0,12 à 2,29 % ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_X^{-1}$ ) correspondant à une vitesse d'accumulation de lipides de 1,31  $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  à 3,36  $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , au début et à la fin de cette étape, respectivement. Durant cette étape, le rendement maximal de conversion du glucose en lipides accumulés a été égal à  $Y_{\text{lip/s}} = 0,08 \text{ g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$

### 3.4.3.2 Métabolites mineurs

Nous avons détecté par HPLC la présence d'acides organiques autres que le citrate (production du pyruvate et du succinate). La figure suivante montre les profils des acides organiques détectés au cours de la culture avec la souche JMY2046 :

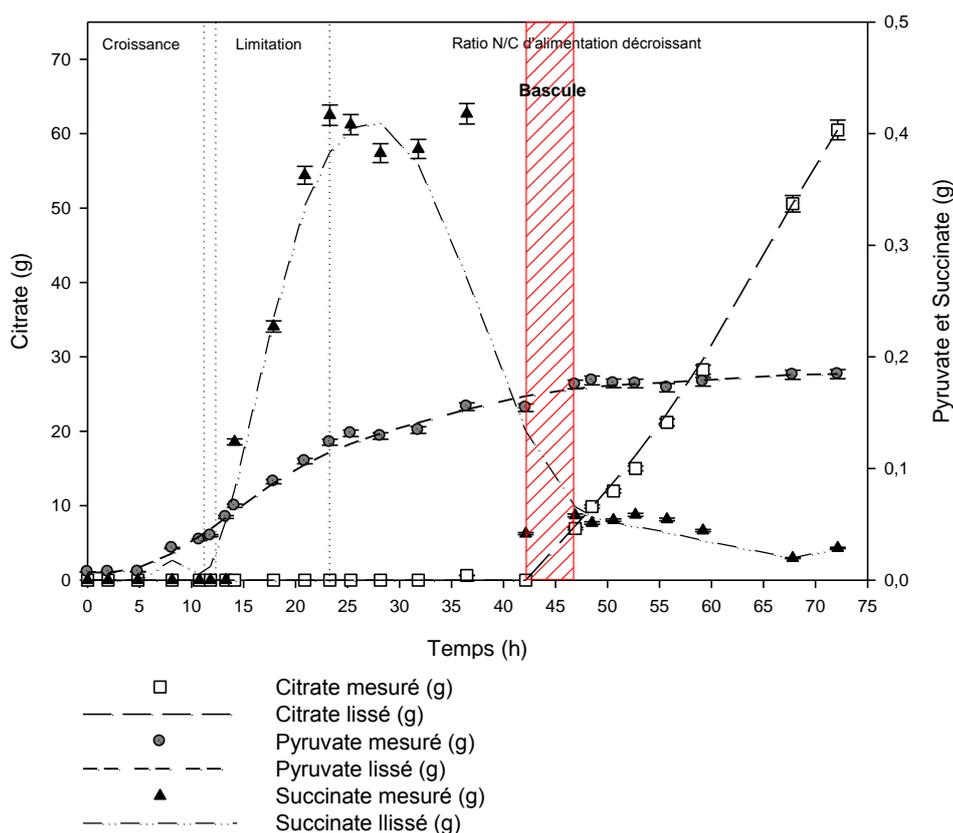


Figure 46. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

Néanmoins les quantités détectées ont été supérieures à celles avec la souche sauvage pour la fin des mêmes périodes, toutes exprimées en grammes :

Souche	Croissance		Limitation		Lipides		Lipides et citrate	
	Pyruvate	Succinate	Pyruvate	Succinate	Pyruvate	Succinate	Pyruvate	Succinate
W29	0,0073	0	0,0921	0,176	0,106	0	0,123	0
JMY2046	0,0073	0	0,123	0,417	0,154	0,0416	0,184	0,0287

Tableau 36. Acides organiques détectés pendant les différents phases de culture fed-batch chez *Y. lipolytica* W29 et JMY2046

Le pyruvate a été détecté dès le début de la culture, tandis que le succinate a été détecté une fois que l'installation de la limitation nutritionnelle a démarrée et elle a diminuée fortement une fois que la production de citrate a été détectée.

D'autres acides organiques tels que le malate, l' $\alpha$ -ketoglutarate, le fumarate, l'acétate, l'oxaloacétate ont été aussi recherchés mais aucun entre eux n'a été détecté par HPLC.

### 3.4.4 Analyse cinétique

#### 3.4.4.1 Le ratio rN/rC

La figure suivante montre le profil de rN/rC ( $\text{molN.Cmol}^{-1}$ ) au cours de la culture de *Y. lipolytica* JMY2046 :

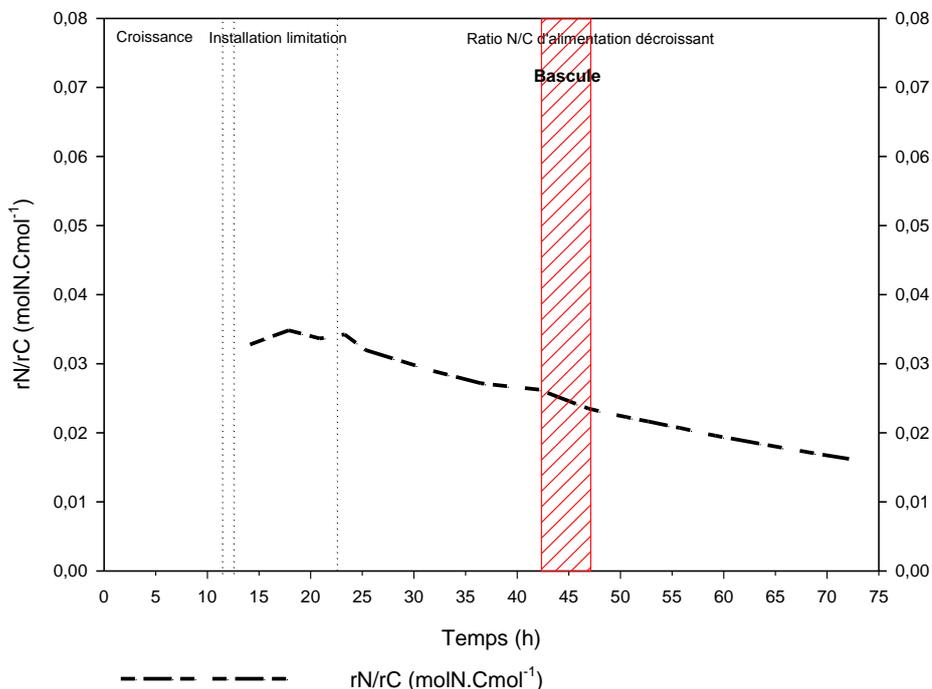


Figure 47. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

D'après l'évolution du  $rN/rC$ , en phase de limitation le  $rN/rC$  a montré un profil décroissant tout au long de la culture fed-batch.

### 3.4.4.2 Phase d'accumulation seule de lipides

Un ratio  $rN/rC$  de  $0,034 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  a induit la seule production de lipides chez *Y. lipolytica* JMY2046 sans la production concomitante d'acide citrique et a été maintenue pendant 29 h.

Comme réalisée pour la souche sauvage W29, nous avons découpé la phase de production en i) phase d'accumulation seule de lipides et ii) phase d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique simultanée. Pour les deux phases nous avons maintenu le débit d'alimentation d'azote constant à  $0,0023 \text{ L.h}^{-1}$  tandis que le débit d'alimentation de glucose a été augmenté de  $0,018$  à  $0,0237 \text{ L.h}^{-1}$ .

Pour la première phase de production (accumulation seule de lipides), le taux de croissance chute de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  à  $0,008 \text{ h}^{-1}$  amenant à une production de biomasse totale de  $225 \text{ g}$  ( $74,7 \text{ g.L}^{-1}$ ).

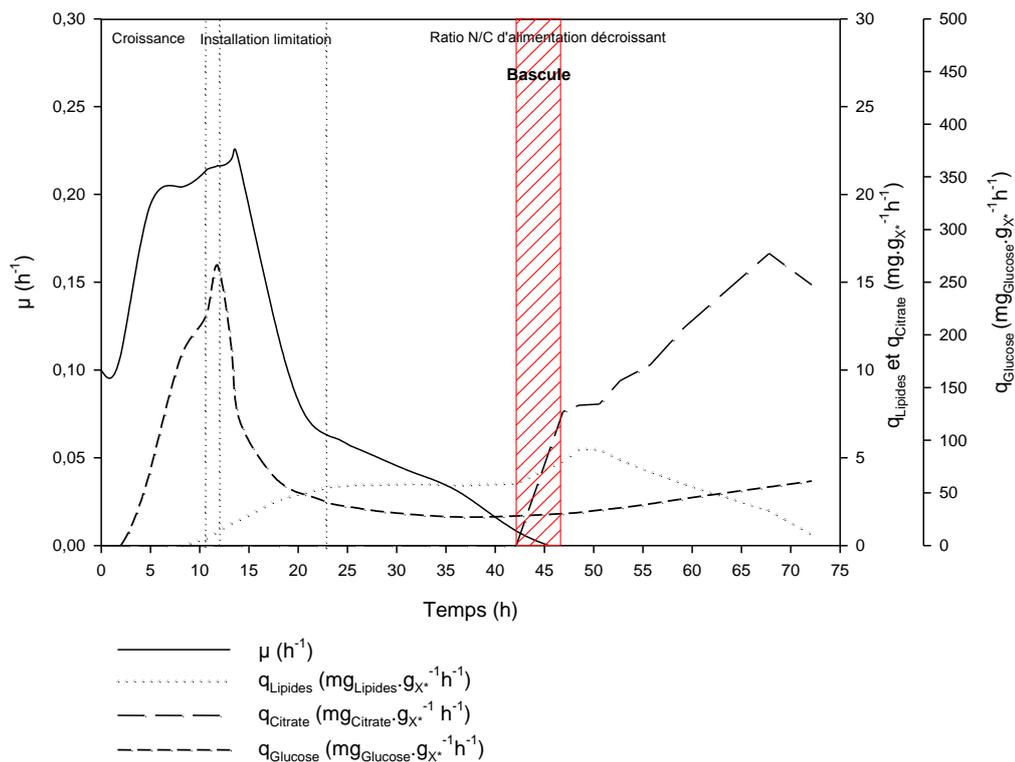


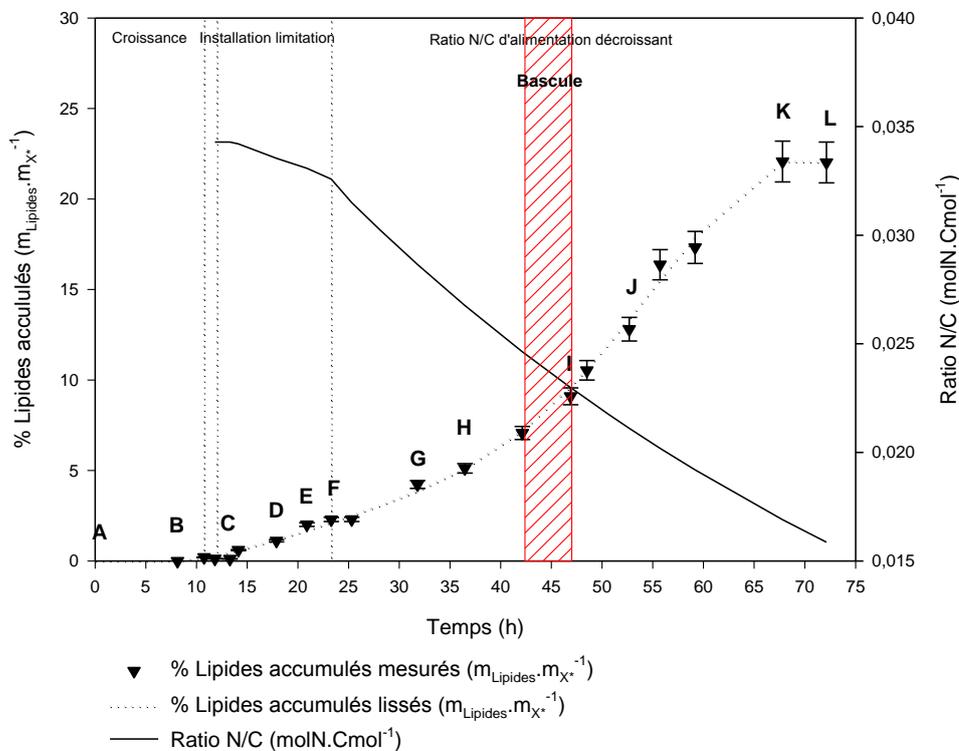
Figure 48. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046.

Nous avons détecté par HPLC une concentration de glucose résiduel maximale de 0,02 g.L<sup>-1</sup> (0,06 g) à 37 h. L'azote résiduel dans le milieu de culture a diminué de 0,01 g à 0,0006 g. De son côté, le pourcentage d'accumulation de polysaccharides a augmenté de 0,46 à 2,79 % ( $m_{\text{Polys}} \cdot m_X^{-1}$ ) (42 h) (figure 42).

En ce qui concerne les lipides, la production de lipides totaux a augmenté de 9,27 g à 26,3 g correspondant à un pourcentage d'accumulation de 2,29 à 7,07 % ( $m_{\text{Lip}} \cdot m_X^{-1}$ ). Les valeurs des vitesses spécifiques d'accumulation de lipides calculés à partir de ces données sont 3,36 mg<sub>Lipides</sub>·g<sub>X</sub><sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> à 3,56 mg<sub>Lipides</sub>·g<sub>X</sub><sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> à 23 et 42 h, respectivement. Les valeurs correspondantes du ratio rN/rC pour cette période sont 0,034 molN.Cmol<sup>-1</sup> (23 h) et 0,026 molN.Cmol<sup>-1</sup> (42 h).

L'accumulation de lipides intracellulaires a aussi été évaluée par fluorescence en utilisant Bodipy 493/503 comme marqueur lipidique. L'image K montre la morphologie d'un groupe de cellules de *Y. lipolytica* JMY2046 faisant partie de la population totale cellulaire à 67 h. A ce moment, le pourcentage d'accumulation de lipides était de 22,07 % ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_X^{-1}$ ), il est évident le changement de morphologie par rapport aux cellules à temps zéro, il s'agit peut être d'une lyse à cause des fortes conditions de limitation nutritionnelle.

Les figures suivantes montrent l'évolution de l'accumulation lipidique au cours de la culture en fed-batch :



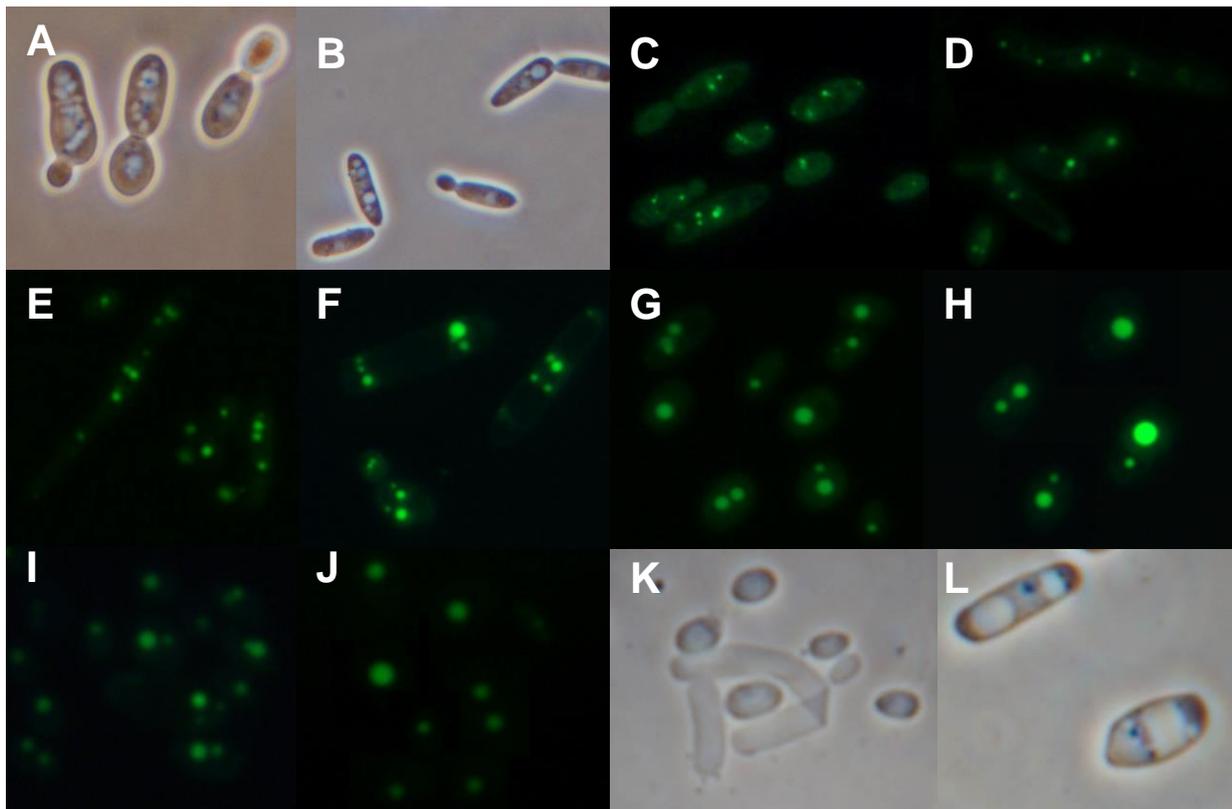


Figure 49. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

Aucune production d'acide citrique n'a été détectée par HPLC pendant la phase de production de lipides de 23 à 42 h.

### 3.4.4.3 Phase d'accumulation de lipides et production d'acide citrique simultanée

L'excrétion d'acide citrique dans le milieu a été observée pour un ratio  $rN/rC$  compris entre 0,023 et 0,026 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

Une production maximale de biomasse totale de 184,47 g (62,3 g.L<sup>-1</sup>) a été mesurée à la fin de la culture correspondant à 143,6 g (48,5 g.L<sup>-1</sup>) de biomasse catalytique (X\*).

Les profils des vitesses spécifiques de consommation de glucose, de production de biomasse catalytique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique en fonction du ratio N/C d'alimentation chez la souche JMY2046 sont montrés dans la figure suivante :

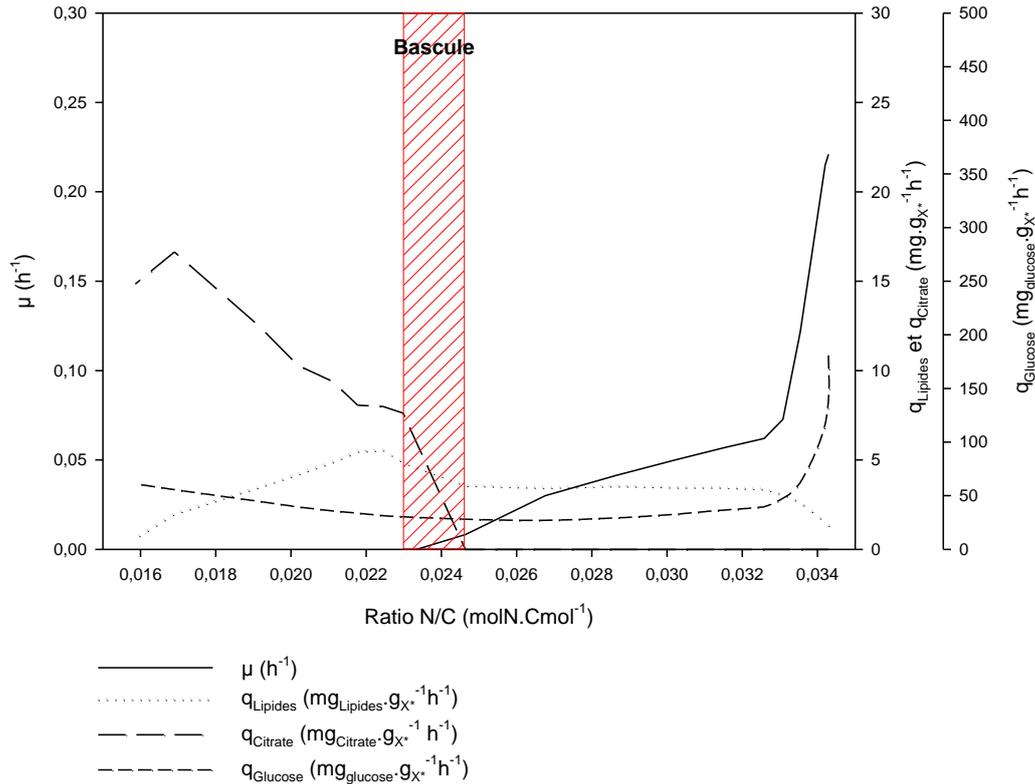


Figure 50. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse catalytique, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production de citrate en fonction du ratio N/C au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

Comme il peut être observé pour l'intervalle de ratio N/C d'alimentation compris entre 0,0224 et 0,0158 molN.Cmol<sup>-1</sup> (correspondant à un ratio rN/rC de 0,023-0,016 molN.Cmol<sup>-1</sup>), la vitesse spécifique d'accumulation de lipides ( $q_{\text{Lipides}}$ ) a diminué de 5,54 à 0,62 mgLipides.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, tandis que la vitesse spécifique de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ) a augmenté de 7,99 à 14,84 mgCitrate.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

#### 3.4.4.4 Rendements de conversion du glucose en lipides et en citrate

Les rendements de conversion du glucose en lipides ( $R_{S/\text{Lip}}$ ) et en citrate ( $R_{S/\text{Cit}}$ ), ont été calculés à partir des vitesses de consommation de glucose ( $r_{\text{Glucose}}$ ) et des vitesses d'accumulation de lipides ( $r_{\text{Lipides}}$ ) et de production de citrate ( $r_{\text{Citrate}}$ ).

Le rendement maximal de conversion du glucose en lipides accumulés est de 0,18 gLipides.gX<sup>-1</sup> à 48 h, au-delà de ce temps, le rendement est descendu drastiquement jusqu'à 0,010 gLipides.gX<sup>-1</sup> à 72 h. Ce comportement est lié à la production de citrate détecté à 47 h.

Pour le citrate, le rendement maximal de conversion du glucose atteint a été de 0,29 g<sub>Ci-</sub>trate.g<sub>Glucose</sub><sup>-1</sup> à 68 h.

L'évolution des rendements est montrée dans la figure suivante :

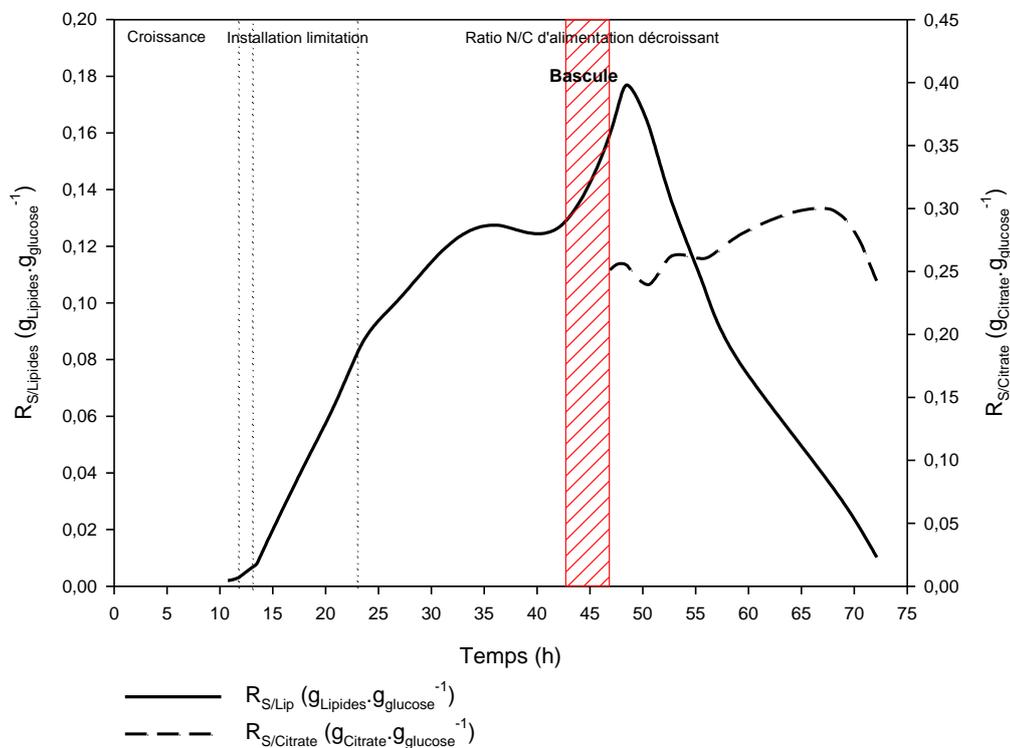


Figure 51. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

### 3.4.4.5 Acides organiques autres que le citrate

La figure suivante montre l'évolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de cette culture :

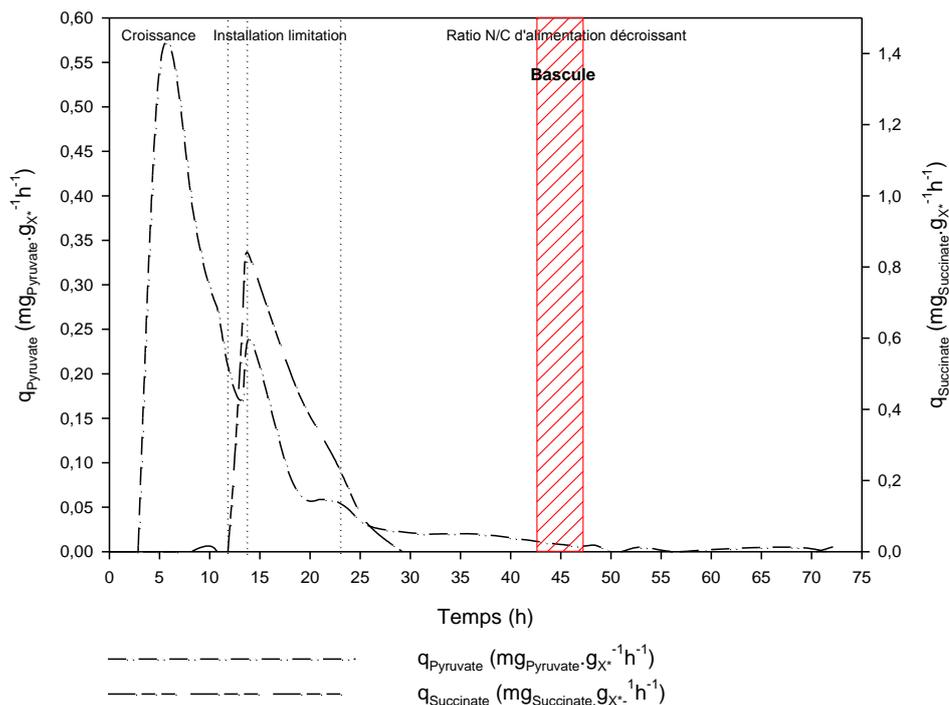


Figure 52. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* 2046

On retrouve ici le même profil que celui observé chez la souche sauvage, à savoir :

- Une production de succinate déclenchée lors de l'accumulation de lipides puis re-consommation de l'acide peu avant la bascule vers l'acide citrique
- Une production de pyruvate pendant la phase de croissance qui s'estompe pendant la mise en place de la limitation nutritionnelle. Le pyruvate n'est lui pas re-consommé.

### 3.4.5 Analyse biochimique enzymatique

#### 3.4.5.1 Evolution des activités spécifiques enzymatiques

Les activités spécifiques enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) ont été déterminées au cours de la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* JMY2046.

Nous avons réalisé quatre dosages enzymatiques pendant la phase de croissance entre 5 et 12 h.

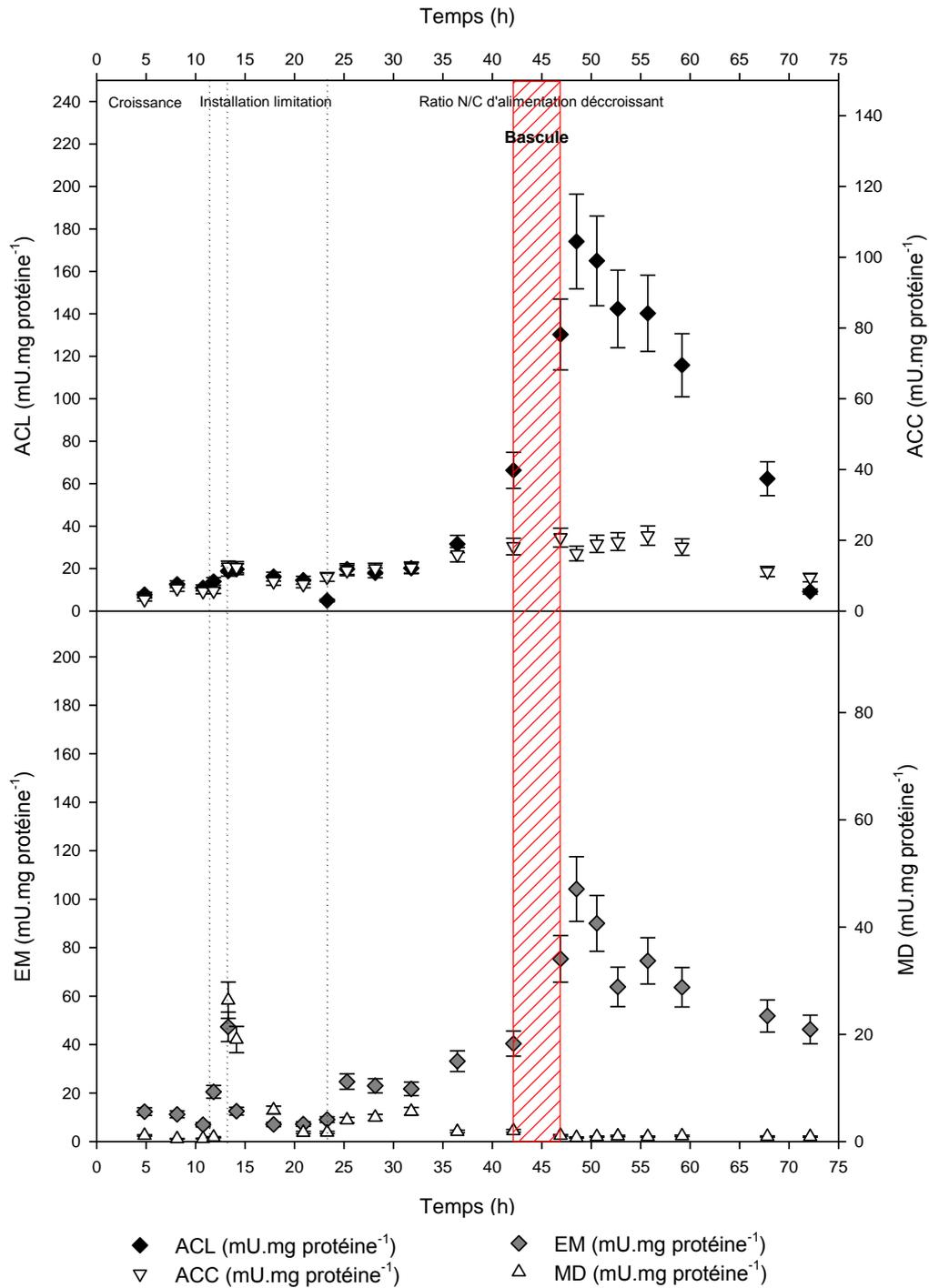


Figure 53. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY2046

On remarque une augmentation des activités spécifiques de l'ACL, de l'ACC et de l'EM pendant la phase tardive de la croissance et le début de la mise en place de la limitation nutritionnelle, d'un facteur 1,78 ; 1,74 et de 1,66 respectivement, tandis que l'activité spécifique enzymatique de la MD est restée faible.

