HAL
open science

Etude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure Yarrowia lipolytica au niveau pariétal

Cynthia Romero Guido

To cite this version:

Cynthia Romero Guido. Etude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure Yarrowia lipolytica au niveau pariétal. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS022 . tel-00825481

HAL Id: tel-00825481

https://theses.hal.science/tel-00825481v1

Submitted on 23 May 2013

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

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

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Institut National Supérieur des Sciences Agronomiques de l'Alimentation et de l'Environnement, AGROSUP Dijon

École Doctorale Environnements, Santé, STIC (E2S)

THÈSE

« Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure *Yarrowia lipolytica* au niveau pariétal »

Présentée et soutenue publiquement
le 19 avril 2012 par

Cynthia ROMERO GUIDO

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : **Sciences de l'Alimentation**
Options : **Biotechnologie, Biochimie Microbienne, Microbiologie**

Membres du jury :

Sabine Fillinger	CR, INRA, AgroParis Tech	Rapporteur
Jean-Marie Fraçois	Pr, INSA, Université de Toulouse	Rapporteur
Yves Waché	MCF, AgroSup Dijon, UB	Directeur de thèse
Jean-Marc Nicaud	DR, CNRS, Institut MICALIS	Examinateur
Jean-François Cavin	Pr, AgroSup Dijon, UB	Examinateur
Hélène Licandro-Seraut	Dr, Institut Pasteur	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires devenu pendant cette période le Laboratoire des Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR AgroSup Dijon) dirigé par Patrick Gervais.

Cette thèse a été financée par l'Agence Nationale de Recherche (ANR), le Programme Alβan, Programme de bourses de haut niveau de l'Union Européenne pour l'Amérique Latine (Code Alβan : E07D404079MX) et le Conseil National de Science et Technologie (CONACyT) du Mexique (No. de registre : 188320)

Tout d'abord, j'exprime ma gratitude au Dr Yves Waché pour avoir encadré mes travaux de thèse. Yves, merci infiniment pour les connaissances scientifiques que tu m'as apportées, pour la confiance, le soutien et l'encouragement que j'ai toujours reçus de ta part. Merci aussi pour avoir partagé avec moi ta musique, ta bonne humeur et tes qualités humaines desquelles j'ai beaucoup appris.

Je remercie Mr Patrick Gervais pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son soutien.

Je remercie les Professeurs Sabine Fillinger (INRA, Versailles) et Jean-Marie François (INSA, Toulouse) pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également les docteurs Jean-Marc Nicaud (INRA, Grignon), Jean-François Cavin (UMR AgroSup Dijon) et Hélène Licandro-Seraut (Institut Pasteur, Paris) d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie pour tous vos conseils scientifiques et tous vos apports pour enrichir et améliorer ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Mr Jean-François Cavin pour son soutien et ses conseils scientifiques et pour m'avoir aidée à obtenir la bourse CONACyT pour finir mes études de thèse.

Je remercie le Dr Hélène Licandro-Seraut pour m'avoir appris la technique de RT-PCR en temps réel, pour son aide, ses conseils scientifiques et sa gentillesse.

Je remercie le Dr. Jorge Luis Folch Mallol pour son soutien inconditionnel et les discussions scientifiques au sujet de ma thèse.

Je remercie Mr Joël Michel pour les travaux de microscopie électronique et pour m'avoir formée à ce sujet. Je remercie également Mme Jeannine Lherminier pour ses conseils scientifiques sur cette technique de microscopie.

Je remercie le Dr Thomas Karbowiak pour m'avoir formée à l'utilisation d'IRTF et le Dr Yann Roche pour m'avoir formée à l'utilisation du microscope confocal. Merci à tous les deux pour leurs conseils scientifiques.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe GPMA. Christine pour son travail administratif et technique. Également Dominique, Erandi, Hanh, Ngoc Ta, Hoa, Thi, Jean-François Ritt, Célia, Hélène Scornec, Bao Ngoc, Dat et Nhi avec qui j'ai travaillé dans une ambiance cordiale et agréable.

Merci à mon stagiaire Diariètou Diop pour ses précieux résultats et pour avoir eu le courage de travailler avec moi même si j'étais en fin de thèse.

Merci aussi à mes amis et collègues vietnamiens Hanh, Hue, Bao, Dat, Ngoc, Dang et Anh Quan pour avoir partagé avec moi l'expérience de réaliser la thèse en France, pour leur sincère amitié, les bons moments ensemble et pour leurs beaux sourires.

Merci à la famille Waché pour tous ces dimanches de beau temps chez eux autour de grands repas et de belles balades dans les vignes de Vougeot. Je garde de très beaux souvenirs de vous tous !

Je remercie Mme Christiane Mahfouf qui a eu la gentillesse de lire cette thèse et de corriger les fautes de Français.

Merci à mes amis Martin et Cécile, Erandi, à la famille Gómez Márquez, Jacky et Ricardo, Christina, Marian, Arnaud, et à mes voisins de la résidence Bossuet : Caroline, Maguida, Tatiana, Lucian et Zoheir. À eux tous pour leur accueil chaleureux, leur sincère amitié et pour m'avoir encouragée dans les moments difficiles. J'exprime mon affection !

Je dédie ce travail :

Avec beaucoup d'admiration à mes parents qui m'ont guidée avec sagesse et amour. Grâce à eux j'ai eu l'opportunité de faire de grandes études et de vivre des expériences merveilleuses. Merci infiniment !

Avec tout mon amour à mon mari qui m'a soutenue et encouragée énormément. Grâce à lui je garde le sourire et je tiens debout même loin de chez moi. Le plus grand merci à toi !

Avec beaucoup d'affection à ma sœur, à mes deux frères et à leurs familles respectives qui sont toujours à mes côtés pour m'encourager et partager avec moi leur bonheur.

Avec gratitude et affection à tous les membres des familles Pajuelo, Nourdin, Milleron et Dieu pour m'avoir accueillie dans une ambiance familiale et chaleureuse.

Etude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure *Yarrowia lipolytica* au niveau pariétal

Résumé :

Yarrowia lipolytica a la particularité de pousser sur de nombreux substrats hydrophobes et de les métaboliser via la β-oxydation ou de les stocker dans des corps lipidiques. Le premier contact entre la cellule et les substrats hydrophobes se déroule sur la surface cellulaire. A cette étape, la composition de la paroi cellulaire en protéines, en β-glucane et en chitine pourrait jouer un rôle important sur l'adhésion et la prise en charge des substrats hydrophobes. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'effet d'une source de carbone hydrophobe (par rapport au glucose) et de la composition du milieu de culture sur la structure pariétale et la production de mélanine chez *Y. lipolytica*.

Les résultats de nos analyses biochimiques et moléculaires ont montré que l'oléate de méthyle (un composé utilisé comme modèle de source de carbone hydrophobe) a induit des modifications au niveau de la paroi cellulaire et que ces modifications ont conduit ou non à l'adhésion de gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire ; à une modification du contenu des composés parietaux ; à la résistance des cellules à des composés toxiques ayant pour cible la paroi cellulaire ; et à la modification des profils d'expression de 27 gènes analysés codant des protéines de paroi cellulaire. Certains de ces gènes sont surexprimés depuis les premières heures de culture en présence d'oléate de méthyle. L'identité des gènes surexprimés suggère la participation de leurs protéines dans l'intégrité de la paroi cellulaire, dans l'adhésion des gouttelettes lipidiques et dans la réponse au stress par l'oléate de méthyle et/ou le manque d'azote.

Nos résultats ont aussi montré que la présence d'oléate de méthyle, huile de ricin et ricinoléate de méthyle a induit la production d'un pigment marron chez une souche

génétiquement modifiée de *Y. lipolytica* (MTLY40-2p) dont la β-oxydation est affectée. Dans ce travail de thèse, nous avons observé que cette souche mutante productrice du pigment marron présente aussi quelques modifications pariétales par rapport à la souche sauvage. Nos résultats suggèrent que le pigment marron est de la DHN-mélanine et que la biosynthèse de cette mélanine est affectée par l'absence de peptone dans le milieu de culture. D'après une analyse *in silico* nous proposons les gènes potentiels de la voie DHN-mélanine chez *Y. lipolytica*.

Mots-clés : *Yarrowia lipolytica*, substrats hydrophobes, gouttelettes lipidiques, paroi cellulaire, protéines de la paroi cellulaire, DHN-mélanine.

Physiological study and molecular mechanisms for the uptake of hydrophobic substrates by the yeast *Yarrowia lipolytica* at the cell wall level

Abstract:

Yarrowia lipolytica can grow on many hydrophobic substrates and metabolize them via the β-oxidation pathway or store them into lipid bodies. The first contact between the cell and the hydrophobic substrates is by the cell wall. In this step, cell-wall proteins (CWP), β-glucane and chitin of the cell wall could play an important role for the adhesion and uptake of hydrophobic substrates. The aim of this work was to study the effect of a hydrophobic carbon source (compared with glucose) and the culture medium composition on the cell wall composition and the melanin production by *Y. lipolytica*. The results of our biochemical and molecular analysis showed that the presence of methyl oleate and the nutrients composition of the culture media have induced some modifications at the cell wall level. These modifications were linked with the adhesion or not of the lipid droplets to the cell surface; with a modified content of the cell wall components; with a resistance to compounds that are toxic for the cell wall, and with the modification of the expression patterns of 27 CWP genes analyzed in this work. Some of these genes were over-expressed since the first hours of culture in the presence of methyl oleate. The identity of the over-expressed CWP genes suggests the participation of their proteins in the cell wall integrity, in the adhesion of lipid droplets and in the stress response to methyl oleate and/or the nitrogen starvation.

Our results have also shown that the presence of the lipids methyl oleate, castor oil and methyl ricinoleate induced the production of a brown pigment by a mutant strain in which the β-oxidation is affected. In this work, we have observed that the mutant strain also presented some cell wall modifications that were not observed in the wild type strain. Our results suggest that the brown pigment is DNH-melanin and that its biosynthesis is affected by the

absence of peptone in the culture medium. By an *in silico* analysis we propose the putative genes involved in the DHN-melanin pathway in a *Y. lipolytica*.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, hydrophobic substrates, lipid droplets, cell wall, cell-wall proteins (CWP), DHN-melanin.

Estudio de los mecanismos fisiológicos y moleculares que permiten la toma de substratos hidrofóbicos a través de la pared celular de la levadura *Yarrowia lipolytica*.

Resumen:

Yarrowia lipolytica tiene la capacidad de crecer sobre numerosos substratos hidrofóbicos y de metabolizarlos a través de la β-oxidación o de almacenarlos en cuerpos lipídicos. El primer contacto entre la célula y los substratos hidrofóbicos se lleva a cabo mediante la pared celular. En esta etapa, la composición en proteínas, β-glucano y quitina de la pared celular podría jugar un papel importante en la adhesión y la toma de substratos hidrofóbicos. En el presente trabajo se estudió el efecto de una fuente de carbono hidrofóbica (en comparación con glucosa) y la composición del medio de cultivo sobre la composición de la pared celular y la producción de melanina en *Y. lipolytica*.

Los resultados de nuestros análisis bioquímicos y moleculares mostraron que el oleato de metilo (un compuesto utilizado como fuente de carbono hidrofóbica) indujo modificaciones en la pared celular y estas modificaciones condujeron al aumento o la disminución de la adhesión de gotas lipídicas a la superficie celular; a la modificación del contenido de los compuestos de la pared celular; a la resistencia de las células a compuestos tóxicos que tienen como blanco la pared celular; y a la modificación del perfil de expresión de 27 genes que codifican para proteínas putativas de la pared celular. La expresión de algunos de estos genes se indujo desde las primeras horas de cultivo en presencia de oleato de metilo. La identidad de los genes sobre-expresados sugiere la participación de sus proteínas en mecanismos como la integridad de la pared celular, la adhesión de las gotas lipídicas a la superficie celular y la respuesta a estrés inducido por oleato de metilo y/o por la falta de nitrógeno en el medio.

Nuestros resultados también mostraron que la presencia de oleato de metilo, de aceite de ricino y de ricinoleato de metilo en el medio de cultivo, indujo la producción de un pigmento

café en una cepa mutante de *Y. lipolytica* (MTLY40-2p) afectada en la β-oxidación. Además observamos que el perfil espectroscópico la pared celular de la mutante MTYL40-2p, se modifica en función del substrato hidrofóbico presente en el medio de cultivo. Nuestros resultados sugieren que el pigmento café es DHN-melanina y que la ausencia de peptona en el medio de cultivo afecta la biosíntesis de esta melanina. A partir de un análisis *in silico* proponemos los genes putativos para la biosíntesis de DHN-melanina en *Y. lipolytica*.

Palabras clave: *Yarrowia lipolytica*, substratos hidrofóbicos, gotas lipídicas, pared celular, proteínas de pared celular, DHN-melanina.

LISTE DES ABREVIATIONS

A_{260}, A_{280}, A_{600} :	Absorbance à 260, 280 et 600 nm
ACT1 :	Gène codant l'actine
Aox :	Acyl-Coenzyme A oxydase
ATR-FTIR :	FTIR à réflectance total atténuée
BLASTp :	Basic Local Alignment Sequence Tool protein
CFW :	Calcofluor blanc
CR :	Rouge Congo
CW :	Paroi cellulaire
CWI :	Intégrité de la paroi cellulaire
CWP :	Protéine de paroi cellulaire
FTIR :	Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier
g :	Accélérations
GC :	Chromatographie en phase gazeuse
GPI :	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HCl :	Acide chlorhydrique
HGA :	Acide homogentisique
HS :	Substrat(s) hydrophobe(s)
LB :	Corps lipidiques
LD :	Gouttelettes lipidiques
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MATH :	Test de l'Adhésion Microbienne à l'hexadécane
MO :	Oléate de méthyle
NR :	Rouge Nile
ORF :	Phase de lecture ouverte
PATAg :	Periodic Acid-Thiocarbaside-Protéinate d'Argent
PB :	Tampon de phosphate
PBS :	Tampon de phosphate salin
PIR :	Protéine avec des répétitions internes
POX2 :	Gène codant l'acyl-Coenzyme A oxydase 2
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel

RE :	Réticulum endoplasmique
rpm :	Rotations par minute
TAG :	Triacylglycérol
SE :	Ester de stéryle
TEM :	Microscopie Electronique de Transmission
TFs :	Facteurs de transcription
TFBS :	Site d’union pour facteur de transcription
YNB :	Yeast Nitrogen Base

1. AVANT PROPOS ……. **1**

2. INTRODUCTION……. **2**

2.1 Généralités sur la levure *Yarrowia lipolytica* …… **2**

2.1.1 Taxonomie ……..... **2**

2.1.2 Physiologie et habitat……... **2**

2.1.3 Caractéristiques génomiques…….. **3**

2 .1.4 Outils génétiques…… **4**

2.2 La paroi cellulaire des levures ……... **4**

2.2.1 Composition et organisation de la paroi cellulaire……..... **4**

2.3 Adaptation de la paroi cellulaire à des conditions externes……. **10**

2.4 Assimilation et bioconversion de substrats hydrophobes par *Y. lipolytica*……. **10**

2.4.1 La prise en charge et le catabolisme des substrats hydrophobes …….. **10**

2.4.1.1 Internalisation des substrats hydrophobes …….. **13**

2.4.1.2 La β-oxydation chez Yarrowia lipolytica …… **14**

2.4.2 Les lactones ……..... **16**

2.4.2.1 Biosynthèse et dégradation de lactone par Y. lipolytica : rôle des acyl-CoA oxydases……. **17**

2.4.2.2 **MINI-REVIEW :** *Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds*…… **19**

2.5 La mélanine chez les champignons ……... **32**

2.5.1 Voies de synthèse de la mélanine chez les champignons ……..... **33**

2.5.1.1 La voie DHN-mélanine……. **33**

2.5.1.2 La voie pyomélanine……. **34**

2.5.1.3 La voie DOPA-mélanine……... **35**

3. PROBLÉMATIQUE…….. **36**

3.1 OBJECTIF……... **36**

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES…….. **38**

4.1 Souches de levure……. **38**

4.2 Milieux de culture et conditions de croissance…….. **38**

4.2.1 Activation des souches et pré-culture…….. **40**

4.2.2 Culture des souches……. **40**

4.3 Microscopie Confocal de Fluorescence et marquage des cellules……... **41**

4.4 Microscopie Electronique de Transmission (TEM)……. **42**

4.5 Essais de sensibilité au calcofluor blanc et au rouge Congo…… **42**
4.6 Test de l'Adhésion Microbienne à l'hexadécane (MATH)…….. **43**
4.7 Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques chez les souches W29 et MTLY37……. **43**
4.8 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)……. **44**
4.9 PCR quantitative en Temps Réel……... **44**
4.9.1 Extraction et électrophorèse d'ARN…… **45**
4.9.2 Traitement à la DNAse…… **45**
4.9.3 Contrôle du traitement à la DNase……. **46**
4.9.4 Synthèse d'ADNc……. **46**
4.9.5 PCR quantitative……. **46**
5. RÉSULTATS……. **48**
CHAPITRE I. Analyse des modifications pariétales et de l'expression des gènes de paroi cellulaire en présence d'oléate de méthyle, un modèle de substrat hydrophobe……. **48**
Publication 1: *Analysis of cell wall modifications and CWP genes transcription in Yarrowia lipolytica under hydrophobic growth conditions*…… **49**
5.1 Résultats complémentaires I…….. **71**
5.1.1 Cinétiques d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire……... **71**
5.1.2 Cinétiques d'expression des gènes de paroi cellulaire spécifiquement induits dans le milieu YNBO……. **74**
5.1.3 Discussion et conclusion……. **75**
5.2 Résultats complémentaires II…….. **78**
5.2.1 Analyses in silico des CWP putatives de Y. lipolytica……. **78**
5.2.1.1 Motifs caractéristiques des protéines pariétales trouvées dans les CWP putatives de Y. lipolytica…… **78**
5.2.1.2 Alignements multiples des CWP putatives de Y. lipolytica avec des CWP d'autres champignons……... **81**
CHAPITRE II. Biosynthèse de mélanine lors de la production de lactone par *Yarrowia lipolytica*, lien avec le métabolisme des lipides…… **93**
Publication 2: *Coupled phase distribution of γ-decalactone and melanin, produced by lactone-degrading or non-degrading Yarrowia lipolytica strains*..... **94**
5.3 Résultats complémentaires III…… **110**

5.3.1 Identification de gènes putatifs de la voie DHN-mélanine chez Yarrowia lipolytica…… **110**

5.3.2 Analyse des protéines putatives de la voie DHN-mélanine chez Yarrowia lipolytica…… **111**

5.3.3 Conclusion……... **117**

6. DISCUSSION GÉNÉRALE……. **118**

6.1 Modifications de la paroi cellulaire en présence d'oléate de méthyle : implications dans l'adhésion de gouttelettes lipidiques……... **118**

6.2 Expression de gènes codant des CWP de *Y. lipolytica* en présence d'oléate de méthyle…….. **119**

6.3 Réponse au stress de la paroi cellulaire et biosynthèse de mélanine chez *Y. lipolytica*……..... **120**

7. CONCLUSION…….. **123**

8. PERSPECTIVES…….. **125**

9. BIBLIOGRAPHIE…… **128**

Liste de Figures

Figure 1. Schéma de la paroi cellulaire chez les levures……... **5**

Figure 2. Résidus de D-glucose……. **6**

Figure 3. Structure d'une ancre GPI…….. **8**

Figure 4. Schéma de la synthèse et du transport de protéines GPI……. **9**

Figure 5. Représentation schématique de l'assimilation des substrats hydrophobes chez *Y. lipolytica*…… **12**

Figure 6. Présence de protrusions à la surface cellulaire de *Y. lipolytica*…….. **14**

Figure 7. Voie de la β-oxydation chez *Y. lipolytica*……... **15**

Figure 8. Représentation schématique de la sélectivité des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica*……... **16**

Figure 9. Structure et formation de la γ-lactone et la δ-lactone…….. **17**

Figure 10. Voie de biosynthèse de DHN-mélanine chez *Aspergillus fumigateurs*…… **34**

Figure 11. Voie de biosynthèse de pyomélanine chez les champignons……... **34**

Figure 12. Voie de biosynthèse de DOPA-mélanine chez les champignons……. **35**

Figure 13. Schéma représentant trois exemples de procédés biotechnologiques réalisés par *Y. lipolytica*……... **37**

Figure I.14. Adherence and accumulation of fatty acids in *Y.lipolytica*……... **56**

Figure I.15. Transmission electron micrographs of *Y. lipolytica*……... **57**

Figure I.16. Susceptibility of *Y. lipolytica* to calcofluor white and Congo red…….. **57**

Figure I.17. Analysis of the yeast cell surface by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy……. **58**

Figure I.18. Expression patterns of CWP coding genes in *Y. lipolytica* W29 grown in methyl oleate containing media…… **63**

Figure 19. Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire chez

la souche sauvage W29 de *Y. lipolytica*……. **72**

Figure 20. Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface celullaire chez la souche mutante MTLY37 de *Y. lipolytica*…… **73**

Figure 21. Expression de sept gènes codant pour des protéines putatives de paroi cellulaire de *Y. lipolytica* à 1 h et 5 h d'induction en présence d'oléate de méthyle……... **75**

Figure 22. Alignement multiple de protéines pariétales de type Cwp……... **82**

Figure 23. Alignement multiple de protéines de type Pir……... **83**

Figure 24. Alignement multiple de protéines de type Tos avec fonction de β-1,3-glucanase permuté…… **84**

Figure 25. Alignement multiple de protéines de type Crh avec fonction de β-1,3-glycosidase…. **85**

Figure 26. Alignement multiple de protéines de type Gas avec fonction de β-1,3-glucanosyltransférase …… **86**

Figure 27. Alignement multiple de protéines de type Plb avec fonction de phospholipase B… **87**

Figure 28. Alignement multiple de protéines de type Ecm33…… **88**

Figure II.29. γ-Decalactone accumulation in the culture medium during the culture of *Yarrowia lipolytica* MTLY36-2P (squares) and MTLY40-2P (lozenges) strains..... **99**

Figure II.30. Production of pigment by *Yarrowia lipolytica* in different oily culture media..... **100**

Figure II.31. Absorbance of the lipid phases produced by the MTLY40-2p strain in different oily media after five days of culture…… **101**

Figure II.32. FTIR spectra of the lipid phases of W29 and MTLY40-2p strains cultivated in oily media..... **103**

Figure II.33. FTIR spectra of the W29 and MTLY40-2p yeast cells cultivated in oily media..... **105**

Figure 34. Représentation de la structure des protéines PKS..... **112**

Figure 35. Alignement des protéines PKS.....……..... **113**

Figure 36. Représentation de la structure des protéines HNR…… **114**

Figure 37. Alignement des protéines HNR……. **114**

Figure 38. Représentation de la structure des protéines MFO et LCC……... **115**

Figure 39. Alignement multiple des protéines MFO et LCC……..... **116**

Liste de Tableaux

Tableau 1. Composants majoritaires de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae*…….. **7**

Tableau 2. Souches de *Yarrowia lipolytica* utilisées dans ce travail……. **38**

Tableau 3. Composition des milieux de cultures utilisés pour modifier la paroi cellulaire de *Yarrowia lipolytica*…….. **39**

Tableau 4. Composition des milieux de culture utilisés pour la production de γ-décalactone et mélanine……... **40**

Tableau 5. Sondes fluorescentes utilisées en microscopie confocale…… **41**

Tableau 6. Conditions d'électrophorèse de l'ARN de *Yarrowia lipolytica*……... **47**

Table I.7. Primers used in this study……. **54**

Table I.8. *In silico* identification of putative CWP coding genes in *Y. lipolytica* and relative expression levels in methyl oleate containing media measured by real time RT-PCR……. **60**

Table I.9. Putative Transcription Factors identified in the promoter region of *Y. lipolytica* CWP coding genes……. **61**

Tableau 10. Recapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica*……... **89**

Tableau 10. Recapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 1)…… **90**

Tableau 10. Recapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 2)…… **91**

Tableau 10. Recapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 3)…… **92**

Table II.11. Description of strains used in this study..... **97**

Table II.12. Concentration in g/l of γ-decalactone present in the different phases of the medium after seven days of culture..... **98**

Tableau 13. Identification *in silico* des gènes putatifs de la voie de biosynthèse de DHN-mélanine chez *Y. lipolytica*…… **111**

AVANT PROPOS

1. AVANT PROPOS

La capacité de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* à produire des composés d'intérêt pharmaceutique et industriel à partir de substrats hydrophobes ou de dégrader des composés hydrophobes qui polluent l'environnement est un sujet qui a conduit plusieurs groupes de recherche à étudier le métabolisme des lipides chez *Y. lipolytica*. À présent, on connait les précurseurs, les intermédiaires et les produits finaux du métabolisme lipidique, les gènes et les enzymes qui participent aux principales étapes ont été caractérisés, des souches mutantes pour ces gènes sont disponibles, et les mécanismes de régulation de la dégradation, du stockage et de la synthèse de lipides sont à l'étude. Par contre, un sujet qui n'a pas beaucoup été étudié est la prise en charge des substrats hydrophobes du milieu par la cellule. Pour cette étape, la paroi cellulaire est le premier organite cellulaire qui établit un contact avec le milieu de culture, sa composition et son ultrastructure peuvent donc jouer un rôle important pour l'adhésion des substrats hydrophobes à la paroi cellulaire et leur internalisation dans la cellule. Améliorer l'adhésion et l'internalisation des substrats hydrophobes pourrait influencer le rendement de production ou de dégradation de ces composés par *Y. lipolytica*. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au comportement de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* en présence de substrats hydrophobes. Dans ce but, nous avons analysé premièrement les modifications de la composition de la paroi cellulaire, ses propriétés d'hydrophobie, et la réponse transcriptomique de 27 gènes codant des protéines putatives de la paroi cellulaire, tout cela en fonction de la composition du milieu de culture et de la source de carbone : glucose ou oléate de méthyle (un modèle de substrat hydrophobe).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons identifié une souche mutante qui produit de la mélanine dans des conditions de culture utilisées pour la production de γ-décalactone. Dans ce cas là, la mélanine semble être synthétisée par la voie DHN-mélanine.

Pour introduire cette étude, les généralités sur la levure *Y. lipolytica* sont présentées. La composition et l'organisation de la paroi cellulaire des levures, ainsi que l'adaptation de la paroi cellulaire aux conditions externes seront décrites de manière générale. Ensuite on abordera les connaissances sur la prise en charge des substrats hydrophobes et les étapes d'assimilation et de bioconversion des substrats hydrophobes à travers la β-oxydation par cette levure. Dans la dernière partie de cette introduction on abordera également la fonction de la mélanine et les voies de biosynthèse de ce pigment chez les champignons.

INTRODUCTION

2. INTRODUCTION

2.1 Généralités sur la levure *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est une levure oléagineuse capable de croître sur des composés hydrocarbonés et d'accumuler jusqu'à 36% de lipides en poids sec. Cette capacité de modifier et d'accumuler des lipides fait de *Y. lipolytica* un modèle intéressant pour l'étude du métabolisme lipidique chez les eucaryotes ainsi que pour des applications biotechnologiques dans des procédés de biodégradation de composés polluants (alcanes, pétrole), de biosynthèse (acides organiques : acide citrique, acide isocitrique, acide pyruvique) et de bioconversion (arômes : γ-décalactone) à partir de substrats hydrophobes.

2.1.1 Taxonomie

Y. lipolytica est un champignon ascomycète dimorphique de la famille des Saccharomycetaceae. Dans un premier temps, *Y. lipolytica* a été classée comme une espèce du genre *Candida* car aucun stade sexué n'a été observé, et plus spécifiquement caractérisée comme *Candida lipolytica* due à sa capacité d'utiliser des *n*-paraffines et des huiles comme seule source de carbone. La forme parfaite de *C. lipolytica* a été identifiée à la fin des années 60 (Wickerman *et al*., 1970). Les cellules peuvent former des asques contenant de 1 à 4 spores faiblement viables. Deux types cellulaires, dénommés A et B (allèles *MATA* et *MATB*) ont été observés, et *C. lipolytica* a été renommé *Endomycopsis lipolytica*, puis *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) et finalement *Yarrowia lipolytica* (van der Walt et von Arx, 1980). *Y. lipolytica* est un organisme dimorphique capable de se développer en forme de levures bourgeonnantes, d'hyphaes et de pseudohyphaes en fonction de la composition du milieu ou des conditions de culture (Rodríguez et Domínguez, 1984 ; Ota *et al*, 1984). Ses colonies varient en forme et en texture (elles peuvent être plates, brillantes, embrouillées, nettes).

2.1.2 Physiologie et habitat

Y. lipolytica présente un métabolisme aérobie strict, à la différence de la majorité des levures hemiascomycètes. Cette levure considérée comme non-pathogène croît normalement entre 10 et 32-34°C mais exceptionnellement elle est capable de croître jusqu'à 37°C. Ces caractéristiques de *Yarrowia lipolytica* ont permis de l'approuver comme un organisme GRAS (de l'Anglais « Generally Recognized As Safe ») par la FDA (« American Food and Drug Administration ») et de l'utiliser pour des procédés industriels agroalimentaires et pharmaceutiques. Cette levure peut utiliser une grande variété de substrats carbonés tels que

les sucres comme le glucose, le galactose et le mannitol (Kreger van Rij, 1984). Par contre elle ne peut pas assimiler le saccharose car elle ne possède pas d'invertase. D'autres sources de carbone utilisées par *Y. lipolytica* sont les acides organiques (le lactate et le citrate), les acides aminés (la méthionine) ainsi que le glycérol (Papanikolaou et Aggelis, 2003) et l'éthanol, ce dernier à une concentration inférieure à 3% (Barth et Gaillardin, 1997). De plus, *Y. lipolytica* est connue pour sa capacité à assimiler des substrats carbonés hydrophobes tels que les alcanes (hexadécane, décane) et les n-paraffines, des lipides tels que les acides gras (acide ricinoléique, acide palmitique, acide laurique) et des triglycérides (trinoléine, tripalmitine) (Kreger van Rij, 1984). Précisément, son nom provient de cette capacité. Les habitats naturels de *Y. lipolytica* sont les sols et les effluents, mais on peut également l'isoler d'aliments riches en lipides et en protéines tels que le fromage, le yaourt, la charcuterie, le shoyu (sauce de soja), l'huile d'olive, etc. (Barth & Gaillardin 1997). Mais différentes souches de *Y. lipolytica* ont été aussi isolées de certains environnements pollués par du pétrole ou par des huiles et des eaux résiduelles agro-industrielles (Chaillan *et al*. 2004 ; Mafakher *et al*. 2010). *Y. lipolytica* est différent des levures conventionnelles *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* au niveau phylogénétique, physiologique, génétique et de biologie moléculaire.

2.1.3 Caractéristiques génomiques

Le séquençage du génome de la souche E150 de *Y. lipolytica* (provenant du croisement entre la souche sauvage CBS6124-2 isolée de maïs d'origine américaine, et la souche W29 isolée des égouts de Paris) a été réalisé par le consortium Génolevures (Dujon *et al*., 2004). *Y. lipolytica* a un génome de 20,5 Mb composé de six chromosomes sans plasmide extrachromosomal connu. Les particularités de son génome sont son contenu en G+C (environ 50%), sa densité de gènes (1 gène pour chaque 3,3 Kb), sa haute fréquence en introns (13% des gènes ont au moins un intron) (Bon *et al*., 2003), la répartition de son ADNr dans 7 loci situés dans les régions subtélomériques du génome (un seul locus chez *S. cerevisiae*), la faible similarité de ses gènes avec les autres levures, son contenu en éléments transposables (Neuveglise *et al*., 2002). Le génome de *Y. lipolytica* présente plusieurs familles multigéniques impliquées dans l'utilisation et le stockage d'une grande gamme de substrats hydrophobes (Wang *et al*. 1999a, 1999b; Thevenieau *et al*. 2008).

2 .1.4 Outils génétiques

Du fait que *Y. lipolytica* est un système modèle pour l'étude de la physiologie, la génétique, le dimorphisme, l'expression des protéines et le métabolisme lipidique, plusieurs outils génétiques ont été développés : un système de transformation (Davidow *et al*., 1987 ; Gaillardin *et al*., 1985), un système de disruption génétique (Fickers *et al*., 2003), des vecteurs réplicatifs et intégratifs (Fournier *et al*., 1991 ; Gaillardin et Ribet, 1987), un système de réplication de gènes (Le Dall *et al*., 1994), la caractérisation de promoteurs fortement régulés ou constitutifs (Barth et Scheuber, 1993 ; Blanchin-Roland *et al*., 1994) et la construction d'une puce à ADN complète pour des études transcriptomiques.

2.2 La paroi cellulaire des levures

La paroi cellulaire des levures est un organite rigide mais physiologiquement flexible et dynamique situé sur la surface extérieure de la membrane cellulaire. La paroi cellulaire est impliquée dans des fonctions très variées comme : la protection à des conditions défavorables de l'environnement, la morphologie, la rigidité cellulaire, l'échange des ions et la filtration, la perméabilité, l'osmolarité, le métabolisme, et, chez les levures pathogènes, elle est importante dans les interactions avec l'hôte et dans l'expression antigénique.

2.2.1 Composition et organisation de la paroi cellulaire

L'importance de la paroi cellulaire au niveau biologique mais aussi comme une cible pour des antimycotiques chez les champignons pathogènes, a conduit à de nombreux travaux de recherche afin d'élucider sa composition, sa structure et sa synthèse. La composition chimique de la paroi cellulaire de plusieurs champignons a été étudiée et les espèces sur lesquelles on a le plus de connaissances sur cet organite sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. En général, la paroi cellulaire des levures est un organite complexe qui partage une composition et une structure similaires entre les différentes espèces. La paroi cellulaire représente 15 à 30% du poids sec de la cellule et ses trois éléments principaux sont le β-glucane, la chitine et des mannoprotéines qui interagissent par des liaisons covalentes et non-covalentes pour former un grillage tridimensionnel base structurelle de la paroi cellulaire (Figure 1).

β-glucanes. Les β-glucanes de la paroi cellulaire sont des homopolymères insolubles de résidus de D-glucose qui sont unis par des liaisons β-1,3 ou β-1,6-glucoside (Figure 2). Le **β-1,3-glucane** est un polymère fibreux d'environ 1500 monomères de glucose soit 240 kDa et

une longueur des fibres de 600 nm (Tableau 1). C'est le polymère le plus abondant dans la paroi cellulaire (50 % du poids sec) et il fournit la rigidité et l'élasticité pariétales (Lipke & Ovalle, 1998). Le **β-1,6-glucane** est un polymère moins abondant (10 % du poids sec de la paroi cellulaire) et très ramifié, d'environ 150 monomères de glucose soit 24 kDa (Tableau 1). Le β-1,6-glucane a un rôle central dans l'organisation de la paroi cellulaire car il interconnecte tous les composants de la paroi cellulaire, dont les mannoprotéines, le β-1,3-glucane et la chitine (Lipke & Ovalle, 1998 ; Shahinian & Bussey, 2000 ; Kollár, *et al*., 1997).

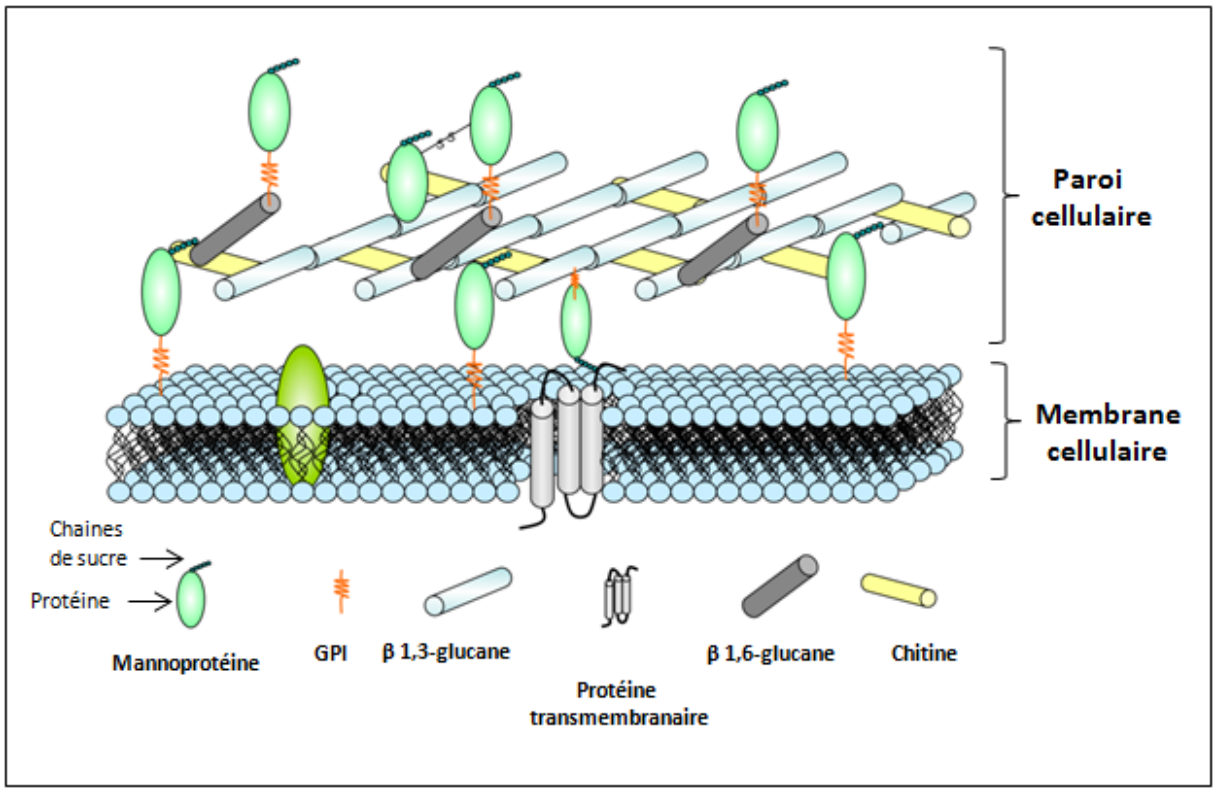


Figure 1. Schéma de la paroi cellulaire chez les levures. Un arrangement des composants principaux de la paroi cellulaire (mannoprotéines, β-1,3-glucane, β-1,6-glucane et chitine) et de la membrane est représenté (Adapté de Molina *et al*, 2000).

Chitine. La chitine est un long homopolymère linéaire de 120 résidus de N-acétylglucosamines liées par des liaisons β-1,4 qui forme de microfibriles. La grande force de tension de ce polymère contribue à l'intégrité de la paroi cellulaire. La chitine est liée à des ramifications non-réductrices du β-1,3-glucane et du β-1,6-glucane (Bowman & Free, 2006 ; Lipke & Ovalle, 1998). Le contenu de chitine est d'environ 1 à 2 % du poids sec de la paroi cellulaire (Tableau 1).

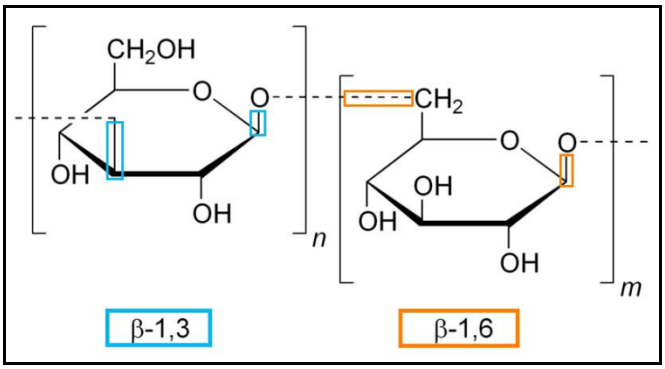


Figure 2. Résidus de D-glucose. Les positions des liaisons β-1,3 et β-1,6 sont respectivement encadrées en bleu et en orange.

Mannoprotéines. Les mannoprotéines sont des protéines mannosylées liées à la paroi cellulaire de manière non-covalente ou covalente. Les mannoprotéines ne sont pas essentielles pour la viabilité cellulaire mais elles sont importantes pour percevoir les conditions environnementales, maintenir la structure pariétale et l'osmolarité, diminuer la perméabilité de composés toxiques, et elles participent à l'adhésion et la biogenèse de la paroi cellulaire (Klis *et al*., 2002).

Les protéines dites **non-covalentes** ou protéines Scw (de l'anglais ***S***oluble ***C***ell ***W***all) sont généralement associées à la surface cellulaire par des interactions non-covalentes ou par des liaisons disulfure avec des composants de la paroi cellulaire, mais on les trouve aussi dans une moindre proportion dans les couches internes de la paroi cellulaire. Ces protéines sont extraites par des agents détergents ou réducteurs tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le dithiothréitol (DTT) respectivement (Mrsă *et al*., 1997 ; Pitarch *et al*., 2002 ; 2008). La délétion multiple de gènes *SCW* chez *S. cerevisiae* conduit à une augmentation de la mortalité des cellules, le fait que cette mortalité puisse être diminuée par la présence de sorbitol, un stabilisateur de l'osmolarité, suggère que les protéines Scw jouent un rôle dans la stabilisation osmotique des cellules de levure (Teparić *et al*., 2004). Quelques protéines Scw ont probablement des activités glucanase capables de remodeler la paroi cellulaire pour permettre par exemple, la séparation cellulaire et le « mating » (Šesták *et al*., 2004 ; Cappellaro *et al*., 1998).

Tableau 1. Composants majoritaires de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae* (Adapté de Klis *et al*, 2006).