---

Pendant la phase de mise en place de la limitation nutritionnelle (entre 13 et 23 h), on remarque également une augmentation des activités spécifiques de toutes les enzymes étudiées : l'ACL d'un facteur 1,35 ; l'ACC d'un facteur 2,2, l'EM d'un facteur 2,3, la MD d'un facteur 32 pour une augmentation de la vitesse spécifique d'accumulation de lipides d'un facteur 2,5.

Durant la phase tardive d'accumulation de lipides (entre 23 et 42 h), les activités de l'ACL, l'ACC et l'EM ont augmenté de facteurs 4,7 ; 1,89 et 4,41 respectivement, tandis que pour la MD l'activité spécifique a diminué de 50 %. Pour ce même période, la vitesse spécifique d'accumulation de lipides a augmenté de 20 %.

Pendant la période de bascule et au début de la production de citrate, les activités spécifiques de l'ACL, EM et ACC ont augmenté d'un facteur 2 et 1,86 et 1,11 respectivement ; tandis que l'activité de la MD a diminué de 42 %.

Enfin, l'ACL et l'EM possèdent leur activités spécifiques maximales dans la même période pour laquelle la vitesse spécifique d'accumulation de lipides est maximale (45-50 h) et égale à  $5,54 \text{ mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

A la fin de la culture où le métabolisme est majoritairement tourné vers la production de citrate, les activités spécifiques de l'ACL, de l'EM, de l'ACC et de la MD chutent drastiquement et tendent à retrouver leur niveau basal.

### 3.4.5.2 Vitesses spécifiques de production des enzymes

Nous avons calculé les vitesses spécifiques de production d'enzyme pour la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* JMY2046.

On remarque que la vitesse spécifique de production de l'ATP citrate lyase ( $q_{\text{ACL}}$ ) est fortement induite lors du début de la phase de décélération du le ratio N/C d'alimentation. La  $q_{\text{ACL}}$  atteint sa valeur maximale à  $q_{\text{Lipides}}$  maximale ( $5,5 \text{ mg}_{\text{Lipides accumulés}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) quand le citrate est déjà détecté dans le milieu de culture. La  $q_{\text{ACL}}$  diminue drastiquement une fois que l'accélération de  $q_{\text{Citrate}}$  est observée.

La figure suivante montre l'évolution de l'activité spécifique de l'ATP citrate lyase ainsi que les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides ( $q_{\text{Lipides accumulés}}$ ) et de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ).

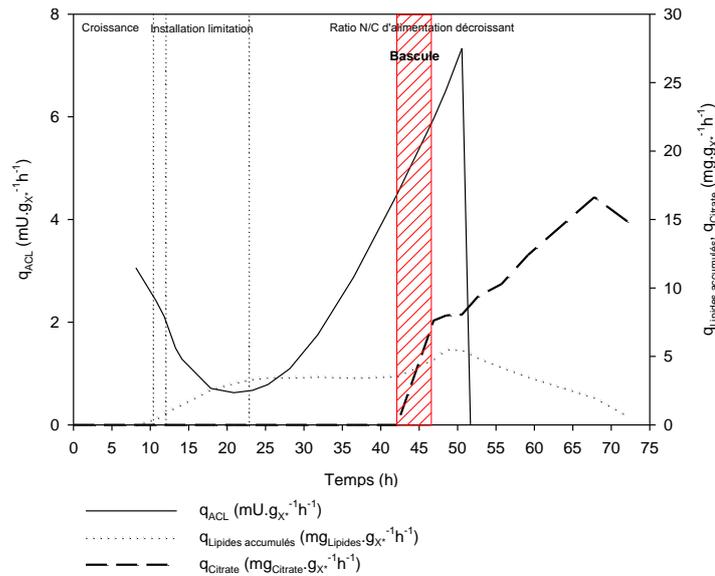


Figure 54. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* JMY2046

En ce qui concerne la vitesse spécifique de production de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), nous observons que son profil diminue drastiquement lors de l'étape de transition entre la croissance et l'installation de la limitation nutritionnelle. La même tendance continue au long de la culture devenant pratiquement nulle lors de la production de citrate à  $q_{Lipides\ accumulés}$  maximale.

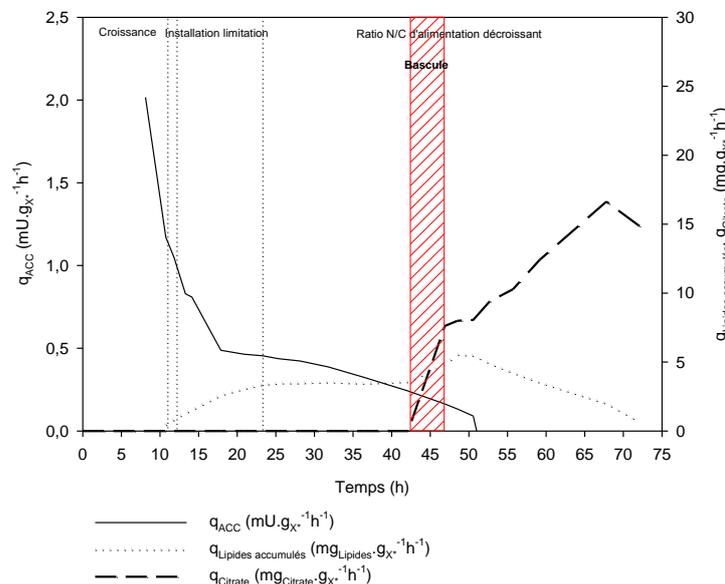


Figure 55. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* JMY2046

La vitesse spécifique de production de l'enzyme malique semble suivre le même comportement que celui de l'ATP citrate lyase. Dans un premier temps, on observe son induction lors de la phase de l'installation de la limitation nutritionnelle et atteint sa valeur

maximale à  $q_{\text{Lipides accumulés}}$  maximale, même période où le citrate a été détecté dans le milieu de culture. Une fois que  $q_{\text{Citrate}}$  atteint une valeur de  $8 \text{ mg}_{\text{Citrate}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , la synthèse de l'enzyme est fortement reprimée (figure 56).

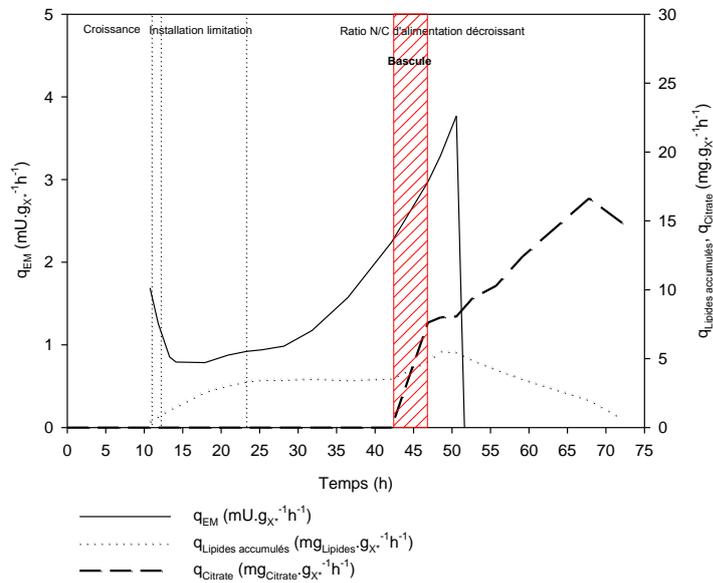


Figure 56. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* JMY2046

Finalement, la figure suivante montre l'évolution de l'activité spécifique de la malate déshydrogénase ainsi que les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides ( $q_{\text{Lipides accumulés}}$ ) et de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ).

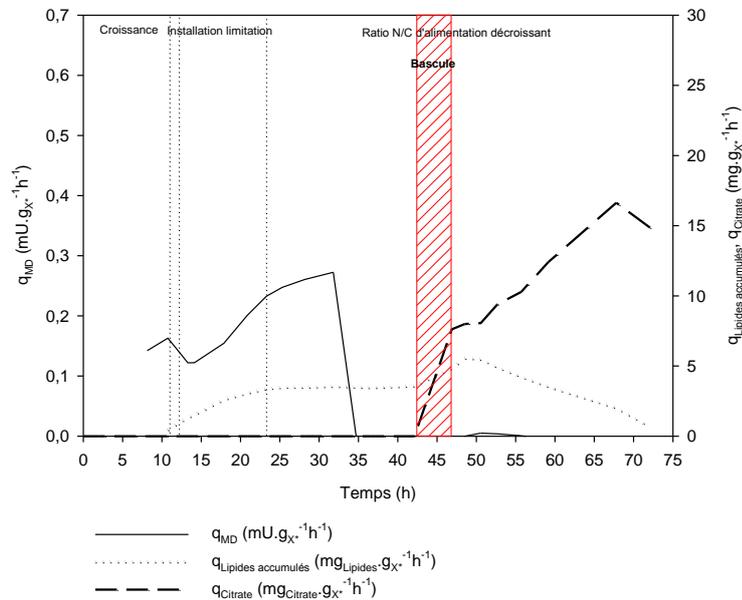


Figure 57. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* JMY2046

La vitesse spécifique de production de la malate déshydrogénase ( $q_{MD}$ ) est déjà induite lors de l'étape de croissance. Elle suit une induction pendant la transition de

---

l'installation de la limitation nutritionnelle et l'étape du ratio N/C d'alimentation décroissant. La  $q_{MD}$  atteint sa valeur maximale à une  $q_{\text{Lipides accumulés}}$  de  $3,5 \text{ mg}_{\text{Lipides accumulés}} \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , au-delà de cette valeur la  $q_{MD}$  semble être fortement affectée.

### 3.4.6 Discussion

Les résultats obtenus avec la souche *Yarrowia lipolytica* JMY2046 délétée pour la forme peroxysomale de la malate déshydrogénase sont comparés à ceux obtenus avec la souche sauvage W29.

Le tableau suivant montre les différents paramètres cinétiques en fed-batch avec les souches JMY2046 et W29 :

Paramètre	W29	JMY2046
$R_{X/S}$ max ( $g_{X^*} \cdot g_{\text{glucose}}^{-1}$ )	0,51	0,43
N/C ratio d'alimentation ( $\text{molN} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ )	0,0342-0,024	0,0342-0,024
Dynamique de la limitation nutritionnelle ( $\text{mmolN} \cdot \text{Cmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0, 17 et 0, 34	0, 17 et 0, 34
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés max ( $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	9,3	5,54
% Lipides accumulés max ( $\text{m}_{\text{Lipides}} \cdot \text{m}_{X^*}^{-1}$ )	22,7	22,1
$q_{\text{Polys}}$ accumulés max ( $\text{mg}_{\text{Polys}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	16,6	2,7
% Polysaccharides accumulés max ( $\text{m}_{\text{Polys}} \cdot \text{m}_{X^*}^{-1}$ )	9,5	2,8
$q_{\text{Pyruvate}}$ max ( $\text{mg}_{\text{Pyruvate}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0,33	0,52
$q_{\text{Succinate}}$ max ( $\text{mg}_{\text{Succinate}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	1,29	0,82
rN/rC à la bascule citrate ( $\text{molN} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ )	0,022	0,025
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés à la bascule citrate ( $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	4,8	3,6
$\mu$ catalytique à la bascule citrate ( $\text{h}^{-1}$ )	0,001	0,0008
$q_{\text{Glucose}}$ à la bascule citrate ( $\text{mg}_{\text{glucose}} \cdot g_{X^*}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	39,9	28,04

Tableau 37. Paramètres cinétiques obtenus lors de cultures en fed-batch avec les souches de *Y. lipolytica* W29 et JMY2046

En phase de croissance, il a été observé un rendement de production de biomasse inférieure chez la souche JMY2046. Cela indiquerait une participation de la malate déshydrogénase peroxysomiale pendant le métabolisme oxydatif, c'est-à-dire d'un catabo-

---

lisme lipidique au cours de la croissance. La délétion de cette enzyme affecterait ainsi l'énergétique cellulaire se traduisant par la diminution du rendement de croissance.

La bascule métabolique chez cette souche a été étudiée dans un ratio N/C d'alimentation compris entre 0,0343 et 0,0158 molN.Cmol<sup>-1</sup> correspondant à un ratio rN/rC de 0,0342-0,016 molN.Cmol<sup>-1</sup> chez cette souche. Nous avons observé que le ratio rN/rC initiale de 0,034 molN.Cmol<sup>-1</sup> induit la seule production de lipides chez cette souche mutante comme chez la souche sauvage W29.

La dynamique de limitation nutritionnelle imposée dans cette culture a été la même que pour la culture en fed-batch avec la souche sauvage en raison de 0,17 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> pendant l'étape de limitation et en raison de 0,34 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> pendant l'étape de production.

En ce qui concerne les lipides, le taux d'accumulation a été supérieur chez la souche mutante au début de la phase (supérieur d'un facteur 1,68) mais les valeurs diffèrent très peu à la fin de cette phase.

Les valeurs de rN/rC semblent varier entre les deux souches. Dans un même ratio N/C d'alimentation, chez la souche mutante JMY2046 le ratio rN/rC est inférieur de 2 % pendant l'étape de limitation, supérieur de 10 % pendant l'étape d'accumulation de lipides et supérieur de 18 % pendant l'étape d'accumulation de lipides et production de lipides simultanée. Ceci traduit un flux catabolique plus faible en absence de la malate déshydrogénase.

Ces observations vont dans le sens d'une participation d'une voie métabolique peroxysomiale de catabolisme lipidique concomittante au métabolisme de croissance et d'accumulation lipidique sur glucose.

Quand le ratio rN/rC a atteint une valeur comprise entre 0,026-0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup>, nous avons détecté la production d'acide citrique dans le milieu de culture. Cet intervalle du ratio rN/rC est supérieur de 20 % par rapport à la souche sauvage W29. Cela suggère que le fait de réduire le flux de carbone dans le métabolisme lipidique par la délétion de la MDH déclenche la bascule vers l'acide citrique plus tôt qui pourrait s'expliquer par un phénomène de saturation de cette voie plus précoce.

Evidemment ces hypothèses reposent sur le fait que la délétion de la malate déshydrogénase peroxysomiale entraîne un arrêt ou un ralentissement du catabolisme lipidique peroxysomiale. Cela reste néanmoins à démontrer dans l'avenir.

---

### 3.5 Culture de *Yarrowia lipolytica* JMY1552 en mode fed-batch

L'enzyme ATP citrate lyase a été décrite pour être une des enzymes clés dans l'accumulation des lipides (Ratledge 2002; Ratledge 2004) et elle est spécifiquement présente chez les microorganismes oléagineux.

A partir de nos résultats des activités spécifiques enzymatiques obtenus en D-stat et fed-batch, nous avons constaté une corrélation entre la dynamique de l'ATP citrate lyase et la production de lipides. Nous avons observé que, pendant l'étape d'accélération de la vitesse spécifique d'accumulation de lipides, l'activité spécifique de l'ACL est maximale juste avant que l'acide citrique soit produit en excès. Ce phénomène pourrait indiquer une relation entre l'ATP citrate lyase, l'accumulation lipidique et la production d'acide citrique.

Dans ce cas, la surexpression de l'ACL peut-elle « retarder » l'apparition de la production d'acide citrique en rédirigeant une partie du flux de carbone vers les acides gras ?

Nous avons donc décidé d'étudier l'impact de la surexpression de l'ATP-citrate lyase sur les bacsules métaboliques de *Yarrowia lipolytica*. Pour ce faire, une souche génétiquement modifiée de *Yarrowia lipolytica* JMY1552 surexprimant les gènes ACL1 et ACL2 sous le contrôle du promoteur pPOX2 inductible par l'acide oléique a été cultivé en réacteur fed-batch selon le protocole décrit précédemment.

#### 3.5.1 Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch

De la même façon que pour la souche sauvage W29 et la souche mutante JMY2046, la stratégie d'alimentation a consisté en les trois phases précédemment décrites.

Néanmoins, du fait d'une défaillance technique dans la pompe d'alimentation de glucose à 57 h, deux profils d'alimentation de glucose ont été appliqués. Le deuxième profil correspond à l'ajustement manuel réalisé au cours de la culture.

Les profils d'alimentation en glucose et en azote sont présentés dans la figure suivante :

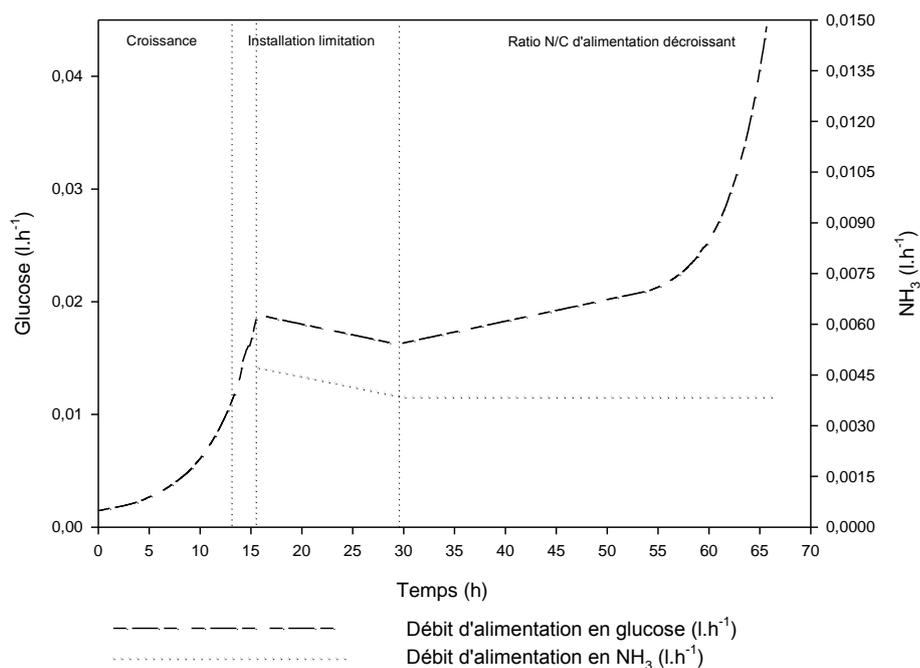


Figure 58. Profils des débits d'alimentation en glucose et en  $\text{NH}_3$  au cours de la culture en fed-batch avec *Y. lipolytica* JMY1552

Comme pour les cultures précédentes, le contrôle du pH pendant la phase de croissance a été assuré par une solution de  $\text{NH}_3$  (5 M), tandis que pour les étapes suivantes, le pH a été contrôlé par l'ajout de KOH (5 M) ou de l'acide ortho-phosphorique, selon les besoins.

Les apports en sels du milieu CFMA (hors  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), en vitamines et en oligo-éléments ont été réalisés selon les besoins de chaque culture une fois que la biomasse a atteint  $15 \text{ g.L}^{-1}$  d'accroissement.

### 3.5.2 Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch

Pour l'étude de la transition métabolique nous avons décidé d'étudier un ratio N/C d'alimentation sur une gamme plus vaste, parce qu'à la différence de la souche JMY2046 (délétion de la malate déshydrogénase peroxysomale) avec un phénotype proche de la souche sauvage, la souche mutante JMY1552 présente une mutation génétique plus critique pour la régulation du métabolisme lipidique. C'est pour ces raisons que le ratio N/C d'alimentation initial de limitation nutritionnelle choisi a été de  $0,061 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  et a été diminué jusqu'à  $0,021 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ , selon la dynamique suivante :

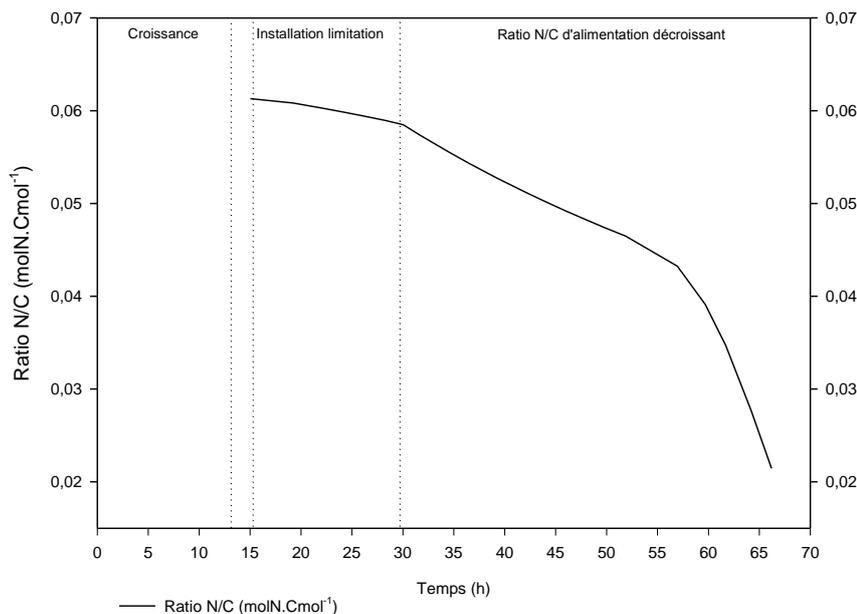


Figure 59. Evolution du profil du ratio N/C d'alimentation au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

1. Une phase de croissance, où la culture a été maîtrisée pour avoir une croissance exponentielle contrôlée par l'apport du glucose
2. Phase de mise en place de la limitation azotée, où le ratio N/C d'alimentation a été diminué de 0,061 à 0,058 molN.Cmol<sup>-1</sup> pendant 15 heures, correspondant à une dynamique de limitation nutritionnelle de 0,21 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>.
3. Une étape où le ratio N/C d'alimentation a été constamment diminué par les ajouts contrôlés d'un flux de glucose et d'azote dans le milieu de culture de manière indépendante. A cause d'une défaillance technique dans la pompe d'alimentation de glucose nous avons obtenu deux profils du ratio N/C d'alimentation différents. Un premier profil où le ratio N/C d'alimentation a été diminué de 0,058 à 0,043 molN.Cmol<sup>-1</sup> pendant 27 heures correspondant à une dynamique de limitation nutritionnelle de 0,56 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>. Un deuxième profil où le ratio N/C d'alimentation a été diminué de 0,043 à 0,021 molN.Cmol<sup>-1</sup> pendant 9 heures correspondant à une dynamique de limitation nutritionnelle de 2,4 mmolN.Cmol<sup>-1</sup>.

### 3.5.3 Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch

#### 3.5.3.1 Métabolites majeurs

La figure suivante montre l'évolution des profils des masses en métabolites majeurs tels que la biomasse totale, glucose résiduel et azote résiduel obtenus au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552.

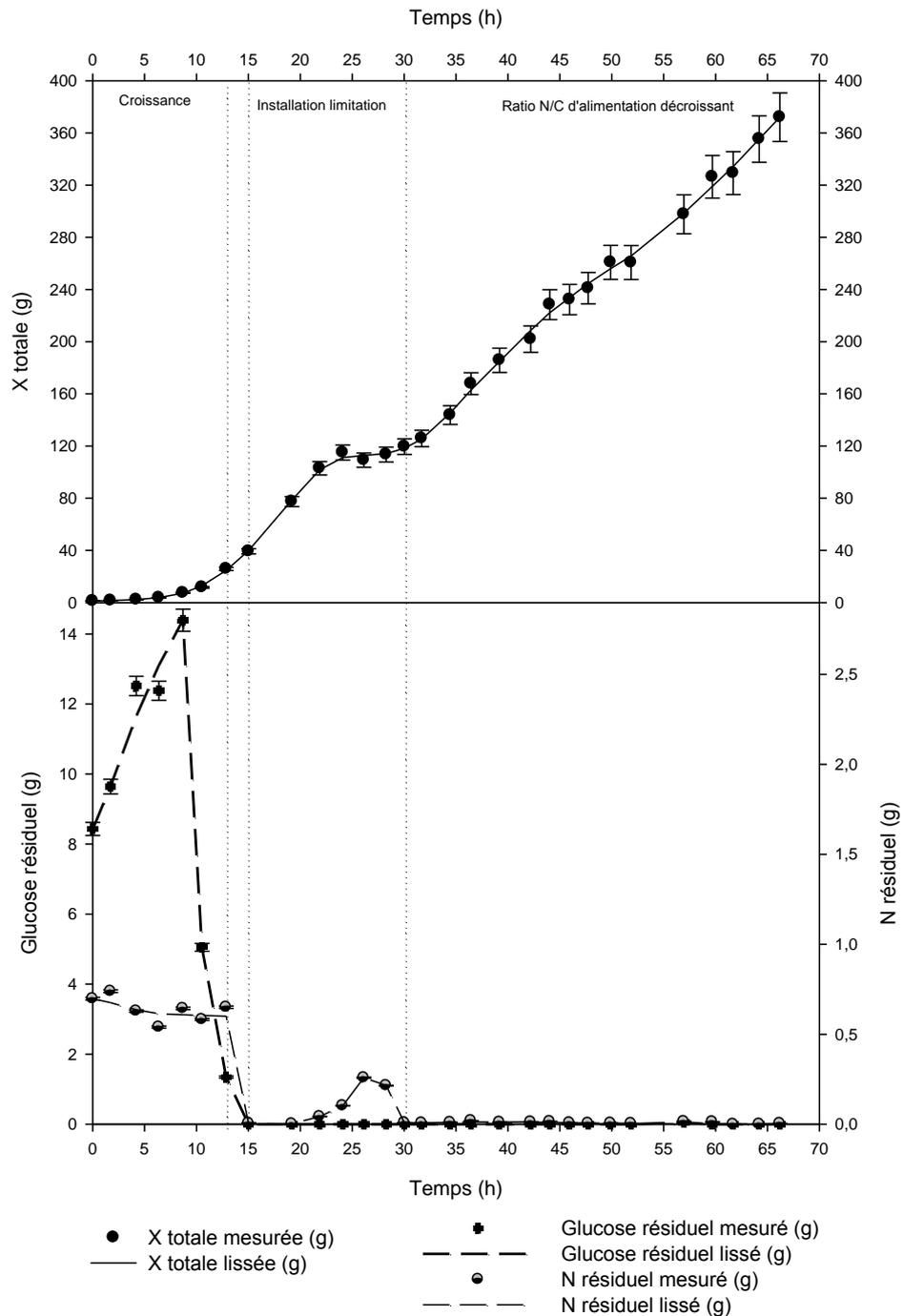


Figure 60. Evolution des profils de biomasse totale, de citrate, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

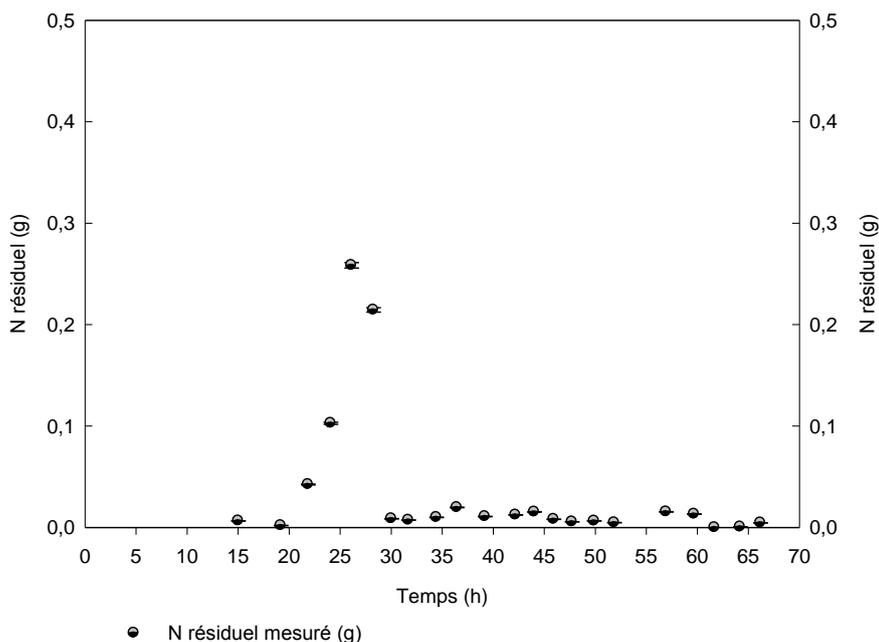


Figure 61. Zoom de l'évolution du profil d'azote résiduel au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Pendant la phase de croissance (0 à 13 h), un taux de croissance ( $\mu_{\text{expo}}$ ) de  $0,22 \text{ h}^{-1}$  était obtenu grâce à un apport exponentiel de la solution de glucose. Durant cette phase, la quantité de biomasse totale obtenue a été de  $25,7 \text{ g}$  ( $11 \text{ g.L}^{-1}$ ). Néanmoins une quantité maximale de  $14 \text{ g}$  ( $6,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) de glucose a été détectée par HPLC après 9 h de culture.

L'azote a été apporté sous la forme de  $\text{NH}_3$  (5 M) pour la régulation du pH. Nous avons dosé l'azote résiduel dans le milieu de culture indiquant une quantité résiduelle moyenne de  $0,64 \text{ g}$  ( $0,27 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Durant l'étape d'épuisement d'azote dans le moût de fermentation qui a duré environ 2 heures chez la souche JMY1552, nous avons détecté une production maximale de polysaccharides totaux de  $8,50 \text{ g}_{\text{Polys}} \cdot \text{g}_{\text{X}^*}^{-1}$  à 15 h.