Composant (Degré de polymérisation)	Masse moléculaire (kDa)	% du poids de la paroi
β-1,3-glucane (1500)	240	30-45
β-1,6-glucane (150)	24	5-10
Chitine (120)	25	1.5-6
Mannoprotéine	Très varié	30-50

Les protéines fixées de manière **covalente** sont divisées en deux classes : Les protéines dites « GPI » et celles dites « PIR ». Les **protéines GPI** sont les plus abondantes dans la paroi cellulaire. Ces protéines sont généralement *N*-glycosylées et/ou *O*-glycosylées, riches en sérine et thréonine, elles ont un peptide signal N-terminal et fréquemment présentent des répétitions internes (Caro *et al*., 1997). En C-terminal, elles ont une séquence hydrophobe qui est remplacée par une ancre «***G***lycosyl ***P***hosphatidyl ***I***nositol » (GPI) reliant au réticulum endoplasmique (RE). L'ancre GPI est attachée de manière covalente au site ω proche du C-terminal de la protéine. La structure du GPI est décrite dans la Figure 3. L'ancre GPI est biosynthétisée par une voie très conservée chez les eucaryotes (Figure 4). Les premières étapes de la biosynthèse de l'ancre GPI se déroulent dans le RE ou à sa surface : la synthèse de la structure centrale du GPI est faite dans le lumen du RE. Ensuite les protéines GPI suivent la voie de sécrétion RE-Golgi pour être présentées à la surface cellulaire. Une particularité de quelques champignons est que le GPI est scindé entre le premier mannose et la glucosamine, la protéine avec la partie restant de l'ancre GPI est dirigée vers la paroi cellulaire et liée de manière covalente au β-1,6-glucane (Richard et Plaine, 2007). La distribution des protéines GPI dans la membrane ou la paroi cellulaire est contrôlée par un signal de deux aminoacides basiques présents dans les quatre aminoacides situés en N-terminal du site ω. Avec ce signal, la protéine est retenue dans la membrane plasmique alors qu'en son absence la protéine est adressée à la paroi cellulaire (Caro *et al*, 1997 ; Frieman et Cormack, 2003). Certaines protéines GPI sont liées de manière indirecte au β-1,3-glucane par l'intermédiaire du β-1,6-glucane au moyen de l'ancre GPI. Ces protéines peuvent être libérées

de la paroi cellulaire par digestion avec une β-1,3 ou β-1,6-glucanase mais aussi avec de l'acide hydrofluorique (HF)-pyridine qui coupe les liaisons phosphodiester de l'ancre GPI. D'autres protéines GPI sont ancrées sur la chitine par du β-1,6-glucane au moyen du GPI, ces protéines peuvent être libérées de la paroi cellulaire par digestion avec des chitinases, β-1,6-glucanases ou (HF)-pyridine (Pitarch *et al*., 2008). Les protéines GPI réalisent différentes fonctions. Elles sont liées à la construction de la paroi cellulaire (Mouyna *et al*., 2000), au maintien de la stabilité osmotique (Teparić *et al*., 2004), à la floculation et à la formation du biofilm (Soares 2010), à l'agglutination sexuelle (Lipke et Kurjan, 1992) et quelques autres ont des activités enzymatiques, par exemple de phospholipases (Djordjevic, 2010).

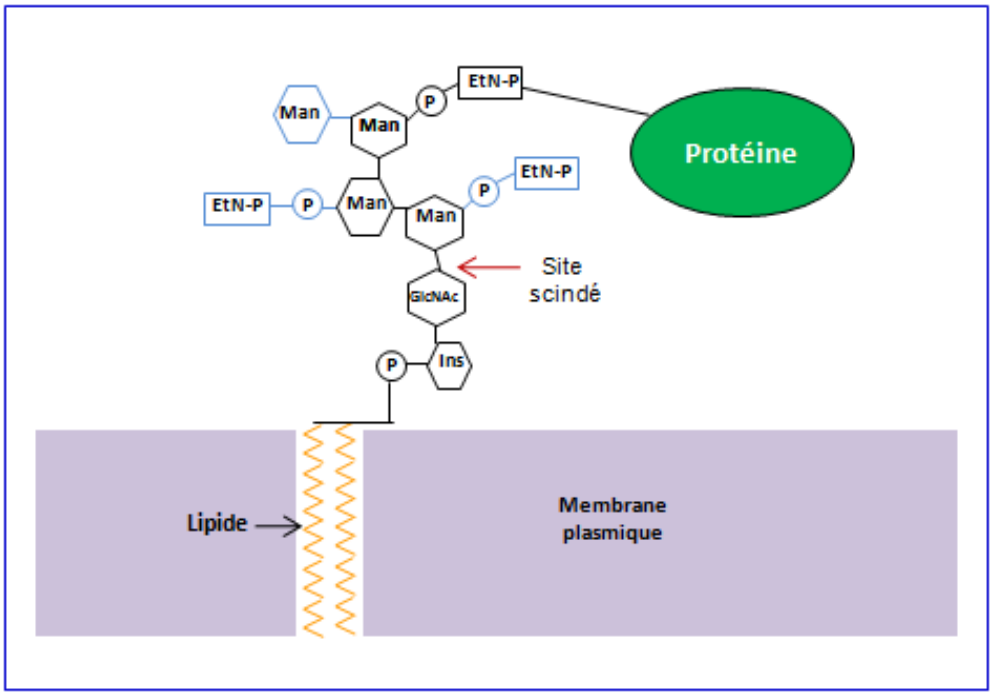


Figure 3. Structure d'une ancre GPI. La structure en noir est trouvée chez les protéines GPI de n'importe quel eucaryote. Les groupes en bleu sont des chaînes latérales additionnées au GPI chez *S. cerevisiae*. Le lipide attaché au GPI peut être le diacylglycérol ou la céramide. Le site où le GPI est scindé pour s'adresser à la paroi cellulaire est marqué (flèche rouge). **Ins)** Inositol ; **GlcNAc)** N-Acétyle-Glucosamine ; **Man)** Mannose ; **EtN-P)** Phosphatidylethanolamine (Modifié de Richard et Plaine, 2007).

Les **protéines PIR** (de l'anglais « ***P***roteins with ***I***nternal ***R***epeats ») sont minoritaires dans la paroi cellulaire. Ces protéines forment des familles de protéines hautement *O*-glycosilées qui partagent des caractéristiques en commun comme un peptide signal N-terminal, un site Kex2p pour une modification protéolytique par la Kex2 protéase (Mrsa, *et al*., 1997 ; Toh-E *et al*., 1993) et d'une à dix répétitions internes riches en glutamine qui semblent être essentielles

pour la modification du site Kex2 et l'attachement au β-1,3-glucane qui en découle. Par contre elles ne présentent pas de séquence pour l'addition d'un GPI en C-terminal; (Castillo *et al*., 2003 ; Ecker *et al*,. 2006). Ces protéines sont directement liées au β-1,3-glucane via une liaison alcaline-labile, et peuvent être libérées par un traitement alcalin doux ou par digestion enzymatique avec la β-1,3-glucanase (Pitarch *et al*., 2008). Les protéines PIR sont liées à la résistance au stress, par exemple l'expression de Hsp150p est induite par un stress thermique, le manque d'azote, un stress oxydatif et par la présence d'aluminium (Russo *et al*., 1992 ; 1993 ; Ezaki, et al., 1998). Les protéines PIR sont aussi impliquées dans le maintien de la stabilité osmotique (Teparić *et al*., 2004), la protection des cellules contre des protéines antifungiques telles que l'osmotine (Yun *et al* ., 1997) et dans la stabilité de la paroi cellulaire quand il y a une diminution de β-1,6-glucane (Kapteyn, et al., 1999).

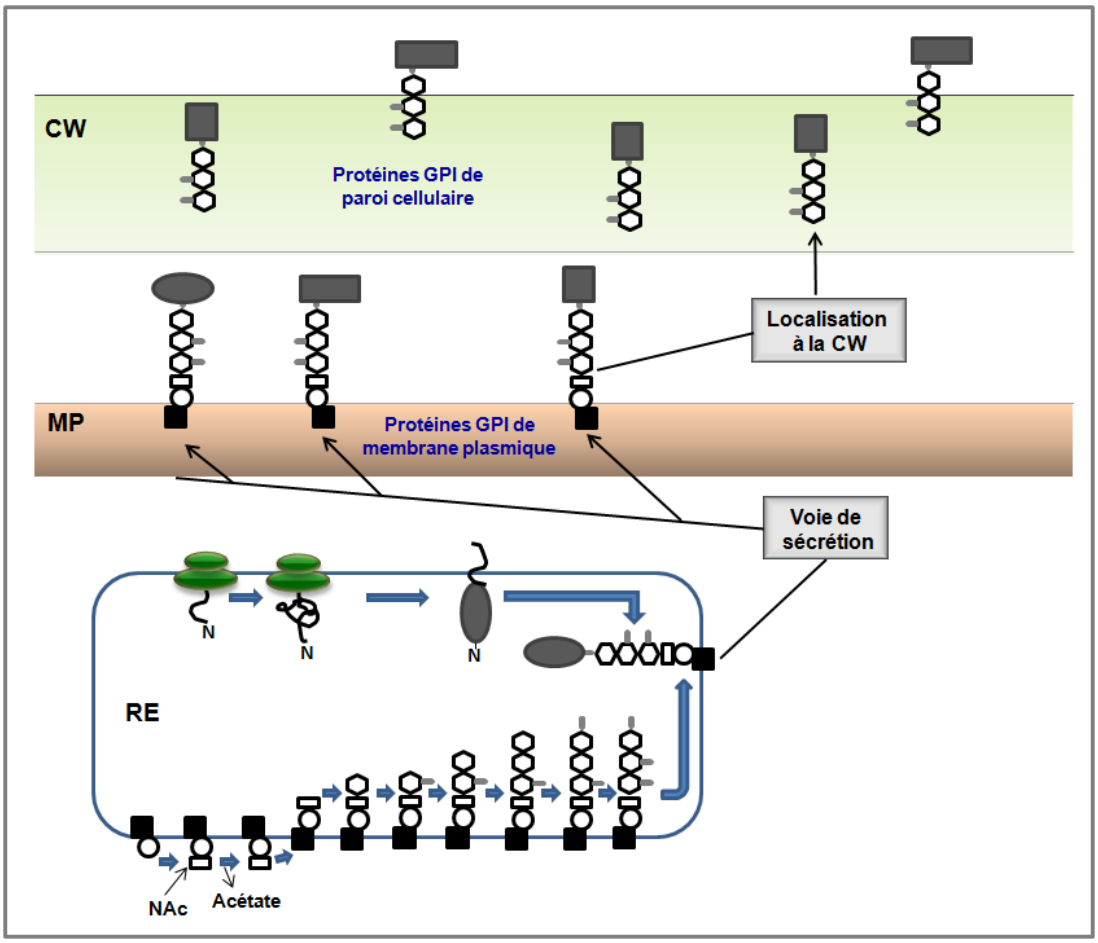


Figure 4. Schéma de la synthèse et du transport des protéines GPI. La biosynthèse du GPI se déroule dans le réticulum endoplasmique. Les protéines GPI suivent la voie de sécrétion pour être présentées à la surface cellulaire. **CW)** Paroi cellulaire ; **MP)** Membrane plasmique ; **RE)** Réticulum endoplasmique ; **NAc)** N-Acétyle (Adapté de Richard et Plaine, 2007).

2.3 Adaptation de la paroi cellulaire à des conditions externes

La paroi cellulaire des levures est une structure dynamique qui se modifie constamment tout au long du cycle de vie des cellules, mais aussi en réponse aux modifications du milieu (source de carbone, disponibilité de nutriments et d'oxygène, pH) et en réponse au stress (choc thermique, basse osmolarité, exposition à des composés nuisibles pour la paroi cellulaire, mutations de gènes de la paroi cellulaire). Pour s'adapter aux conditions environnementales, la paroi cellulaire doit modifier sa composition et son organisation afin de maintenir son intégrité et en même temps la viabilité cellulaire. L'intégrité pariétale est assurée par la variation de la proportion des polymères de chitine et de β-glucanes et le degré d'interconnection entre les deux, ainsi que par la variation des protéines de paroi cellulaire (Firon, *et al*, 2004). La construction de la paroi cellulaire est directement ou indirectement contrôlée par les principales voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui règlent l'accouplement, la sporulation, la croissance invasive, la réponse à haute osmolarité et la réponse au stress de la paroi cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, les deux voies directement impliquées dans la réponse aux stresses qui mettent en danger la paroi cellulaire sont la voie de signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire, une voie MAPK contrôlée par la protéine kinase C (catalytique) Pkc1, et la voie de réponse à haute osmolarité de glycérol, qui est une voie MAPK contrôlée par Hog1 (Klis *et al*., 2002 ; Levin, 2005 ; Lessage et Bussey, 2006). Ces deux voies de signalisation et la collaboration entre elles sont abordées dans la suite en faisant référence à *S. cerevisiae*. Ensuite on parlera des connaissances à ce sujet sur la levure *Y. lipolytica*.

2.4 Assimilation et bioconversion de substrats hydrophobes par *Y. lipolytica*

2.4.1 La prise en charge et le catabolisme des substrats hydrophobes

Pour utiliser des substrats non hydrosolubles, il est nécessaire d'établir premièrement un contact entre la phase hydrophobe et les cellules de levure. Dans un milieu contenant des substrats hydrophobes tels que des alcanes, des acides gras, ou des triglycérides, *Y. lipolytica* est capable de produire du surfactant (Cirigliano & Carman,, 1984) et des lipases extracellulaires (Hadeball, 1991) ainsi que de modifier les propriétés de la surface cellulaire afin de favoriser la disponibilité, l'adhésion et l'internalisation des substrats hydrophobes (Aguedo *et al*. 2003).

Une fois que les substrats hydrophobes sont dans les cellules de *Yarrowia*, ils sont catabolisés par l'oxydation monoterminale des alcanes (ω-oxydation) dans le réticulum endoplasmique et par la β-oxydation des acides gras activés dans les peroxysomes, ou ils sont stockés comme triacylglycérol (TAG) et esters de stéryl (SE) dans des corps lipidiques. Il y a aussi une communication entre les cycles du glyoxylate et du citrate qui se déroulent dans le peroxysome et dans la mitochondrie, respectivement. Chez *Y. lipolytica*, les enzymes impliquées dans le catabolisme des substrats hydrophobes comme les lipases, les cytochromes P450 et les acyl CoA oxydases, sont codées par des familles multigéniques (Fickers *et al*., 2011; Iida *et al*., 2000 ; Wang *et al*., 1999b). Un schéma général de l'assimilation des substrats hydrophobes est montré dans la figure 5.

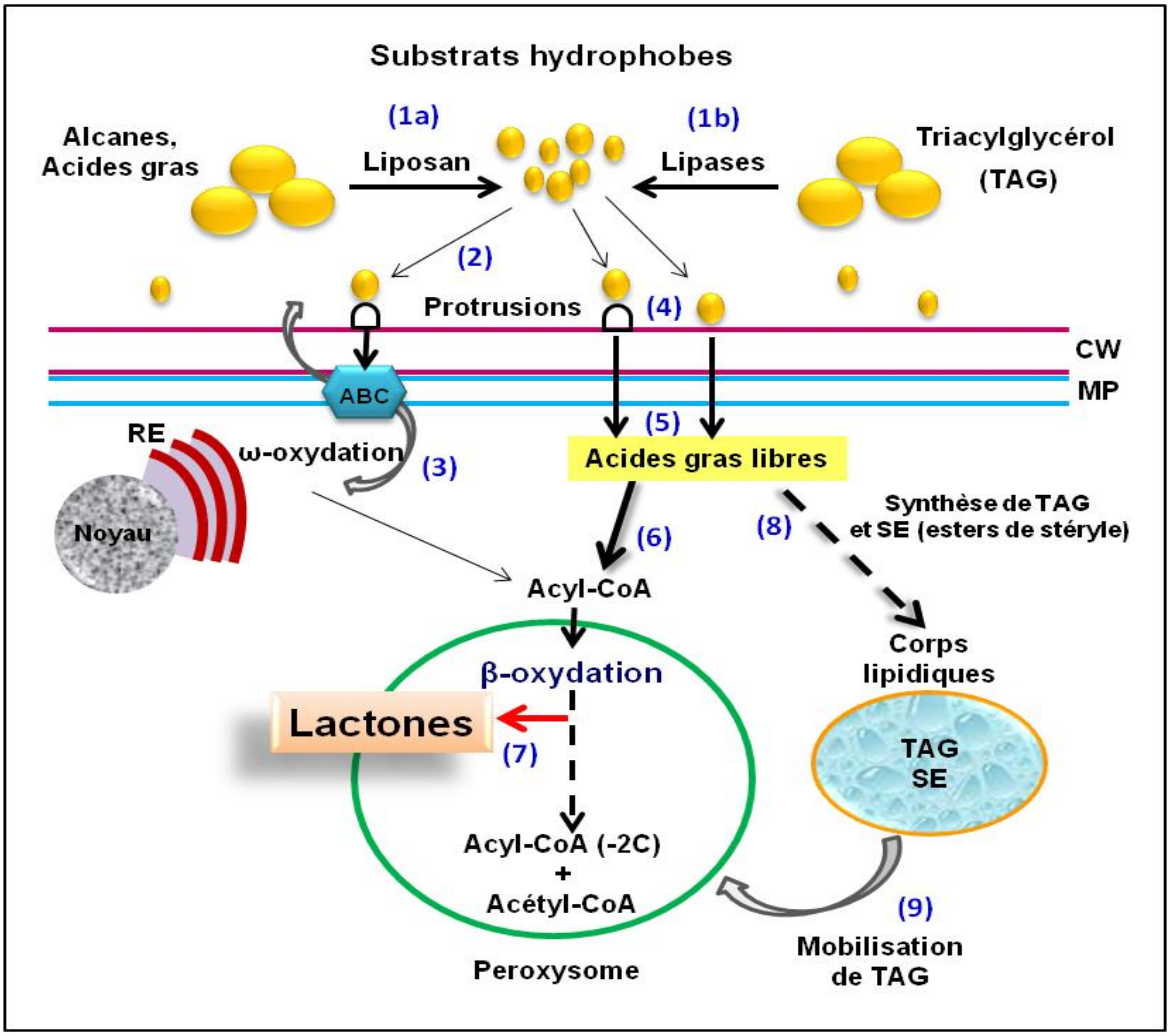


Figure 5. Représentation schématique de l'assimilation des substrats hydrophobes chez *Y. lipolytica*. 1a et **1b)** En présence de substrats hydrophobes (alcanes, acides gras, triacylglycérol), *Y. lipolytica* produit du liposan et des lipases pour émulsifier et diminuer la taille des gouttelettes lipidiques. **2** et **3)** Les alcanes adhérent à la paroi cellulaire (CW) par des protrusions et sont transportés par un transporteur ABC (ATP-binding-cassette) vers le réticulum endoplasmique (RE) où ils sont transformés en acyl-CoA avec une étape d'ω-oxydation. **4** et **5)** Les acides gras libres, produits de l'hydrolyse de TAG par la lipase extracellulaire adhérent directement à la CW ou par le moyen des protrusions, ils traversent la membrane plasmique (MP) et ils se retrouvent dans le cytoplasme. **6)** Les acides gras sont activés en Acyl-CoA et dégradés par la β-oxydation. **7)** Les acides hydroxylés formés par la première étape de la β-oxydation peuvent être transformés en lactones. **8)** D'un autre côté, les acides gras libres peuvent être transformés en TAG et SE et stockés dans des corps lipidiques. **9)** Les TAG peuvent être mobilisés vers le peroxysome et rentrer dans la β-oxydation (Beopoulos *et al.*, 2009 ;Thevenieau *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Internalisation des substrats hydrophobes

L'internalisation de ces substrats comprend trois étapes : le contact et l'adsorption sur la paroi cellulaire ; la traversée de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique, dans ce cas par diffusion facilitée quand il s'agit de faibles concentrations, ou par diffusion simple si la concentration augmente (Kolhwein et Paltauf, 1984); et par désorption pour la rentrée des substrats hydrophobes dans le cytoplasme. La première étape, celle qui nous concerne principalement dans ce travail, peut être réalisée de trois manières : **1) Solubilité.** Pour faciliter cette voie, *Y. lipolytica* produit du liposan, un émulsifiant dont la structure est celle d'une glycoprotéine comportant 83% de carbohydrates et 17% d'acides aminés. Le liposan diminue la tension superficielle et la taille des gouttelettes des substrats hydrophobes (Cirigliano & Carman, 1984), ce qui augmente la surface de contact avec la cellule. De plus cette levure sécrète des lipases extracellulaires qui hydrolysent les triacylglycérols en acides gras libres pour faciliter leur adsorption par la cellule. **2) Adhésion par des interactions physico-chimiques.** Aguedo *et al* (2003) ont suggeré que l'adhésion des gouttelettes lipidiques soit associée à des interactions acide-base de Lewis. Mais il est aussi probable que l'hydrophobie et des propriétés électrostatiques jouent un rôle important (Waché *et al*. 2000a ; Ly *et al*. 2006). Pour que l'adhésion soit possible, la surface cellulaire doit présenter une affinité pour la phase lipidique, donc avoir un caractère hydrophobe global ou partiel ou encore que le milieu contienne des agents amphiphiles se plaçant aux interfaces. L'hydrophobie de la surface des cellules est ainsi considérée comme l'un des facteurs les plus importants dans l'assimilation des composés hydrophobes (Kim *et al*., 2000). **3) Adhésion facilitée.** Chez *Candida tropicalis* et *C. albicans* la présence de *n*-alcanes induit la formation de protrusions à la surface cellulaire (Osumi *et al*. 1975). Ces protrusions forment des canaux qui traversent la paroi cellulaire et la membrane plasmique et pourraient transporter des *n*-alcanes vers le réticulum endoplasmique où ils sont hydroxylés par le système de P450 monooxyénase (ω-oxydation). La formation de protrusions à la surface cellulaire a été également rapportée chez *Y. lipolytica* cultivée sur acide oléique (Mlíčková, *et al.*, 2004), ces protrusions semblent être un point d'ancrage qui facilite l'adhésion et probablement aussi l'internalisation des gouttelettes lipidiques (Figure 6). Jusqu'à présent, les protrusions n'ont pas été étudiées en détail, donc on ne connait pas leur régulation, ni leur nature et leur composition biochimique.

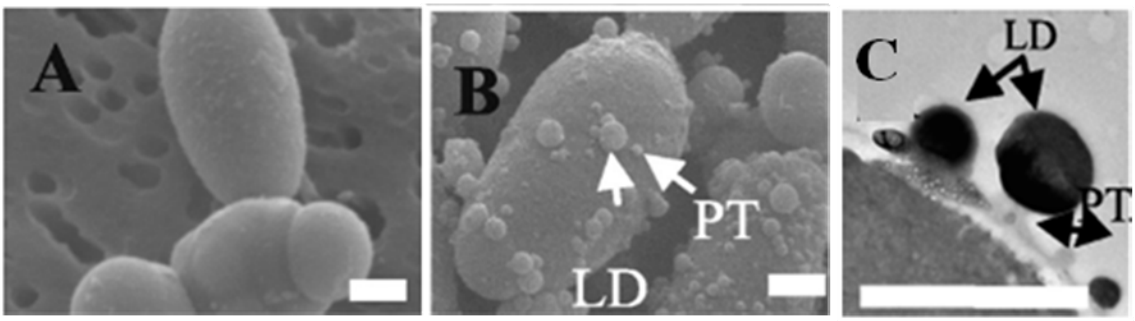


Figure 6. Présence de protrusions à la surface cellulaire de *Y. lipolytica*. Micrographies électroniques de cellules ayant poussé sur glucose **(A)** ou sur un milieu minimum en présence d'acide oléique **(B** et **C)**. **LD)** Gouttelettes lipidiques ; **PT)** Protrusions ; (Mlíčková, *et al.*, 2004).

Dans l'adhésion facilitée on peut aussi considérer la participation des protéines de paroi cellulaire. À ce sujet, Amaral *et al* (2006) ont observé une diminution de l'hydrophobie de la surface de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 après avoir digéré les protéines de paroi cellulaire par un traitement des cellules avec la pronase (un mélange d'endo et d'exo-proteinases). La participation des protéines de paroi cellulaire à la prise en charge des substrats hydrophobes et l'hydrophobie de la surface ont aussi été aussi mises en évidence chez d'autres champignons. Chez *S. cerevisiae*, la co-expression des gènes *DAN1* et *AUS1* (codant la mannoprotéine Dan1 et le transporteur ABC Aus1, respectivement) chez la souche sauvage a conduit à l'entrée de stérol dans des conditions aérobies de croissance, alors que chez *S. cerevisiae* le stérol est uniquement internalisé dans des conditions anaérobies.

2.4.1.2 La β-oxydation chez *Yarrowia lipolytica*

La β-oxydation est la principale voie métabolique pour la dégradation des acides gras. En général, dans les cellules eucaryotes, la β-oxydation des acides gras se déroule dans les mitochondries et les peroxysomes. Les acides gras à longue chaîne carbonée sont premièrement oxydés dans les peroxysomes puis oxydés jusqu'à l'acétyl-CoA (C2) dans les mitochondries (Osmundsen *et al.*, 1991). Chez les levures, à la différence des autres organismes eucaryotes, la β-oxydation des acides gras est restreinte aux peroxysomes (Endrizzi *et al.*, 1996). La β-oxydation peroxysomale consiste en l'oxydation cyclique des acides gras activés (sous forme d'acyl-CoA) dans la position beta à travers quatre réactions successives dont les activités sont : l'acyl-CoA oxydase, le 2-énoyl-CoA hydratase, le 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-cétoacyl-CoA thiolase (Figure 7). Deux carbones de la chaîne carbonée sont raccourcis à chaque cycle de β-oxydation jusqu'à l'obtention d'acétyl-CoA qui va ensuite entrer dans le cycle du glyoxylate ou être exporté vers la mitochondrie

pour intégrer le cycle du citrate (synthétisé dans Waché *et al*., 2003). Chez *Saccharomyces cerevisiae* la première étape de la β-oxydation est catalysée par une seule acyl-CoA oxydase (Aox). Par contre, chez *Y. lipolytica* il existe une famille de six acyl-CoA oxydases (nommés Aox1 à Aox6) codées par les gènes *POX1* à *POX6*. Les cinq gènes *POX1* à *POX5* ont été isolés par Le Clainche (1997). Alors que *POX6* a été identifié lors du séquençage du génome de *Y. lipolytica* (Dujon *et al*., 2004). Ces enzymes Aox, qui constituent l'étape limitante de la β-oxydation possèdent une spécificité de substrat. Les travaux de Wang *et al*. (1999a, 1999b) ont montré que cette spécificité est liée à la longueur de la chaîne carbonée du composé acyl-CoA (Figure 8). Ainsi Aox2 est spécifique des acyl-CoA à longue chaîne et Aox3 des acyl-CoA à courte chaîne. En revanche les Aox4 et Aox5 ne semblent pas être sensibles à la longueur de chaîne, elles présentent une faible activité envers un large spectre de longueur de chaîne (de C4 à C18). Par contre, les Aox1 et Aox6 sont impliquées dans la consommation de diacides (Luo *et al*., 2000 ; Thevenieau, 2006).

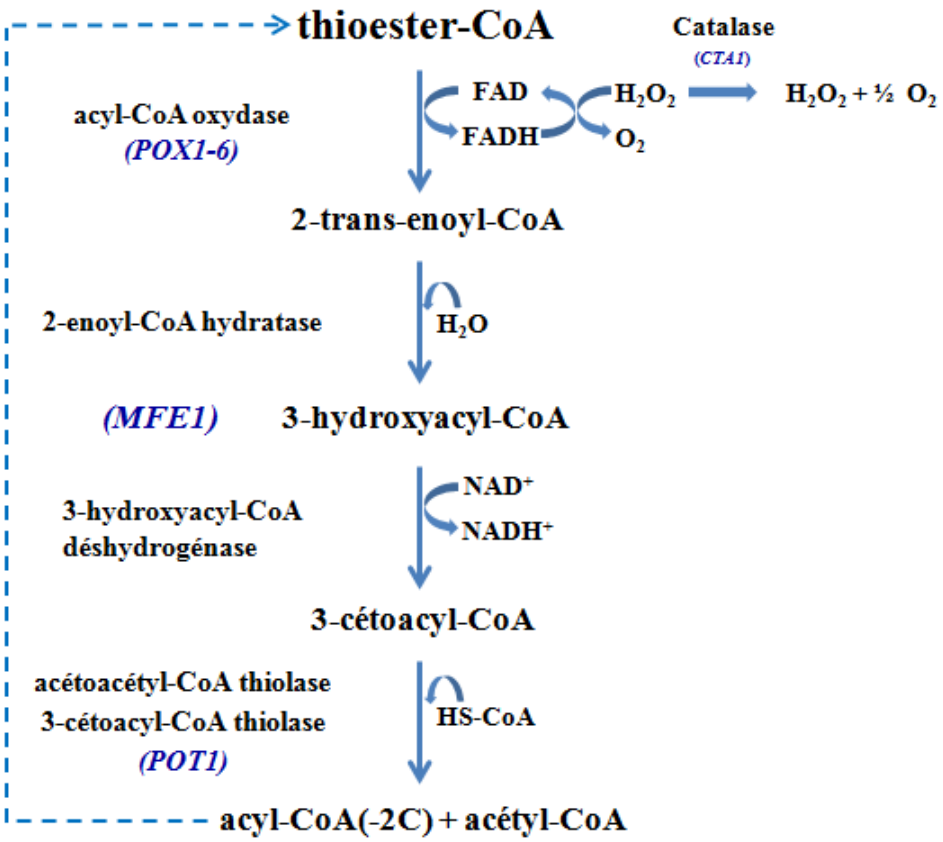


Figure 7. Voie de la β-oxydation chez *Y. lipolytica*. Les gènes codant les enzymes impliquées dans chaque réaction de la β-oxydation sont indiqués entre parenthèses.

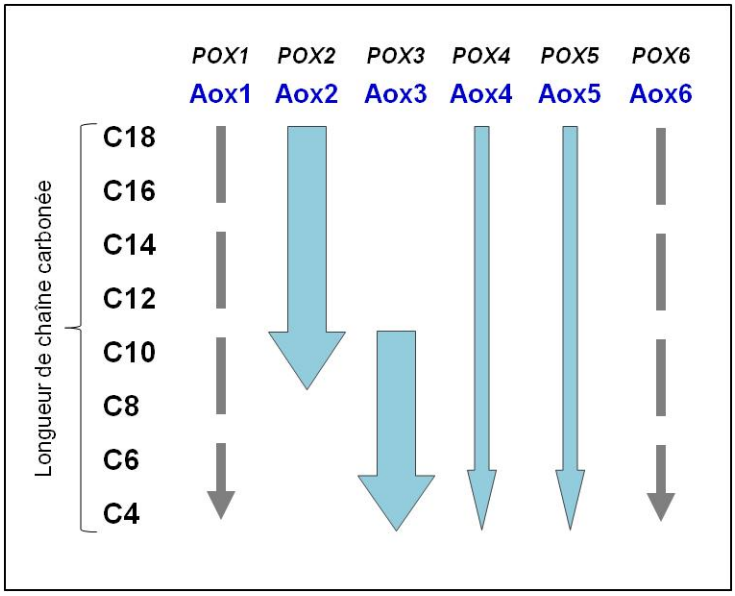


Figure 8. Représentation schématique de la sélectivité des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica*. Les Aox2 à Aox5 dégradent des acyl-CoA (flèches bleues). Aox1 et Aox6 sont spécifiques pour la dégradation de diacides (flèches grises).

2.4.2 Les lactones

Les lactones sont des esters particuliers comportant un cycle bi-oxygéné, résultant de la cyclisation ou lactonisation d'acides hydroxylés (Figure 9). Les γ-lactone (4-alcanolide, lorsque la fonction hydroxyle se trouve sur un carbone en position C4) et δ-lactone (5-alcanolide, lorsque l'hydroxyle est en C5) représentent les deux structures les plus fréquemment identifiées. Entre 4 et 12 carbones, les lactones sont des composés volatils, qui possèdent, le plus souvent, une odeur fruitée. Les composés de ce type présentent des propriétés aromatisantes et ils se trouvent naturellement dans de nombreux fruits tels que la pêche, l'abricot, la mangue, l'orange, la prune, etc., à des concentrations de l'ordre du mg/kg, dans le lait et ses dérivés et dans certains produits fermentés (Alchihab, *et al*., 2010). Les propriétés sensorielles des lactones sont influencées par la forme du cycle, la longueur de la chaîne carbonée latérale, la présence de doubles liaisons, la présence de substituants sur le cycle ou sur la chaîne (Dufossé, *et al*., 1994). Les lactones sont utilisées comme des additifs pour aromatiser une grande variété d'aliments et de boissons. Les γ-lactones ont un pouvoir aromatisant plus élevé que les δ-lactones.

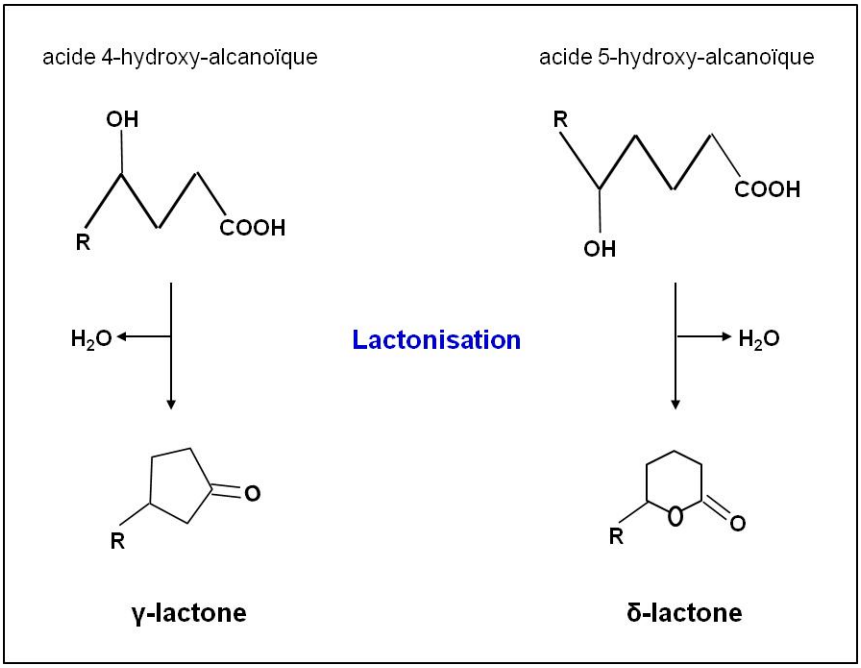


Figure 9. Structure et formation de la γ-lactone et la δ-lactone (Pagot *et al*., 1998 ; Waché *et al*., 2002).

2.4.2.1 Biosynthèse et dégradation de lactone par *Y. lipolytica* : rôle des acyl-CoA oxydases

La bioconversion d'acides gras en γ-décalactone par des levures, a été découverte par Okui, *et al* (1963). Ils ont montré que *Candida tropicalis* dégrade l'acide ricinoléique en acides en C16, C14, C12, γ-décalactone et acide-2-hydroxy-octanoïque. Vingt ans plus tard, Farbood et Wilis (1983) ont fait mention d'un brevet décrivant la biotransformation d'huile de ricin en γ-décalactone par *Y. lipolytica*. A partir de ce moment, *Y. lipolytica* a été une des levures les plus utilisées pour la production de lactones. Une souche auxotrophe de *Y. lipolytica* (Po1D), placée dans un fermenteur contenant un milieu de biotransformation en présence de concentrations faibles en uracile (base aminée correspondant à l'auxotrophie) est capable de produire 9,5 g/L de γ-décalactone après 75 heures (Nicaud *et al*., 1996). À présent, la γ-décalactone est le composé le plus produit par biotechnologie. L'acide gras précurseur le plus fréquemment utilisé pour la production de γ-décalactone est l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxy-octadéc-9-énoïque) ou son ester méthylique.

Lors de la production de lactones par bioconversion, la concentration en métabolites du milieu atteint un maximum puis diminue progressivement car une dégradation se produit. D'après Endrizzi-Joran (1994), la capacité des levures à dégrader la γ-décalactone existe tout au long

de la bioconversion et la concentration dans le milieu serait la différence entre ce qui a été excrété et dégradé. L'analyse du rôle des acyl-CoA oxydases de *Y. lipolytica* dans la biotransformation de l'acide ricinoléique en γ-décalactone a été réalisée par Waché, *et al* (2000b). Ils ont suivi la production et la dégradation de la lactone produite par des souches de *Y. lipolytica* mono- et multi-disruptées pour les gènes *pox*. Une souche délétée pour le gène *pox1 (*Δ*pox1*) présente une activité acyl-CoA oxydase totale supérieure et une production de γ-décalactone inférieure à la souche sauvage. Les souches mono-disruptées produisent des niveaux de lactone similaires à ceux de la souche sauvage (50 mg/l), excepté la souche Δ*pox3* (220 mg/l en 24 h). De même, pour les souches multi-disruptées, seule la souche Δ*pox1* présente des vitesses de production plus élevées. La souche Δ*pox2*Δ*pox3* produit environ 150 mg/l. La production et la dégradation de la lactone par le triple mutant Δ*pox2*Δ*pox3*Δ*pox5* sont faibles, alors que le quadruple disruptant Δ*pox2*Δ*pox3*Δ*pox4*Δ*po5* ne produit ni ne consomme la lactone. Ces résultats montrent que les souches contenant la délétion *pox3*, codant l'acyl-CoA oxydase spécifique des chaînes courtes, dégradent plus lentement l'acide 4-hydroxydécénoïque, ce qui permet à l'acide de cycliser et de former la lactone. Afin d'améliorer la production de γ-décalactone et de diminuer sa consommation par *Y. lipolytica*, Waché, *et al* (2001 ; 2002) ont construit une souche délétée pour le gène *pox4*, les résultats montrent que cette souche n'est pas capable de dégrader la γ-décalactone. En revanche cette souche produit dix fois plus de γ-décalactone que la souche sauvage.

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-010-2945-0

MINI-REVIEW

Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds

Cynthia Romero-Guido · Isabel Belo · Thi Minh Ngoc Ta · Lan Cao-Hoang · Mohamed Alchihab · Nelma Gomes · Philippe Thonart · Jose A. Teixeira · Jacqueline Destain · Yves Waché

Received: 25 August 2010 / Revised: 8 October 2010 / Accepted: 8 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The consumers' demand for natural flavour and fragrances rises. To be natural, compounds have to result from the extraction of natural materials and/or to be transformed by natural means such as the use of enzymes or whole cells. Fungi are able to transform some fatty acids into lactones that can thus be natural. Although some parts of this subject have been reviewed several times, the present article proposes to review the different pathways utilised, the metabolic engineering strategies and some current concerns on the reactor application of the transformation including scaling up data. The main enzymatic steps are hydroxylation and β-oxidation in the traditional way, and lactone desaturation or Baeyer–Villiger oxidation. Although the pathway to produce γ-decalactone is rather well known, metabolic engineering strategies may result in significant improvements in the productivity. For the production of other lactones, a key step is the hydroxylation of fatty acids. Beside the biotransformation, increasing the production of the various lactones requires from biotechnologists to solve two main problems which are the toxicity of lactones toward the producing cell and the aeration of the emulsified reactor as the biochemical pathway is very sensitive to the level of available oxygen. The strategies employed to resolve these problems will be presented.

Keywords Lactone · Yeast · Fungi · *Yarrowia* · *Rhodotorula* · Aroma · Lipids · Metabolism · Hydroxylation · β-oxidation · Oxygen transfer · Bioreactor · Up scaling · Emulsion · Cell wall · Membrane · Fluidity · Toxicity · Trapping · Immobilisation

C. Romero-Guido · T. M. N. Ta · Y. Waché (✉)
Laboratoire GPMA, Université de Bourgogne/AgroSup Dijon,
1, esplanade Erasme,
21000 Dijon, France
e-mail: ywache@u-bourgogne.fr

I. Belo · N. Gomes · J. A. Teixeira
IBB-Centre of Biological Engineering, University of Minho,
Campus de Gualtar,
4710-057 Braga, Portugal

L. Cao-Hoang
Laboratory of Post-harvest Technology,
School of Biological and Food Technology,
Hanoi University of Science and Technology,
1 Dai Co Viet Road,
Hanoi, Vietnam

M. Alchihab · P. Thonart · J. Destain
Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité de Bio-Industries,
Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège,
Passage des Déportés, 2,
5030 Gembloux, Belgium

Present Address:
T. M. N. Ta
Institute of Biotechnology and Environment,
Nha Trang University,
02 Nguyen Đình Chieu,
Nha Trang, Khánh Hòa, Vietnam

Introduction

The world of flavours and fragrances has begun to industrialise with the increase in the demand of these substances. One important question of this field is the availability of single compounds to formulate aromas and perfumes. The chemical industry has begun to synthesise such compounds around the year 1850 with methyl salicylate, cinnamic aldehyde, benzaldehyde and vanillin

Published online: 28 October 2010

and about 2,000 synthetic compounds are currently available (Feron and Waché 2005). In the end of the 1980s, the interest of consumers for natural products rose. The word "natural" is defined legally by American and European regulations (e.g., for aromas: CFR 1990 and the European regulation CE 1334/2008) and a substance can be considered as natural when it comes from a plant, animal or microbial origin with a physical, microbial or enzymatic process. Therefore, biotechnological routes may be, if they exclude any chemical steps, a way to get natural products. During this period, many pathways were investigated and about 400 natural aroma compounds were proposed to the market (Feron and Waché 2005). Nowadays, there is a second boom on natural compounds which concerns now the whole world. The pathways proposed in the 1990s are now reinvestigated to make them more efficient and those that have not been economically realistic are revisited. Lactones are a family of flavours and fragrances that are concerned by such a trend. Depending on the compounds, they exhibit fruity and oily properties with peach, apricot or coconut notes. Among them, the pathway to γ-decalactone was the first discovered (Okui et al. 1963) and the resulting lactone is now the compound which is the most produced through biotechnology (Gatfield 1999). It is used in many aroma and cosmetic preparations. It can be easily obtained from hydroxy fatty acids by a yeast transformation and is also naturally present in many products fermented by yeasts. Most of the other lactones are also encountered in fermented products but are far more difficult to produce. Finally, macrocyclic lactones are used for their musk notes in cosmetics and perfumes and their production also uses a yeast metabolic pathway (Waché 2010).