Une quantité maximale de  $4,5 \text{ g}_{\text{Lipides}}$  totaux a été mesurée correspondant à  $2,5 \text{ g}_{\text{Lipides}}$  accumulés. En ce qui concerne l'azote résiduel, il a été rapidement consommé de  $0,65 \text{ g}$  à  $0,0065 \text{ g}$  (à 15 h), tandis que le taux de croissance a diminué de  $0,18$  à  $0,14 \text{ h}^{-1}$ .

Pendant la deuxième phase de limitation nutritionnelle (de 15 à 30 h), le ratio N/C d'alimentation a été diminué de  $0,061$  à  $0,058 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  en imposant des débits d'alimentation des pompes de glucose et d'azote, correspondant aux valeurs du ratio  $r\text{N}/r\text{C}$  de  $0,115$  à  $0,06 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ . L'échantillonnage pendant cette phase a été réalisé environ toutes les 2,5 heures.

Les profils de la biomasse catalytique ( $\text{X}^*$ ), des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés chez *Y. lipolytica* JMY1552 sont montrés dans la figure suivante :

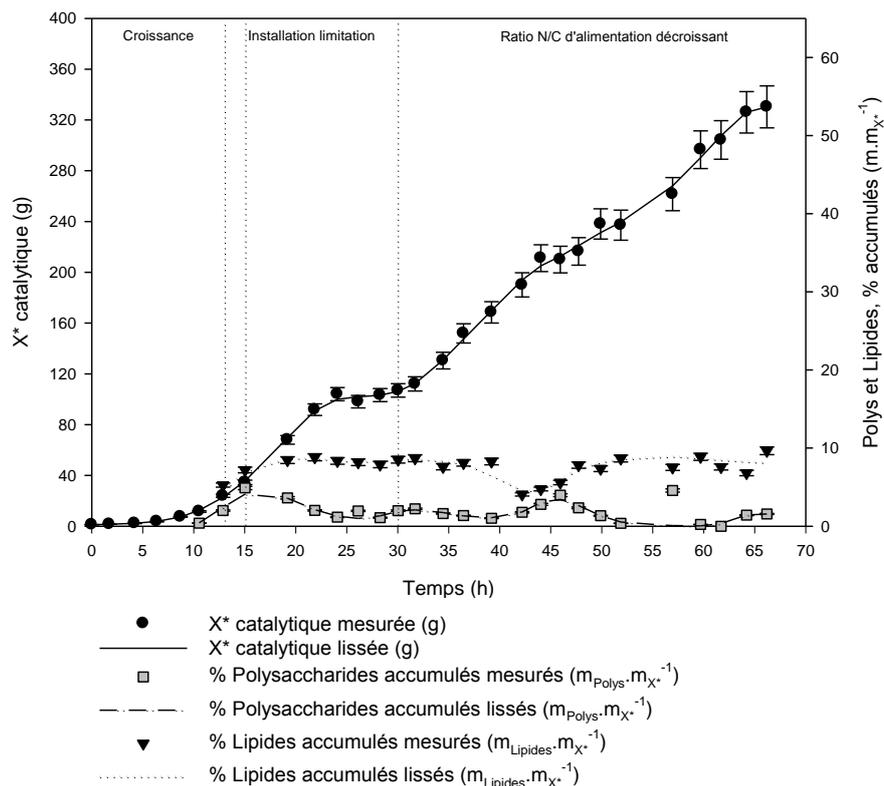


Figure 62. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Les événements observés lors de la phase de limitation chez *Yarrowia lipolytica* JMY1552 sont décrits ci-dessous :

- Diminution du taux de croissance de  $0,14$  à  $0,04 \text{ h}^{-1}$ , permettant de produire une quantité maximale de biomasse totale égale à  $119 \text{ g}$  ( $48 \text{ g.L}^{-1}$ ) qui correspond à une biomasse catalytique de  $106 \text{ g}$  ( $43 \text{ g.L}^{-1}$ ).
- Une consommation des polysaccharides accumulés lors de la phase d'épuisement d'azote dans le moût de fermentation, révélée par la diminution du pourcentage de polysaccharides accumulés de  $4,9$  à  $2\%$  ( $m_{\text{Polys}} \cdot m_{X^*}^{-1}$ ).
- Une faible augmentation de l'accumulation de lipides intracellulaires de  $7,2 \%$  à  $8,5 \%$  ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_{X^*}^{-1}$ ). Durant cette étape, le rendement maximal de conversion du glucose en lipides accumulés a été égal à  $0,15 \text{ g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ . Nous observons également un changement dans le profil d'accumulation de lipides vers  $40 \text{ h}$  résultat d'un problème technique dans l'alimentation du glucose au réacteur que se traduit notamment par une reconsommation des lipides accumulés.

- Une augmentation de la quantité d'azote résiduelle dans le milieu de fermentation maximale de 0,26 g (0,11 g.L<sup>-1</sup>) à 26 h et reconsommée à 0,009 g (0,004 g.L<sup>-1</sup>) à 30 h.

### 3.5.3.2 Métabolites mineurs

Le dosage réalisé par HPLC révèle une présence de pyruvate et de succinate pendant la culture avec la souche JMY1552. La figure suivante montre les profils de la production de pyruvate et de succinate au cours de la culture :

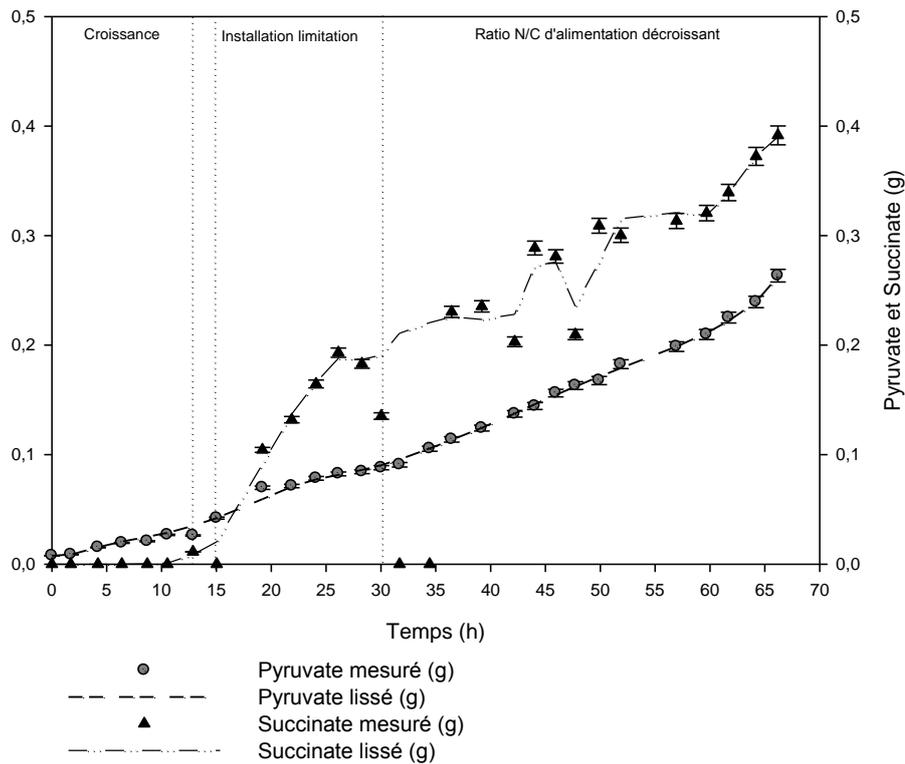


Figure 63. Evolution de la production d'acides organiques au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Le pyruvate a été détecté dès le début de la culture à des très faibles quantités quand les conditions en apport nutritionnelle n'étaient pas limitantes et sa production s'est maintenue tout au long de la culture. La vitesse spécifique de production de pyruvate a été maximale à 4 h et égale à 1,18 mg<sub>Pyruvate</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Le succinate de son côté, a été détecté à 13 h à une concentration de 0,0048 g.L<sup>-1</sup> (0,011 g) ; 0,27 mg<sub>Succinate</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> étant la vitesse maximale à 19 h.

---

### 3.5.4 Analyse cinétique

#### 3.5.4.1 Le ratio $rN/rC$

La figure suivante montre le profil de  $rN/rC$  ( $\text{molN.Cmol}^{-1}$ ) au cours de la culture fed-batch de *Y.lipolytica* JMY1552 :

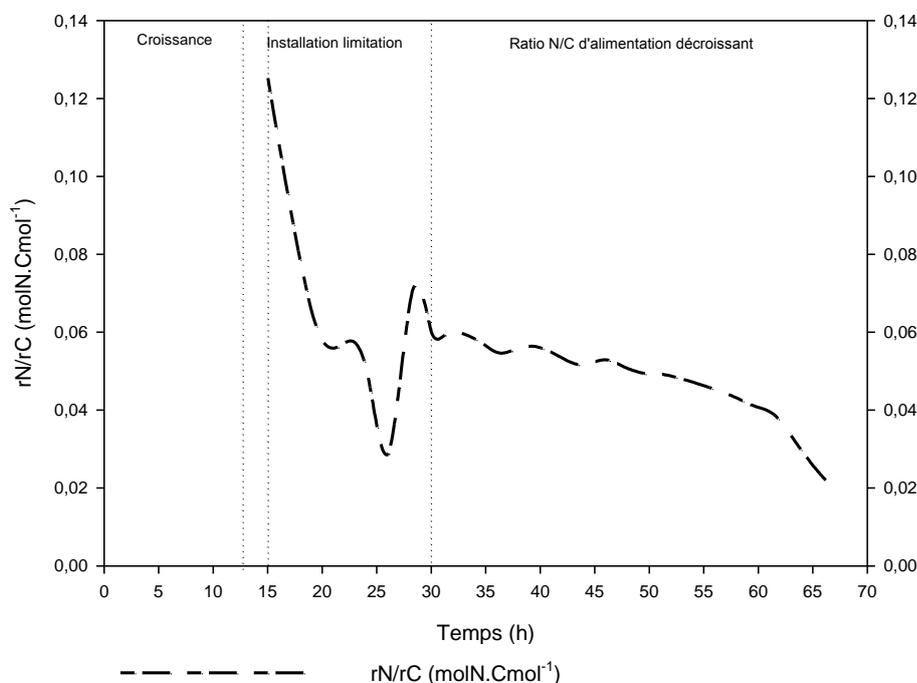


Figure 64. Evolution du  $rN/rC$  au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Pendant l'étape de limitation nutritionnelle, un premier profil décroissant du  $rN/rC$  est observé. Ce profil provient d'une accumulation d'azote dans le milieu de culture jusqu'à 26 h. Un deuxième profil croissant est observé une fois que la quantité résiduelle d'azote dans le milieu diminue du fait de sa consommation par la souche JYM1552.

En ce qui concerne l'étape de production de lipides, nous avons observé un profil décroissant avec de faibles variations suivant la dynamique imposée sur la limitation nutritionnelle. Dans cette étape, la variation la plus évidente est observée à 61 h correspondant à une vitesse spécifique de consommation d'azote de  $0,41 \text{ mg}_N.\text{g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### 3.5.4.2 Phase d'accumulation seule de lipides

Dans la période comprise entre 30 et 66 h, le débit d'alimentation d'azote a été maintenu constant alors que le glucose a subi deux accélérations différentes.

Pour la première étape comprise entre 30 et 57 h, le taux de croissance a diminué de 0,04 à  $0,028 \text{ h}^{-1}$  qui est une diminution moins importante par rapport aux souches W29 et

JMY2046. Chez la souche JMY1552, la biomasse totale maximale obtenue a été de 297 g (110 g.L<sup>-1</sup>) correspondant à une biomasse catalytique de 261 g (97 g.L<sup>-1</sup>). Pour la deuxième étape de production, le taux de croissance a diminué de 0,028 à 0,018 h<sup>-1</sup> à 66 h.

De son côté, l'azote résiduel dans le milieu de culture a oscillé de 0,009 g (à 30 h) à 0,020 g (à 37 h) à 0,015 g (à 57 h), correspondant aux vitesses spécifiques de consommation d'azote de 2,19 ; 0,84 et 0,44 mg<sub>N</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivement. Tandis que pour la fin de la culture, la quantité d'azote résiduel détecté dans le milieu de culture a été de 0,0046 g (0,0016 g.L<sup>-1</sup>).

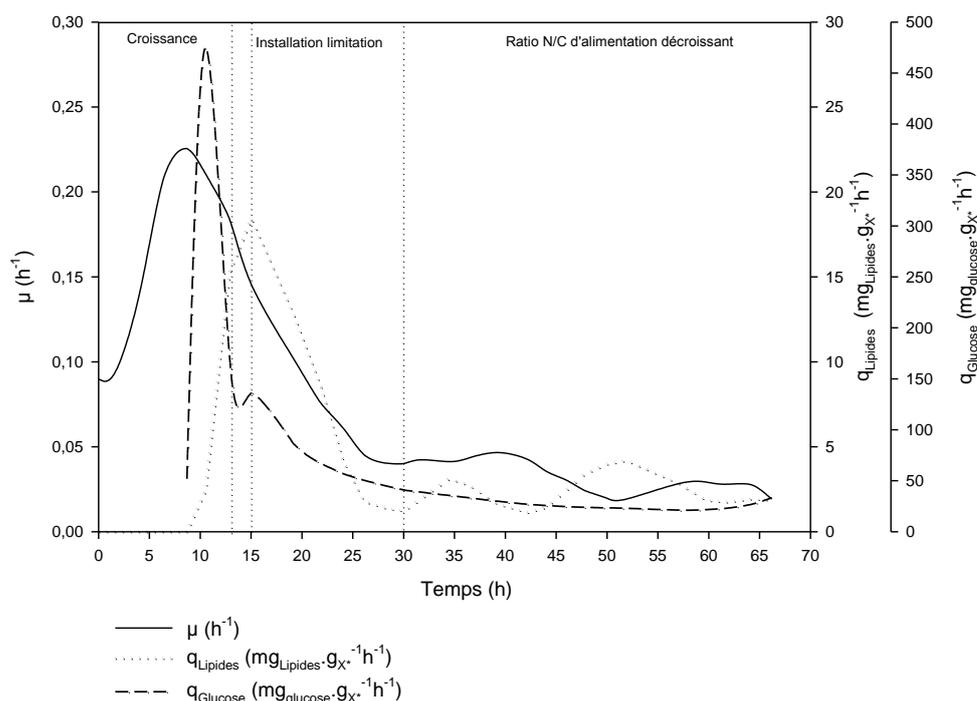


Figure 65. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse et d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Le pourcentage d'accumulation de polysaccharides a augmenté de 2 à 4,6 % (m<sub>Polys</sub>.m<sub>X</sub><sup>-1</sup>), alors que pour la deuxième étape de production a diminué à 1,6 % (m<sub>Polys</sub>.m<sub>X</sub><sup>-1</sup>).

En ce qui concerne les lipides, le pourcentage de lipides totaux a diminué de 14,42 à 13,44 % (m<sub>Lipides</sub>.m<sub>X</sub><sup>-1</sup>) (diminution de 6,4 %), alors que pour la deuxième étape et fin de la culture a augmenté à 15,5% (m<sub>Lipides</sub>.m<sub>X</sub><sup>-1</sup>). Les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides calculées à partir de ces données sont 1,2 mg<sub>Lipides</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (30 h), 2,8 mg<sub>Lipides</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (57 h) et 1,8 mg<sub>Lipides</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (66 h).

L'accumulation de lipides intracellulaires a aussi été évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 comme marqueur lipidique. Les figures suivantes montrent l'évolution de l'accumulation lipidique au cours de la fermentation fed-batch de la souche JMY1552 :

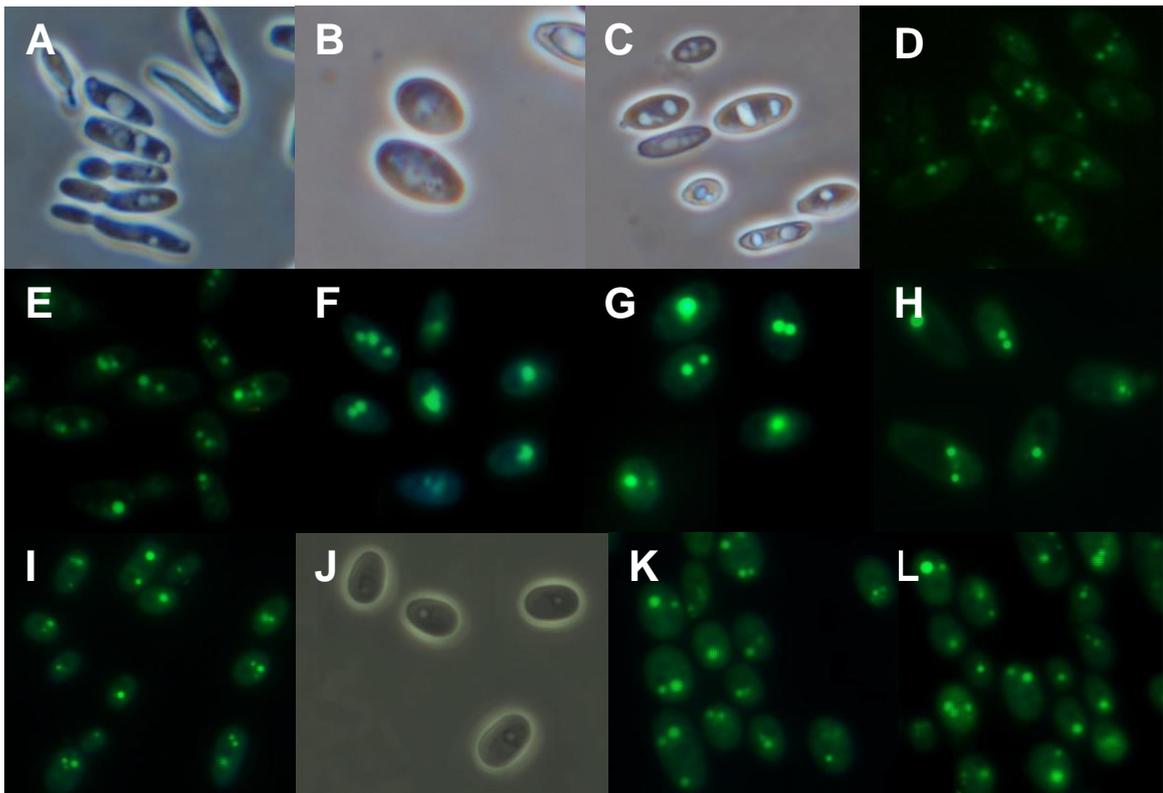
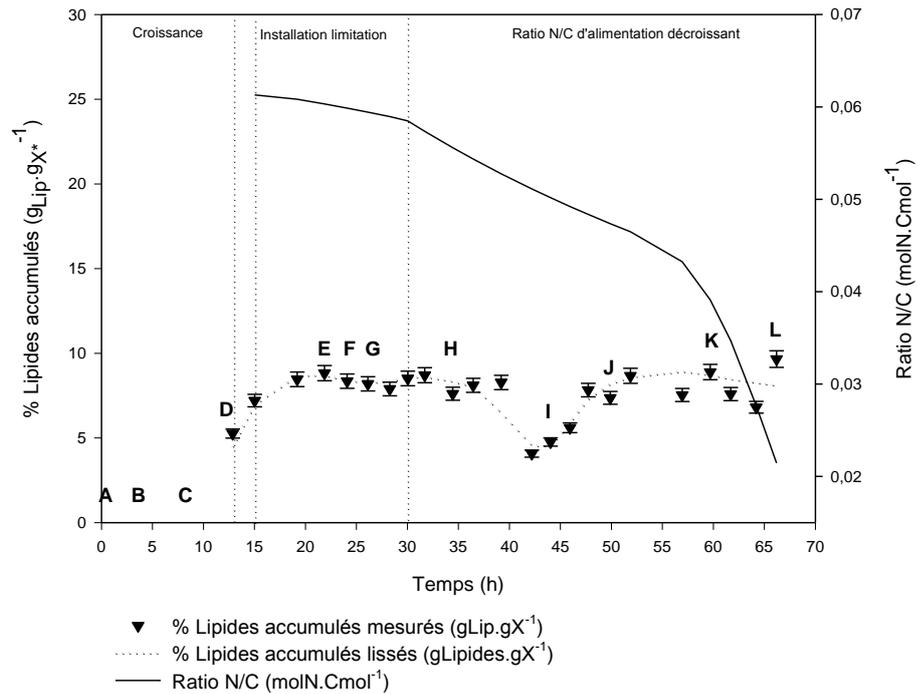


Figure 66. Evolution de l'accumulation lipidiques évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

### 3.5.4.3 Phase d'accumulation de lipides et production d'acide citrique simultanée

Aucune production d'acide citrique n'a été observée dans la gamme du ratio rN/rC étudiée et comprise entre 0,115 et 0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

### 3.5.4.4 Rendements de conversion du glucose en lipides et en citrate

Le rendement de conversion du glucose en lipides ( $R_{S/Lip}$ ) a été calculé à partir des vitesses de consommation de glucose ( $r_{Glucose}$ ) et des vitesses d'accumulation de lipides ( $r_{Lipides}$ ). L'évolution du rendement est montrée dans la figure suivante :

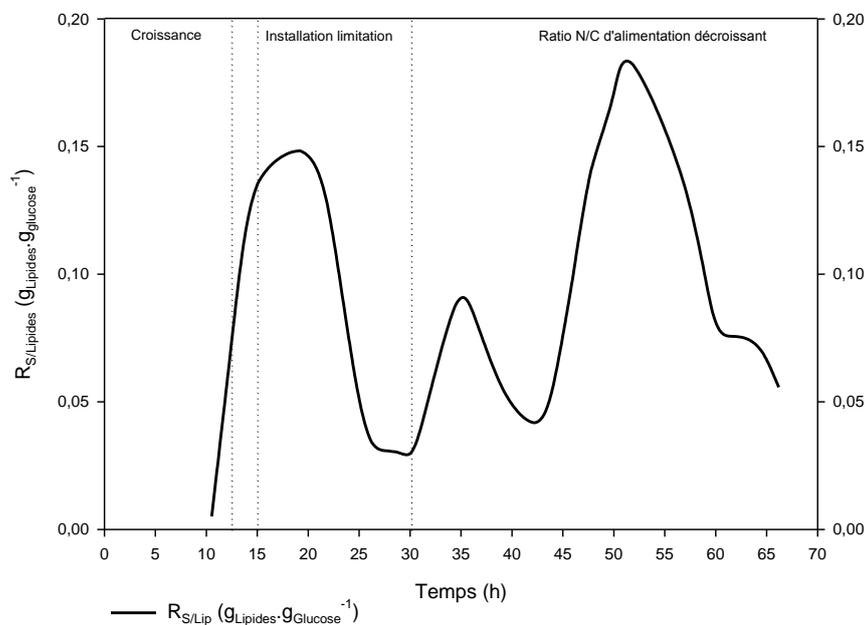


Figure 67. Evolution des rendements de conversion du substrat en lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Comme il peut être observé, le rendement de lipides diffère fortement de ceux des souches W29 et JMY12046. Le rendement maximal de conversion de glucose en lipides accumulés a été égal à  $0,18 g_{Lipides} \cdot g_{glucose}^{-1}$  à 52 h et descendu à  $0,06 g_{Lipides} \cdot g_{glucose}^{-1}$  à 66 h.

Aucune production d'acide citrique n'a été détectée par HPLC pendant l'étape de production comme observé chez les souches W29 et JMY2046.

### 3.5.4.5 Acides organiques autres que le citrate

La figure suivante montre les vitesses spécifiques de production de pyruvate et succinate au cours de la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* JMY1552.

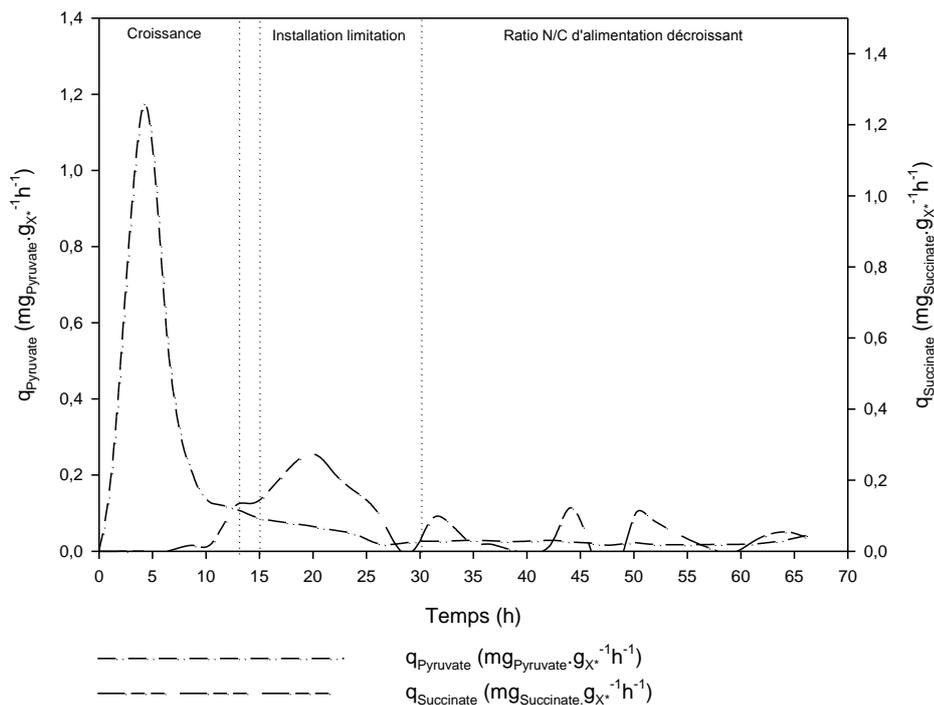


Figure 68. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Les autres acides organiques tels que le malate, l'alpha-cetoglutarate, le fumarate, l'acétate, l'oxaloacétate ont été recherchés mais aucun n'a été détecté par HPLC.

### 3.5.5 Analyse biochimique enzymatique

#### 3.5.5.1 Evolution des activités spécifiques enzymatiques

Les activités spécifiques enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) ont été déterminées pour la souche JMY1552.

Deux dosages enzymatiques ont été réalisés pendant la phase de croissance. Dans cette période l'activité de l'ACL a augmenté d'un facteur 1,11, tant que les enzymes MD et l'EM ont diminué leur activité de 23 % et 25 %, respectivement. L'ACC a montré une activité spécifique constante avec une valeur moyenne de 24,6 mU.mg protéine<sup>-1</sup>.

La mise en place de la limitation nutritionnelle a été instaurée à 15 h et pendant cette étape nous avons observé que l'activité de l'ACC a augmenté de 32 % ainsi que les activités de l'EM et l'ACL d'un facteur 2,8 et 1,9, respectivement. De son côté la quantité de MD a diminué de 33 %.

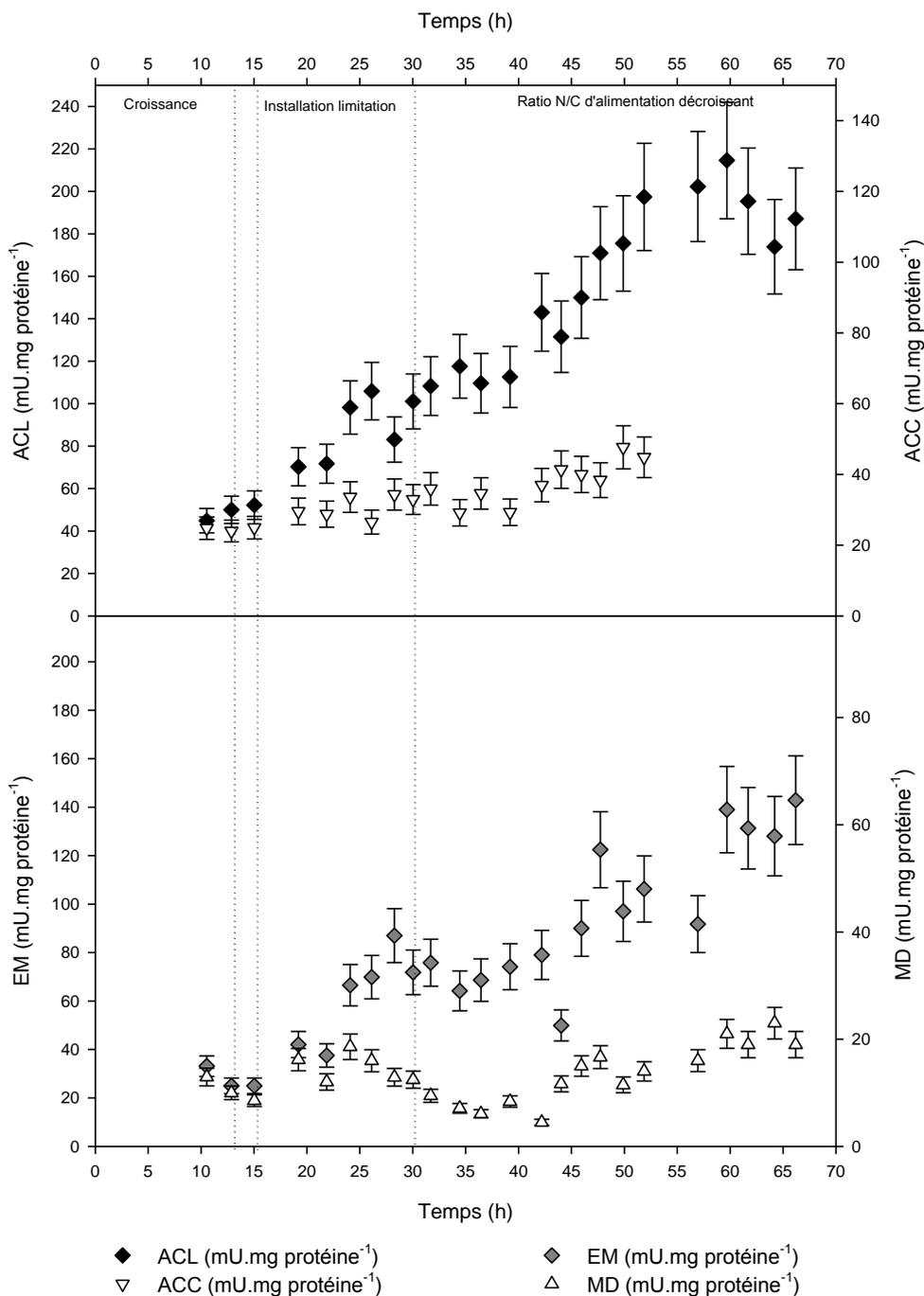


Figure 69. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Au cours de la période comprise entre 30 et 66 h, la quantité en EM a augmenté d'un facteur 2 ainsi que celle en ACL étant maximale à 60 h. D'autre part, l'ACC n'a pu être mesurée que jusqu'à 52 h à cause d'une perte d'échantillons mais montrant une activité maximale à la fin de cette période ; la MD a oscillé durant cette période étant maximale à 64 h.