This article proposes to review pathways used to obtain the main lactones, the metabolic engineering strategies employed to increase production and to discuss the main problems encountered in bioengineering such as the toxicity and degradation of the produced lactone and oxygen transfer problems especially during scaling up.

Metabolic pathways and biocatalysis

Four main pathways are used for the production of flavour and fragrance lactones. These pathways consist in the (1) hydroxylation, β-oxidation and lactonisation of fatty acids, (2) reduction of unsaturated lactones, (3) Baeyer–Villiger oxidation of cyclic ketone and (4) α,ω-oxidation of alkanes or fatty acids. This latter pathway gives rise to α,ω-dicarboxylic acids that, in certain conditions of dilution, sequential addition or activation, can lactonise into macrocyclic lactones. These latter compounds will only be mentioned in the present review and more details are available in Waché (2010).

Pathway from fatty acids

The general scheme is presented in Fig. 1. A fatty acid is hydroxylated in odd or even position and undergoes cycles of β-oxidation. For unsaturated fatty acids, some isomerisation steps are required (see Waché et al. (2003) for the production of γ-decalactone from ricinoleic acid) and finally, when the hydroxyl group of the fatty acid is located near the hydroxyl group of the carboxylic end, lactonisation (intramolecular esterification) occurs. Depending on the localisation of the hydroxyl group, lactonisation can give rise to a γ-, δ- or ε-lactone (Fig. 2).

Hydroxylation

Of the different steps, the hydroxylation is often the most difficult, especially to obtain an economically viable process. There is one favourable natural substrate available from castor oil, ricinoleic acid which is hydroxylated in C12. Indeed, this oil comprises between 70% and 90% of the ricinoleyl moiety which is the substrate to produce γ-decalactone (Table 1). Other hydroxylated acids that can be sources of lactones are 5-hydroxy decanoic acid for the production of γ-nonalactone and coriolic acid (a C18 acid hydroxylated in 13) for the production of δ-dodecalactone (Table 1). However, as hydroxylated acids are often not available in economically favourable conditions, several pathways have introduced a hydroxylation step. In current patented processes, this step often consists in the peroxidation of a polyunsaturated fatty acid with lipoxygenase or a similar enzyme (Tables 1 and 2). Other unspecific reactive oxygen species generating enzymes such as peroxidase or xanthine oxidase are also used. Applications of these

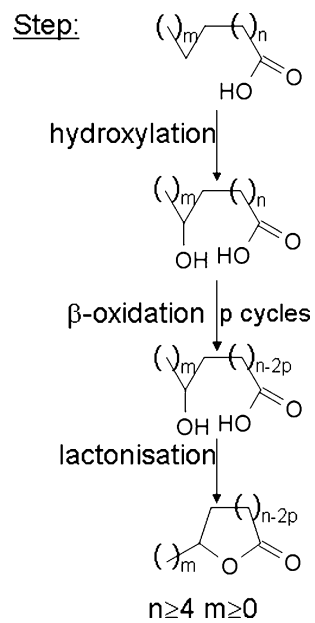


Fig. 1 General scheme for the biotechnological production of lactones

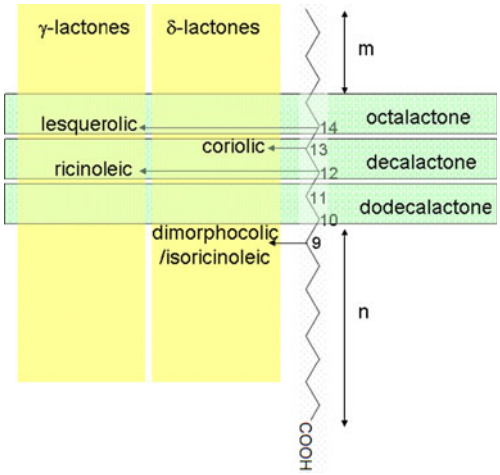


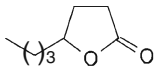
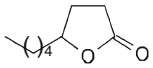
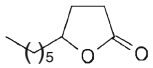
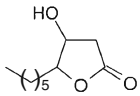
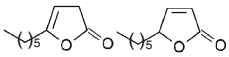
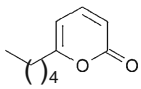
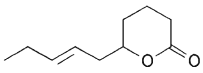
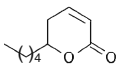
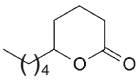
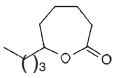
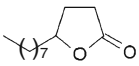
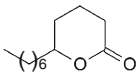
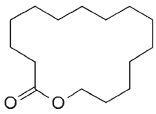
Fig. 2 Location of the hydroxylation on the C18-fatty acid (*arrow*), name of the corresponding fatty acid and resulting lactone (*right* size of the lactone, *top left* size of the cycle)

enzymes concern for instance the production of 6-pentyl-α-pyrone or δ-jasminlactone (Table 1) or of other flavours and fragrances such as verbenone, nootkatone and, when used on carotenoids with an oxidative cleavage step, ionones, cyclocitral and dihydroactinidiolide (Table 2). As these unspecific hydroxylations are not totally satisfying, research of new microbial hydroxylases is growing and the number of publication on the characterisation of this type of enzymes is significantly increasing. However, many hydroxylases are not specific either and the utilisation of *Mortierella* sp for instance to produce octalactone from caprylic (octanoic) acid gives rise to many different lactones (Farbood 1991). Moreover, yields obtained with these enzymes are often quite low. Actually, only ω-oxidation is very specific and enables 100% bioconversion (Picataggio et al. 1993; Picataggio et al. 1992; Picataggio et al. 1991; Waché 2010). Another way to obtain interesting hydroxylases is enzyme directed evolution taking the natural example of what occurred for castor oil. Indeed, in *Ricinus comunis*, the hydroxylase evolved by relatively minor modification of active-site structures of the C12 desaturase gene and modifications of only a few amino-acids result in changes in activity (Broun et al. 1998).

β-oxidation

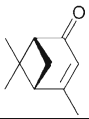
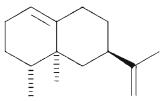
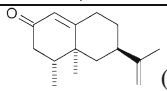
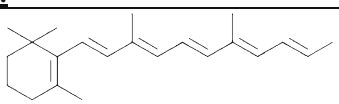
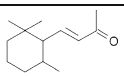
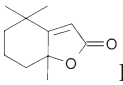
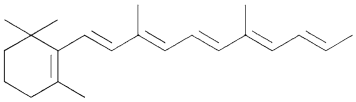
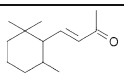
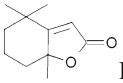
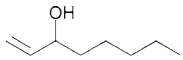
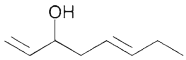
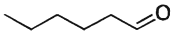
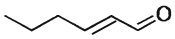
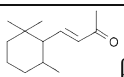
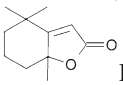
As discussed in Waché et al. (2003), the β-oxidation pathway is quite complex. In fungi, the concerned β-oxidation takes place in peroxisomes and has some specificity. Cells have to take the C18 substrate and oxidise it to a shorter (C12 to C8) lactone. However, β-oxidation is a group of four reactions catalysed by three enzymes. At each cycle, the compound gives rise to a two-carbon shorter metabolite and an acetyl. The cycle is theoretically repeated until the complete breakdown of the substrate. The enzymes involved work usually on several β-oxidation cycles on different chain lengths metabolites. The pathway depends on the pools of acyl-CoA and free CoA, on the presence of molecular oxygen (the first reaction in the peroxisomal pathway is catalysed by an oxidase and not by a dehydrogenase as in the mitochondrial pathway) and from the presence of NAD. In peroxisomes, cofactors would be regenerated by a shuttle mechanism from the mitochondrial respiration which would depend on the peroxisomal and cytoplasmic malate dehydrogenases (Mdh3 and Mdh2, respectively) in *Saccharomyces cerevisiae* (van Roermund et al. 2003). Beside the importance of the different cellular pools, β-oxidation can be channelled and this is particularly the case in the mitochondrial pathway (Eaton et al. 2001). Some authors have studied the model of oxidative degradation or ricinoleate for four different *Sporidiobolus* strains producing various amounts of γ-decalactone (Blin-Perrin et al. 2000). Based on the identification of intermediates for the different strains, they identified free intermediates, leaking pipe and channelled models, and concluded that the way of channelling was important in the objective of lactone production. However, although it can be assumed that a real compartmented channel can avoid completely the production of lactones, this model is probably not occurring in peroxisomal β-oxidation. In peroxisomes, the stage of organisation is not as evolved as in mitochondria (Bartlett and Eaton 1994; Bartlett et al. 1990; Eaton et al. 2000) and the question is more a question of competition between different reactions: at each stage, the metabolite can be hydrolysed if CoA is needed, it can go back in the reverse direction in the pathway if the next enzyme is saturated or the amount of NAD is not sufficient etc. As a result, the number of β-oxidation cycles taking place as well as the type of metabolites exiting the pathway (for instance 3-OH compounds) depends on these pools and ratios. This makes this pathway difficult to control but some rare strains are naturally very performing in good reactor conditions. Industrial strains have thus been selected after a thorough screening while the aeration of the reactor has been optimised for the chosen strains. Although metabolic engineering approaches are rare, a genetic engineering one has been attempted with *Yarrowia lipolytica*. This species is to date the one having the highest number of genes coding for acyl-CoA oxidases, the enzyme catalysing the first step of β-oxidation (Wang et al. 1998; Wang et al. 1999a, b) which exerts also a control on the pathway (Pagot et al. 1998). As shown in Fig. 3a, deleting genes coding for all short-chain specific enzymes resulted in an increased accumulation and a stopped degradation of γ-decalactone (Groguenin et al. 2004; Waché et al. 2000a, b; Waché et al. 1998). Decreasing the acyl-CoA oxidase activity on long chain metabolites had also the surprising effect of increasing the amount of γ-decalactone versus 3-hydroxy-γ-decalactone (Waché et

Table 1 Some lactones available through fungal biotechnology and their precursor and pathway

lactone	Substrate (acids if not otherwise stated)	Product	Reactions involved				References
			Hydro	oxidation	Isom / satur	lacton	
γ-C8	caprylic (C8)	 γ-octalactone	×			×	(Farbood 1991)
γ-C9	δ-OH decanoic	 γ-nonalactone		α-		×	(Lange and Garbe 2000)
	linoleic		×	cleavage	×	×	From Tressl cited by (Feron and Waché 2005)
γ-C10	ricinoleic (12-OH)	 γ-decalactone		β-	×	×	(Waché et al. 2003)
γ-C10	ricinoleic (12-OH)	 3-hydroxylactone	×	β-	×	×	(Waché et al. 2001)
γ-C10	ricinoleic (12-OH)	 decen-4-olides		β-	×	×	(Waché et al. 2001)
δ-C10	linoleic	 6-pentyl-α-pyrone	×	β-	×	×	(Serrano-Carreon et al. 1993)
δ-C10	linolenic	 δ-jasminlactone	×	β-	×	×	(Cardillo et al. 1991)
δ-C10	 Massoia- and unsaturated-lactones	 δ-decalactone			×		(Cardillo et al. 1993; Farbood et al. 1999)
ε-C10	ricinoleic (12-OH)	 ε-decalactone		β-	×	×	(Gatfield et al. 1993)
γ-C12	oleic	 γ-dodecalactone	×	β-	×	×	(Cardillo et al. 1991)
δ-C12	coriolic (13-OH)	 δ-dodecalactone		β-		×	(Cardillo et al. 1991)
Macro cyclic lactones	C15 acids	Ex:  Thibetolide (Exaltolide)		ω-oxidation		×	See (Waché 2010)

Hydro: hydroxylation; Isom/satur: isomerisation/saturation; lacton: lactonisation (esterification).

Table 2 Use of lipid oxidation for the production of aroma compounds

Catalyst	Substrate/reaction	products	Note	reference
Oxidation without cleavage:				
Monoterpenol dehydrogenase from *Pleurotus sapidus*	Alpha-pinene	Verbenone 4 	Rosemary oil	(Krings et al. 2009)
Lipoxygenase from *Glycine max* (soy bean) CYP450 enzymes from *Pseudomonas putida* Fungal laccases	 (+) Valencene	 (+) nootkatone	grapefruit	(Fraatz et al. 2009)
Oxidation with cleavage:				
Fungi, Peroxidase from *Lepista irina* Xanthine oxidase Lipoxygenase	 β-carotene	 β-ionone  DHA	Flower, berries Black tea	(Belin et al. 1994; Ly et al. 2008; Zorn et al. 2003; Zorn et al. 2003)
Peroxidase from *Marasmius scorodonius*	 β-carotene	 β-ionone  DHA	Flower, berries Black tea	(Scheibner et al. 2008)
Lipoxygenase hydroperoxide lyase from *Aspergillus*, *Fusarium*, *Agaricus* sp.	Linoleic, linolenic and arachidonic acids	 1-octen-3-ol  1,5-octadien-3-ol	Green, mushroom	(Hall et al. 2004; Husson et al. 2001)
Recombinant *Capsicum annum* HPL in *Yarrowia lipolytica*	Linoleic, linolenic and acids	 hexanal  hexenal	Green notes	(Bourel et al. 2004)
Peroxidase from *Marasmius Scorodonius* or recombinant enzyme from *E coli*	β-Apo-80-carotenal β-apo-120-carotenal β-carotene lutein …	 β-ionone  DHA	Flower, berries Black tea	(Zelena et al. 2009)

DHA: Dihydroactinidiolide

al. 2001). This lactone accumulates when the regeneration of NAD is not sufficient (Gatfield et al. 1993; Waché et al. 2001). Such a result can be explained by the fact that a decrease in the β-oxidation flux decreases the demand for NAD and thus the cofactor is not anymore a limiting compound for the pathway. This phenomenon occurs also when the aeration of cells is modified and this accumulation can be a symptom of upscaling problems in industry. When aeration is decreased (Figs. 3b and 4), the 3-hydroxy lactone accumulates but when the amount of oxygen is still decreased, oxygen lacks for the oxidation step, the flux in the pathway decreases and thus, NAD is again sufficient and the 3-hydroxy lactone does not accumulate (Escamilla García et al. 2009; Escamilla García et al. 2007a, b).

Isomerisation and lactonisation

The isomerisation step is usually not considered as a rate-limiting one. Moreover, there is a diversity of reactions depending on the microorganisms and probably also on the

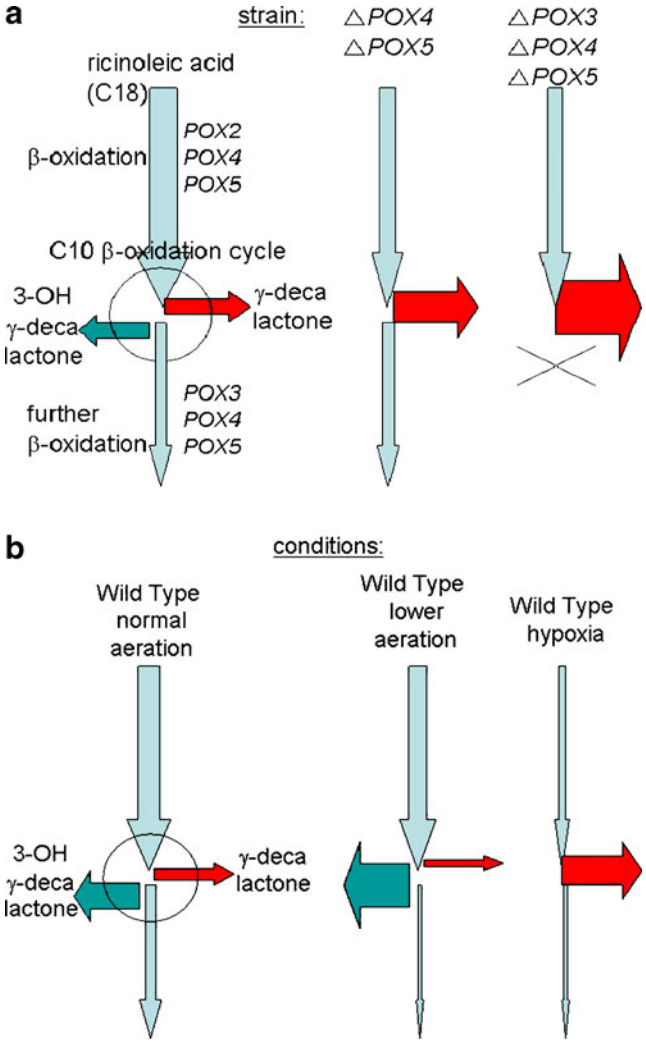


Fig. 3 Factors affecting the production of lactones from ricinoleic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **a** Genetic factors, **b** presence of oxygen

environmental conditions as several intermediates have been detected. This has been shown in Waché et al. (2003).

Lactonisation occurs readily particularly in acidic environments; however, the importance of an enzymatic step is difficult to assess. As discussed in Endrizzi et al. (1996), depending on the strain, the lactone or hydroxy acid can be

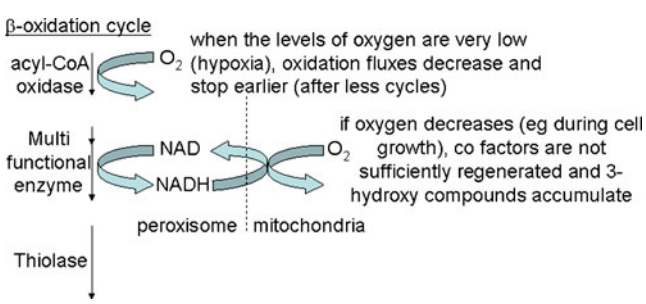


Fig. 4 Oxygen demand in the β-oxidation pathway

detected in the medium but when the lactone form accumulates, it is not known whether esterification took place intracellularly and if so, if an enzyme was responsible for this step.

When lactonisation occurs subsequently to β-oxidation, the structure of the lactone depends on the localisation of the hydroxyl group on the initial fatty acid chain. If the hydroxyl is in even position, it will approach the carboxyl end borne by the carbon atom in 6- or 4-position giving rise to 6-olide or 4-olide (ε- or γ-lactone) while an odd position will result in 5-olide (δ-lactone).

Other pathways

There are other possibilities to obtain lactones than from the hydroxylation and subsequent lactonisation of fatty acids. One possibility is the modification of existing lactones, which consists generally in a saturation of an unsaturated lactone such as massoia lactones. There are several lactones present in the bark oil of the wood of massoia (*Cryptocarya massoia* which is a Lauraceae). This medium-sized tree grows in the rainforest of New Guinea and its oil or bark components are used in traditional medicine and in the flavour and fragrance industry (the authors have no data on the ecological awareness of the massoia oil production, it can only be noted that the tree is not considered as endangered (Burfield 2010)). It possesses 10, 12 or 14 carbon lactones with an unsaturated cycle (Rali et al. 2007). With the help of Baker's yeast or *Pichia*, *Hansenula*, *Debaromyces* or *Geotrichum* sp., it is possible to produce the corresponding saturated lactone (Cardillo et al. 1993). High yields are possible for this reaction which is limited to available unsaturated lactones and thus mainly used to produce δ-decalactone.

For the optical resolution of a racemate of lactones, it is also possible to use the highly specific lactonases (for instance from *Fusarium oxysporum*; Kataoka et al. 2007) however, this may not be useful in the production of natural compounds which are usually present in enantiomeric excesses (it may be noted that the enantiomeric excess contributes to evidence the natural origin of a compound), and the slight difference in the sensorial properties of the optical isomers does not justify any additional step for purification.

In biocatalysis, another way of producing lactones is with monooxygenases catalysing Baeyer–Villiger oxidations. These enzymes work on a cyclic ketone by adding an oxygen molecule in the cycle. Their role has been identified in the synthesis of microbial lactones with an importance in quorum-sensing, hormone and cell-to-cell communication (volatile lactones with a structure close to that of aroma compounds but present in ppm or ppb concentrations; Kataoka et al. 2007). These enzymes are already used in

several enzyme-catalysed chemical synthesis (Alphand et al. 2003). Although they have a great importance for asymmetric synthesis, they may have a limited role to play in the large-scale production of natural compounds as they require large amount of an adequate natural substrate (mainly 4- or 5-carbon-cycle ketones).

Microbial production

Lipid intake by cells

The first contact between fungal cells and their substrate/environment is by interaction between the cell wall and the medium. This part of the process of utilisation of lipid substrates has not resulted in improvements yet but it is still a subject of attention of biotechnologists. The cell wall is a flexible structure situated on the outer face of the cell. This structure plays important roles in protection, permeability, cellular rigidity, influx of nutrient, mating, morphogenesis, interaction between cells and host cells, etc. In general, the major constituents of the fungi cell-wall are β-glucans, chitin and mannoproteins. In a medium containing hydrophobic substrates such as alkanes, lipids, fatty acids, etc., fungal cells can modify their surface properties to carry out the hydrophobic substrate intake. This intake is done in three steps: contact and adsorption over the cell wall; crossing of the cell wall and the membrane; and desorption to enter the cytoplasm. The first step can be done in three different ways: (1) cells with hydrophilic surface properties can produce bioemulsifiers and extracellular lipases in order to improve the solubility of hydrophobic substrates. (2) In addition to probable hydrophobic and electrostatic properties (Ly et al. 2006; Waché et al. 2000a, b), the adhesion of lipid droplets seems to be linked to Lewis acid-base interactions (Aguedo et al. 2003a, b, c). (3) In *Candida tropicalis* and *Y. lipolytica* the synthesis of channels from the membrane and protrusions on the cell surface is induced by the presence of alkanes or fatty acids. These structures seem to be involved in the facilitated adhesion of lipid droplets and could participate to their intake (Mlícková et al. 2004; Osumi et al. 1975). Nevertheless, there is still no evidence of the biochemical composition and regulation of those protrusions. In the facilitated adhesion, we can suggest the role that cell wall components could play in cell surface hydrophobicity and adhesion properties. They would be an interesting target of future research to improve the biotransformation of lipids. Despite the existence of proteins forming a hydrophobic surface layer on the fungi cells such as hydrophobins (Boualem et al. 2008), the participation of cell wall mannoproteins in the intake of lipids and increased surface hydrophobicity has been evidenced. In *S. cerevisiae*, the co-expression of *DAN1* and *AUS1* genes, encoding the mannoprotein Dan1 and the ABC transporter Aus1, respectively, in a wild-type background resulted in sterol intake in aerobiosis (Alimardani et al. 2004). In the human pathogen yeast *Candida glabrata*, the presence of adhesion-like GPI mannoproteins seems to coincide with an incremented hydrophobicity and adhesion capacity (de Groot et al. 2008). Even non-hydrophobic cell wall proteins can enhance the cell hydrophobicity. An example is the mannoprotein Cwp10 of *Metarhizium anisopliae*, the expression of this protein into a Cwp10-absent strain of *Beauveria bassiana* increased the conidial hydrophobicity and the adhesion to hydrophobic Teflon (Li et al. 2010).

Toxicity of lactone

Many natural lactones have a biological activity which can be antibacterial, antifungal or anti-inflammatory. The antimicrobial properties of some lactones were reported: 2-deceno-δ-lactone against bacteria (Nago et al. 1993), 6-pentyl-α-pyrone against producing strain of *Trichoderma viride* (Bonnarme et al. 1997), γ-decalactone and his precursor 4-hydroxydecanoic acid against producing strain of *Sporidiobolus salmonicolor* (Feron et al. 1996). Lactones have also a toxic effect against the producing cells which in conditions of production results in cell growth inhibition and limitation of the production rate (Alchihab et al. 2009; Alchihab et al. 2010; Endrizzi et al. 1996; Feron et al. 1996; Waché et al. 2003). The decline of cell viability has been shown to be associated with an increase in the lactone concentration in culture media during biotransformation (Dufossé et al. 1999; Feron et al. 1997). The degree of toxicity has been also reported as depending on the structure of the lactone and particularly on the length of the lateral hydrophobic chain. For example, at 300 mg/L, butyrolactone has almost no effect on the cell growth while the same concentration of γ-decalactone totally inhibits cell development (Aguedo et al. 2002). These authors have also studied the mechanisms underlying the toxicity of the lactone compounds toward the model yeast *Y. lipolytica* and found that lactone decreased the intracellular pH (through a H^+-ATPase inhibition and an alteration of membrane integrity) and increased the cellular membrane fluidity at the same time (Aguedo et al. 2003a, b, c). This fluidising effect occurred even at non-toxic concentrations showing that lactones diffuse well in cellular membrane. It is proposed that the toxic effect of lactone compounds on yeast may be linked to a strong interaction of the molecule with cell membrane lipids and components (Aguedo et al. 2003a, b, c). Recent work has shown that the cellular response to this interaction depends on the cellular state and the presence of lipids in the culture. In the case of *Y. lipolytica*, a concentration of 3 g/L of γ-dodecalactone leads to a 50%

cell death when cultured in glucose while this concentration exhibits no effect on the viability of cells grown in methyl oleate (Ta et al. 2010a, b). The authors have also shown that this lactone caused a sterol depletion which altered cell physiology and that an incorporation of sterol into the cellular membrane could make the cells more resistant. Our recent laboratory results reveal also the role of intracellular lipids structure as lipid bodies in the cellular response toward lactones. In this case, cellular resistance is observed to be linked with the presence of intracellular lipid bodies as the cells possessing more lipid bodies are more resistant toward lactone (Ta et al., in preparation).

Processes to decrease lactone toxicity in bioreactors

Some strategies have been developed to avoid lactone toxicity. The most common methods used to remove organic compounds from the fermentation medium involve solvent extraction, trapping in vegetable oils, adsorption on activated carbon or on porous hydrophobic polymers. β-Cyclodextrins were also used to extract numerous compounds by inclusion (Bar 1989).

Three techniques (in situ trapping in oily phases, inclusion in β-cyclodextrins, adsorption on porous hydrophobic sorbents) were studied to overcome the toxicity of γ-decalactone produced by *S. salmonicolor* using ricinoleic acid as precursor (Dufossé et al. 1999). Oily phases added to the media (olive oil, paraffin,...) have a protective effect on *S. salmonicolor*. β-Cyclodextrins were added in the culture medium (5 g/L) containing toxic concentrations of γ-decalactone (400 and 600 mg/L). The lactone trapping in cyclodextrins were shown insufficient for the preservation of cell viability. On the other hand, the adsorption of γ-decalactone on activated carbon and porous hydrophobic polymers (Porapak Q, Chromosorb 105 and SM4) is a suitable method to extract this molecule from aqueous medium (Dufossé et al. 1999; Souchon et al. 1998). These authors reported that the presence of adsorbents in the biotransformation medium allows them to maintain a very low concentration of lactone in the medium and so reduces the toxicity against the yeast.

The utilisation of immobilised cells of *S. salmonicolor* for the biotransformation of ricinoleic acid into γ-decalactone was another technique carried out in order to protect the cells (Lee et al. 1998). This yeast was immobilised in *k*-carrageenan, chitosan, agarose or calcium alginate. Among the different methods of immobilisation, calcium alginate is the most adequate procedure for the production of γ-decalactone. The production of γ-decalactone with alginate-immobilised *S. salmonicolor* is higher than that with free cells. These authors reported that this enhancement in the production of γ-decalactone could be attributed to the newly released cells from calcium alginate beads. In contrast, immobilisation of *S. salmonicolor* with *k*-carrageenan, chitosan, agarose reduces the production of the lactone as compared with free cells. The influence of some physical factors including preculture time, media, initial pH and bead concentrations on the production of γ-decalactone by immobilised *S. salmonicolor* with calcium alginate beads was also investigated (Lee et al. 1999). They observed that the preculture time and bead concentration did not affect the production of γ-decalactone. However, the use of immobilised cells showed better tolerance to pH perturbations.

Furthermore, it is possible to decrease the fluidising action of γ-decalactone on the cells by lowering the process temperature. In this aim, Alchihab et al. (2009) have used a psychrophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. This yeast produces high amounts of 4-hydroxydecanoic acid and γ-decalactone from castor oil (4.2 and 2.2 g/L, respectively) at 12 °C (Alchihab et al. 2010). These authors have tested the toxic effects of the two molecules on the growth of *R. aurantiaca*. The results show that the 4-hydroxydecanoic acid is less toxic to *R. aurantiaca* than that of γ-decalactone.

In order to reduce the toxicity of lactone toward *R. aurantiaca*, the effects of different natural gums (gum arabic, gum xanthan and gum tragacanth) on the growth and the production of γ-decalactone by *R. aurantiaca* were studied. The gum tragacanth has a protective effect on the growth of *R. aurantiaca* (Alchihab et al. 2010). They reported that the gum tragacanth plays an important role as surfactant in the biotransformation. This could be linked to an enhancement in oxygen transfer and solubility in the medium. In fact, Gomes et al. (2007) have reported that the addition of small amounts of Tween 80 in the medium strongly increases the oxygen transfer and thus improves γ-decalactone production by *Y. lipolytica*.

Oxygen transfer in emulsified culture media

It is well known that oxygen affects aroma production by *Y. lipolytica* (Aguedo et al. 2005). Different approaches have been used to enhance the oxygen transfer rate (OTR) to yeast cultures that are composed of a solid phase (cells), biphasic liquid phases and a gas phase. In such complex systems, oxygen transfer rate from air to culture may be influenced by many factors, such as the nature of the hydrophobic phase and respective concentration, bioreactor design and operation.

In traditional stirred tank bioreactors, OTR from gas to the liquid phase has been improved by using high agitation and aeration rates (Alonso et al. 2005; Escamilla García et al. 2007a, b), which have a direct impact on the volumetric mass transfer coefficient, k_La (Eq. 1).

$$OTR = k_La(O^s - O) \quad (1)$$

In fact, OTR depends on k_La and on the driving force for the mass transfer which is the difference between the oxygen solubility (O^s) and the dissolved oxygen concentration (O) in the medium.

Since in many cases, the culture medium is an oil-in-water emulsion, such as in the case of aroma production from methyl ricinoleate, the effect on k_La of the second water-immiscible phase has been taken into account through empirical correlations such as Eq. 2 (Gomes et al. 2007).

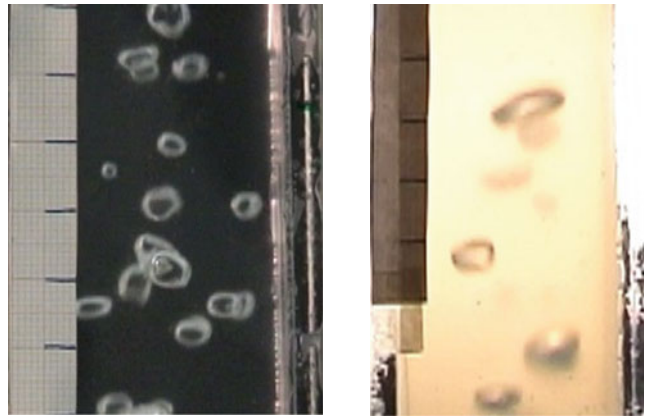
$$k_La = \delta \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^{\alpha} \cdot (v_s)^{\beta} \cdot (1 - X_{\mathrm{ORG}})^{\gamma} \quad (2)$$

where Pg represents the power requirement of the aerated bioreactor; V, the bioreactor working volume; v_s, the superficial gas velocity through the bioreactor; X_{ORG}, the fraction of the total bioreactor working volume that is in the organic phase (the hydrophobic substrate or the surfactants) and δ, α, β and γ are real constants. These equations have been adapted from two-phase partitioning bioreactors modelling where the second water-immiscible phase is an inert hydrophobic compound added to the culture medium as an oxygen carrier (Nielsen et al., 2003). This is the case of PFCs (Amaral et al. 2006; Amaral et al. 2008) and silicone oils (Ates et al. 2002).

The correlation of Eq. 1 is of great importance to scale-up problems since the majority of strategies include the criteria of keeping k_La constant for aerobic processes (Ju and Chase 1992). Moreover, since mixing of dispersed phases, both gas bubbles and oil droplets, are of extreme importance in emulsified culture media, the maintenance of equal power input per unit volume (P_g/V) may be included in the combination of criteria for scale-up process such as aroma production from castor oil or its derivatives.

The effect of the hydrophobic phase on k_La may vary according to the range of concentrations (Gomes et al. 2007). Studies conducted in pneumatic agitated bioreactors, like bubble columns and air-lift bioreactors, have shown that the increase of the hydrophobic fraction in a oil-in-water emulsion can decrease k_La, because it causes a decrease in the interfacial area (a) for mass transfer, as a consequence of the partition of the surfactant molecules between water and oil phases, leading to the increase of air bubbles size and coalescence, thus decreasing the bubble dispersion in the liquid medium (Gómez-Díaz et al. 2009; Fig. 5).

Air-lift bioreactors have great potential for the development of bioprocesses based in aerobic cultures due to the high oxygen transfer rates capacity of these systems (Freitas and Teixeira 2001). Due to the absence of mechanical stirring in these bioreactors, aeration rate is the key operating factor for improving mixing and emulsion stability, as well as oxygen transfer rate (Gómez-Díaz et al. 2010). A lab-scale air-lift bioreactor was already



[Tween 80] = 0.093 %
[MR] = 0 %

[Tween 80] = 0.093 %
[MR] = 0.54 %

Fig. 5 Influence of methyl ricinoleate (MR) concentration upon the bubbles size distribution in a column bubbles bioreactor (adapted with permission from (Gómez-Díaz et al. 2009))

successfully applied in the biotransformation of methyl ricinoleate into aroma by *Y. lipolytica* W29 and it was shown that the aeration conditions determined the production of aroma (Escamilla García 2008). Thus in this type of bioreactors volumetric gas flow rate per unit liquid volume (vvm) or superficial gas velocity (v_s) are the crucial factors to use as scale-up criteria.

The presence of hydrophobic compounds in culture medium generally leads to a global enhancement of OTR which is mostly attributed to the high affinity of oxygen to these compounds, thus increasing the driving force for oxygen mass transfer from gas to the bulk liquid phases.

For many cases, the intrinsic factor for oxygenation optimisation is the level of oxygen in the medium instead of aeration rate. Dissolved oxygen concentration control was proven to be an effective way of selecting the metabolites produced in the biotransformation of methyl ricinoleate by *Y. lipolytica* W29 (Escamilla García et al. 2009).

Ju and Chase (1992) proposed improved scale-up strategies for aerobic fermentations by keeping OTR at predetermined dissolved oxygen concentrations that can be achieved in different scales of operation by using different oxygen partial pressures in the influent gas streams. These strategies could be further improved by using hyperbaric bioreactors (Belo et al. 2005). In these bioreactors, the increase of OTR is attained by the increase of total air pressure, and consequently of oxygen partial pressure.

Hyperbaric bioreactors were successfully applied in biotransformation of methyl ricinoleate into aroma by *Y. lipolytica* cultures. Cellular growth was stimulated under increased air pressure up to 5 bar and the influence of oxygen on the activities of enzymes of β-oxidation

pathway in *Y. lipolytica* has been highlighted (Aguedo et al. 2005).

Production of γ-decalactone in large scale

As described above, the oxygen transfer is a parameter of great importance in order to produce lactone by yeast bioconversion of oils or fatty acids. To perform this parameter and to enhance scale of production, many techniques have been tested: batch, repeated batch, fed batch.

Most papers reporting γ-decalactone production use batch mode in bioreactors. Feron et al. (1996) compared the γ-decalactone production by *S. salmonicolor* and *S. ruinenii* in a 7-L bioreactor using 41 g/L of methyl ricinoleate. The cultures were stirred (250 rpm) and aerated (1 vvm) with a volumetric oxygen transfer coefficient of 90 h^{-1}. *S. salmonicolor* produced 0.6 g/L of γ-decalactone after 7 days of culture whereas *S. ruinenii* produced 1.6 g/L after 6 days of culture.

Aguedo et al. (2005) studied the production of decalactones under different conditions of agitation and aeration at atmospheric pressure in a 2-l bioreactor. They reported that the increasing of K_La from 26 to 123 h^{-1} prevented the depletion of O_2 from the medium during the phase of γ-decalactone production and increased the concentration of 3-hydroxy-γ-declactone from 122 to 263 mg/L. A further increase of K_La to 162 h^{-1} by an aeration of 1.8 vvm maintained the dissolved O2 at its maximum level but caused a substantial decrease in the concentration of decalactones.

Gomes et al. (2007) also investigated the influence of K_La on the production of γ-decalactone by *Y. lipolytic* at different values (26, 32, 49, 70, 102, 125 and 151 h^{-1}) in a 2-L bioreactor. They observed that the maximum production of γ-decalactone (140 mg/L) was obtained at 70 h^{-1}.

Rabenhorst and Gatfield (2000) compared the γ-decalactone production using *Y. lipolytica* strain HR 145 (DSM 12397) in 10 and 300-L bioreactors. In the 10-L bioreactor, the optimum conditions of agitation and aeration for γ-decalactone production were 400 rpm and 3 L/min leading to a production of 12.5 g/L after 52 h. For the 300-L bioreactor, the best agitation and aeration were 180 rpm and 35 L/min, which yielded similar production after 69 h.

Alchihab et al. (2010) have produced γ-decalactone by the psychrophilic strain of the yeast *R. aurantiaca* in 20 and 100-L batch bioreactors. By using 20 g/L of castor oil, 6.5 and 4.5 g/L of γ-decalactone were obtained in 20- and 100-L bioreactors, respectively.

The repeated-batch processes combine advantages of fed-batch and batch processes, mainly making possible to conduct the process during long periods and to improve the production compared to the batch process. While investigating the γ-decalactone production by *Sporidiobolus ruinenii* in a 7-L bioreactor using four successive batch fermentations, Dufossé et al. (1998) obtained 5.5 g/L of γ-decalactone in each 10-days run.

The fed-batch processes are characterised by the addition of one or more nutrients to the bioreactor during the process, maintaining the products inside the bioreactor until the final fermentation. The fed-batch processes are employed to prevent the inhibition of cells by substrate or metabolic products. Lee et al. (1995) investigated the influence of pH and aeration on γ-decalactone production by *Sporobolomyces odorus* in a 5-L batch bioreactor. These authors showed that maintaining the pH of the medium at 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 neither affected the growth of *S. odorus* nor improved the yield of γ-decalactone. The greater yield of γ-decalactone was obtained when aeration was maintained at 1.0 or 1.5 vvm. Fed-batch cultures were then carried out in a 5-L biorector to improve cell concentration and γ-decalactone with additions of castor oil hydrolysate on 3rd, 4th and 5th day of cultivation. They found that the maximum yield of γ-decalactone (208 mg/L) increased with the number of castor oil hydrolysate feedings.

Conclusion

In conclusion, fungi are interesting catalysts to degrade hydroxylated fatty acids and produce lactones, such as the well-studied and produced γ-decalactone. Moreover, they can also realise the hydroxylation step if adequate substrates are not available. This field of investigation is in rapid development and resulted already on the production of some lactones such as 6-pentyl-α-pyrone. Many other lactones can be produced but their price depends on the availability of natural corresponding substrates. To increase those productions, other pathways could be of interest in the future but are still in the laboratory stage.

Once the association of substrate and catalyst is found, comes the time of bioreactor optimisation. Some steps are delicate in particular the way oxygen is provided to cells, the more so as this oxygen transfer is difficult to maintain when the process is scaled up. The production of lactone has become a model system for the study of oxygen in this multiphasic reactor which can possess an additional phase to trap the lactone produced and thus, detoxify the biotransformation medium. Such a complex system is an exciting laboratory challenge which has probably no industrial reality yet as most of the industrial productions is likely to be still based on classical batch reactors. Despite an important decrease in the price of γ-decalactone, productivity gains are thus still ahead.

Acknowledgements The authors acknowledge Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for the financial support provided (SFRH/BD/28039/2006).