### 3.5.5.2 Vitesses spécifiques de production d'enzymes

Nous avons calculé les vitesses spécifiques de production d'enzyme pour la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica* JMY1552.

La figure suivante montre l'évolution de la vitesse spécifique de production de l'ATP citrate lyase ainsi que les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides ( $q_{\text{Lipides accumulés}}$ ) et de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ).

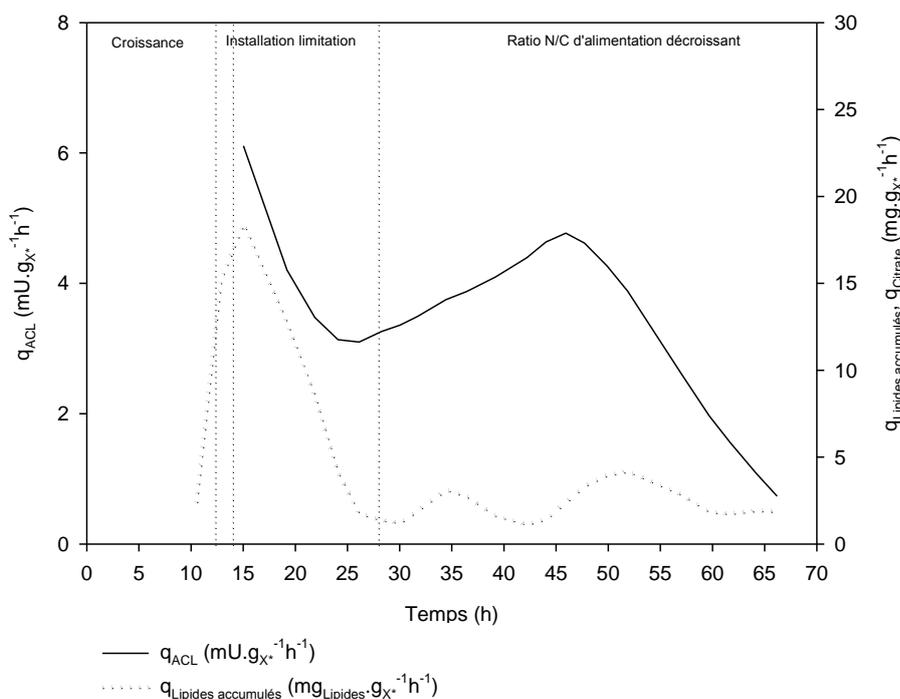


Figure 70. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

On remarque une diminution de  $q_{\text{ACL}}$  lors de l'étape de l'installation de la limitation nutritionnelle suivant le profil de  $q_{\text{Lipides accumulés}}$ . La vitesse spécifique maximale est atteinte dans cette période à  $q_{\text{Lipides accumulés}}$  maximale ( $18,4 \text{ mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Un deuxième profil croissant est observé durant l'étape du ratio N/C décroissant pendant 20 h, au-delà de cette période la  $q_{\text{ACL}}$  chute jusqu'à la fin de la culture.

Concernant la vitesse spécifique de production de l'acétyl-CoA, nous observons que la  $q_{\text{ACC}}$  suit la dynamique d'accumulation de lipides pendant l'étape d'installation de la limitation nutritionnelle. La  $q_{\text{ACC}}$  semble se stabiliser pendant l'étape du ratio N/C décroissant à  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pendant 20 h, au-delà de cette période la  $q_{\text{ACC}}$  diminue.

La figure suivante montre l'évolution de l'activité spécifique de l'acétyl-CoA carboxylase pendant la culture.

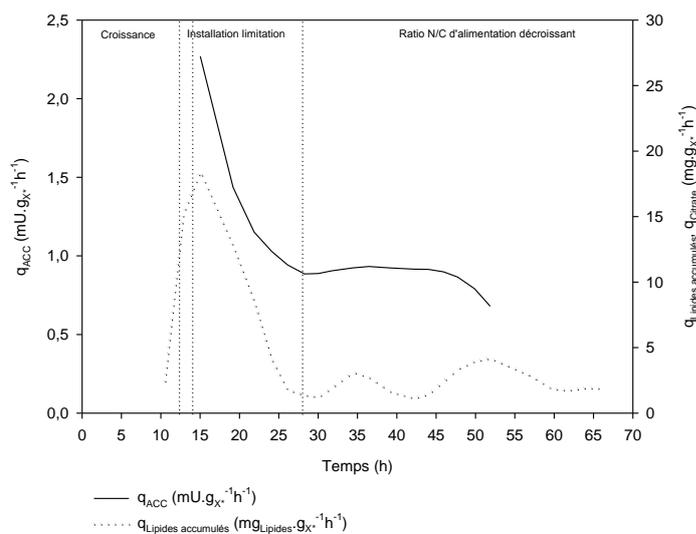


Figure 71. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

On remarque un comportement similaire de la vitesse spécifique de production de l'enzyme malique ( $q_{EM}$ ) par rapport à celle de la  $q_{ACC}$ . Un premier profil décroissant est observé pendant l'étape de l'installation de la limitation nutritionnelle et semble se stabiliser jusqu'à la fin de la culture (figure 71).

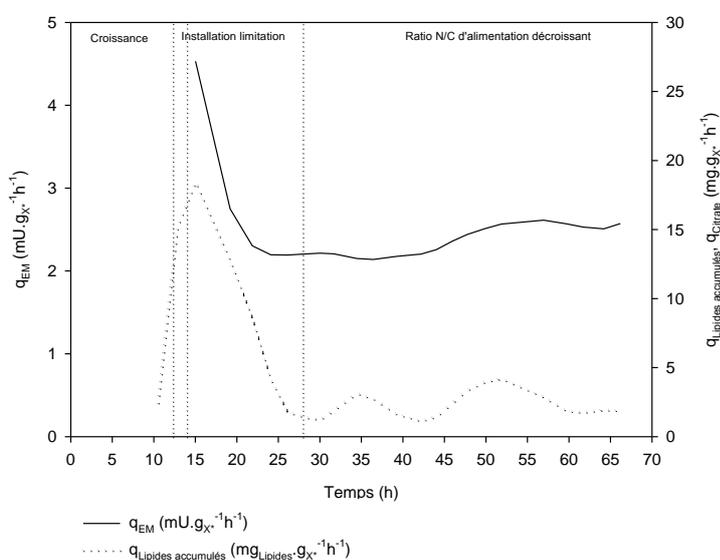


Figure 72. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

Finalement la vitesse spécifique de production de la malate déshydrogénase ( $q_{MD}$ ) a présenté tout au long de la culture des valeurs très faibles. Un premier profil décroissant est observé pendant l'étape de l'installation de la limitation nutritionnelle suivant la dynamique de la vitesse spécifique de production de lipides. Lorsque l'étape où le ratio N/C d'alimentation décroissait, on remarque une accélération de la  $q_{MD}$  pendant 10 h.

La figure suivante montre l'évolution de l'activité spécifique de la malate déshydrogénase pendant la culture.

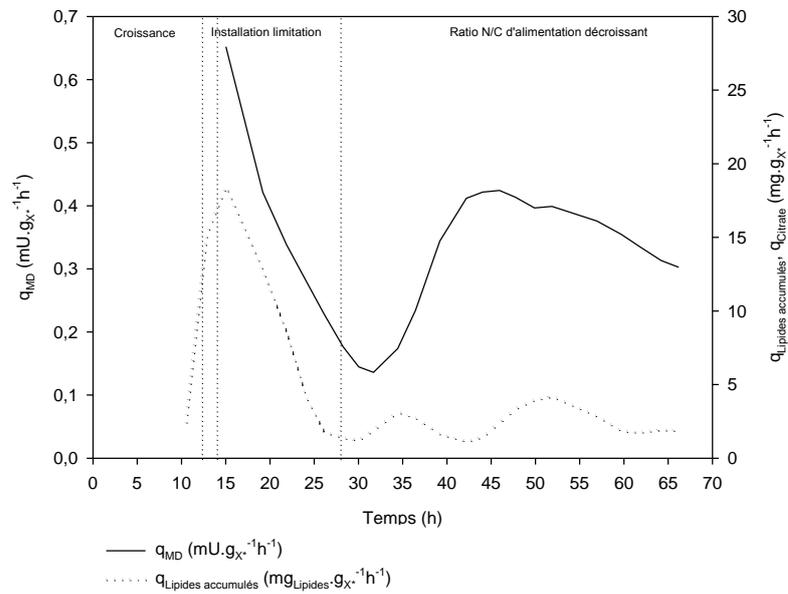


Figure 73. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* JMY1552

---

### 3.5.6 Discussion

Suivant la stratégie établie au début de ces travaux concernant l'étude des voies métaboliques impliquées dans la bascule métabolique chez *Y. lipolytica*, nous avons étudié l'impact de la surexpression des gènes codant pour les unités ACL1 et ACL2 de l'enzyme ATP citrate lyase sous contrôle du promoteur pPOX2 inductible par les lipides.

Le choix du ratio N/C d'alimentation initial égal à 0,061 molN.Cmol<sup>-1</sup> nous a permis d'étudier une gamme plus vaste du degré de limitation nutritionnelle constatant qu'un ratio N/C d'alimentation initial de 0,061 molN.Cmol<sup>-1</sup> induit seulement l'accumulation de lipides sans la production concomitante d'acide citrique. Nous avons identifié un ratio rN/rC de 0,115 molN.Cmol<sup>-1</sup> pour l'accumulation de lipides, valeur directement lié aux phénomènes d'accumulation des substrats observés.

Nous avons détecté une accumulation de lipides lors de la phase de croissance chez cette souche. La surexpression des ACL1 et ACL2 étant sous le contrôle du promoteur pPOX2, il semblerait donc que le promoteur ait été induit avant même l'induction de l'accumulation des lipides. L'effecteur réel du promoteur POX2 reste à déterminer.

Nous observons que l'induction du promoteur pPOX2 se traduit par une vitesse d'accumulation plus élevée impactant visiblement le taux de croissance en comparaison à la souche sauvage mais sans la production concomitante d'acide citrique.

La dynamique des paramètres cinétiques dérivés de la surexpression de l'ATP citrate lyase montre que même avec un degré de limitation nutritionnelle moins important, le taux de croissance est inférieur à ceux des souches W29 et JMY2046 tout au long de la culture.

Concernant le citrate, aucune production de cet acide n'a été détecté chez la souche JMY1552 contrairement aux souches W29 et JMY2046 dans un même intervalle du ratio rN/rC. La gamme du ratio rN/rC étudié avec la souche JMY1552 a été de 0,115 à 0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

D'autre part, nous avons observé une dynamique de production de pyruvate et de succinate différente de celles des souches W29 et JMY2046. Pour la souche JMY1552, la production totale de pyruvate à la fin de la culture a été supérieure d'un facteur 2,2 par rapport à la souche W29 et d'un facteur 1,8 par rapport à la souche JMY2046. La même tendance a été observée pour le succinate à la fin de la culture, sa production a été supérieure d'un facteur 10 par rapport à la souche JMY2046 tandis que pour la souche W29 nous n'avions pas détecté de succinate.

Paramètre	W29	JMY1552
$R_{X/S}$ max ( $g_X \cdot g_{\text{glucose}}^{-1}$ )	0,51	0,39
N/C ratio d'alimentation ( $molN \cdot Cmol^{-1}$ )	0,0342-0,016	0,061-0,021
Dynamique de la limitation nutritionnelle ( $mmolN \cdot Cmol^{-1}h^{-1}$ )	0, 17 et 0,34	0,21, 0,56 et 2,4
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés max ( $mg_{\text{Lipides}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	9,3	18,43
% Lipides accumulés max ( $m_{\text{Lipides}} \cdot m_X^{-1}$ )	22,7	8,9
$q_{\text{Polys}}$ accumulés max ( $mg_{\text{Polys}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	16,6	9,9
% Polysaccharides accumulés max ( $m_{\text{Polys}} \cdot m_X^{-1}$ )	9,5	4,9
$q_{\text{Pyruvate}}$ max ( $mg_{\text{Pyruvate}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	0,33	1,2
$q_{\text{Succinate}}$ max ( $mg_{\text{Succinate}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	1,29	0,27
rN/rC bascule citrate ( $molN \cdot Cmol^{-1}$ )	0,022	N.D.
$q_{\text{Lipides}}$ accumulés bascule citrate ( $mg_{\text{Lipides}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	4,8	N.D.
$\mu$ catalytique bascule citrate ( $h^{-1}$ )	0,00098	N.D.
$q_{\text{Glucose}}$ bascule citrate ( $mg_{\text{glucose}} \cdot g_X^{-1} h^{-1}$ )	39,9	N.D.

N.D. : Non détecté

Tableau 38. Paramètres cinétiques obtenus lors des cultures en fed-batch avec les souches W29 et JMY1552

L'activité enzymatique de l'acétyl-CoA carboxylase chez la souche JMY1552 a été supérieure d'environ un facteur 2 par rapport aux souches W29 et JMY2046. Malheureusement son activité n'a pas pu être évaluée jusqu'à la fin de la culture comme pour les autres souches.

De la même façon que pour l'enzyme acétyl-CoA carboxylase, l'activité de l'enzyme malique a suivi en parallèle la dynamique de l'enzyme ATP citrate lyase. En comparant cette activité chez les autres souches, nous observons que l'activité maximale a été exhibée chez la souche sauvage, mais dans la période de production simultanée de lipides et d'acide citrique.

Dans le tableau suivant nous comparons les activités spécifiques enzymatiques de la souche sauvage et la souche JMY1552 :

---

Enzyme	W29 fed-batch (mU.mg protéine <sup>-1</sup> )				JMY1552 (mU.mg protéine <sup>-1</sup> )			
	Croissance	Limitation	Lipides	Lip/AC	Croissance	Limitation	Lipides	Lip/AC
ACL	N.D.	17-37	33-89	89-18	44,87-52,4	52-101	101-187	N.D.
ACC	N.D.	3-6,6	4 <i>vm</i>	6-4	24 <i>vm</i>	24-33	33-44	N.D.
EM	N.D.	15,5 <i>vm</i>	16-26	26-0	33-25	25-71	71-86-142	N.D.
MD	N.D.	3-5	5-7	7-1,9	13-8	8-12	12-19	N.D.

ACL : ATP citrate lyase, ACC : acétyl-CoA carboxylase, EM : enzyme malique, MD : malate déshydrogénase, Lip/AC : production de lipides et acide citrique, N.D. : non déterminé, *vm* : valeur moyenne

On peut observer que les activités spécifiques des toutes les enzymes sont plus importantes chez la souche mutante par rapport à la souche sauvage, particulièrement pour l'acétyl-CoA carboxylase et l'enzyme malique. Cela suggérerait qu'il y ait une corégulation de la synthèse de ces enzymes avec celle de l'ATP citrate lyase, dont l'effecteur commun reste à déterminer. Ce réarrangement complexe des enzymes autour de la synthèse de lipides pourrait être la clé de l'accumulation lipidique chez *Yarrowia lipolytica* traduit par l'action proche de plusieurs enzymes et non par l'action d'une seule enzyme comme il a été supposé par certains auteurs.

---

### 3.6 Culture de *Yarrowia lipolytica* $\Delta$ gut2 en mode fed-batch

La troisième souche testée est une souche délétée pour son gène GUT2, codant pour une glycérol-3-phosphate déshydrogénase (figure 61). Il a été montré précédemment que cette délétion avait pour effet d'augmenter la disponibilité du glycérol-3-phosphate dans la cellule (Cescut, 2009). Le glycérol-3-phosphate est nécessaire à la synthèse des triacylglycérols, étant le précurseur de l'acide lysophosphatidique (LPA).

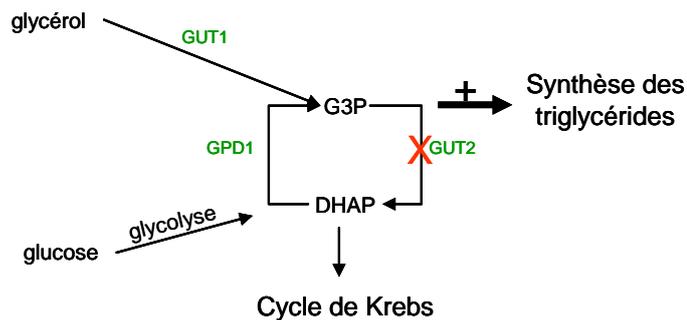


Figure 74. Situation de la délétion de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase chez *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2 au niveau du nœud métabolique glycérol-3-phosphate. D'après Cescut (2009).

L'étude à partir de cette souche devait nous permettre d'évaluer l'impact d'une plus grande disponibilité du glycérol-3-phosphate pour la synthèse des TAG, sur la bascule métabolique étudiée.

Dans ce chapitre seront montrés les résultats obtenus en culture fed-batch et une discussion et comparaison avec les résultats obtenus avec la souche sauvage sera présentée.

#### 3.6.1 Stratégie de conduite du réacteur en fed-batch

Nous avons suivi la même stratégie utilisée précédemment pour la souche JMY 1552. Les alimentations en glucose et en azote étant contrôlées pour les deux réacteurs en parallèle, il n'était pas possible de découpler l'alimentation pour chaque souche, donc nous avons décidé de déclencher l'étape d'épuisement d'azote au moment où les conditions été atteintes chez la souche JMY1552.

A cause du retard de la croissance chez la souche  $\Delta$ gut2 par rapport à la souche JMY1552, les conditions idéales pour déclencher l'étape d'épuisement d'azote dans le milieu de culture ont été atteintes à 13h pour la souche JMY1552, tandis que pour la souche  $\Delta$ gut2 les conditions idéales n'étaient atteintes qu'à 15 h.

Cette manœuvre a impliqué de n'avoir pas les mêmes conditions nutritionnelles dans les deux réacteurs même si les apports dans l'alimentation étaient égaux. Cependant, toutes

les autres considérations ont été prises en compte, en termes de régulation de pH et des apports en sels du milieu CFMA (hors  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), en vitamines et en oligo-éléments.

Les profils d'alimentation de glucose en d'azote son montrés dans la figure suivante :

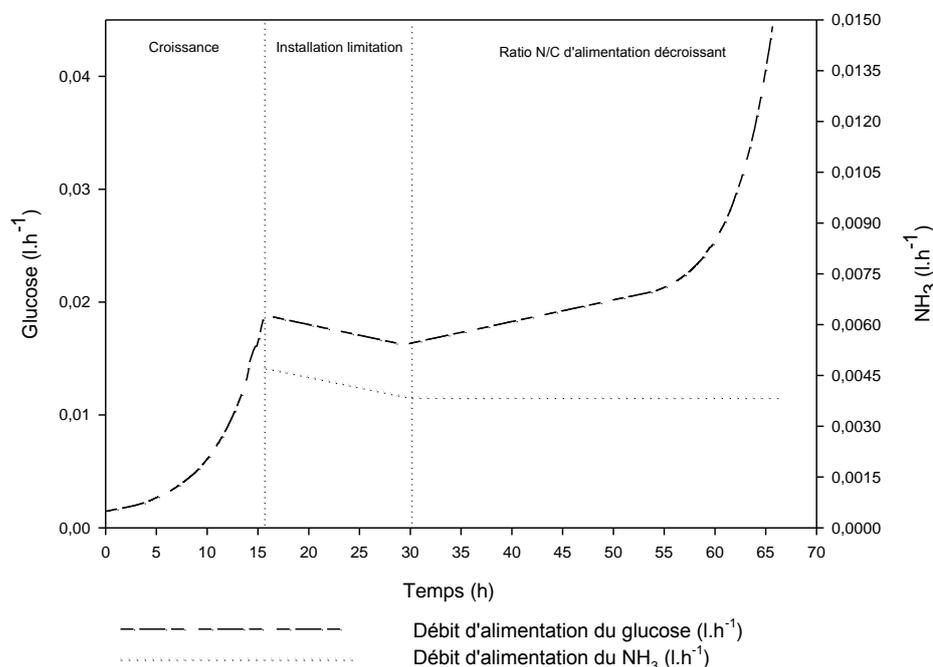


Figure 75. Profils de débits d'alimentation du glucose en du  $\text{NH}_3$  au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta\text{gut}2$

### 3.6.2 Profil de diminution du ratio N/C d'alimentation en réacteur fed-batch

Pour la souche  $\Delta\text{gut}2$ , nous avons étudié une gamme du ratio N/C d'alimentation comprise entre 0,061 et 0,021 molN.Cmol<sup>-1</sup> à l'identique identique que pour la souche JMY1552. Ce ratio N/C reflète le degré de limitation nutritionnelle imposé dans l'alimentation, néanmoins, à cause du retard de la croissance de la souche  $\Delta\text{gut}2$  et donc de l'accumulation de glucose dans le milieu de culture ainsi que d'une consommation d'azote inférieure à celle estimée, ce paramètre ne traduit pas les conditions réelles pendant l'étape de croissance et l'étape de limitation nutritionnelle.

Comme indiqué précédemment, les alimentations en glucose et en azote étés réalisées simultanément en imposant des débits connus aux pompes, malheureusement la défaillance technique trouvée dans la pompe de glucose a aussi affecté le profil du ratio N/C d'alimentation chez la souche  $\Delta\text{gut}2$  L'évolution du profil du ratio N/C d'alimentation pour cette culture correspond au même profil montre pour la souche JMY1552 (Voir section 3.5.2).

### 3.6.3 Evolution des variables d'état au cours de la culture fed-batch

#### 3.6.3.1 Métabolites majeurs

La figure suivante montre l'évolution des profils des masses en métabolites majeurs tels que la biomasse totale, citrate, glucose résiduel et azote résiduel obtenus au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2.

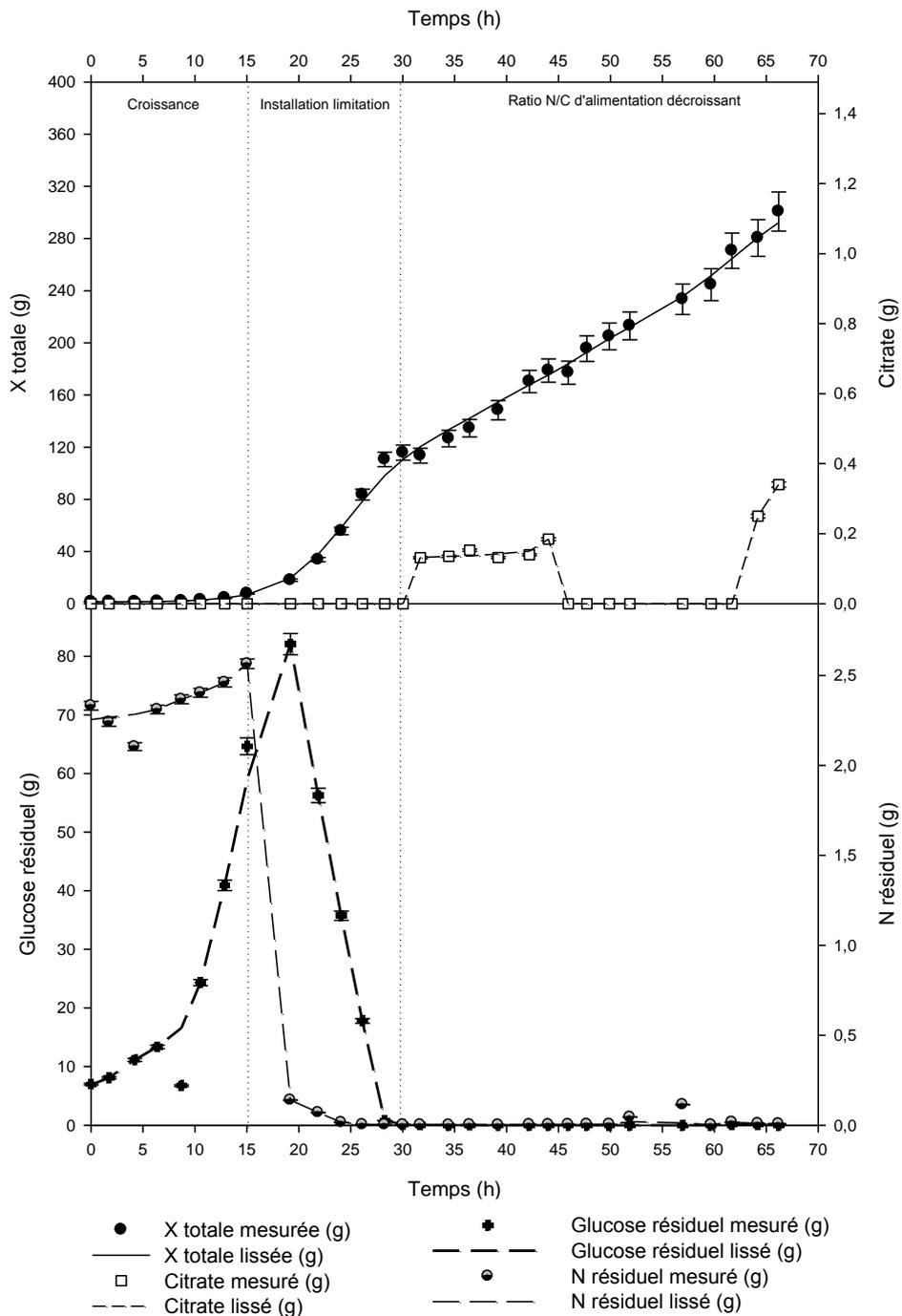


Figure 76. Evolution des profils de biomasse totale, glucose résiduel et azote résiduel au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

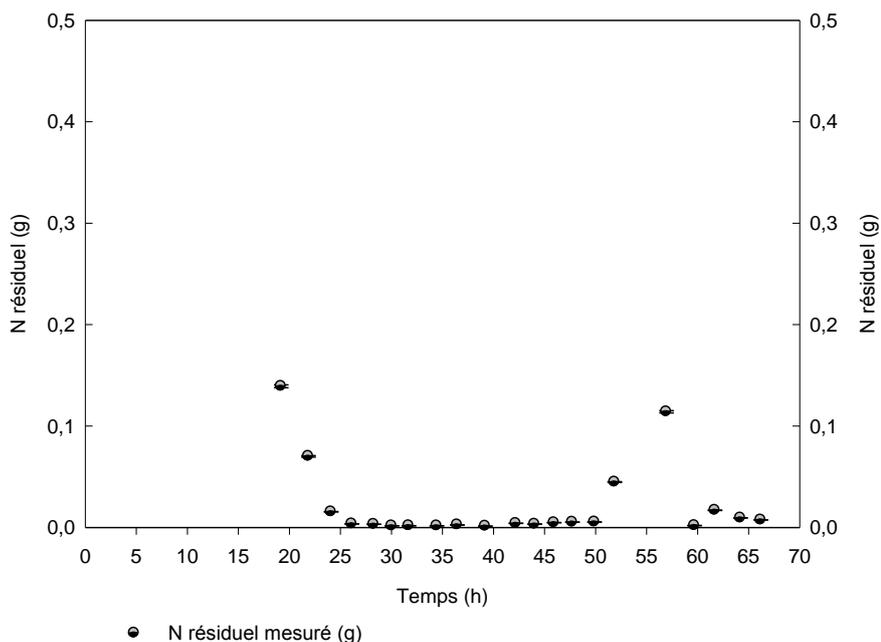


Figure 77. Zoom de l'évolution de l'azote résiduel au cours de la culture de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

Pendant l'étape de croissance, nous avons observé un taux de croissance assez faible (moyenne de  $0,07 \text{ h}^{-1}$ ) par rapport à la souche JMY1552, représentant une valeur inférieure de 64 %. Dans cette phase, la quantité de biomasse totale obtenue a été de 8 g ( $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Nous avons observé une accumulation de glucose et d'azote dû au retard de la croissance. Une quantité de 65 g ( $29 \text{ g.L}^{-1}$ ) de glucose a été détecté par HPLC tant que l'azote résiduel dosé a été compris entre 2,3 et 2,5 g ( $0,98\text{-}1,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) représentant une quantité supérieure d'un facteur 3,6 par rapport à la souche JMY1552.

Un métabolisme purement oxydatif a été confirmé par une production très faible d'acides organiques et par l'absence de lipides accumulés.

Ensuite, la phase de limitation nutritionnelle a été déclenchée en imposant un ratio N/C variable imposé par l'alimentation de  $0,061$  à  $0,058 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ , correspondant à une variation de ratio  $rN/rC$  de  $0,041$  à  $0,029 \text{ molN.Cmol}^{-1}$ .