References

Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin J-M, Gervais P (2002) Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. Biotechnol Lett 24:1975–1979

Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin JM (2003a) Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. Int J Food Microbiol 80:211–215

Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin JM (2003b) Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. J Appl Microbiol 94:258–265

Aguedo M, Waché Y, Mazoyer V, Sequeira-Le Grand A, Belin JM (2003c) Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. J Agric Food Chem 51:3007–3011

Aguedo M, Gomes N, Escamilla Garcia E, Waché Y, Mota M, Teixeira JA, Belo I (2005) Decalactones production by *Yarrowia lipolytica* under increased O2 transfer rates. Biotechnol Lett 27:1617–1621

Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Majad L, Ghalfi H, Wathelet JP, Thonart P (2009) Production of gamma-decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. Appl Biochem Biotechnol 158:41–50

Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Wathelet JP, Thonart P (2010) The utilization of gum tragacanth to improve the growth of *Rhodotorula aurantiaca* and the production of gamma-decalactone in large scale. Appl Biochem Biotechnol 162:233–241

Alimardani P, Regnacq M, Moreau-Vauzelle C, Ferreira T, Rossignol T, Blondin B, Berges T (2004) SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. Biochem J 381:195–202

Alonso F, Oliveira E, Dellamora-Ortiz G, Pereira-Meirelles F (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. Braz J Chem Eng 22:9–18

Alphand V, Carrea G, Wohlgemuth R, Furstoss R, Woodley JM (2003) Towards large-scale synthetic applications of Baeyer–Villiger monooxygenases. Trends Biotechnol 21:318–323

Amaral P, Rocha-Leao M, Marrucho I, Coutinho J, Coelho M (2006) Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. J Chem Technol Biotechnol 81:1368–1374

Amaral PF, Freire MG, Rocha-Leao MH, Marrucho IM, Coutinho JA, Coelho MA (2008) Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. Biotechnol Bioeng 99:588–598

Ates S, Dingil N, Bayraktar E, Mehmetoglu U (2002) Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil. Process Biochem 38:433–436

Bar R (1989) Cyclodextrin-aided bioconversions and fermentations. Trends Biotechnol 7:2–4

Bartlett K, Eaton S (1994) Intermediates of mitochondrial beta-oxidation. Biochem Soc Trans 22:432–436

Bartlett K, Hovik R, Eaton S, Watmough NJ, Osmundsen H (1990) Intermediates of peroxisomal beta-oxidation. Biochem J 270: 175–180

Belin JM, Dumont B, Ropert F (1994) Procédé de fabrication, par voie enzymatique, d'arômes, notamment des ionones et des aldéhydes en C6 à C10. Patent WO 94/08028

Belo I, Pinheiro R, Mota M (2005) Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. J Biotechnol 115:397–404

Blin-Perrin C, Molle D, Dufossé L, Le-Quéré J-L, Viel C, Mauvais G, Féron G (2000) Metabolism of ricinoleic acid into gamma-decalactone: beta-oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. FEMS Microbiol Lett 188:69–74

Bonnarme P, Djian A, Latrasse A, Féron G, Giniès C, Durand A, Le Quéré J-L (1997) Production of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. J Biotechnol 56:143–150

Boualem K, Waché Y, Garmyn D, Karbowiak T, Durand A, Gervais P, Cavin J-F (2008) Cloning and expression of genes involved in conidiation and surface properties of *Penicillium camemberti* grown in liquid and solid cultures. Res Microbiol 159:110–117

Bourel G, Nicaud JM, Nthangeni B, Santiago-Gomez P, Belin JM, Husson F (2004) Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes. Enz Microb Technol 35:293–299

Broun P, Shanklin J, Whittle E, Somerville C (1998) Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. Science 282:1315–1317

Burfield T (2010) 'Banned' essential oils'. Compiled from a variety of cropwatch sources. July 2010 v1.08. http://www.cropwatch.org/Banned%20essential%20oils%20v1.08.pdf

Cardillo R, Fuganti C, Barbeni M, Cabella P, Guerda P, Allegrone G (1991) Procédé de production microbiologique des gamma- et delta-lactones. Patent EP0412880

Cardillo R, Fuganti C, Barbeni M, Allegrone G (1993) Procédé pour la préparation de delta lactones saturées par biohydrogénation des composés insaturés naturels correspondants à l'aide de micro-organismes. Patent EP O577463A2

de Groot PW, Kraneveld EA, Yin QY, Dekker HL, Gross U, Crielaard W, de Koster CG, Bader O, Klis FM, Weig M (2008) The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. Eukaryot Cell 7:1951–1964

Dufossé L, Feron G, Mauvais G, Bonnairme P, Durand A, Spinnler H (1998) Production of gamma-decalactone and 4-hydroxy-decanoic acid in the genus *Sporidiobolus*. J Ferment Bioeng 86:169–173

Dufossé L, Souchon II, Feron G, Latrasse A, Spinnler HE (1999) In situ detoxification of the fermentation medium during gamma-decalactone production with the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. Biotechnol Prog 15:135–139

Eaton S, Bursby T, Middleton B, Pourfarzam M, Mills K, Johnson AW, Bartlett K (2000) The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? Biochem Soc Trans 28:177–182

Eaton S, Bartlett K, Quant PA (2001) Carnitine palmitoyl transferase I and the control of beta-oxidation in heart mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 285:537–539

Endrizzi A, Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud J-M, Belin J-M (1996) Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. Crit Rev Biotechnol 16:301–329

Escamilla García E (2008) Aspects de la degradation de substrats hydrophobes en composés d'arômes par la levure *Yarrowia lipolytica*. PhD Thesis Université de Bourgogne

Escamilla García E, Belin J-M, Waché Y (2007a) Use of a Doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*. J Appl Microbiol 103:1508–1515

Escamilla García E, Nicaud J-M, Belin J-M, Waché Y (2007b) Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of gamma-decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a factorial approach. Biotechnol J 2:1280–1285

Escamilla García E, Aguedo M, Gomes N, Choquet A, Belo I, Teixeira J, Belin J, Waché Y (2009) Production of 3-hydroxy-gamma-decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Mol Catal, B 57:22–26

Farbood M (1991) Octalactone-containing composition, fermentation process for producing same and organoleptic uses thereof. Patent US719154

Farbood M, Harris G, Kizer LE, McLean LB, Morris J (1999) Process for preparing saturated lactones, products produced therefrom and organoleptic uses of said products. Patent EP0952226

Feron G, Waché Y (2005) Microbial biotechnology of food flavor production. In: Dominick T (ed) Food biotechnology, 2nd edn. Dekker, New York, pp 407–441

Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Le Quere JL, Spinnler HE (1996) Production, identification, and toxicity of gamma-decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. Appl Environ Microbiol 62:2826–2831

Feron G, Dufossé L, Mauvais G, Bonnarme P, Spinnler HE (1997) Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of gamma-decalactone. FEMS Microbiol Lett 149:17–24

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2009) Nootkatone—a biotechnological challenge. Appl Microbiol Biotechnol 83:35–41

Freitas C, Teixeira J (2001) Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. Chem Eng J 84:57–61

Gatfield IL (1999) Biotechnological production of natural flavor materials. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (eds) Flavor chemistry, thirty years of progress. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp 211–227

Gatfield IL, Güntert M, Sommer H, Werkhoff P (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particuliar reference to gamma-decalactone. Chem Mikrobiol Technol Lebensm 15:165–170

Gomes N, Aguedo M, Teixeira JA, Belo I (2007) Oxygen mass transfer in a biphasic medium: influence on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ-decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Biochem Eng J 35:380–386

Gómez-Díaz D, Gomes N, Teixeira J, Belo I (2009) Oxygen mass transfer to emulsions in a bubble column contactor. Chem Eng J 152:354–360

Gómez-Díaz D, Gomes N, Teixeira J, Belo I (2010) Gas–liquid interfacial area in the oxygen absorption to oil-in-water emulsions in an airlift reactor. Can J Chem Eng 88:561–564

Groguenin A, Waché Y, Escamilla Garcia E, Aguedo M, Husson F, LeDall M, Nicaud J, Belin J (2004) Genetic engineering of the beta-oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. J Molec Catal B 28:75–79

Hall CE, Husson F, Kermasha S (2004) Characterization of an enriched lipoxygenase extract from *Aspergillus niger* in terms of specificity and nature of flavor precursors production. J Mol Catal B 29:201–209

Husson F, Bompas D, Kermasha S, Belin JM (2001) Biogeneration of 1-octen-3-ol by lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus*. Process Biochem 37:177–182

Ju L-K, Chase G (1992) Improved scale-up strategies of bioreactors. Bioprocess Bioeng 8:49–53

Kataoka M, Honda K, Sakamoto K, Shimizu S (2007) Microbial enzymes involved in lactone compound metabolism and their biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol 75: 257–266

Krings U, Lehnert N, Fraatz MA, Hardebusch B, Zorn H, Berger RG (2009) Autoxidation versus biotransformation of alpha-pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of alpha-pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. J Agric Food Chem 57:9944–9950

Lange H, Garbe L (2000) Yeast alpha-oxidation enzymes, used to degrade organic compounds by one carbon atom, used to convert 5-hydroxydecanoic acid to gamma-nonalactone. Patent DE19929577

Lee S, Lin S, Chou C (1995) Growth of and production of γ-decalactone by *Sporobolomyces odorus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. J Ferment Bioeng 80:195–199

Lee S, Cheng H, Chen W, Chou C (1998) Production of gamma-decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Process Biochem 33:453–459

Lee S, Cheng H, Chen W, Chou C (1999) Effect of physical factors on the production of γ-decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Process Biochem 34:845–850

Li J, Ying SH, Shan LT, Feng MG (2010) A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. Appl Microbiol Biotechnol 85:975–984

Ly MH, Naïtali M, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M, Le TM, Belin J-M, Waché Y (2006) Importance of the surface charge of bacteria to control the stability of emulsions. Internat J Food Microbiol 112:26–34

Ly MH, Cao Hoang L, Belin J-M, Waché Y (2008) Improved co-oxidation of beta-carotene to beta-ionone using xanthine oxidase-generated reactive oxygen species in a multiphasic system. Biotechnol J 3:220–225

Mlícková K, Roux E, Athenstaedt K, D'Andrea S, Daum G, Chardot T, Nicaud J-M (2004) Lipid accumulation, the formation of lipid bodies, and acyl-CoA oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol 70:3918–3924

Nago H, Matsumoto M, Nakai S (1993) 2-deceno-delta-lactone-producing fungi, strains of *Fusarium solani*, isolated by using a medium containing decano-delta-lactone as the sole carbon source. Biosci Biotechnol Biochem 57:2107–2110

Nielsen DR, Daugulis AJ, McLellan PJ (2003) A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase partitioning bioreactors. Biotechnol Bioeng 83:735–742

Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M (1963) Metabolism of hydroxy fatty acids: 1. Metabolic conversion of ricinoleic acid by a certain microorganism to 8-D-(+)-hydroxy tetradec-cis-5-enoic acid. J Biochem 53:265–270

Osumi M, Fukuzumi F, Yamada N, Nagatani T, Teranishi Y, Tanaka A, Fukui S (1975) Surface structure of some *Candida* yeast cells grown on *n*-alkanes. J Ferment Technol 53:244–248

Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud J-M, Waché Y, Belin J-M (1998) Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 49:295–300

Picataggio S, Deanda K, Mielenz J (1991) Determination of *Candida tropicalis* Acyl Coenzyme A Oxidase Isozyme Function by Sequential Gene disruption. Molecular and cellular Biology 11:4333–4339

Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, Lanning D, Reynolds R, Mielenz J, Eirich LD (1992) Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long chain dicarboxylic acids. Biotechnology 10:894–898

Picataggio S, Deanda K, Dudley E (1993) Site-specific modification of the *Candida tropicalis* genome. Patent US5254466 (A)

Rabenhorst J, Gatfield I (2000) Process for the production of gamma-decalactone. Patent WO0024920

Rali T, Wossa S, Leach D (2007) Comparative chemical analysis of the essential oil constituents in the bark, heartwood and fruits of *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. (Lauraceae) from Papua New Guinea. Molecules 12:149–154

Scheibner M, Hulsdau B, Zelena K, Nimtz M, de Boer L, Berger RG, Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade beta-carotene. Appl Microbiol Biotechnol 77:1241–1250

Serrano-Carreon L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM (1993) Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl-alpha-pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. Appl Environ Microbiol 59:2945–2950

Souchon I, Spinnler HE, Dufossé L, Voilley A (1998) Trapping of gamma-decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents: application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. Biotechnol Tech 12:109–113

Ta TMN, Cao-Hoang L, Lourdin M, Phan-Thi H, Goudot S, Marechal PA, Waché Y (2010a) A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol (in revision)

Ta TMN, Cao-Hoang L, Phan-Thi H, Tran HD, Gresti J, Marechal PA, Cavin JF, Waché Y (2010b) New insights into the effect of medium chain length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. Appl Microbiol Biotechnol 87:1089–1099

van Roermund CW, Waterham HR, Ijlst L, Wanders RJ (2003) Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Mol Life Sci 60:1838–1851

Waché Y (2010) Production of dicarboxylic acids and flavours by the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G, Steinbüchel A (eds) *Yarrowia lipolytica*, molecular biology and biotechnology (in press). Springer, Berlin

Waché Y, Pagot Y, Nicaud J-M, Belin J-M (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. J Mol Catal B 149:165–169

Waché Y, Bergmark K, Courthaudon J-L, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2000a) Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. Lett Appl Microbiol 30: 183–187

Waché Y, Laroche C, Bergmark K, Moller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall M-T, Wang H, Nicaud J-M, Belin J-M (2000b) Involvement of acyl-CoA oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol 66:1233–1236

Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield I, Nicaud J-M, Belin J-M (2001) Role of β-oxidation enzymes in the production of γ-decalactones from methyl ricinoleate. Appl Environ Microbiol 67:5700–5704

Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2003) Catabolism of hydroxyacids and production of lactones by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 61:393–404

Wang H, Le Clainche A, Le Dall M-T, Waché Y, Pagot Y, Belin JM, Gaillardin C, Nicaud JM (1998) Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase *ACO3* gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. Yeast 14:1373–1386

Wang H, Le Dall M-T, Waché Y, Laroche C, Belin J-M, Gaillardin C, Nicaud J-M (1999a) Evaluation of acyl CoA oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. J Bacteriol 181:5140–5148

Wang H, Le Dall M-T, Waché Y, Laroche C, Belin J-M, Nicaud J-M (1999b) Cloning, sequencing and characterization of five genes coding for Acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochem Biophys 31:165–174

Zelena K, Hardebusch B, Hulsdau B, Berger RG, Zorn H (2009) Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases. J Agric Food Chem 57:9951–9955

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Berger RG (2003a) Cleavage of beta, beta-carotene to flavor compounds by fungi. Appl Microbiol Biotechnol 62:331–336

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimtz M, Berger RG (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves beta, beta-carotene to flavor compounds. Biol Chem 384:1049–1056

2.5 La mélanine chez les champignons

Les mélanines sont des pigments de couleurs variées amplement distribués chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Ces macromolécules chargées négativement, hydrophobes et de haut poids moléculaire sont formées par la polymérisation oxydative de composés phénoliques ou indoliques. Les trois types de mélanines sont : 1) Les eumélanines de couleur noir ou marron produites de l'oxydation de la tyrosine (et/ou phénylalanine) en o-dihydroxyphénylalanine (DOPA) ; 2) les phéomélanines de couleur jaune à rouge produits de la cystéinylation du DOPA ; et 3) les allomélanines, synthétisées via la voie des pentacétides par l'oxydation et la polymérisation de dihydroxynaphtalène (DHN) ou tétrahydroxynaphtalène (DHN-mélanines), d'acide homogentisique (pyomélanines), de γ-glutaminyl-4-hydroxybenzène, de cathécoles, ou d'acide 4-hydrophénylacétique (Langfelder *et al* 2003 ; Jacobson 2000 ; Plonka et Grabacka, 2006).

Les deux types de mélanines les plus connus chez les champignons sont la DHN-mélanine et la DOPA-mélanine dont la fonction a été plutôt liée à la protection des cellules contre les facteurs externes comme par exemple, les radiations UV, l'oxydation, les températures extrêmes, la toxicité par des métaux lourds, etc. Mais chez les champignons pathogènes la mélanine est aussi un facteur de virulence et de pathogénie qui leur procure de la turgescence pour assurer l'invasion des tissus végétaux et les protège de l'action des enzymes chez des plantes affectées, ou de la réponse immunitaire chez l'être humain. D'autres fonctions ont aussi été attribuées à la mélanine comme donner de la rigidité à la paroi cellulaire et stocker de l'eau et des ions pour éviter la dessiccation (Jacobson, 2000 ; Casadevall *et al*., 2000 ; Nosanchuk et Casadevall, 2003).

La localisation de la mélanine chez les champignons est variée, on peut la trouver entre la membrane et la paroi cellulaire, intercalée dans la paroi cellulaire, ou externe à la paroi cellulaire. La mélanine externe peut être produite dans la cellule et externalisée, ou produite à l'extérieur de la cellule à partir soit de l'oxydation de certains composants du milieu de culture par des phénoloxydases extracellulaires, soit de l'autoxydation des composés phénoliques libérés dans le milieu tels que le L-DOPA ou le catéchol en forme de mélanine. Quelquefois cette mélanine externe s'associe à la surface cellulaire mais elle n'est pas fortement liée à la paroi (Langfelder *et al*., 2003).

2.5.1 Voies de synthèse de la mélanine chez les champignons

Trois voies de synthèse de mélanine ont été décrites chez les champignons, la voie DHN-mélanine, synthétisée par la majorité des ascomycètes ; la voie pyomélanine, détectée jusqu'à présent chez *Y. lipolytica* (Carreira *et al*., 2001b), *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus fumigatus* ; et la voie DOPA-mélanine synthétisée par des espèces d'ascomycètes et quelques basidiomycètes (Langfelder *et al*., 2003). Les modèles généraux de la biosynthèse de DHN-mélanine et pyomélanine que nous décrivons ici sont ceux déduits d'*A. fumigatus* dont les gènes participants et les produits intermédiaires ont été identifiés (Pihet *et al*., 2009), mais on peut s'attendre à des modifications spécifiques en fonction de l'espèce.

2.5.1.1 La voie DHN-mélanine

Les précurseurs initiaux pour la biosynthèse de DHN-mélanine sont une molécule d'acétyl-CoA et quatre molécules de malonyl-CoA, ou uniquement des molécules de malonyl-CoA (Figure 10). Certains champignons comme *Colleotrichum lagenarium* transforment le malonyl-CoA en 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalène (1,3,6,8-THN) par une polycétide synthase (Pks) en une seule étape (Fujii *et al*., 2000). Par contre chez *Aspergillus fumigatus*, à partir d'acétyl-CoA et/ou de malonyl-CoA l'enzyme Alb1p/Pks (ACJ13039) forme l'heptacétide naphtopyrone qui est donc transformée en 1,3,6,8-THN par l'hydrolase polyketide Ayg1 (ACJ13045) (Fujii *et al*., 2004). Ensuite le 1,3,6,8-THN est réduit par la 1,3,6,8-THN réductase Arp2p (ACJ13050) en scytalone qui est déshydratée en 1,3,8-trihydroxynaphtalène (1,3,8-THN) par la sytalone déshydratase Arp1p (ACJ13057). Une deuxième étape de réduction est faite par Arp2p (ACJ13050) pour transformer le 1,3,8-THN en vermelone, la déshydratation de cette dernière forme le 1,8-déshydroxynaphtalène (1,8-DHN) par l'action de la vermelone déshydratase Abr1p (ACJ13063). Finalement la laccase (ACJ13069 ; EC 1.10.3.2) Abr2p polymérise le 1,8-DHN en DHN-mélanine (Pihet *et al*., 2009).

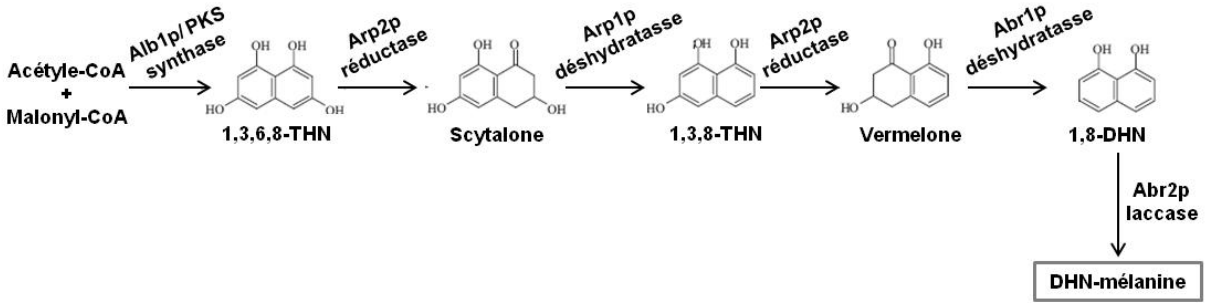


Figure 10. Voie de biosynthèse de DHN-mélanine chez *Aspergillus fumigatus*. Alb1P/PKS) Polycétide synthase ; **Arp2p)** 1,3,6,8-THN réductase ; **Arp1p)** Sytalone déshydratase ; **Abr1p)** Vermelone déshydratase ; **Abr2p)** Laccase. L'action de le 1,3,6,8-THN réductase peut être inhibée par le pyroquilon **(Pq)** (Adapté de Pihet *et al*., 2009).

2.5.1.2 La voie pyomélanine

La pyomélanine est un produit du catabolisme de L-tyrosine (Figure 11). La biosynthèse de pyomélanine a été récemment découverte chez *A. fumigatus*. Ce deuxième type de mélanine n'est pas indispensable pour la pathogenicité d'*A. fumigatus*. Dans cette voie la tyrosine aminotransferase Tat transforme le L-tyrosine en 4-hydroxyphénylpyruvate qui est ensuite transformé en homogentisate par la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase HppD. L'homogentisate peut suivre deux chemins, soit il est dégradé par l'enzyme homogentisate dioxygénase HmgA pour former le 4-maleylacetoacétate, soit il est polymérisé en pyomélanine (Schmaler-Ripke *et al*., 2009).