Les profils de biomasse catalytique ( $X^*$ ), de polysaccharides accumulés et de lipides accumulés chez *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2 sont montrés dans la figure suivante :

:

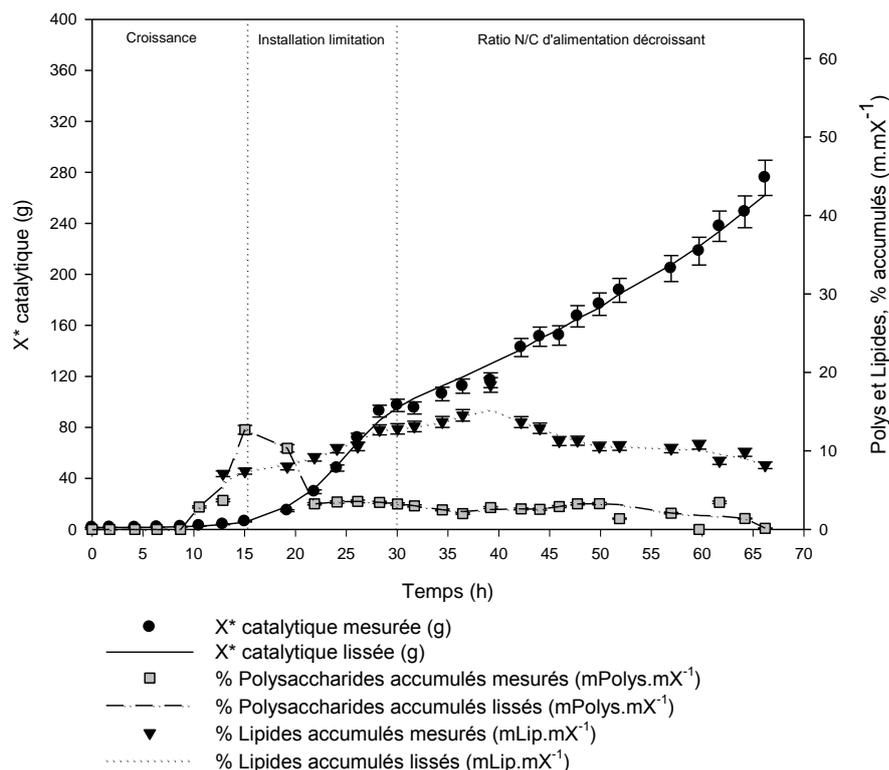


Figure 78. Evolution de la biomasse catalytique, des polysaccharides accumulés et des lipides accumulés au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* Δgut2

La phase de mise en place de la limitation nutritionnelle a été accompagnée par une série d'événements spécifiques :

- le taux de croissance a été maximal durant cette étape et égal à  $0,17 \text{ h}^{-1}$  (19 h) et maintenu pendant 5 h. Avec ce taux de croissance nous avons obtenu une quantité maximale de biomasse totale égale à  $115,8 \text{ g}$  ( $48 \text{ g.L}^{-1}$ ) correspondant à une biomasse catalytique de  $97 \text{ g}$  ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ )
- Une diminution du taux d'accumulation des polysaccharides de  $12,7$  à  $3,23 \%$  ( $\text{mPolys.mX}^{-1}$ )
- Un taux d'accumulation de lipides de  $13 \%$  ( $\text{mLipides.mX}^{-1}$ ) à 30 heures, valeur supérieure de  $44 \%$  par rapport à la souche JMY1552 pour la même

### 3.6.3.2 Métabolites mineurs

Nous avons détecté par HPLC une présence de pyruvate et de succinate pendant la culture avec la souche Δgut2. La figure suivante montre les profils de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture :

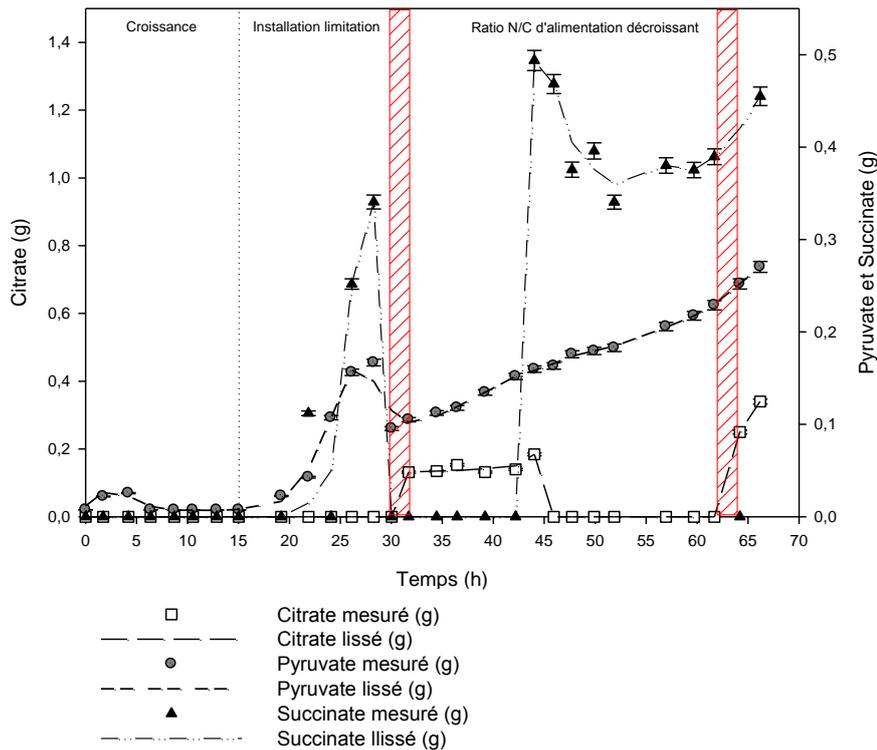


Figure 79. Evolution de la production des acides organiques au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* Δgut2

On remarque une production de pyruvate dès le début de la culture comme chez les autres souches étudiées, néanmoins sa production chez la souche Δgut2 est moins importante par rapport aux autres souches. Concernant le succinate, nous observons qu'il est produit pendant les phases d'accumulation de lipides et reconsommé pendant les phases d'excrétion de citrate. Une analyse cinétique de la production des acides organiques autres que le citrate sera donnée dans les sections suivantes.

Les autres acides organiques tels que le malate, l'alpha-cétoglutarate, le fumarate, l'acétate, l'oxaloacétate ont été recherchés mais aucun n'a été détecté par HPLC

### 3.6.4 Analyse cinétique

#### 3.6.4.1 Le ratio rN/rC

La figure suivante montre le profil rN/rC (molN.Cmol<sup>-1</sup>) au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica* Δgut2 :

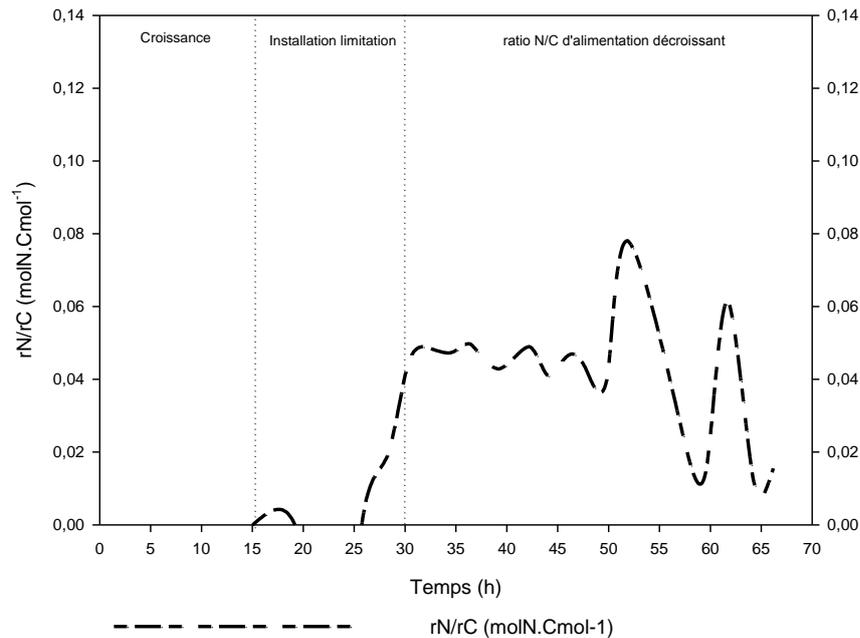


Figure 80. Evolution du rN/rC au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

Le profil du ratio rN/rC a présenté des perturbations à cause des phénomènes d'accumulation des sources carbonée et azotée. Pendant l'étape de la mise en place de la limitation nutritionnelle, nous avons détecté une accumulation d'azote jusqu'à 25 h. Ce profil présente aussi des perturbations entre 51 et 58 heures liés également à l'accumulation d'azote dans le milieu de culture. L'évolution de ce paramètre sera discutée de manière plus détaillé dans les sections suivantes.

### 3.6.4.2 Phase d'accumulation seule de lipides

Durant cette étape le ratio N/C a été diminué 0,058 à 0,015 molN.Cmol<sup>-1</sup> suivant deux dynamiques de limitation nutritionnelle et correspondant à un ratio rN/rC de 0,041 et 0,015 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

Le graphique suivant montre l'évolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch:

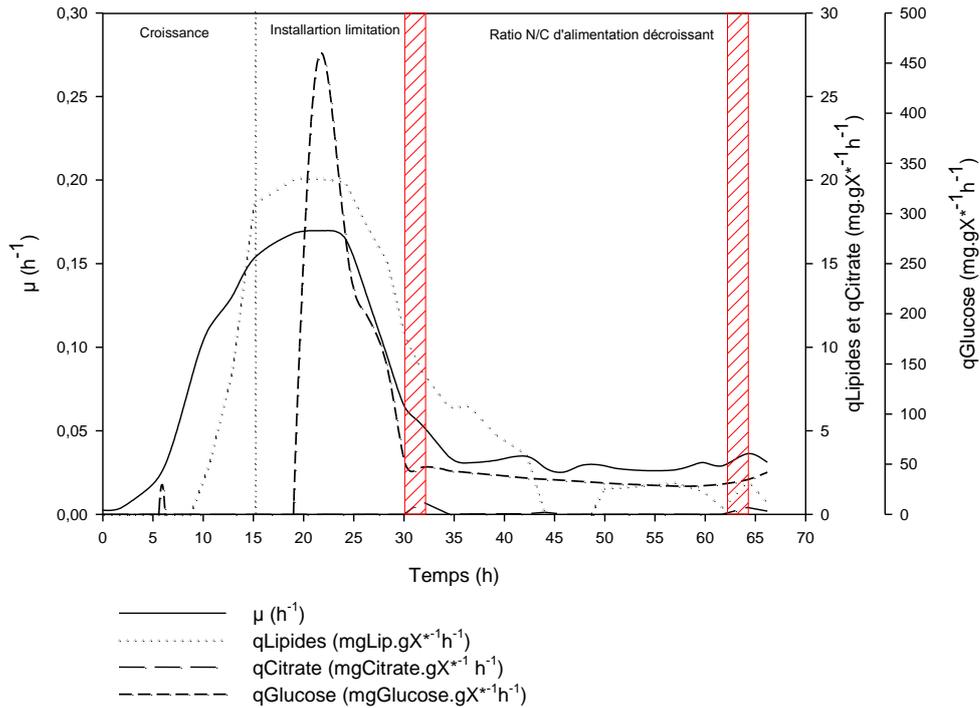


Figure 81. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta gut2$

Le taux de croissance a subi un ralentissement à partir de 25 h et à partir de 35 h il semble se stabiliser à  $0,03 h^{-1}$  permettant une production de biomasse totale de  $233,5 g$  ( $87,5 g.L^{-1}$ ) correspondant à une biomasse catalytique de  $204,6 g$  ( $77 g.L^{-1}$ ).

Tout le glucose apporté en alimentation a été qui se traduit par une vitesse spécifique de consommation de glucose, supérieure de 32 % par rapport à la souche JMY1552 ( $0,029 g_{glucose}.gX^{*-1} h^{-1}$ ).

L'accumulation de lipides a été maximale à 39 h égale à 18 % ( $m_{Lipides}.mX^{*-1}$ ) et elle a diminué à 10 % ( $m_{Lipides}.mX^{*-1}$ ) à 57 heures, correspondant aux vitesses spécifiques d'accumulation de lipides de 4,7 et  $1,9 g_{Lipides}.gX^{*-1}.h^{-1}$ , respectivement.

L'accumulation de lipides intracellulaires a aussi été évaluée par fluorescence en utilisant Bodipy 493/503. Nous avons observé un changement de morphologie pendant la phase de retard de croissance, la figure D montre une morphologie très allongée par rapport à la morphologie initiale (figure A), ce changement peut être lié aux conditions de limitation nutritionnelle non contrôlées du fait de l'accumulation de glucose dans le milieu de culture. Les figures suivantes montrent l'évolution de l'accumulation lipidique au cours de la culture en fed-batch :

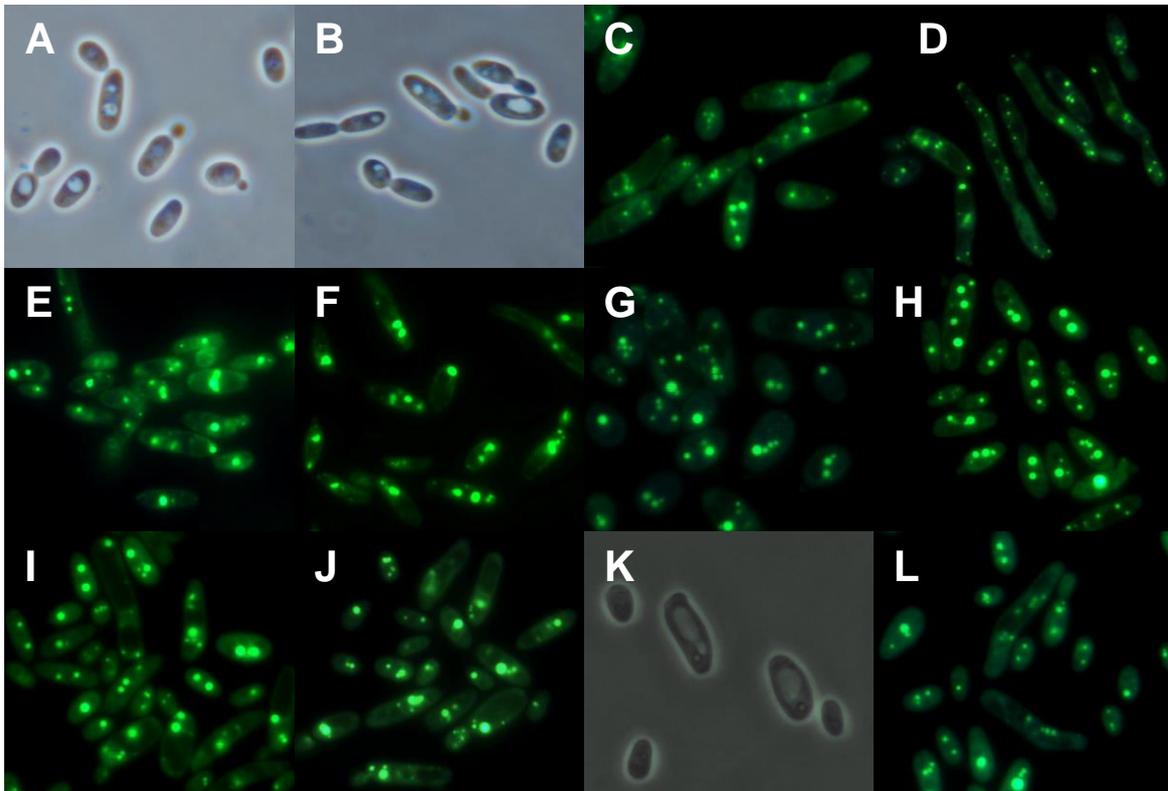
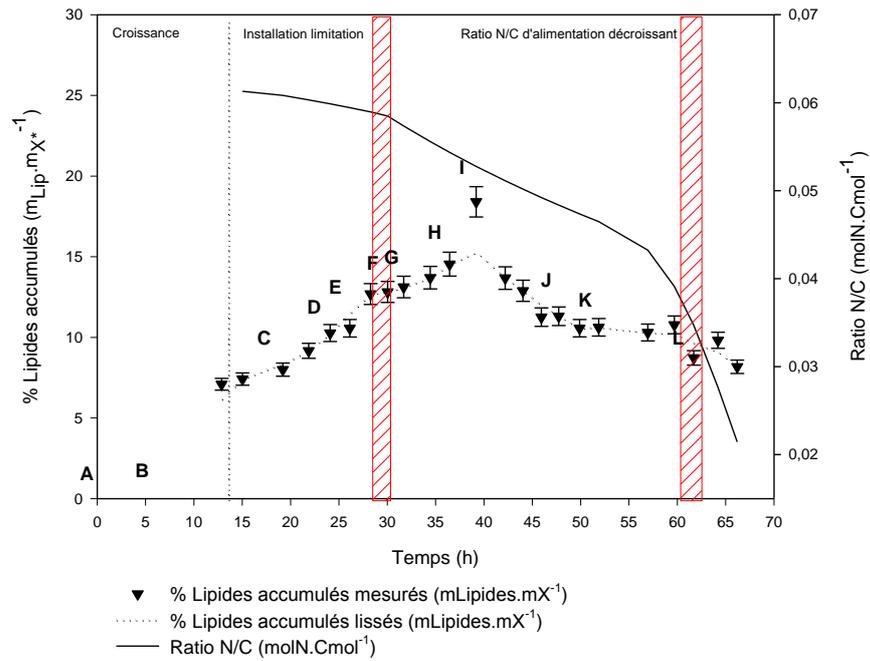


Figure 82. Evolution de l'accumulation lipidique évaluée par fluorescence avec Bodipy 493/503 au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

### 3.6.4.3 Phase d'accumulation de lipides et production d'acide citrique simultanée

Nous avons détecté une première bascule vers la production d'acide citrique dans la période comprise entre 30 et 32 heures (0,053 g.L<sup>-1</sup>), correspondant à une gamme de rN/rC de 0,041-0,048 molN.Cmol<sup>-1</sup>. Cette première production d'acide citrique est extrêmement

faible (limite de détection de l'HPLC) et a été maintenue pendant 12 heures avec une quantité moyenne de 0,15 g (0,058 g.L<sup>-1</sup>) correspondant à une vitesse de production d'acide citrique moyenne de 0,16 mg<sub>Citrate</sub>.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Aucune présence d'acide citrique n'a été pas détectée entre 46 et 61 heures traduisant un reconsumation de l'acide.

Le taux de croissance a été maintenu constant pendant la deuxième étape de production avec une valeur moyenne de 0,03 h<sup>-1</sup> qui a permis d'obtenir une biomasse totale maximale de 300 g (105 g.L<sup>-1</sup>) correspondant à une biomasse catalytique de 276 g (96 g.L<sup>-1</sup>), quantité inférieure de 16,5 % par rapport à la souche JMY1552.

Nous avons détecté une quantité de glucose résiduel de 0,06 g (0,022 g.L<sup>-1</sup>) entre 62-64 heures correspondant à une vitesse spécifique de consommation de glucose moyenne de 0,032 g<sub>glucose</sub>.gX<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Le taux d'accumulation de lipides a diminué de 10,3 à 8,2 % (m<sub>Lipides</sub>.mX<sup>-1</sup>) à 66 heures, correspondant aux vitesses spécifiques d'accumulation de lipides de 1,9 et 0,7 g<sub>Lipides</sub>.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivement.

La figure suivante montre les vitesses spécifiques de production de biomasse catalytique, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique en fonction du ratio N/C au cours de la culture :

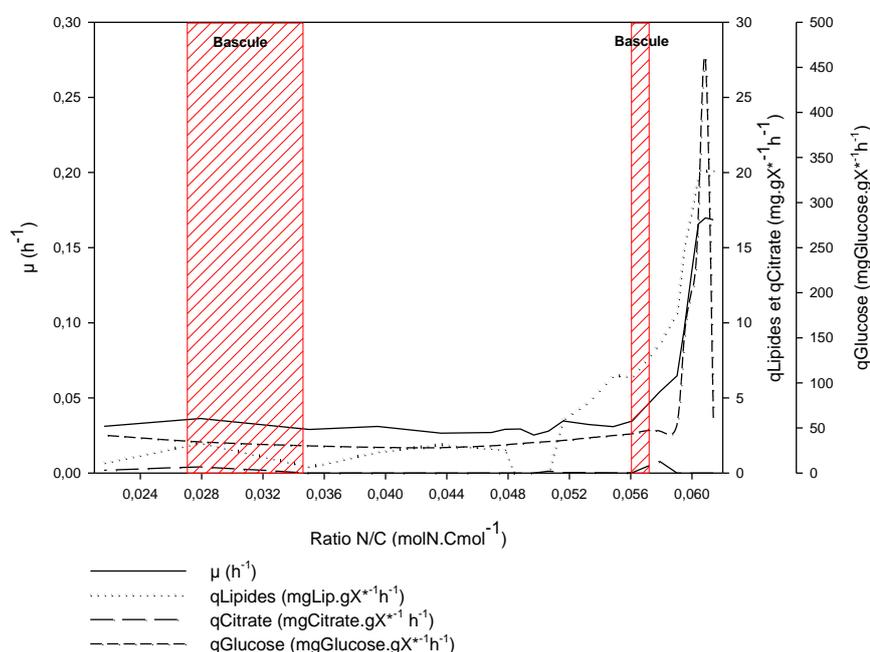


Figure 83. Evolution des vitesses spécifiques de production de biomasse, de consommation de glucose, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au en fonction du ratio N/C avec *Y. lipolytica* Δgut2

### 3.6.4.4 Rendements de conversion du glucose en lipides et en citrate

Nous avons calculés les rendements de conversion du glucose en lipides et en citrate pour cette culture, la figure suivante montre les évolutions au cours de la culture :

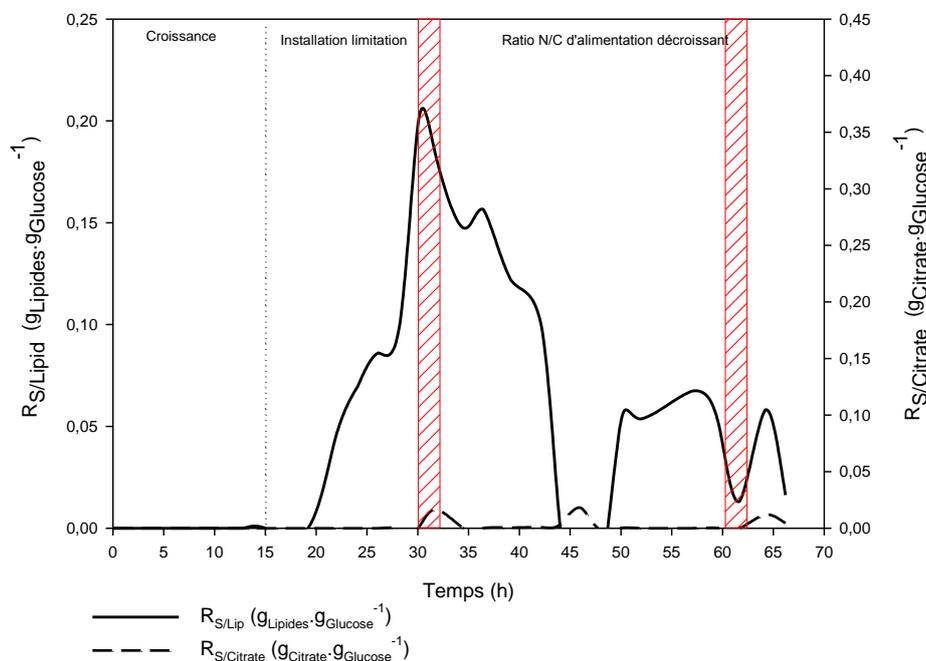


Figure 84. Evolution des rendements de conversion de substrat en lipides et en citrate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

Nous avons observé un rendement de conversion du glucose en lipides maximale de  $0,21 \text{ g}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$  dans la même période où nous avons détecté une très faible production d'acide citrique dans le milieu de culture.

### 3.6.4.5 Acides organiques autres que le citrate

Le graphe suivant montre les vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture avec *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2 . A partir de 19 h, la production de pyruvate a augmenté rapidement de  $0,11$  à  $0,38 \text{ mg}_{\text{Pyruvate}} \cdot \text{g}_{\text{X}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Cette période d'accélération coïncide avec la consommation de glucose résiduel et d'azote résiduel qui avaient été accumulés précédemment.

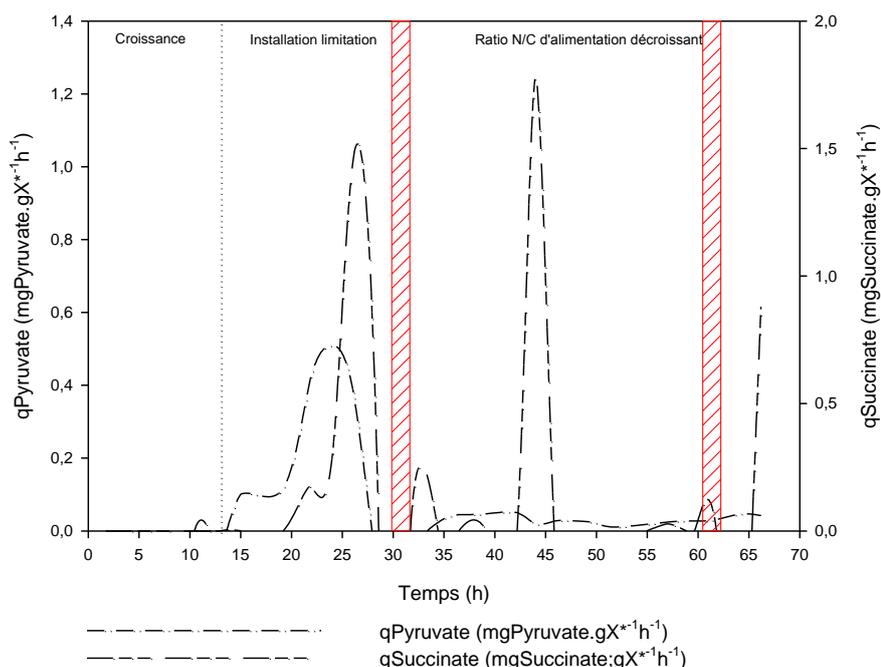


Figure 85. Evolution des vitesses spécifiques de production de pyruvate et de succinate au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

Les autres acides organiques tels que le malate, l'alpha-cétoglutarate, le fumarate, l'acétate, l'oxaloacétate ont été recherchés mais aucun n'a été détecté par HPLC.

### 3.6.5 Analyse biochimique enzymatique

#### 3.6.5.1 Evolution des activités spécifiques enzymatiques

Les activités spécifiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) ont été déterminées pour la souche  $\Delta$ gut2.

On remarque une faible augmentation des activités spécifiques de toutes les enzymes étudiées pendant la phase de mise en place de la limitation nutritionnelle et la phase d'accumulation de lipides. Néanmoins, les activités enzymatiques mesurées montrent un grand écart par rapport aux celles mesurées chez les autres souches mutantes de *Yarrowia lipolytica*.

Ainsi, nous observons une augmentation des activités spécifiques entre l'étape initiale de mise en place de la limitation nutritionnelle et la fin de la culture. L'ACL a augmenté d'un facteur 3; l'ACC a augmenté d'un facteur 1,9; tant que l'EM et la MD ont augmenté leur activité d'un facteur 2,73 et 3,26 respectivement.

Nous n'avons observé aucun impact de la production d'acide citrique sur les activités spécifiques des enzymes étudiées dû peut-être à la très faible quantité produite de cet acide organique.

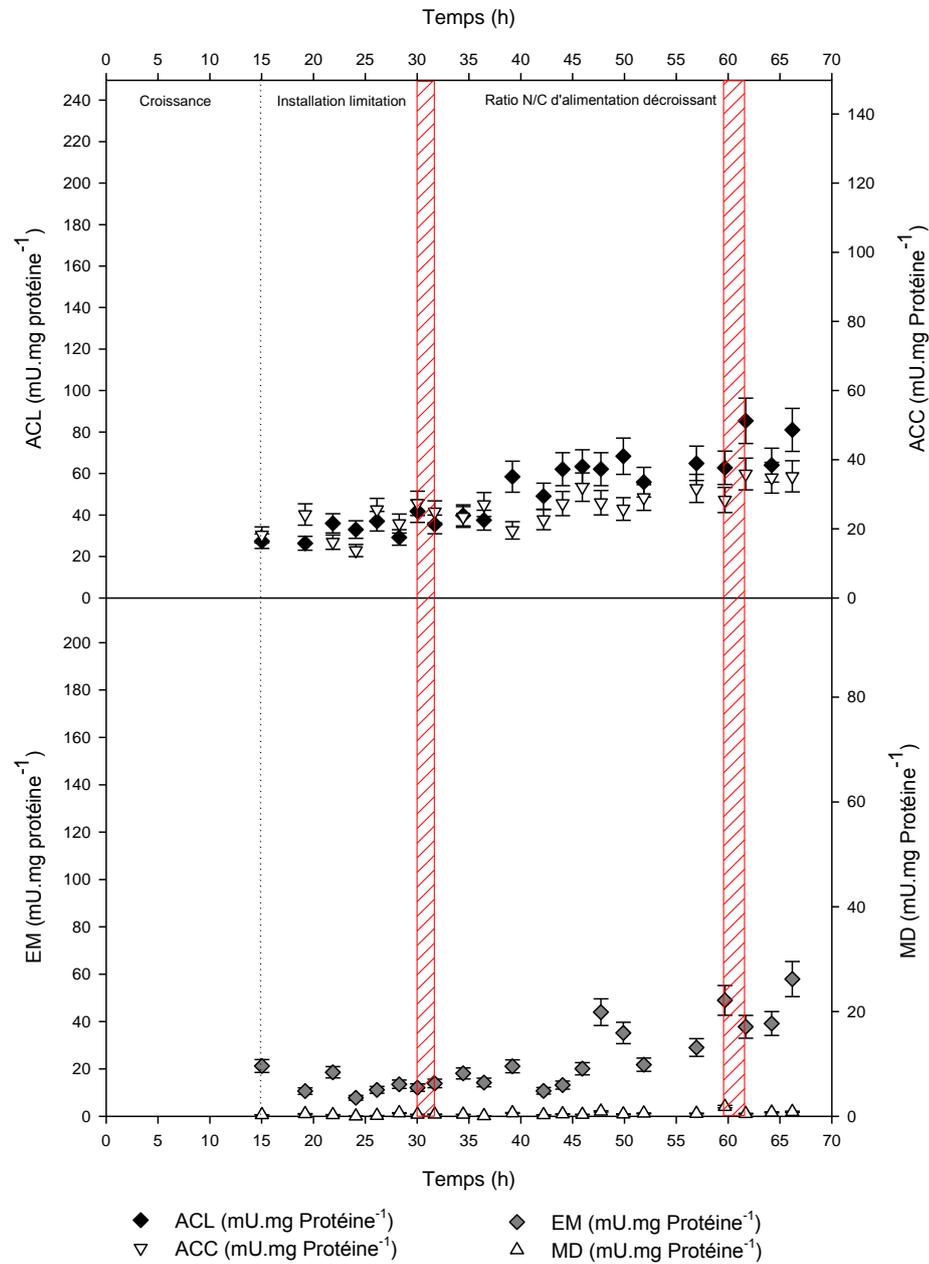


Figure 86. Evolution des activités enzymatiques de l'ATP citrate lyase (ACL), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la malate déshydrogénase (MD) au cours de la culture fed-batch de *Y. lipolytica*  $\Delta$ gut2

### 3.6.5.2 Vitesses spécifiques de production d'enzymes

Nous avons calculé les vitesses spécifiques de production d'enzyme pour la culture fed-batch de *Yarrowia lipolytica*  $\Delta$ gut2.

La figure suivante montre l'évolution de la vitesse spécifique de production d'ATP citrate lyase ainsi que les vitesses spécifiques d'accumulation de lipides ( $q_{\text{Lipides accumulés}}$ ) et de production d'acide citrique ( $q_{\text{Citrate}}$ ).

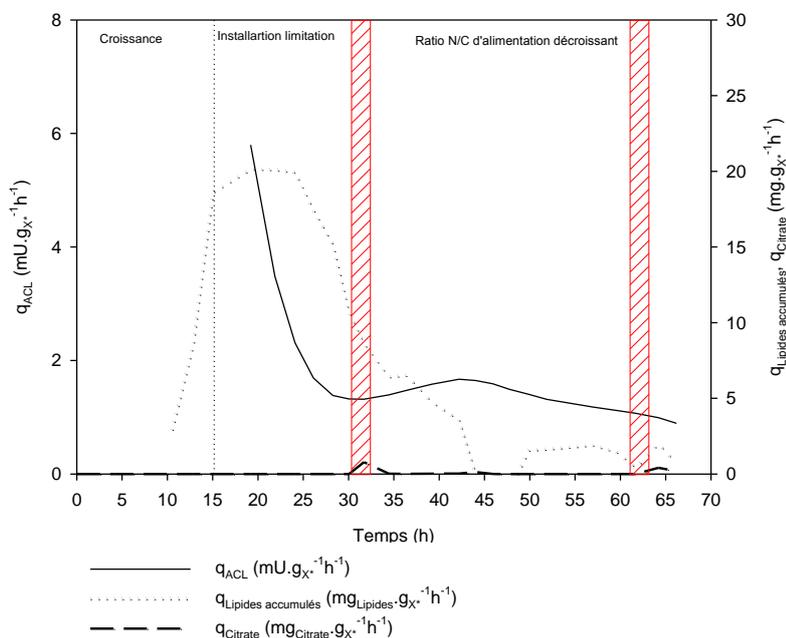


Figure 87. Evolution des vitesses spécifiques de production d'ATP citrate lyase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* Δgut2

Dans la figure suivante nous pouvons observer l'évolution de la vitesse spécifique de production de l'acétyl-CoA carboxylase au cours de la culture.

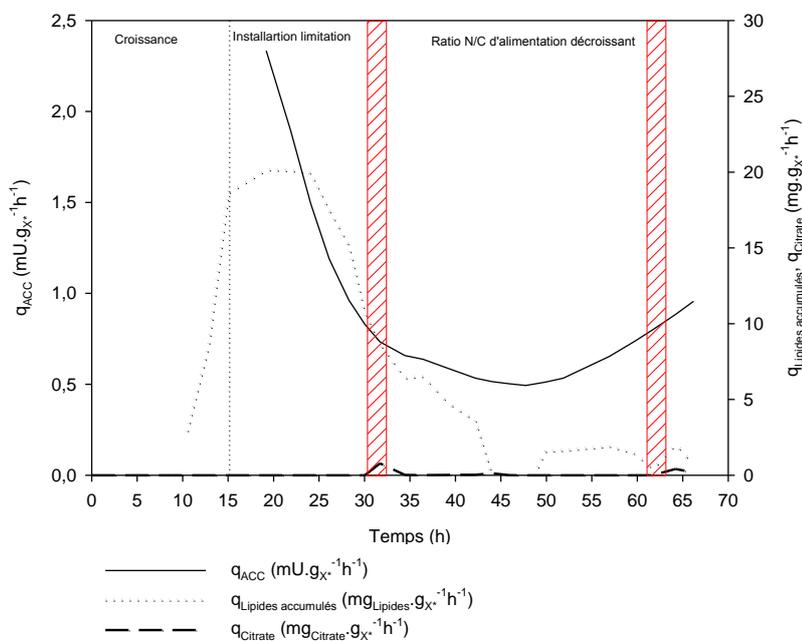


Figure 88. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'acétyl-CoA carboxylase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica* Δgut2

Nous observons que la  $q_{ACC}$  chute brusquement lors de l'étape d'installation de la limitation nutritionnelle selon la dynamique de la vitesse d'accumulation de lipides. Dans les dernières 15 heures de la culture, on repère une légère reprise de la synthèse d'ACC.

On remarque dans la figure suivante que la vitesse spécifique de production de l'enzyme malique suit la même tendance que celle de  $q_{ACC}$ . Dans un premier temps, la  $q_{EM}$  diminue en parallèle à  $q_{Lipides\ accumulés}$  pendant 20 h. Un deuxième profil montre une induction de l'enzyme jusqu'à la fin de la culture se dissociant du profil de  $q_{Lipides\ accumulés}$ .

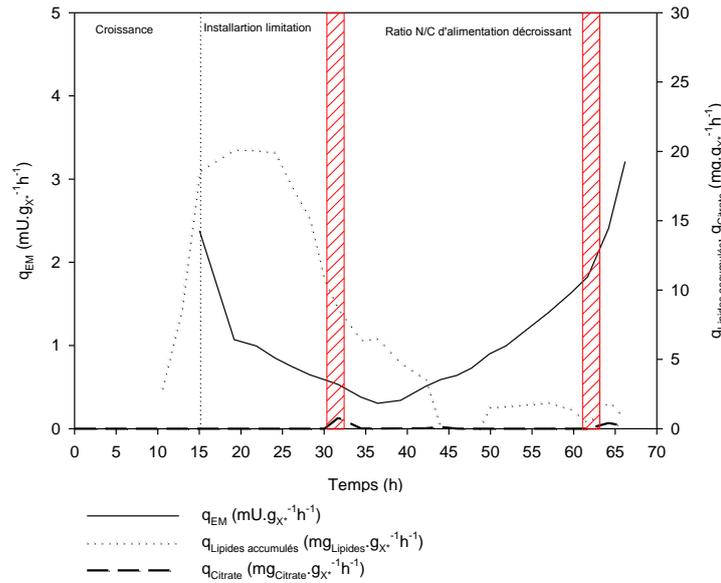


Figure 89. Evolution des vitesses spécifiques de production de l'enzyme malique, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica*  $\Delta gut2$

Enfin, la vitesse spécifique de production de la malate déshydrogénase a exhibé des valeurs très faibles au cours de la culture. Une diminution de la vitesse spécifique est observée pendant l'étape de mise en place de la limitation nutritionnelle et semble se stabiliser jusqu'à la fin de la culture.

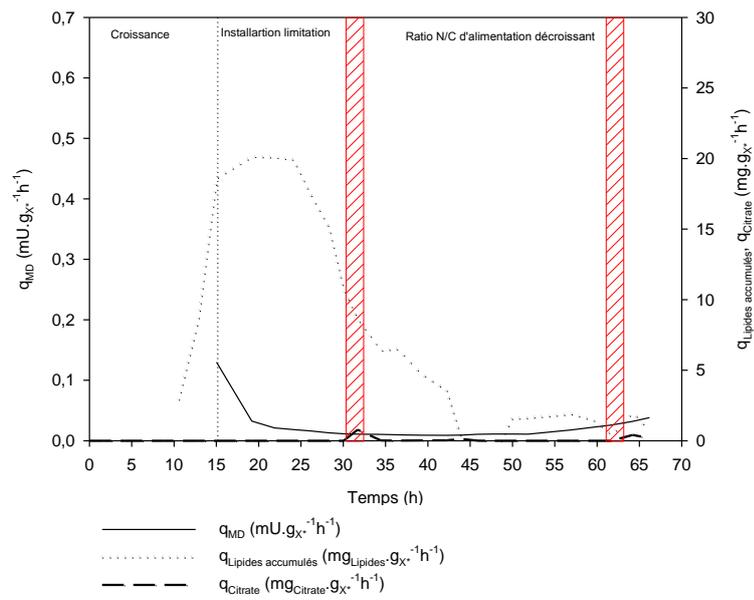


Figure 90. Evolution des vitesses spécifiques de production de la malate déshydrogénase, d'accumulation de lipides et de production d'acide citrique au cours de la culture fed-batch de *lipolytica*  $\Delta gut2$

### 3.6.6 Discussion

Nous avons étudié la bascule métabolique chez *Yarrowia lipolytica*  $\Delta$ gut2 en culture fed-batch sous une limitation nutritionnelle en azote en utilisant le glucose comme seule source de carbone.

L'objectif principal de cette culture était d'étudier l'impact de la disponibilité du glycérol-3-phosphate pour la synthèse des TAG sur les bascules métaboliques étudiées.

Assez peu d'enseignement est à tirer de cette étude du fait des problèmes de conduite de culture rencontrés.

La souche  $\Delta$ gut2 a montré un retard dans la croissance par rapport à la souche JMY1552, de ce fait le glucose apporté dans l'alimentation a été accumulé dans le milieu de culture provoquant ainsi que le ratio N/C d'alimentation ne correspond plus au ratio N/C d'alimentation prévu. Cette souche semble avoir été plus perturbée par les problèmes de débits d'alimentation ce qui a fait fortement osciller le ratio rN/rC rendant difficile notamment la détermination du ratio déclenchant la production de citrate. L'acide citrique a été détecté dans le milieu à un ratio de 0,06 molN.Cmol<sup>-1</sup> quelques heures après que le ratio est chuté à 0.016 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

Le tableau suivant montre les différents paramètres cinétiques obtenus lors des cultures fed-batch des souches W29 et  $\Delta$ gut2 :

Tableau 39. Paramètres cinétiques obtenus lors des cultures en fed-batch avec les souches W29 et  $\Delta$ gut2

Paramètre	W29	$\Delta$ gut2
R <sub>X/S</sub> max (g <sub>X</sub> *g <sub>glucose</sub> <sup>-1</sup> )	0,51	0,38
N/C ratio d'alimentation (molN.Cmol <sup>-1</sup> )	0,0342-0,016	0,061-0,021
Dynamique de la limitation nutritionnelle (mmolN.Cmol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0, 17 et 0,34	0,21, 0,56 et 2,4
q <sub>Lipides</sub> accumulés max (mg <sub>Lipides</sub> .g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	9,3	20,13
% Lipides accumulés max (m <sub>Lipides</sub> .m <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	22,7	18,4
q <sub>Polys</sub> accumulés max (mg <sub>Polys</sub> .g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	16,6	35,4
% Polysaccharides accumulés max (m <sub>Polys</sub> .m <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	9,5	12,7
q <sub>Pyruvate</sub> max (mg <sub>Pyruvate</sub> .g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,33	0,51

---

$q_{\text{Succinate max}} (\text{mg}_{\text{Succinate}} \cdot \text{g}_{\text{X}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	1,29	1,47
$r_{\text{N}}/r_{\text{C}} \text{ bascule citrate}$ ( $\text{mol}_{\text{N}} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ )	0,022	0,041 et 0,06
$q_{\text{Lipides accumulés bascule citrate}}$ ( $\text{mg}_{\text{Lipides}} \cdot \text{g}_{\text{X}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	4,8	10,7 et 0,4
$\mu \text{ catalytique bascule citrate (h}^{-1}\text{)}$	0,00098	0,06 et 0,029
$q_{\text{Glucose bascule citrate}}$ ( $\text{mg}_{\text{glucose}} \cdot \text{g}_{\text{X}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	39,9	53,8 et 30,1

Durant la phase seule d'accumulation lipidique, nous observons que le taux d'accumulation a été le plus important par rapport aux autres souches étudiés même à des degrés de limitation nutritionnelle plus sévères. Aucune production de citrate n'a été observée confirmant qu'il est possible de contrôler le métabolisme dans l'accumulation de lipides sans la production concomitante d'acide citrique.

Enfin on retrouve là-encore une production de succinate concomittante à l'accumulation des lipides qui s'arrête dès l'excrétion de citrate.

---

### 3.7 Discussion générale

L'objectif de ces travaux était d'étudier la bascule d'un métabolisme purement oxydatif à l'accumulation de lipides puis à la production concomitante d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica*. La bascule métabolique chez *Yarrowia lipolytica* a lieu sous la limitation d'un nutriment spécifique et en présence d'une concentration élevée de la source de carbone. Pendant nos travaux nous avons étudié la bascule métabolique chez cette levure sous une limitation nutritionnelle en azote en utilisant le glucose comme seule source de carbone.

La première question posée au début de ces travaux était :

- **Quel est le degré de limitation nutritionnelle caractéristique du déclenchement de chacune des deux transitions métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* vers l'accumulation de triglycérides et vers l'excrétion de citrate ?**

D'après notre recherche bibliographique, ce paramètre n'était pas clairement identifié chez cette levure sous une limitation azotée en utilisant le glucose comme seule source de carbone. Cescut (2009) a observé qu'aux alentours d'une valeur du ratio C/N de 10  $\text{Cmol.mol N}^{-1}$  (égal à un ratio N/C de 0,10  $\text{molN.Cmol}^{-1}$ ) *Yarrowia lipolytica* W29 produisait de l'acide citrique, néanmoins la valeur critique précise n'était pas quantifiée pour la bascule vers le citrate ou pour la bascule vers l'accumulation de lipides.

Un des premiers défis affrontés au cours de nos travaux a été la conception d'un outil permettant l'identification précise du ratio rN/rC qui révèle la dynamique entre les vitesses de consommation de l'azote et du carbone, étant donc un paramètre important pour l'identification des bascules. Le choix a été dirigé vers une variante du mode continue, le D-stat.

Le D-stat donne la possibilité de faire évoluer un paramètre de culture suivant un profil de variation défini au cours de temps permettant ainsi d'étudier l'impact d'une variation de ce paramètre sur le métabolisme microbien. Dans notre étude, le paramètre choisi a été le flux d'apport de la source azotée. Nous avons fait varier le flux azoté au cours de temps suivant un profil de décélération du débit d'alimentation modifiant par conséquent le degré de la limitation nutritionnelle (ratio rN/rC).

Le premier résultat majeur de cette étude a été l'identification précise du ratio (rN/rC) critique pour les deux bascules en D-stat.

Le ratio rN/rC critique à la transition métabolique d'un métabolisme oxydatif à l'accumulation lipidique chez *Yarrowia lipolytica* W29 a été identifié à 0,085  $\text{molN.Cmol}^{-1}$

---

pendant la culture en D-stat. L'accumulation lipidique a été maintenue dans une gamme comprise entre 0,085 à 0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup>. Au-delà de cette valeur, *Y. lipolytica* bascule vers l'excrétion concomitante d'acide citrique à l'accumulation de lipides.

Nous avons ensuite choisi de déterminer ces ratios rN/rC critiques identifiés en D-stat en culture fed-batch.

La conduite fed-batch utilisée est basée sur celle développée par Cescut (Cescut 2009) et diffère de celle-ci sur la troisième phase. La conduite d'alimentation inclut trois phases principales : i) une étape de croissance seule contrôlée par l'apport de la source carbonée, ii) une étape de mise en place de la limitation nutritionnelle pour la seule accumulation de lipides et iii) une dernière étape où grâce à une alimentation croissante en source carbonée (glucose) nous avons pu atteindre le degré de limitation critique pour l'excrétion de citrate.

En fed-batch nous avons confirmé qu'un ratio rN/rC égal à 0,034 molN.Cmol<sup>-1</sup> (inclue dans la gamme prédéfinie en D-stat) induit la seule production de lipides chez la souche sauvage W29, alors que l'excrétion d'acide citrique a été identifiée dans un intervalle du ratio rN/rC compris entre 0,022-0,019 molN.Cmol<sup>-1</sup>. Ce qui nous a amené à confirmer nos résultats obtenus en D-stat.

Dans la culture en D-stat nous avons contrôlé le taux de croissance, par une double limitation nutritionnelle, à 0,08 h<sup>-1</sup> alors qu'en fed-batch le taux de croissance a varié pendant la phase de diminution du rN/rC, de 0,07 à 0 h<sup>-1</sup>. Il semble donc qu'une limitation nutritionnelle critique affecte les mécanismes au même niveau de régulation métabolique et est indépendante du taux de croissance dans la gamme étudiée (0 à 0,08 h<sup>-1</sup>).

Les résultats obtenus sur les ratios de limitation nutritionnelle critiques aux transitions métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* nous amène à étudier les potentialités spécifiques de la souche sur la production de lipides. C'est pourquoi, au cours de ces travaux nous avons voulu répondre à la question suivante :

- **Est-il possible de fixer le métabolisme de *Yarrowia lipolytica* dans un état d'accumulation lipidique sans la production concomitante de co-produits?**

Cescut (2009) avait montré qu'il était possible de limiter la production d'acide citrique pendant l'accumulation de lipides en contrôlant les flux d'alimentation en carbone et d'azote au moyen d'un PID. Nous avons ici montré qu'il était possible d'accumuler des lipides sans production d'acide citrique dès lors que l'on contrôle l'alimentation en carbone et azote (et donc le ratio N/C) dans une gamme comprise entre 0,085 à 0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

---

Lors des cultures en D-stat et fed-batch réalisés, nous avons constaté qu'un taux de croissance faible ( $\mu$ ) favorise l'accumulation lipidique. Lors de la culture en D-stat, nous avons imposé un  $\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$  avec lequel nous avons obtenu une vitesse maximale d'accumulation de lipides sans production d'acide citrique de  $1,5 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  tandis qu'en fed-batch le  $\mu$  était proche de zéro pour une  $q_{\text{lip}} \text{ max}$  de  $5 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Néanmoins les vitesses maximales d'accumulation de lipides ont été obtenues lorsqu'il y a production concomitante d'acide citrique. Chez la souche sauvage, la vitesse maximale d'accumulation de lipides de  $9,3 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  a été obtenue avec une vitesse de production de citrate de  $2,5 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Parmi les autres co-produits nous avons observé une accumulation de polysaccharides lors de la limitation nutritionnelle. Ce phénomène avait aussi été observé par Cescut (2009) chez *R. glutinis* et *Y. lipolytica*. L'accumulation de polysaccharides représente une réserve osidique induite dès l'installation de la limitation azotée. L'accumulation de polysaccharides s'accélère lorsque l'accumulation de lipides s'accélère puis chute lorsque celle de lipides se stabilise.

Enfin il a été également détecté, à de faibles concentrations, la présence d'acide pyruvique et d'acide succinique dans le milieu de culture.

L'accumulation d'acide pyruvique a lieu dès la phase de croissance où sa vitesse est la plus élevée puis diminue jusqu'à la fin de la culture. Chez les souches W29 et JMY2046, les vitesses spécifiques de production semblent se stabiliser pendant la période de production de lipides et varient très peu pendant l'étape d'accumulation extracellulaire d'acide citrique simultanée. Cette accumulation pourrait être ainsi liée à la gestion des flux métaboliques au niveau du carrefour de l'acide citrique. D'après certains auteurs, cette production est liée principalement à l'activité de l'enzyme malique (Zink et Katz 1973; McCullough 1974). Néanmoins, nous n'avons pu mettre en évidence aucune relation entre la production d'acide pyruvique et les teneurs en enzyme malique dans nos cultures.

Nous avons aussi observé une production de succinate induite par la limitation azotée. Le succinate exhibe sa vitesse spécifique de production maximale dans la phase d'accumulation de lipides sans production de citrate simultanée mais l'acide succinique est reconsumé lorsque la production de citrate est déclenchée. Ainsi, la souche JMY1552 qui ne produit pas d'acide citrique produit continuellement de l'acide succinique. Cette relation entre acide succinique et lipides et acide citrique doit trouver son explication dans les mécanismes de régulation du métabolisme lipidique. D'après la littérature, en phase d'accumulation de lipides, l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) serait fortement inhibée. Ainsi le flux de carbone serait dévié en partie vers l'acide citrique et la synthèse des lipides.

La production d'acide succinique pourrait alors être liée à une activité du shunt glyoxylique par l'action de l'isocitrate lyase. Ainsi le succinate serait accumulé à cause du flux trop important pour la succinate déshydrogénase.

- **Quels sont les mécanismes qui contrôlent ces bascules métaboliques d'un métabolisme oxydatif à l'accumulation de lipides puis à l'excrétion d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica* ?**

D'après la littérature chez les microorganismes oléagineux en général, un stress nutritionnel génère une série d'événements caractéristiques, simplifiés dans le schéma suivant :

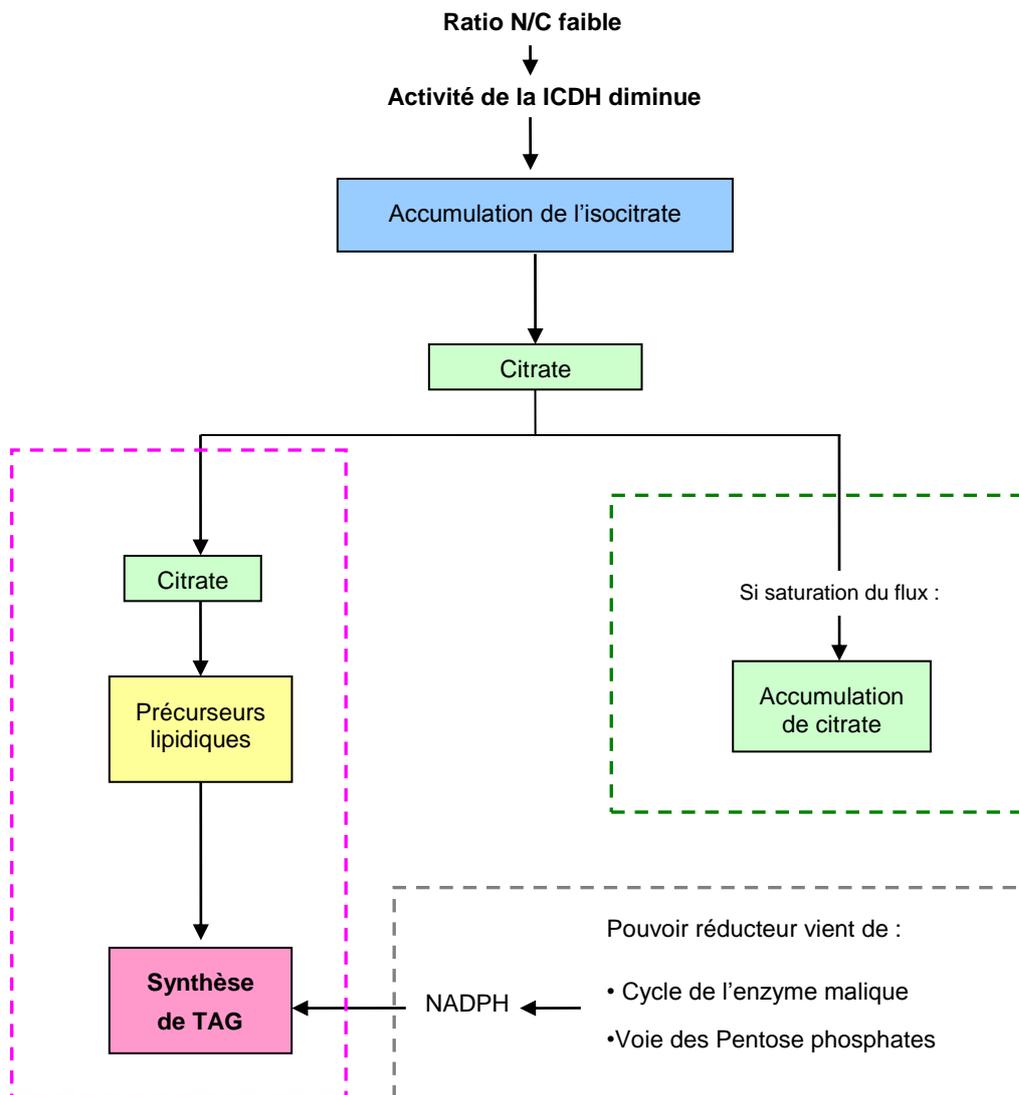


Figure 91. Schéma représentatif du métabolisme chez les microorganismes oléagineux

Sous une limitation en azote, (au ratio rN/rC faible), l'activité de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (ICDH) diminue à cause de sa dépendance à l'adénosine monophosphate (AMP), générant ainsi que l'isocitrate puis le citrate s'accumulent dans la mitochondrie.

---

De son côté, le citrate accumulé dans la mitochondrie sort vers le cytosol pour, dans un premier temps, être métabolisé vers la synthèse des lipides ( $\Phi$ Acétyl-CoA) tout en utilisant le pouvoir réducteur pour la synthèse de triacylglycérols sous la forme de  $\text{NADPH}_2$  ( $\Phi\text{NADPH}_2$  lipides totaux) qui est apporté soit par le cycle de l'enzyme malique soit par la voie des pentose phosphate.

Dans un deuxième temps, quand le flux de citrate devient trop important, il ne peut plus être entièrement métabolisé en acides gras et est excrété hors de la cellule ( $\Phi$ Citrate excrété). Néanmoins ce schéma n'identifie pas la ou les étapes contrôlant les transitions métaboliques chez *Yarrowia lipolytica*. Cela nous amène à nous poser la question suivante :

- **Peut-on expliquer simplement la bascule vers l'excrétion d'acide citrique en termes de saturation des flux métaboliques ? Quel en serait l'étape saturante ?**

Afin de rentrer un peu plus dans les mécanismes contrôlant les bascules métaboliques chez *Y. lipolytica*, nous avons d'une part mesuré les teneurs cellulaires en un certain nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique et d'autre part calculé à partir des données expérimentales trois flux métaboliques qui nous semblaient pertinents et caractéristiques des 3 carrefours métaboliques étudiés : les carrefours autour du citrate, de l'acétyl-coenzyme A et du  $\text{NADPH}_2$ .

Ces flux métaboliques sont le flux de citrate intracellulaire ( $\Phi$ Citrate intra), le flux de synthèse d'acétyl-CoA ( $\Phi$ Acétyl-CoA) et le flux de génération de  $\text{NADPH}_2$  requis pour la synthèse des lipides totaux ( $\Phi\text{NADPH}_2$  lipides totaux). Ces flux métaboliques ont été calculés en postulant l'absence d'accumulation des métabolites considérés dans la cellule.

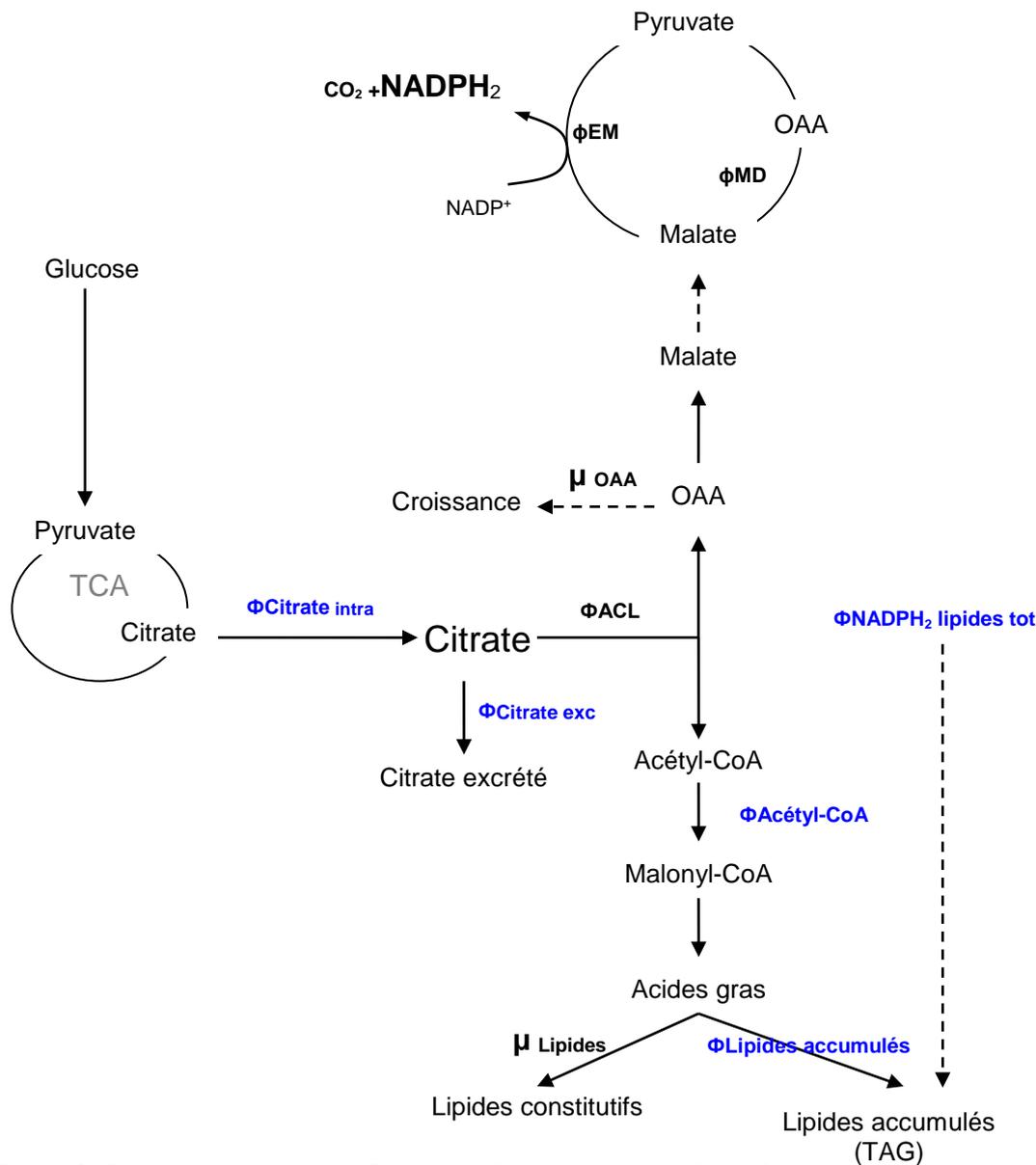


Figure 92. Schéma représentatif des flux métaboliques étudiés chez *Y. lipolytica*

Tout d'abord, le  $\Phi_{\text{Citrate intra}}$  traduit le flux de carbone sortant du cycle de Krebs sous la forme de citrate. Ce flux est ensuite distribué dans la cellule vers la synthèse de l'acétyl-coA au travers de l'ATP-citrate lyase (ACL) et vers l'excrétion d'acide citrique.

Le  $\Phi_{\text{Acétyl-CoA}}$  traduit le flux de carbone au niveau de l'acétyl-coA et qui est ensuite distribué vers la synthèse des acides gras constitutifs de la biomasse et ceux accumulés sous forme de triacylglycérols (TAG). Ce flux de carbone est transformé par l'acétyl-coA carboxylase (ACC)

Enfin, le  $\Phi_{\text{NADPH}_2 \text{ lipides totaux}}$  prend en compte la production de  $\text{NADPH}_2$  nécessaires à la synthèse des lipides totaux (constitutifs et accumulés).

La représentation de ces 3 flux métaboliques en fonction du ratio  $rN/rC$  n'ont pas permis de dégager de corrélation évidente. Les représentations des ratios entre le flux  $\Phi_{\text{Citrate intra}}/\Phi_{\text{Acétyl-CoA}}$  et  $\Phi_{\text{Citrate intra}}/\Phi_{\text{NADPH}_2}$  Lipides totaux en fonction du  $rN/rC$  semblent indiquer l'existence d'une valeur critique du ratio  $\Phi_{\text{Citrate intra}}/\Phi_{\text{NADPH}_2}$  au-delà duquel la bascule métabolique aurait lieu. Cela indiquerait dans ce cas que la bascule pourrait être déclenchée du fait d'une insuffisance de l'apport en  $\text{NADPH}_2$  pour soutenir la synthèse des acides gras.

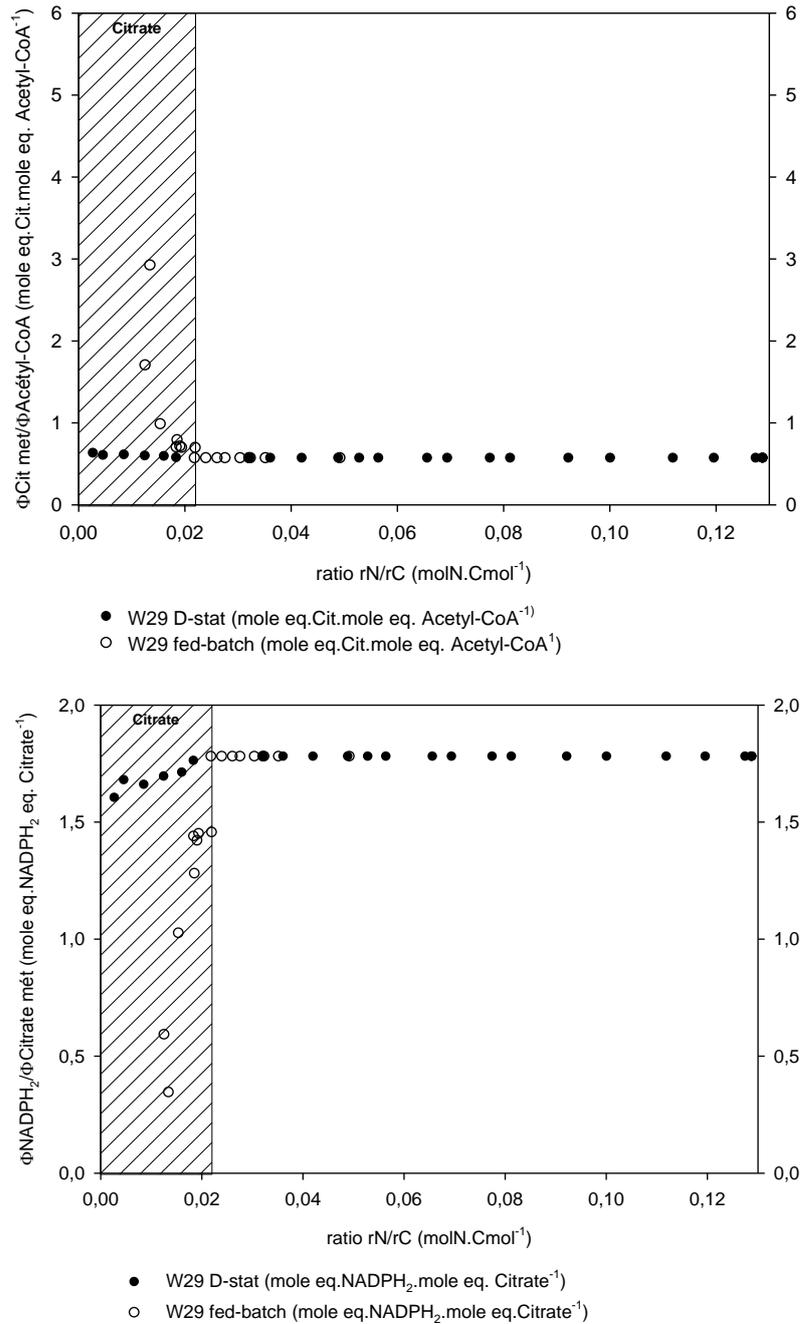


Figure 93.  $\Phi_{\text{Citrate intra}}/\Phi_{\text{Acétyl-CoA}}$  et  $\Phi_{\text{NADPH}_2}/\Phi_{\text{Citrate intra}}$  en fonction du ratio  $rN/rC$  au cours des cultures D-Stat et fed-batch de *Y. lipolytica* W29

La représentation du  $\Phi_{\text{Citrate intra}}/\Phi_{\text{NADPH}_2}$  Lipides totaux en fonction du  $rN/rC$  sur les souches génétiquement modifiées indique la même valeur critique au-delà de laquelle la bascule a lieu. Cela s'est vérifié avec la souche JMY2046 et la souche  $\Delta\text{gut2}$ . La souche JMY1552 semble n'avoir jamais dépassé cette valeur et n'a donc pas produit d'acide citrique.

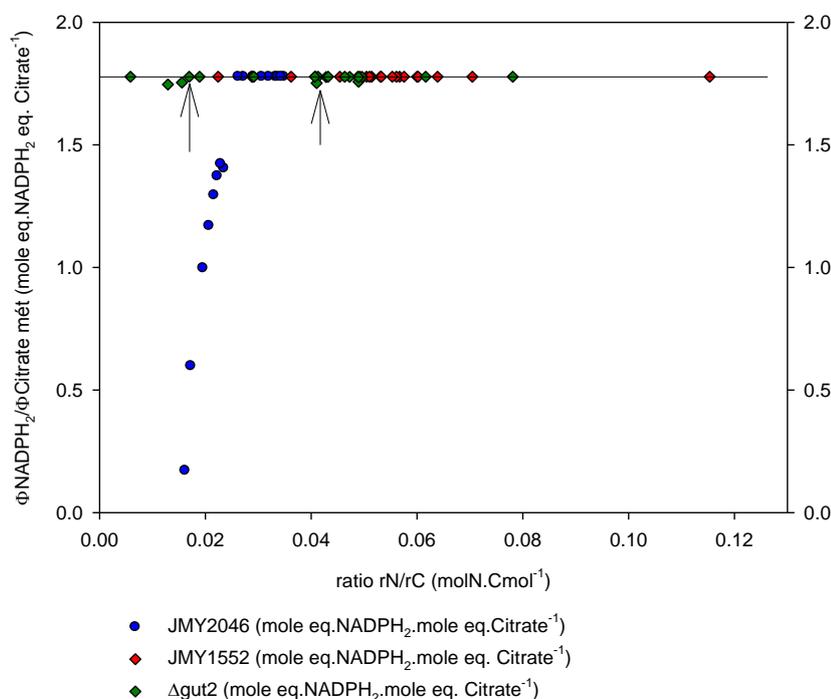


Figure 94.  $\Phi_{\text{NADPH}_2}/\Phi_{\text{Citrate intra}}$  en fonction du ratio  $rN/rC$  au cours des cultures des souches génétiquement modifiées. Les flèches indiquent les excrétions d'acide citrique chez la souche  $\Delta\text{gut2}$ .

Au cours de ces travaux nous nous sommes focalisés sur 3 carrefours métaboliques, celui de l'acide citrique, celui de l'acétyl-coenzyme A et enfin du glycérol-3-phosphate. Nous avons abordé cette question par le suivi de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique et par l'analyse phénotypique de 3 souches génétiquement modifiées.

Un premier résultat marquant concerne l'analyse phénotypique de la souche JMY2046 délétée pour la forme peroxysomale de la malate déshydrogénase (MD). D'une part la diminution du rendement de croissance sur glucose (0,43 au lieu de 0,51  $\text{g.g}^{-1}$  pour le sauvage) semble indiquer la participation d'une voie métabolique peroxysomale incluant l'activité malate déshydrogénase à l'énergétique cellulaire. Cette voie métabolique doit vraisemblablement être la voie de  $\beta$ -oxydation indiquant un turn-over des acides gras synthétisés.

D'autre part, la bascule métabolique vers l'excrétion d'acide citrique a lieu chez cette souche pour un  $rN/rC$  de  $0,025 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  (au lieu de  $0,022 \text{ molN.Cmol}^{-1}$  chez le sau-

---

vage). Cette bascule précoce pourrait s'expliquer par le fait qu'en l'absence d'un flux d'acides gras allant vers la  $\beta$ -oxydation, le carrefour métabolique autour de l'acétyl-coA et/ou des acides gras serait saturé plus tôt.

De la même façon, la détermination du rN/rC critique pour la bascule de l'acide citrique chez les autres souches génétiquement modifiées nous amène à avancer quelques hypothèses sur les mécanismes déclenchant la bascule métabolique.

La culture de la souche JMY1552 sur-exprimant l'ACL montre une absence d'excrétion d'acide citrique dans une gamme de 0,06 à 0,021 molN.Cmol<sup>-1</sup>. La souche sauvage commence à excréter de l'acide citrique à un rN/rC de 0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup>.

Logiquement nous aurions donc dû détecter de l'acide citrique à la fin de la culture du mutant. Néanmoins nous devons rester prudents quant à la conclusion de cette observation puisque nous n'avons pas balayé de manière suffisamment lente et prononcée la gamme autour de la bascule vers l'acide citrique. Si cette observation se confirmait, le fait que la surexpression de l'ATP citrate lyase (ACL) repousse la bascule citrique mettrait en avant l'ACL comme enzyme contrôlant la bascule. Si on se fie à l'hypothèse faite pour la souche délétée pour la MDH peroxydomale d'un contrôle au niveau du carrefour de l'acétyl-coA, une augmentation du flux carboné par l'ACL amenant donc plus d'acétyl-coA aurait donc dû déclencher également la bascule citrique à un rN/rC plus élevé. Mais nous avons observé que la surexpression de l'ACL s'accompagnait d'une surexpression de l'acétyl-coA carboxylase (ACC), de la MD et de l'enzyme malique (EM). Cette co-régulation des enzymes du métabolisme de l'acide citrique par l'ACL permettrait ainsi de drainer l'excès du flux d'acétyl-coA généré par la surexpression de l'ACL. Ceci se traduit par l'obtention d'une vitesse spécifique d'accumulation de lipides supérieure d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage. Par contre, cette augmentation de la capacité de synthèse d'acide gras chez cette souche ne s'accompagne pas d'une augmentation de la teneur en lipides accumulés (9% contre 23% chez le sauvage). Ceci s'explique par le maintien d'un taux de croissance de l'ordre de 0,035 h<sup>-1</sup> pour une gamme de rN/rC entre 0,04 et 0,021 molN.Cmol<sup>-1</sup>, alors que le taux de croissance chute à zéro à l'approche de 0,022 molN.Cmol<sup>-1</sup> chez le sauvage.

La même analyse sur la souche  $\Delta$ gut2, délétée pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GUT2), n'a pas pu être possible du fait des accidents d'alimentation. La délétion de GUT2 permet d'augmenter la disponibilité du glycérol-3-phosphate dans la cellule en supprimant une de ses voies de consommation (navette glycérol) (Cescut, 2009). L'augmentation de la disponibilité de ce métabolite entraîne une augmentation de la vitesse spécifique d'accumulation de lipides maximale d'un facteur 2,2 comparativement à la

souche sauvage. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus par Cescut (2009) avec la même souche en système fed-batch piloté par PID. Contrairement à la souche sur-exprimant l'ACL, cette vitesse spécifique d'accumulation de lipides élevée ne s'accompagne pas ou moins d'une diminution de la teneur en lipides accumulés (18 % contre 23 % pour la souche sauvage). L'augmentation de la teneur en glycérol-3-phosphate permettrait dans ce cas de lever la saturation de l'accumulation de lipides sous forme de triacylglycérols (TAG) dont le glycérol-3-phosphate est un des substrats.

D'autre part, le suivi des teneurs intracellulaires des enzymes ciblées (ACL, ACC, MD et EM) a montré un profil dynamique similaire entre les différents modes de culture avec la souche sauvage et la souche JMY2046 délétée pour la MD peroxysomale. Une première induction de l'ACL, l'ACC et des MD a lieu rapidement après l'installation de la limitation nutritionnelle. Leur teneur est maximale pendant la phase d'accumulation de lipides et de production de citrate simultanée puis leur synthèse est fortement réprimée dès l'excrétion de l'acide citrique.

La teneur en ACL corrélait assez bien avec le flux de carbone passant au niveau de l'acide citrique intracellulaire pendant la phase d'accumulation des lipides avant excrétion d'acide citrique (Figure ci-dessous). Au-delà, la teneur en ACL n'est plus représentative du flux métabolique.

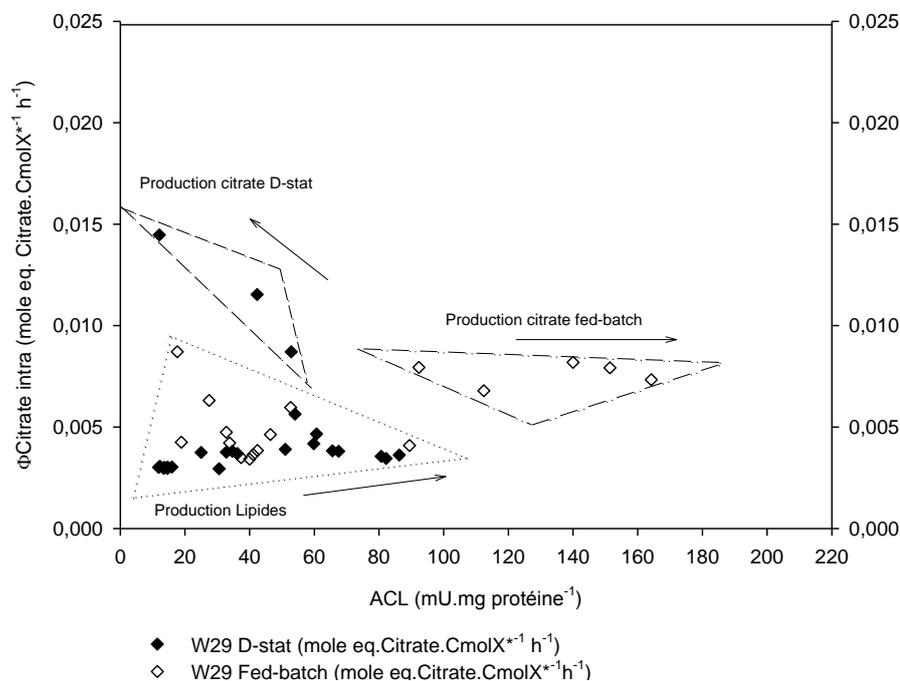


Figure 95.  $\Phi$ Citrate intra fonction de l'activité spécifique enzymatique de l'ATP citrate lyase lors des cultures D-stat et fed-batch de *Y. lipolytica* W29

Nous n'avons pas retrouvé une telle adéquation entre l'ACC et la MD avec les flux métaboliques calculés ( $\Phi_{\text{Acetyl-coA}}$ ,  $\Phi_{\text{Citrique}}$ ).

De son côté, la synthèse de l'enzyme malique est induite un peu plus tard lorsque l'accumulation de lipides est déjà effective et s'accélère avec l'accélération de l'accumulation de lipides. Sa teneur cellulaire est maximale quelques temps après l'excrétion du citrate puis chute excessivement. Le graphe ci-dessous montre une bonne adéquation entre la teneur cellulaire en enzyme malique et le flux spécifique de génération de  $\text{NADPH}_2$  nécessaire à la synthèse des acides gras pendant la phase d'accumulation de lipides jusqu'à la bascule de l'acide citrique (cf figure ci-dessous). Après l'excrétion de l'acide citrique, la teneur cellulaire en enzyme n'est plus représentative du flux de  $\text{NADPH}_2$  formé.

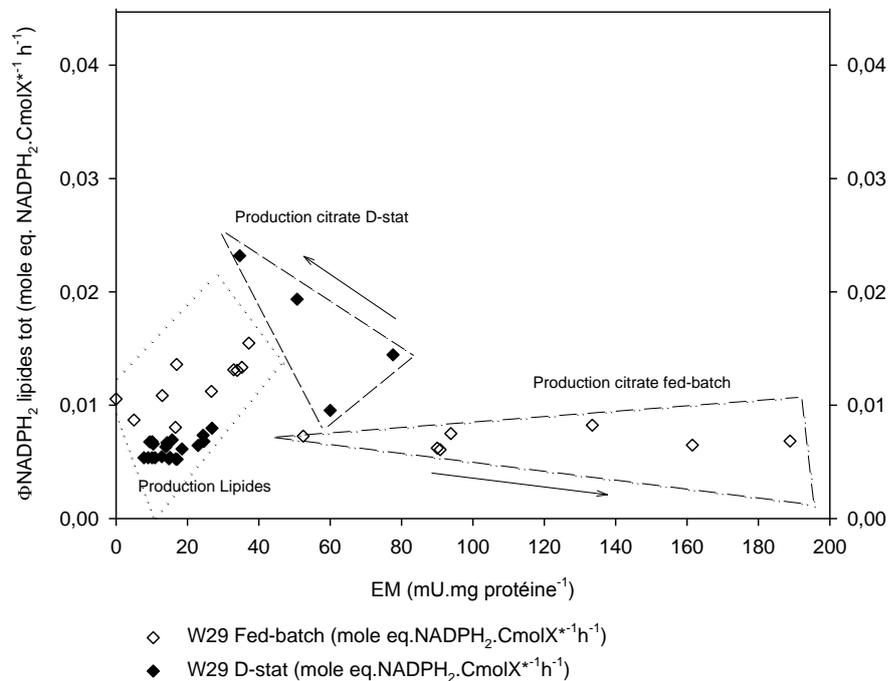


Figure 96.  $\Phi_{\text{NADPH}_2}$  lipides totaux fonction de l'activité spécifique enzymatique de l'enzyme malique lors des cultures D-stat et fed-batch de *Y. lipolytica* W29

Ces observations amènent à se poser la question de l'origine du flux de  $\text{NADPH}_2$  nécessaire pour soutenir la synthèse des lipides et de son implication dans la bascule de l'acide citrique. Il aurait été intéressant pour cela de quantifier également la teneur en glucose-6-phosphate déshydrogénase, enzyme générant le  $\text{NADPH}_2$  dans la voie des pentoses phosphates. D'après Ratledge (2002), l'enzyme malique fournirait moins de 15 % des besoins en  $\text{NADPH}_2$  chez *M. circinelloides*.

---

Néanmoins, il est nécessaire d'être prudent vis-à-vis de ces relations entre teneurs en enzyme et flux métaboliques, puisqu'il est connu que la teneur en enzyme ne reflète pas toujours l'activité *in vivo* de l'enzyme. Enfin l'analyse transcriptomique réalisée sur le D-stat a montré que les niveaux des transcripts (teneurs en ARNm) ne reflétaient pas non plus les teneurs cellulaires en enzyme suggérant fortement des systèmes de régulation des mécanismes contrôlant les bascules métaboliques au niveau post-transcriptionnel notamment sur les enzymes ciblées.

---

### 3.8 Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure compréhension des phénomènes qui se succèdent lors des bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* : d'un métabolisme purement oxydatif vers l'accumulation de lipides et vers l'excrétion d'acide citrique concomitante.

Dans l'étude bibliographique, nous avons mis en évidence les différentes connaissances autour du métabolisme lipidique chez les microorganismes oléagineux ainsi qu'autour de la production d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica* en utilisant différentes sources de carbone. D'après la recherche bibliographique effectuée, peu de choses étaient connues sur les points de régulation spécifiques à la levure *Y. lipolytica* vers une bascule métabolique, particulièrement lors de l'accumulation de lipides et l'excrétion de citrate simultanée. Le degré de limitation nutritionnelle critique aux bascules métaboliques était un autre paramètre méconnu chez cette levure.

Nous avons donc étudié les bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* en caractérisant la levure avec diverses approches de génie des bioprocédés : en batch, chémostat ou continu, D-stat, fed-batch et A-stat. Nous avons maîtrisé ces différentes conduites afin d'étudier le métabolisme de la levure en imposant une faible évolution du degré de limitation nutritionnelle.

Nos résultats indiquent que tant que le ratio  $rN/rC$  est maîtrisé dans un intervalle compris entre 0,085-0,023 molN.Cmol<sup>-1</sup>, *Yarrowia lipolytica* sera capable d'accumuler de lipides. Au-delà de cette valeur *Yarrowia lipolytica* produit simultanément des lipides et de l'acide citrique. C'est à ce moment là qu'un autre système alternatif devrait interagir afin de fournir les NADPH<sub>2</sub> nécessaires à la synthèse de lipides quand le cycle de l'enzyme malique est affecté par l'excès de citrate. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la vitesse spécifique d'accumulation de lipides est maximale dans la période simultanée de production de citrate avant d'être très fortement dégradée.

Il semble que les bascules métaboliques chez *Yarrowia lipolytica* sont le résultat d'un système de régulation enzymatique complexe et non le résultat de l'action isolé d'une enzyme comme il a été supposé auparavant. Nos résultats indiquent que lors de l'accumulation lipidique les enzymes ATP citrate lyase, acétyl-CoA carboxylase et enzyme malique interagissent de manière conjointe dirigeant le flux excédant du carbone vers la synthèse de lipides. Néanmoins lorsque le ratio  $rN/rC$  atteint sa valeur critique, le carbone excédant est accumulé sous la forme d'acide citrique.

---

Nous avons également étudié la régulation métabolique au niveau des flux métaboliques chez la souche sauvage ainsi que chez les souches mutantes en D-stat et fed-batch. Nous constatons que quelle que soit l'enzyme étudiée chez la souche sauvage nous retrouvons la même dynamique des flux métaboliques. Néanmoins, une fois que la production de citrate est déclenchée, ces flux ne présentent plus la même dynamique.

Nous considérons qu'un aspect intéressant à étudier à la suite de ces travaux de thèse serait l'analyse de la teneur en cendres de la biomasse afin de comparer les fractions minérales entre les différentes souches et les différents modes de cultures utilisés en fonction des profils de la teneur en lipides pendant l'accumulation.

Une analyse de la modulation du profil des acides gras permettra d'apporter d'information importante concernant le degré d'insaturation entre les différentes souches étudiées afin de proposer une souche potentielle cible qui aurait entre autres, l'avantage d'accumuler des lipides avec un degré d'insaturation élevé avec une vitesse spécifique d'accumulation élevée.

Il serait intéressant d'utiliser des modèles métaboliques afin d'élucider les possibles voies que sont réprimées ou activées lors des bascules métaboliques tout en prenant en compte les paramètres cinétiques obtenus lors de ces travaux, plus particulièrement le cas de la voie des pentoses phosphate pouvant fournir les  $\text{NADPH}_2$  pour la synthèse de lipides lorsque l'activité de l'enzyme malique est affecté.

Un autre scénario intéressant à approfondir serait la construction d'un double mutant de *Yarrowia lipolytica* ayant les caractéristiques d'un sur disponibilité de glycérol-3-phosphate ainsi qu'une surexpression de l'ATP citrate lyase. En théorie avec cette combinaison, il existerait une accélération des activités du nœud du citrate qui empêcherait l'excrétion du citrate vers l'extérieur de la cellule, il serait aussi possible que ce scénario permette que l'activité de l'enzyme malique soit également augmentée.

---

## Références

- Akin, N., S. Aydemir, C. Kocak and M. A. Yildiz (2003) Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening, *Food Chemistry* 80 (1), 77-83.
- Amaral, P. F. F., M. H. M. Rocha-Leao, I. M. Marrucho, J. A. P. Coutinho and M. A. Z. Coelho (2006) Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier, *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology* 81 (8), 1368-1374.
- Anastassiadis, S., A. Aivasidis and C. Wandrey (2002) Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation, *Applied Microbiology And Biotechnology* 60 (1-2), 81-87.
- Anastassiadis, S., C. Wandrey and H. J. Rehm (2005) Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio, *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21 (5), 695-705.
- Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach and G. M. Guebitz (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production, *Bioresource Technology* 99 (8), 3051-3056.
- 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 (5), 1450-1459.
- Bankar, A. V., A. R. Kumar and S. S. Zinjarde (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (5), 847-865.
- Bard, M., N. D. Lees, L. S. Burrows and F. W. Kleinhans (1978) Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants, *Journal of Bacteriology* 135 (3), 1146-1148.
- Barth, G. and C. Gaillardin (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *Fems Microbiology Reviews* 19 (4), 219-237.
- Barth, G. and W. Kunkel (1979) Alcohol-dehydrogenase (adh) in yeasts. 2. nad<sup>+</sup>-dependent and nadp<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenases in *saccharomycopsis-lipolytica*, *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie* 19 (6), 381-390.
- Bartnickigarcia, S. and W. J. Nickerson (1962) Nutrition, Growth, And Morphogenesis Of *Mucor Rouxii*, *Journal Of Bacteriology* 84 (4), 841-&.
- Beopoulos, A., J. Cescut, R. Haddouche, J. L. Uribelarra, C. Molina-Jouve and J. M. Nicaud (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, *Progress in Lipid Research* 48 (6), 375-387.
- Bintsis, T. and R. K. Robinson (2004) A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese, *Food Chemistry* 88 (3), 435-441.
- Bloomfield, D. K. and K. Bloch (1960) Formation Of Delta-9-Unsaturated Fatty Acids, *Journal Of Biological Chemistry* 235 (2), 337-345.
- Boer, V. M., J. H. de Winde, J. T. Pronk and M. D. W. Piper (2003) The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur, *Journal Of Biological Chemistry* 278 (5), 3265-3274.
- Botham, P. A. and C. Ratledge (1979) Biochemical Explanation For Lipid-Accumulation In *Candida-107* And Other Oleaginous Microorganisms, *Journal Of General Microbiology* 114 (OCT), 361-375.

- 
- Boulton, C. A. and C. Ratledge (1981) Correlation Of Lipid-Accumulation In Yeasts With Possession Of Atp-Citrate Lyase, *Journal Of General Microbiology* 127 (NOV), 169-176.
- Boulton, C. A. and C. Ratledge (1983) partial-purification and some properties of atp - citrate lyase from the oleaginous yeast lipomyces-starkeyI, *Journal of General Microbiology* 129 (SEP), 2863-2869.
- Boulton, C. A. and C. Ratledge (1984) Cryptococcus-Terricolus, An Oleaginous Yeast Re-Appraised, *Applied Microbiology And Biotechnology* 20 (1), 72-76.
- Bressler, R. and S. J. Wakil (1961) Studies on mechanism of fatty acid synthesis.9. conversion of malonyl coenzyme a to long chain fatty acids, *Journal of Biological Chemistry* 236 (6), 1643-&.
- Browse, J., N. Warwick, C. R. Somerville and C. R. Slack (1986) Fluxes Through The Prokaryotic And Eukaryotic Pathways Of Lipid-Synthesis In The 16-3 Plant Arabidopsis-Thaliana, *Biochemical Journal* 235 (1), 25-31.
- BruszeWs.Te, R. O. Mumma and C. L. Fergus (1972) Thermophilic Fungi.4. Lipid Composition Of 6 Species, *Lipids* 7 (11), 695-&.
- Calderbank, J., M. H. J. Keenan, A. H. Rose and G. D. Holman (1984) Accumulation Of Amino-Acids By Saccharomyces-Cerevisiae Y185 With Phospholipids Enriched In Different Fatty-Acyl Residues - A Statistical-Analysis Of Data, *Journal Of General Microbiology* 130 (NOV), 2817-2824.
- Castelli, A., G. P. Littarru and Barbares.G (1969) Effect Of Ph And Co2 Concentration Changes On Lipids And Fatty Acids Of Saccharomyces Cerevisiae, *Archiv Fur Mikrobiologie* 66 (1), 34-&.
- Cescut, J. (2009) Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique: physiologie et performance de procédés,
- Chen, G. Q., Y. Jiang and F. Chen (2008) Variation of lipid class composition in Nitzschia laevis as a response to growth temperature change, *Food Chemistry* 109 (1), 88-94.
- Chen, J. Y., C. M. Wen and T. L. Chen (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by Acinetobacter radioresistens, *Biotechnology And Bioengineering* 62 (3), 311-316.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25 (3), 294-306.
- Chun, P. W., M. Fried and E. F. Ellis (1967) Use of water-soluble polymers for isolation and purification of human immunoglobulins, *Analytical Biochemistry* 19 (3), 481-&.
- Cobon, G. S. and J. M. Haslam (1973) Effect of altered membrane sterol composition on temperature-dependence of yeast mitochondrial atpase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 52 (1), 320-326.
- Coelho M.A.Z., P. F. F. A., I. Belo (2010) Yarrowia lipolytica: and industrial workhorse, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*
- Crolla, A. and K. J. Kennedy (2001) Optimization of citric acid production from Candida lipolytica Y-1095 using n-paraffin, *Journal Of Biotechnology* 89 (1), 27-40.
- Daniel, H. J., R. T. Otto, M. Binder, M. Reuss and C. Syldatk (1999) Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with Cryptococcus curvatus ATCC 20509 and Candida bombicola ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates, *Applied Microbiology And Biotechnology* 51 (1), 40-45.
- Davis, M. S., J. Solbiati and J. E. Cronan (2000) Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli, *Journal Of Biological Chemistry* 275 (37), 28593-28598.
- Deak, T. (2001) Identification of yeasts isolated from poultry meat, *Acta Biologica Hungarica* 52 (2-3), 195-200.
- Destain, J., D. Roblain and P. Thonart (1997) Improvement of lipase production from Yarrowia lipolytica, *Biotechnology Letters* 19 (2), 105-107.
- Does, A. L. and L. F. Bisson (1989) Comparison of glucose-uptake kinetics in different yeasts, *Journal of Bacteriology* 171 (3), 1303-1308.
-

- 
- Duntze, W., D. Neumann, J. M. Gancedo, Atzpodie.W and H. Holzer (1969) Studies On Regulation And Localization Of Glyoxylate Cycle Enzymes In *Saccharomyces Cerevisiae*, *European Journal Of Biochemistry* 10 (1), 83-&.
- Egli, T. (1991) On Multiple-Nutrient-Limited Growth Of Microorganisms, With Special Reference To Dual Limitation By Carbon And Nitrogen Substrates, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 60 (3-4), 225-234.
- Eletr, S., M. A. Williams, T. Watkins and A. D. Keith (1974) PERTURBATIONS OF DYNAMICS OF LIPID ALKYL CHAINS IN MEMBRANE SYSTEMS - EFFECT ON ACTIVITY OF MEMBRANE-BOUND ENZYMES, *Biochimica Et Biophysica Acta* 339 (2), 190-201.
- Elrefai, A. H. and I. A. Elkady (1968) STEROL PRODUCTION OF YEAST STRAINS, *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie* 8 (5), 355-&.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1984a) Effect Of Nitrogen-Source On Lipid-Accumulation In Oleaginous Yeasts, *Journal Of General Microbiology* 130 (JUL), 1693-1704.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1984b) Phosphofructokinase And The Regulation Of The Flux Of Carbon From Glucose To Lipid In The Oleaginous Yeast *Rhodospiridium-Toruloides*, *Journal Of General Microbiology* 130 (DEC), 3251-3264.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1985a) Partial-Purification And Properties Of Pyruvate-Kinase And Its Regulatory Role During Lipid-Accumulation By The Oleaginous Yeast *Rhodospiridium-Toruloides* Cbs-14, *Canadian Journal Of Microbiology* 31 (5), 479-484.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1985b) The Physiological Significance Of Citric-Acid In The Control Of Metabolism In Lipid-Accumulating Yeasts, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 3 349-375.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1985c) The Role Of The Mitochondrial Nad+ - Isocitrate Dehydrogenase In Lipid-Accumulation By The Oleaginous Yeast *Rhodospiridium-Toruloides* Cbs-14, *Canadian Journal Of Microbiology* 31 (9), 845-850.
- Evans, C. T., A. H. Scragg and C. Ratledge (1983) A Comparative-Study Of Citrate Efflux From Mitochondria Of Oleaginous And Non-Oleaginous Yeasts, *European Journal Of Biochemistry* 130 (1), 195-204.
- Fahien, L. A., E. H. Kmiotek, M. J. Macdonald, B. Fibich and M. Mandic (1988) REGULATION OF MALATE-DEHYDROGENASE ACTIVITY BY GLUTAMATE, CITRATE, ALPHA-KETOGLUTARATE, AND MULTIENZYME INTERACTION, *Journal of Biological Chemistry* 263 (22), 10687-10697.
- Farrell, J. and A. H. Rose (1971) Temperature Effects On Solute Accumulation By *Candida Utilis*, *Archiv Fur Mikrobiologie* 79 (2), 122-&.
- Feofilova, E. P., Y. E. Sergeeva and A. A. Ivashchkin (2010) Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review), *Applied Biochemistry And Microbiology* 46 (4), 369-378.
- Ferreira, T. (2009) Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru. Universidad Federal do Rio de Janeiro,
- Fgaier, H. and H. J. Eberl (2011) Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup, *Journal Of Theoretical Biology* 273 (1), 103-114.
- 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, *Applied Microbiology And Biotechnology* 59 (4-5), 493-500.
- Finogenova, T. V., S. V. Kamzolova, N. V. Shishkanova, A. P. Ilchenko and E. G. Dedyukhina (1996) Influence of the specific growth rate and zinc ions on the synthesis of citric and isocitric acids and on the biomass composition of *Yarrowia lipolytica* N 1 yeast, *Applied Biochemistry And Microbiology* 32 (1), 30-34.
-

- 
- Finogenova, T. V., I. G. Morgunov, S. V. Kamzolova and O. G. Chernyavskaya (2005) Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects, *Applied Biochemistry And Microbiology* 41 (5), 418-425.
- Finogenova, T. V., N. V. Shishkanova, E. A. Fausek and S. S. Eremina (1991) Biosynthesis Of Isocitric Acid From Ethanol By Yeasts, *Applied Microbiology And Biotechnology* 36 (2), 231-235.
- Flores, C.-L., C. Rodríguez, T. Petit and C. Gancedo (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts, *FEMS Microbiology Reviews* 24 (4), 507.
- Formica, J. V. and R. O. Brady (1959) The enzymatic carboxylation of acetyl coenzyme-a, *Journal of the American Chemical Society* 81 (3), 752-752.
- Fox, B. G., K. S. Lyle and C. E. Rogge (2004) Reactions of the diiron enzyme stearyl-acyl carrier protein desaturase, *Accounts Of Chemical Research* 37 (7), 421-429.
- Fukui, M., S. Shiomi, N. Tanuma, T. Katsuda, N. Shiomi and H. Yamaji (2009) Oil degradation in soil by a hydrocarbon assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 S93-S94.
- Gelpi, J. L., A. Dordal, J. Montserrat, A. Mazo and A. Cortes (1992) Kinetic-studies of the regulation of mitochondrial malate-dehydrogenase by citrate, *Biochemical Journal* 283 289-297.
- Gill, C. O., M. J. Hall and C. Ratledge (1977) Lipid-Accumulation In An Oleaginous Yeast (*Candida* 107) Growing On Glucose In Single-Stage Continuous Culture, *Applied And Environmental Microbiology* 33 (2), 231-239.
- Gill, C. O. and C. Ratledge (1973) Regulation of de-novo fatty-acid biosynthesis in n-alkane-utilizing yeast, *Candida*-107, *Journal of General Microbiology* 78 (OCT), 337-347.
- Granger, L. M., P. Perlot, G. Goma and A. Pareilleux (1993) Effect Of Various Nutrient Limitations On Fatty-Acid Production By *Rhodotorula-Glutinis*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 38 (6), 784-789.
- Greshnykh, K., Grigoryan, AN, Dikanskaya, EM, Dyatlovitskaya, EV, Bergel'son, LD. (1968) Effect of temperature and nitrogen source on lipid biosynthesis by yeast grown on n-alkanes, *Mikrobiologiya* 37 251-254.
- Guillouet, S. and J. M. Engasser (1996) Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium and potassium limited continuous cultures under high osmotic pressure, *Applied Microbiology And Biotechnology* 46 (3), 291-296.
- Gunstone, F. D. a. H., J.L. (2007) *The Lipid Handbook*, 3rd ed. 128-134.
- Hansson, L. and M. Dostalek (1986) Effect Of Culture Conditions On Fatty-Acid Composition In Lipids Produced By The Yeast *Cryptococcus-Albidus* Var *Albidus*, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 63 (9), 1179-1184.
- Haskell, B. E. and E. E. Snell (1965) Effect Of Vitamin B6 Deficiency On Composition Of Yeast Lipids, *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 112 (3), 494-&.
- Haslam, J. M., T. W. Spithill, A. W. Linnane and J. B. Chappell (1973) Biogenesis of mitochondria.33. effects of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of *saccharomyces-cerevisiae*, *Biochemical Journal* 134 (4), 949-957.
- Hassan, M., P. J. Blanc, L. M. Granger, A. Pareilleux and G. Goma (1993) Lipid Production By An Unsaturated Fatty-Acid Auxotroph Of The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum* Grown In Single-Stage Continuous-Culture, *Applied Microbiology And Biotechnology* 40 (4), 483-488.
- 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, *Journal of Biological Chemistry* 268 (15), 10946-10952.
- Hemachander, C. and R. Puvanakrishnan (2000) Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations, *Process Biochemistry* 35 (8), 809-814.
- Heredia, L. and C. Ratledge (1988) Simultaneous Utilization Of Glucose And Xylose By *Candida-Curvata* D In Continuous Culture, *Biotechnology Letters* 10 (1), 25-30.
-

- 
- Hiltunen, J. K., F. Okubo, V. A. S. Kursu, K. J. Autio and A. J. Kastaniotis (2005) Mitochondrial fatty acid synthesis and maintenance of respiratory competent mitochondria in yeast, *Biochemical Society Transactions* 33 1162-1165.
- Hirai, M., T. Shiotani, A. Tanaka and S. Fukui (1976) Studies on physiology and metabolism of hydrocarbon-utilizing microorganisms. 11. effects of carbon and nitrogen-sources on levels of several nadp-linked and nad-linked dehydrogenase-activities of hydrocarbon-utilizable candida yeast, *Agricultural and Biological Chemistry* 40 (9), 1819-1827.
- Holdsworth, J. E., M. Veenhuis and C. Ratledge (1988) Enzyme-Activities In Oleaginous Yeasts Accumulating And Utilizing Exogenous Or Endogenous Lipids, *Journal Of General Microbiology* 134 2907-2915.
- Honecker, S., B. Bisping, Z. Yang and H. J. Rehm (1989) Influence Of Sucrose Concentration And Phosphate Limitation On Citric-Acid Production By Immobilized Cells Of *Aspergillus-Niger*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 31 (1), 17-24.
- Hosono, K. and K. Aida (1974) Lipid-Composition Of *Saccharomyces-Cerevisiae* Defective In Mitochondria Due To Pantothenic-Acid Deficiency, *Journal Of General And Applied Microbiology* 20 (1), 47-58.
- Hunter, K. and A. H. Rose (1972) Lipid Composition Of *Saccharomyces-Cerevisiae* As Influenced By Growth Temperature, *Biochimica Et Biophysica Acta* 260 (4), 639-&.
- Iassonova, D. R., E. G. Hammond and S. E. Beattie (2008) Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 85 (8), 711-716.
- Il'chenko, A. P., O. G. Chernyavskaya, N. V. Shishkanova and T. V. Finogenova (2002) Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of alpha-ketoglutaric and citric acids: A comparative study of the central metabolism enzymes, *Microbiology* 71 (3), 269-274.
- Il'chenko, A. P., N. V. Shishkanova, O. G. Chernyavskaya and T. V. Finogenova (1998) Oxygen concentration as a factor controlling central metabolism and citric acid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol, *Microbiology* 67 (3), 241-244.
- Illman, A. M., A. H. Scragg and S. W. Shales (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme And Microbial Technology* 27 (8), 631-635.
- Jacob, Z. (1991) Enrichment Of Wheat Bran By *Rhodotorula-Gracilis* Through Solid-State Fermentation, *Folia Microbiologica* 36 (1), 86-91.
- Jacob, Z. (1992) Linear Growth And Lipid-Synthesis In The Oleaginous Yeast *Rhodotorula-Gracilis*, *Folia Microbiologica* 37 (2), 117-121.
- Jacob, Z. and M. N. Krishnamurthy (1990) Studies On Physicochemical Characteristics And Fatty-Acid Composition Of Lipids Produced By A Strain Of *Rhodotorula-Gracilis* Cfr-1, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 67 (10), 642-645.
- Johnson, V. W., M. Singh, V. S. Saini, D. K. Adhikari, V. Sista and N. K. Yadav (1995) Utilization Of Molasses For The Production Of Fat By An Oleaginous Yeast, *Rhodotorula-Glutinis* Iip-30, *Journal Of Industrial Microbiology* 14 (1), 1-4.
- Kamzolova, S. V., N. V. Shishkanova, I. G. Morgunov and T. V. Finogenova (2003) Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*, *Fems Yeast Research* 3 (2), 217-222.
- Kapoor, K. C., K; Tauro, P. (1982) Citric acid, In: Reed, G (Ed), *Precott and Dunn's Industrial Microbiology*. AVI Publishing Co. Inc. 709-747.
- Kasemets, K., M. Drews, I. Nisamedtinov, K. Adamberg and T. Paalme (2003) Modification of A-stat for the characterization of microorganisms, *Journal Of Microbiological Methods* 55 (1), 187-200.
- Kates, M. and R. M. Baxter (1962) Lipid Composition Of Mesophilic And Psychrophilic Yeasts (*Candida* Species) As Influenced By Environmental Temperature, *Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology* 40 (9), 1213-&.
-

- 
- Kawasse, F. M., P. F. Amaral, M. H. M. Rocha-Leao, A. L. Amaral, E. C. Ferreira and M. A. Z. Coelho (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing, *Bioprocess And Biosystems Engineering* 25 (6), 371-375.
- Kim, J. W., T. J. Park, D. D. Y. Ryu and J. Y. Kim (2000) High cell density culture of *Yarrowia lipolytica* using a one-step feeding process, *Biotechnology Progress* 16 (4), 657-660.
- Klein, H. P. (1955) Synthesis of lipids in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology* 69 620-627.
- Kleinhans, F. W., N. D. Lees, M. Bard, R. A. Haak and R. A. Woods (1979) ESR Determinations of membrane-permeability in a yeast sterol mutant, *Chemistry and Physics of Lipids* 23 (2), 143-154.
- Kohda, T. A., K. Tanaka, M. Konomi, M. Sato, M. Osumi and M. Yamamoto (2007) Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes, *Genes To Cells* 12 (2), 155-170.
- Kornberg, A. and W. E. Pricer (1951) Diphosphopyridine and triphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenases in yeast, *Journal of Biological Chemistry* 189 (1), 123-136.
- Kovac, L., J. Subik, G. Russ and K. Kollar (1967) On relationship between respiratory activity and lipid composition of yeast cell, *Biochimica Et Biophysica Acta* 144 (1), 94-&.
- Krebs, H. A. (1937) The intermediate metabolism of carbohydrates, *Lancet* 2 736-738.
- Lanciotti, R., A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola and M. E. Guerzoni (2005) Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater, *Bioresource Technology* 96 (3), 317-322.
- Lazar, Z., E. Walczak and M. Robak (2011) Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC(+) transformants, *Bioresource Technology* 102 (13), 6982-6989.
- Lees, N. D., M. Bard, M. D. Kemple, R. A. Haak and F. W. Kleinhans (1979) ESR Determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants, *Biochimica Et Biophysica Acta* 553 (3), 469-475.
- Lees, N. D., S. L. Lofton, R. A. Woods and M. Bard (1980) The effects of varied energy-source and detergent on the growth of sterol mutants of *saccharomyces-cerevisiae*, *Journal of General Microbiology* 118 (MAY), 209-214.
- Leman, J. (2009) Lipids Production, *Encyclopedia of microbiology* 393-406.
- Li, Q., W. Du and D. H. Liu (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Applied Microbiology And Biotechnology* 80 (5), 749-756.
- Li Y-h, L. B., Sun Y., Z-b Z., F-w B., (2005) Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilating capacity., *Chinese Journal of Biotechnology* 25 43-48.
- Li, Y. H., Z. B. Zhao and F. W. Bai (2007) High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture, *Enzyme And Microbial Technology* 41 (3), 312-317.
- Lsel, D. M. (1988) *Microbial Lipids*, Ratledge, C. and Wikilson, S.C. Eds. London Academic 699-807.
- Lu, X. F., H. Vora and C. Khosla (2008) Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: Implications for biodiesel production, *Metabolic Engineering* 10 (6), 333-339.
- Lucci, L., F. Patrignani, N. Belletti, M. Ndagijimana, M. E. Guerzoni, F. Gardini and R. Lanciotti (2007) Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 2: Evaluation of their effects on sensory quality and biogenic amine content, *Meat Science* 75 (4), 669-675.
- Mansour, S., J. M. Beckerich and P. Bonnarme (2008) Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*, *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21), 6505-6512.
- Martinez-Espinoza, A. D., J. Ruiz-Herrera, C. G. Leon-Ramirez and S. E. Gold (2004) MAP kinase and CAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*, *Current Microbiology* 49 (4), 274-281.
- Mathews, C. K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2002) *Bioquimica*,
-

- 
- McCullough, W. R., CF (1974) The role of malic enzyme in *Aspergillus nidulans*, *Febs Letters* 41 (2), 238-242.
- McMurrou, I. and A. H. Rose (1971) Effects Of Temperature Variation On Fatty Acid Composition Of *Candida-Utilis*, *Journal Of Bacteriology* 107 (3), 753-&.
- Medentsev, A. G., A. Y. Arinbasarova, N. P. Golovchenko and V. K. Akimenko (2002) Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway, *Fems Yeast Research* 2 (4), 519-524.
- Meesters, P., G. N. M. Huijberts and G. Eggink (1996a) High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycérol as a carbon source, *Applied Microbiology And Biotechnology* 45 (5), 575-579.
- Meesters, P., H. vanderWal, R. Weusthuis and G. Eggink (1996b) Cultivation of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* in a new reactor with improved mixing and mass transfer characteristics (Surer(R)), *Biotechnology Techniques* 10 (4), 277-282.
- Meng, X., J. M. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. J. Nie and M. Xian (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renewable Energy* 34 (1), 1-5.
- Metting, F. B. (1996) Biodiversity and application of microalgae, *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17 (5-6), 477-489.
- Miall, L. P., GF (1974) Citric acid production, British Patent (Pfizer limited), 1 369 295.
- Milsom, P. M., JL (1985) Citric acid, In: *Moo-Young, M (Ed), Comprehensive Biotechnology. Pergamon Press Ltd.* 3 665-680.
- Minard, K. I. and L. McAlisterhenn (1991) Isolation, nucleotide-sequence analysis, and disruption of the *mdh2* gene from *saccharomyces-cerevisiae* - evidence for 3 isozymes of yeast malate-dehydrogenase, *Molecular and Cellular Biology* 11 (1), 370-380.
- Mishina, M., T. Kamiryo, A. Tanaka, S. Fukui and S. Numa (1976a) Acetyl-coenzyme-a carboxylase of *candida-lipolytica*.1. purification and properties of enzyme, *European Journal of Biochemistry* 71 (1), 295-300.
- Mishina, M., T. Kamiryo, A. Tanaka, S. Fukui and S. Numa (1976b) Acetyl-coenzyme-a carboxylase of *candida-lipolytica*.2. regulation of cellular content and synthesis of enzyme, *European Journal of Biochemistry* 71 (1), 301-308.
- Mishina, M., Kamiryo, T., Numa, S. (1971) Acetyl-CoA carboxylase from *Candida lipolytica*, *Methods In Enzymology* 71 37-39.
- Moeller, L., B. Strehlitz, A. Aurich, A. Zehnsdorf and T. Bley (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *Engineering In Life Sciences* 7 (5), 504-511.
- Morgunov, I. G., S. V. Kamzolova, A. P. Sokolov and T. V. Finogenova (2004a) The isolation, purification, and some properties of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase from the organic acid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*, *Microbiology* 73 (3), 249-254.
- Morgunov, I. G., N. Y. Solodovnikova, A. A. Sharyshev, S. V. Kamzolova and T. V. Finogenova (2004b) Regulation of NAD(+)-Dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochemistry-Moscow* 69 (12), 1391-1398.
- Mullinax, T. R., J. N. Mock and J. H. Harrison (1982) Regulation of malate-dehydrogenase activity by citrate, *Federation Proceedings* 41 (4), 1141-1141.
- Nagai, J., H. Katsuki, Nishikaw.Y, I. Nakamura, T. Kamihara and S. Fukui (1974) Effects Of Thiamine And Pyridoxine On Content And Composition Of Sterols In *Saccharomyces-Carlsbergensis* 4228, *Biochemical And Biophysical Research Communications* 60 (2), 555-560.
- 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 Research* 2 (3), 371-379.
- Nikawa, J., T. Kodaki and S. Yamashita (1987) Primary structure and disruption of the phosphatidylinositol synthase gene of *saccharomyces-cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry* 262 (10), 4876-4881.
-

- 
- Obermayer, M. and F. Lynen (1976) Structure of biotin enzymes, *Trends in Biochemical Sciences* 1 (8), 169-171.
- Ochoa, S. (1955a) Malic Dehydrogenase From Pig Heart, *Methods In Enzymology* 1 735-739.
- Ochoa, S. (1955b) Malic Enzyme, *Methods In Enzymology* 1 739-753.
- Onodera, J. and Y. Ohsumi (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation, *Journal Of Biological Chemistry* 280 (36), 31582-31586.
- Paalme, T., R. Elken, R. Vilu and M. Korhola (1997) Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat), *Enzyme And Microbial Technology* 20 (3), 174-181.
- Paalme, T., A. Kahru, R. Elken, K. Vanatalu, K. Tiisma and R. Vilu (1995) The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat), *Journal Of Microbiological Methods* 24 (2), 145-153.
- Pan, J. G., M. Y. Kwak and J. S. Rhee (1986) High-Density Cell-Culture Of *Rhodotorula-Glutinis* Using Oxygen-Enriched Air, *Biotechnology Letters* 8 (10), 715-718.
- Papanikolaou, S. (1998) Etude du comportement physiologique d'une souche de *Yarrowia lipolytica* en croissance sur des co-produits industriels: production orientée des lipides cellulaires,
- Papanikolaou, S. and G. Aggelis (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycérol in a single-stage continuous culture, *Bioresource Technology* 82 (1), 43-49.
- Papanikolaou, S., I. Chevalot, M. Komaitis, G. Aggelis and I. Marc (2001) Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* 80 (3-4), 215-224.
- Papanikolaou, S., I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc and G. Aggelis (2002a) Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures, *Applied Microbiology And Biotechnology* 58 (3), 308-312.
- Papanikolaou, S., M. Galiotou-Panayotou, I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc and G. Aggelis (2006) Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*, *Current Microbiology* 52 (2), 134-142.
- Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2002b) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycérol, *Journal Of Applied Microbiology* 92 (4), 737-744.
- Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis and I. Marc (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues, *Current Microbiology* 46 (2), 124-130.
- Park, W. S., P. A. Murphy and B. A. Glatz (1990) Lipid-Metabolism And Cell Composition Of The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum* Grown At Different Carbon To Nitrogen Ratios, *Canadian Journal Of Microbiology* 36 (5), 318-326.
- PereiraMeirelles, F. V., M. H. M. RochaLeao and G. L. S. Anna (1997) A stable lipase from *Candida lipolytica* - Cultivation conditions and crude enzyme characteristics, *Applied Biochemistry And Biotechnology* 63-5 73-85.
- Perez-Campo, F. M. and A. Dominguez (2001) Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*, *Current Microbiology* 43 (6), 429-433.
- Petit, T. and C. Gancedo (1999) Molecular cloning and characterization of the gene HXK1 encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 15 (15), 1573-1584.
- Pfitzner, A., C. P. Kubicek and M. Rohr (1987) Presence and regulation of atp - citrate lyase from the citric-acid producing fungus *aspergillus-niger*, *Archives of Microbiology* 147 (1), 88-91.
- Picataggio, S. K., Smittle, R.B. (1979) Microbiological production of oil, *European Patent Convention EP 5277 A2 19791114*
-

- 
- Poilpre, E., D. Tronquit, G. Goma and V. Guillou (2002) On-line estimation of biomass concentration during transient growth on yeast chemostat culture using light reflectance, *Biotechnology Letters* 24 (24), 2075-2081.
- Polson, A., G. M. Potgieter, J. F. Largier, F. J. Joubert and G. E. F. Mears (1964) Fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight, *Biochimica Et Biophysica Acta* 82 (3), 463-&.
- Posten, C. and G. Schaub (2009) Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view, *Journal Of Biotechnology* 142 (1), 64-69.
- Rane, K. D. and K. A. Sims (1993) Production Of Citric-Acid By *Candida-Lipolytica*-Y1095 - Effect Of Glucose-Concentration On Yield And Productivity, *Enzyme And Microbial Technology* 15 (8), 646-651.
- Ratledge, C. (1968) Production Of Fatty Acids And Lipid By A *Candida* Sp Growing On A Fraction Of N-Alkanes Predominating In Tridecane, *Biotechnology And Bioengineering* 10 (4), 511-&.
- Ratledge, C. (1989) Microbial Routes To Lipids, *Biochemical Society Transactions* 17 (6), 1139-1141.
- Ratledge, C. (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, *Biochemical Society Transactions* 30 1047-1050.
- Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production, *Biochimie* 86 (11), 807-815.
- Ratray, J. B. M., A. Schibeci and D. K. Kidby (1975) LIPIDS OF YEASTS, *Bacteriological Reviews* 39 (3), 197-231.
- Rau, U., L. A. Nguyen, H. Roeper, H. Koch and S. Lang (2005) Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 68 (5), 607-613.
- Rodrigues, G. and C. Pais (2000) The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Food Technology And Biotechnology* 38 (1), 27-32.
- Rose, A. H. (1989) in *Microbial Lipids*. Ratledge, C. and Wilkinson, S.C. 255-279.
- Ruiz-Herrera, J. and R. Sentandreu (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, *Archives Of Microbiology* 178 (6), 477-483.
- Rupcic, J. and V. Maric (2004) Cerebrosides of *Candida lipolytica* yeast, *Applied Microbiology And Biotechnology* 64 (3), 416-420.
- Rymowicz, W., A. Rywinska and B. Zarowska (2007) Biosynthesis of citric acid from crude glycérol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations, *Journal Of Biotechnology* 131 (2), S149-S150.
- Rywinska, A., P. Juszczak, M. Wojtatowicz and W. Rymowicz (2011) Chemostat study of citric acid production from glycérol by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Biotechnology* 152 (1-2), 54-57.
- Samori, C., C. Torri, G. Samori, D. Fabbri, P. Galletti, F. Guerrini, R. Pistocchi and E. Tagliavini (2010) Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents, *Bioresource Technology* 101 (9), 3274-3279.
- Sandager, L., M. H. Gustavsson, U. Stahl, A. Dahlqvist, E. Wiberg, A. Banas, M. Lenman, H. Ronne and S. Stymne (2002) Storage lipid synthesis is non-essential in yeast, *Journal Of Biological Chemistry* 277 (8), 6478-6482.
- Sattur, A. P. and N. G. Karanth (1989) Production Of Microbial Lipids.3. Influence Of C/N Ratio - Experimental-Observations, *Biotechnology And Bioengineering* 34 (6), 872-874.
- Saxena, V., C. D. Sharma, S. D. Bhagat, V. S. Saini and D. K. Adhikari (1998) Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 75 (4), 501-505.
- Schweizer, E. and J. Hofmann (2004) Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems, *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 68 (3), 501-+.
-

- 
- Sergeeva, Y. E., L. A. Galanina, D. A. Andrianova and E. P. Feofilova (2008) Lipids of filamentous fungi as a material for producing biodiesel fuel, *Applied Biochemistry And Microbiology* 44 (5), 523-527.
- Sinigaglia, M., R. Lanciotti and M. E. Guerzoni (1994) Biochemical And Physiological-Characteristics Of *Yarrowia-Lipolytica* Strains In Relation To Isolation Source, *Canadian Journal Of Microbiology* 40 (1), 54-59.
- Solaiman, D. K. Y., R. D. Ashby, A. Nunez and T. A. Foglia (2004) Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate, *Biotechnology Letters* 26 (15), 1241-1245.
- Solovchenko, A. E., I. Khozin-Goldberg, S. Didi-Cohen, Z. Cohen and M. N. Merzlyak (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*, *Journal Of Applied Phycology* 20 (3), 245-251.
- Sorger, D. and G. Daum (2003) Triacylglycerol biosynthesis in yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (4), 289-299.
- Srere, P. A. (1962) Citrate-Cleavage Enzyme, *Methods In Enzymology* 5 641-644.
- Srere, P. A. (1975) Enzymology of formation and breakdown of citrate, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 43 57-101.
- Srere, P. A. and F. Lipmann (1953) An enzymatic reaction between citrate, adenosine triphosphate and coenzyme-a, *Journal of the American Chemical Society* 75 (19), 4874-4874.
- Steinbuechel, A. and B. Fuchtenbusch (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trends In Biotechnology* 16 (10), 419-427.
- Suomalainen, H. a. O., E. (1971) Yeast nutrition and solute uptake, in A. H. Rose and J.S. Harrison (ed). *The yeasts. Academic press Inc. New York* 2 3-74.
- Szabo, R. and V. Stofanikova (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*, *Fems Microbiology Letters* 206 (1), 45-50.
- Tahoun, M., O. Shata, R. Mashaley and S. Aboudonia (1986) Influence Of Selected Sugars And Temperature On Fatty-Acids Composition In *Candida-Lipolytica*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 24 (3), 235-239.
- Treichel, H., D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio and J. V. Oliveira (2010) A Review on Microbial Lipases Production, *Food and Bioprocess Technology* 3 (2), 182-196.
- Turcotte, G. and N. Kosaric, "Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts," in "Bioprocesses and Engineering," 73, (1989).
- Uthoff, S., D. Broker and A. Steinbuechel (2009) Current state and perspectives of producing biodiesel-like compounds by biotechnology, *Microbial Biotechnology* 2 (5), 551-565.
- Venter, T., J. L. F. Kock, P. J. Botes, M. S. Smit, A. Hugo and M. Joseph (2004) Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil, *Systematic And Applied Microbiology* 27 (2), 135-138.
- Volpe, J. J. and P. R. Vagelos (1976) Mechanisms And Regulation Of Biosynthesis Of Saturated Fatty-Acids, *Physiological Reviews* 56 (2), 339-417.
- Waite, M. and S. J. Wakil (1962) Studies on mechanism of fatty acid synthesis.12. acetyl coenzyme a carboxylase, *Journal of Biological Chemistry* 237 (9), 2750-&.
- Wang, H. J. J., M. T. Le Dall, Y. Wache, 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*, *Journal Of Bacteriology* 181 (17), 5140-5148.
- Weitzel, G., U. Pilatus and L. Rensing (1987) The Cytoplasmic Ph, Atp Content And Total Protein-Synthesis Rate During Heat-Shock Protein Inducing Treatments In Yeast, *Experimental Cell Research* 170 (1), 64-79.
- Whitworth, D. A. and C. Ratledge (1975) Analysis of intermediary metabolism and its control in a fat-synthesizing yeast (*candida-107*) growing on glucose or alkanes, *Journal of General Microbiology* 88 (JUN), 275-288.
-

- 
- Wickerha.Lj, C. P. Kurtzman and A. I. Herman (1970) SEXUAL REPRODUCTION IN CANDIDA LIPOLYTICA, *Science* 167 (3921), 1141-&.
- Witters, L. A. and T. D. Watts (1990) Yeast acetyl-coa carboxylase - invitro phosphorylation by mammalian and yeast protein-kinases, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 169 (2), 369-376.
- Xu, D. B., C. P. Madrid, M. Rohr and C. P. Kubicek (1989) The Influence Of Type And Concentration Of The Carbon Source On Production Of Citric-Acid By *Aspergillus-Niger*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 30 (6), 553-558.
- Yalcin, H. T. and F. B. Ucar (2009) Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses, *Annals Of Microbiology* 59 (3), 477-483.
- Yalcin, S. K., M. T. Bozdemir and Z. Y. Ozbas (2009) A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media, *Indian Journal of Biotechnology* 8 (4), 408-417.
- Yamagami, S., T. Iida, Y. Nagata, A. Ohta and M. Takagi (2001) Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for n-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochemical And Biophysical Research Communications* 282 (3), 832-838.
- Yamauchi, H., H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu (1983) Mass-Production Of Lipids By *Lipomyces-Starkeyi* In Microcomputer-Aided Fed-Batch Culture, *Journal Of Fermentation Technology* 61 (3), 275-280.
- Yarrow, D. (1972) 4 New Combinations In Yeasts, *Antonie Van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology And Serology* 38 (3), 357-&.
- Ykema, A., M. M. Kater and H. Smit (1989) Lipid Production In Wheypermeate By An Unsaturated Fatty-Acid Mutant Of The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum*, *Biotechnology Letters* 11 (7), 477-482.
- Ykema, A., E. C. Verbree, M. M. Kater and H. Smit (1988) Optimization Of Lipid Production In The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum* In Whey-Permeate, *Applied Microbiology And Biotechnology* 29 (2-3), 211-218.
- Yoon, S. H. and J. S. Rhee (1983) Lipid From Yeast Fermentation - Effects Of Cultural Conditions On Lipid Production And Its Characteristics Of *Rhodotorula-Glutinis*, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 60 (7), 1281-1286.
- Zhang, Y., I. P. Adams and C. Ratledge (2007) Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation, *Microbiology-Sgm* 153 2013-2025.
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H., Zhao, Z.K. (2010) Lipid production by *Rhodospirium turolloides* Y4 using different substrate feeding strategies, *Indian Journal of Biotechnology*
- Zinjarde, S. S. and A. A. Pant (2002) Hydrocarbon degraders from tropical marine environments, *Marine Pollution Bulletin* 44 (2), 118-121.
- Zink, M. W. and J. S. Katz (1973) Malic Enzyme Of *Fusarium-Oxysporum*, *Canadian Journal Of Microbiology* 19 (10), 1187-1196.