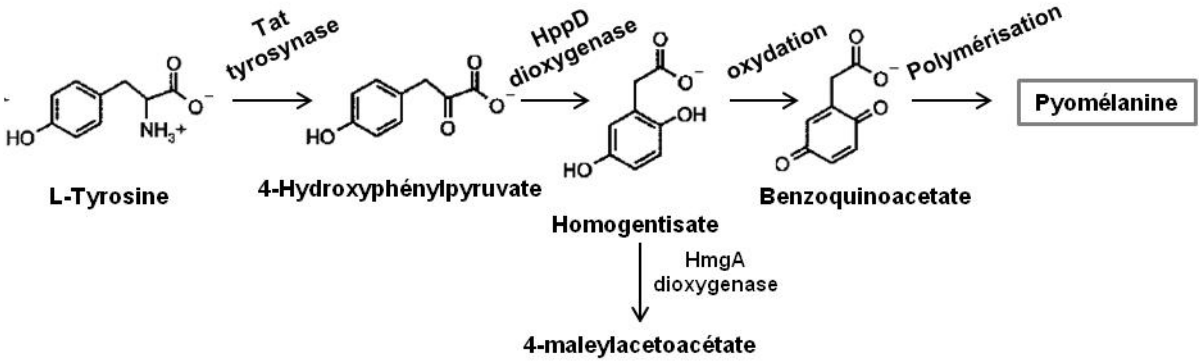


Figure 11. Voie de biosynthèse de pyomélanine chez les champignons. Tat) Tyrosine aminotransferase ; **HppD)** 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase ; **HmgA)** Homogentisate dioxygenase (Adapté de Schmaler-Ripcke *et al*., 2009).

2.5.1.3 La voie DOPA-mélanine

La biosynthèse de DOPA-mélanine est réalisée à partir de deux précurseurs initiaux : la L-tyrosine, un précurseur intracellulaire qui est hydroxylé en L-DOPA et ensuite en dopaquinone par l'action d'une tyrosinase ; ou bien la L-DOPA, un précurseur exogène qui est oxydé en dopaquinone par l'action d'une phénol oxydase (laccase). L'oxydation et la polymérisation simultanées de la dopaquinone forment la DOPA-mélanine (Figure 12) (Langfelder *et al*., 2003).

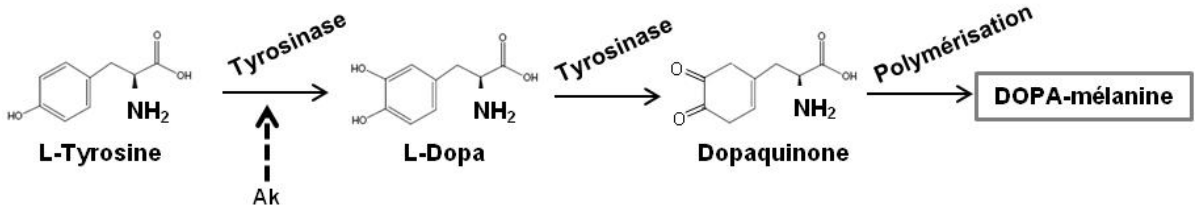


Figure 12. Voie de biosynthèse de DOPA-mélanine chez les champignons. Tyr) Tyrosinase ; **Lac)** Laccase. L'action de la tyrosinase peut être inhibée par l'acide Kojic **(Ak)**.

PROBLÉMATIQUE

ET OBJECTIF

3. PROBLÉMATIQUE

La capacité de *Y. lipolytica* à métaboliser une grande variété de substrats hydrophobes a fait de cette levure l'objet de différents procédés biotechnologiques tels que la biodégradation de composés polluants (*n*-alcanes, pétrole), la biosynthèse de produits d'intérêt industriel comme par exemple les acides organiques à partir de glycérol ou même de pétrole, et la bioconversion d'acides gras en lactones. Dans ces trois cas on part de substrats hydrophobes. Sachant que la paroi cellulaire est une structure dynamique capable de s'adapter aux conditions de croissance, il est probable qu'en présence de substrats hydrophobes comme seule source de carbone, la paroi cellulaire modifie sa structure et ses propriétés physicochimiques, biochimiques et moléculaires afin d'améliorer l'adhésion et le transport de tels substrats dans la cellule. De plus, il est possible que pendant l'entrée à travers la surface cellulaire, une partie des substrats hydrophobes restent intercalés dans la membrane plasmique causant ainsi une fluidification membranaire qui pourrait induire un stress (Figure 13).

3.1 OBJECTIF

L'objectif de ce travail est d'étudier les modifications physiologiques et moléculaires de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* en réponse à l'oléate de méthyle (un modèle de substrat hydrophobe) et dans des conditions de bioconversion d'huile de ricin en γ-décalactone.

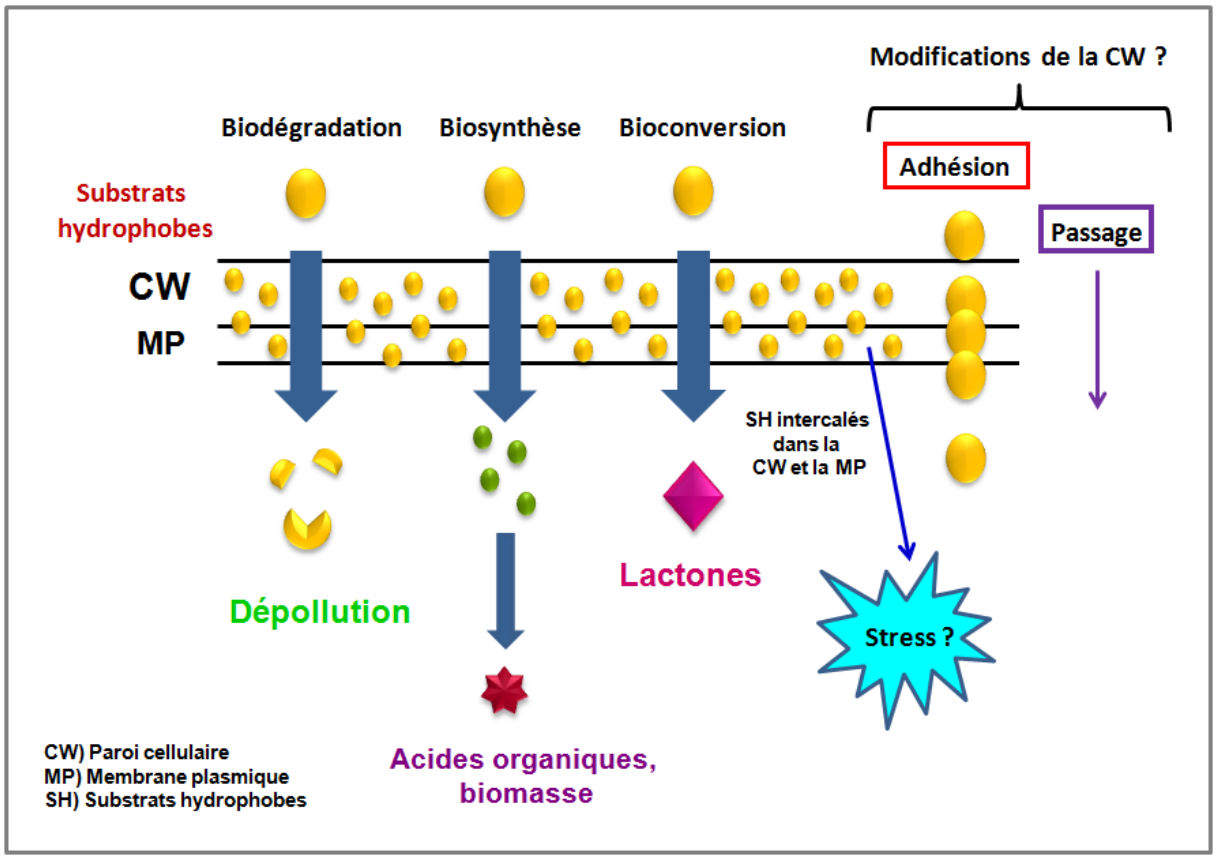


Figure 13. Schéma représentant trois exemples de procédés biotechnologiques réalisés par *Y. lipolytica*. Les substrats hydrophobes pourraient induire des modifications de la paroi cellulaire et des réponses au stress.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Souches de levure

Ce travail a été réalisé avec la levure *Y. lipolytica*. Les souches utilisées sont listées dans le Tableau 2. Les souches ont été conservées dans du glycérol à 20% à -70°C.

Tableau 2. Souches de *Yarrowia lipolytica* utilisées dans ce travail.

Souche	Génotype	Origine
W29	Sauvage *MatA*	Barth et Gaillardin, 1996
MTLY37	*Δpox5Δpox2Δpox3Δpox4* ::*URA3*	Wang *et al*, 1999a
MTLY36-2p	*Δpox2Δpox3Δpox5-POX2*	Groguenin *et al*., 2004
MTLY40-2p	*Δpox2Δpox3Δpox4Δpox5-POX2*	Groguenin *et al*., 2004

4.2 Milieux de culture et conditions de croissance

Pour analyser l'adhésion des corps lipidiques à la paroi cellulaire et l'expression des gènes codants des protéines de paroi cellulaire nous avons utilisé trois milieux de culture différents dont les compositions sont décrites dans le Tableau 3. La souche sauvage W29 a été cultivée dans le milieu témoin YPD un milieu riche contenant du glucose comme source de carbone, et dans les deux milieux : YPO, un milieu riche dont la composition est similaire à celle de YPD mais où l'on a remplacé le glucose par de l'oléate de méthyle ; et YNBO, un milieu minimum contenant du « Yeast Nitrogen Base » (YNB) donc une base azotée pour levure, et de l'oléate de méthyle comme seule source de carbone. L'YNB a été préparé à une concentration stock de 20x et stérilisé par filtration avec un filtre à une taille de pore de 0,2 µm. Pour la souche mutante MTLY37 on a aussi utilisé les deux milieux riches YPD, et YPO, mais comme milieu minimum on a utilisé le tampon phosphate avec oléate de méthyle (PBSO). Voir la composition des milieux dans le Tableau 3.

Tableau 3. Composition des milieux de culture utilisés pour modifier la paroi cellulaire de *Yarrowia lipolytica*.

Composants (g/L)	YPD	YPO	YNBO	PBSO
Extrait de levure	10	10	-----	-----
Peptone	20	20	-----	-----
Glucose	20	-----	-----	-----
Oleate de méthyle	-----	5	5	5
Tween 80	-----	0,2	0,2	0,2
[a]YNB	-----	-----	6,7	-----
[b]PBS 25 mM, pH 5,6	-----	-----	-----	✓

[a]YNB : Yeast Nitrogen Base ; [b]PBS : Tampon de phosphate

Pour les analyses de production de γ-décalactone les souches mutantes MTLY36-2p et MTLY40-2p ont été cultivées dans le milieu PCO (Tableau 4). Alors que pour les analyses de la production de mélanine on a cultivé les souches W29 et MTLY40-2p dans des milieux de culture contenant différentes huiles comme source de carbone, et peptone ou YNB comme sources d'azote. Les milieux contenant de la peptone sont PCO, PMR, PMO et POL, alors que celui contenant de l'YNB est YCO. La composition des cinq milieux de culture est décrite dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composition des milieux de culture utilisés pour la production de γ-décalactone et mélanine.

Composants (g/L)	PCO	PMR	PMO	POL	YCO
Peptone	20	20	20	20	-----
Huile 10 g/L	Huile de ricin	Ricinoléate de méthyle	Oléate de méthyle	Huile d'olive	Huile de ricin
Tween 80	0,8-1,0	0,8-1,0	0,8-1,0	0,8-1,0	0,8-1,0
[a]YNB	-----	-----	-----	-----	6,7

[a]YNB : Yeast Nitrogen Base

4.2.1 Activation des souches et pré-culture

Les souches de levure conservées dans du glycérol à 20% sont décongelées et activées sur un milieu gélosé YPDA (milieu YPD additionné de 20 g/L d'agarose) en boites de Pétri à 27°C pendant 48 heures.

Les levures activées sur YPDA sont collectées et lavées deux fois à l'eau physiologique (9 g/L chlorure de sodium) pour être inoculées à une A_{600}=0,25 (8,125 x 10^6 cellules/ml) dans une fiole crantée de 250 ml contenant 100 ml de milieu YPD. La pré-culture est incubée à 27°C pendant 19 heures (jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance) sous agitation à 140 rpm. Les levures de la pré-culture sont récoltées par centrifugation à 6,000 g à 19°C pendant 5 min et lavées deux fois à l'eau physiologique. Ces levures sont utilisées pour inoculer les cultures.

4.2.2 Culture des souches

Les milieux de culture sont ensemencés à une A_{600}=0,25. Pour avoir des cultures en milieu de phase exponentielle de croissance, les cultures sont incubées à 27°C sous agitation à 140 rpm pendant 19 h dans le milieu YPD ou pendant 24 h dans les milieux YPO, YNBO et PBSO. Pour la production de lactones et mélanine les cultures ont été incubées dans les mêmes

conditions de croissance pendant 1 à 5 jours dans les milieux PCO, YCO, PMR, PMO et POL.

Quand les cellules sont récoltées et lavées à l'eau physiologique, on collecte les culots cellulaires par centrifugation à 6000 g à 19°C pendant 5 min pour procéder aux manipulations désirées.

4.3 Microscopie confocale de fluorescence et marquage des cellules

La microscopie confocale de fluorescence est un outil qui permet de visualiser la morphologie des cellules vivantes ou fixées en utilisant des sondes fluorescentes. Dans ce travail nous avons utilisé cette technique de microscopie pour analyser l'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire des levures ayant poussé en présence d'oléate de méthyle. Les sondes utilisées sont : le rouge Nil, pour le marquage des lipides et le calcofluor blanc, pour le marquage de la paroi cellulaire. Le rouge Nil présente une fluorescence rouge lorsqu'il se trouve dans un environnement apolaire, donc c'est un très bon marqueur pour les corps lipidiques (trouvés dans le cytoplasme) et les gouttelettes lipidiques (trouvées à la surface cellulaire ou dans le milieu) des cellules vivantes ou fixées (Greenspan *et al*. 1985). Le calcofluor blanc est un fluorochrome non spécifique qui se lie irréversiblement à la chitine de la paroi cellulaire des champignons. Le contour des cellules marquées au calcofluor blanc fluoresce en bleu brillant. Le double marquage des cellules avec rouge Nil et calcofluor blanc permet une meilleure observation de l'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire. Dans le Tableau 5 on montre les caractéristiques de fluorescence des sondes utilisées.

Tableau 5. Sondes fluorescentes utilisées en microscopie confocale.

Sonde	Ex max (nm)	Em max (nm)	Stock	Temps d'incubation	Composés ou organite marqué
Rouge Nil (Sigma)	549	650	1 mg/ml Acétone	5 min	Lipides
Calcofluor blanc (Sigma)	355	433	1 mg/ml Eau	5 min	Paroi cellulaire

Pour le marquage des lipides, des culots cellulaires ont été resuspendus dans 998 µl d'eau distillée et on a ajouté 2 µl du rouge Nil (1 mg/ml) à l'abri de la lumière. Cinq minutes plus tard on a déposé 15 µl de cellules marquées sur une lame, on a couvert avec une lamelle et on a fait des observations au microscope confocal. Parfois, pour mieux observer la surface cellulaire et en même temps les gouttelettes lipidiques, les cellules marquées au rouge Nil ont été aussi marquées au calcofluor blanc. Alors, après avoir marqué au rouge Nil on a ajouté 10 µl de calcofluor blanc (1 mg/ml) avant de faire les observations au microscope confocal. Les observations des cellules marquées par les sondes fluorescentes ont été faites avec un microscope confocal multispectral Eclipse TE 2000E, Nikon, avec un système de lasers He/Ar multiplateaux. La longueur d'onde d'excitation a été de 561 nm pour le rouge Nil. Alors que pour l'observation des gouttelettes lipidiques et de la paroi cellulaire en même temps on a excité le rouge Nil et le calcolfuor blanc à une longueur d'onde de 488 nm. Les images ont été prises et visualisées par le logiciel EZ-C1 software version 3.50.

4.4 Microscopie Electronique de Transmission (TEM)

Pour déterminer s'il y avait des différences de morphologie pariétale pour les cellules ayant poussé sur les milieux de culture YPD, YPO et YNBO, nous avons fait des préparations pour la microscopie TEM. Cette méthode consiste en la fixation des levures en suspension suivie d'une inclusion en résine époxy (EmBed 812/DER 736) permettant de réaliser des coupes ultrafines pour des études morphologiques ultra structurales. Les coupes ont été marquées par la méthode de PATAg (Periodic Acid-Thiocarbaside-Protéinate d'Argent) pour mettre en évidence des polysaccharides (Thiéry, 1967). Les observations ont été faites avec un microscope électronique de transmission Hitachi 7500 à 80 kV équipé d'une caméra CCD à haute résolution AMT Advantage. Les images transmises ont été enregistrées et traitées par le logiciel AMT.

4.5 Essais de sensibilité au calcofluor blanc et au rouge Congo

L'analyse de la sensibilité au calcofluor blanc et au rouge Congo est un essai utilisé de façon routinière pour mettre en évidence des changements dans la composition ou la structure de la paroi cellulaire chez les champignons. Ces colorants anioniques interfèrent avec la construction de la paroi cellulaire en se collant aux chaînes naissantes de chitine et en

intervenant avec l'assemblage de la chitine au β-1,3-glucane et au β-1,6-glucane. Par conséquent le calcofluor blanc et le rouge Congo affaiblissent la paroi cellulaire et affectent la croissance des cellules (Ram *et al*., 1994 ; Ram *et al*., 2006). Pour analyser la sensibilité de la paroi cellulaire de *Yarrowia lipolytica* au calcofluor blanc et au rouge Congo nous avons utilisé des cellules ayant poussé sur les milieux YPD, YPO et YNBO. Les cellules ont été collectées par centrifugation et lavées à l'eau physiologique. Ensuite, on a préparé une suspension cellulaire à une A_{600}=2.0 (6,5 x 10^7 cellules/ml) et les dilutions en cascade suivantes ont été réalisées : 6,5 x 10^6, 6,5 x 10^5, 6,5 x 10^4, 6,5 x 10^3, 6,5 x 10^2 cellules/ml. On a pris 5 µl de chaque dilution pour inoculer les milieux YPDA (témoin) et YPDA contenant 15, 20 et 30 µg/ml du calcofluor blanc ou 20, 30 et 60 µg/ml du rouge Congo. Les cultures en boites de Pétri on été incubées à 27°C et 24 h plus tard on a observé la croissance des cellules.

4.6 Test de l'Adhésion Microbienne à l'hexadécane (MATH)

Pour déterminer les propriétés d'hydrophobie de la surface cellulaire de la levure ayant poussé en présence d'oléate de méthyle, nous avons réalisé un test d'adhésion microbienne à l'hexadécane (MATH) avec des cellules de *Y. lipolytica* ayant poussé dans le milieu glucosé YPD et dans les milieux lipidiques YPO et YNBO. Ce test consiste à doser par spectroscopie l'absorbance de la concentration cellulaire initiale et finale de la phase aqueuse d'une suspension cellulaire qui a eu un contact avec un hydrocarbure liquide, dans ce cas là l'hexadécane (Rosenberg, 1980).

4.7 Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques chez les souches W29 et MTLY37

A partir des pré-cultures des souches W29 et MTLY37, on a inoculé 100 ml de chaque milieu de culture (YPD, YPO, YNBO et PBSO) à une A_{600}=0,25 dans des fioles crantées à 250 ml. Les cultures ont été incubées à 27°C avec agitation à 140 rpm pendant 1 heure, 3 heures et 5 heures. Aux différents temps d'incubation, on a pris des échantillons de 10 ml de chaque culture. Les cellules ont été récoltées et lavées deux fois à l'eau physiologique. Ensuite, les cellules ont été marquées et observées au microscope confocal de fluorescence.

4.8 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique facile à mettre en œuvre et qui permet d'analyser pratiquement tout type d'échantillon sans le détruire, donc également des cellules vivantes. Le principe de cette technique est basé sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge (dans la région entre 4000 et 400 cm^{-1}) par l'échantillon analysé. Les vibrations caractéristiques des liaisons chimiques provoquées par le rayonnement infrarouge ont une fréquence de vibration exprimée en cm^{-1}. Le profil du spectre obtenu est une espèce de trace digitale de l'échantillon. La localisation exacte des bandes en cm^{-1} d'un composé dépend de l'influence du reste de la molécule, et la taille des bandes dans le spectre est proportionnelle à la concentration du groupe fonctionnel respectif. En microbiologie, cette technique peut être utilisée pour la caractérisation, l'identification et la classification des microorganismes en analysant le profil du FTIR de la surface cellulaire (Naumann *et al*., 1991 ; Helm *et al*., 1991). Dans ce travail nous avons utilisé la spectroscopie FTIR pour analyser la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* ayant poussé en présence d'oléate de méthyle et d'autres huiles telles que l'huile de ricin, le ricinoléate de méthyle et l'huile d'olive, ainsi que pour analyser la phase lipidique pigmentée des cultures de *Y. lipolytica* contenant une des huiles mentionnées. Les paramètres précis d'utilisation sont donnés dans la Publication 1 (page 48) et la Publication 2 (page 97).

4.9 PCR quantitative en Temps Réel

Pour les analyses de transcription des gènes codant des protéines de paroi cellulaire on a utilisé la méthode de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Cette méthode permet de quantifier les acides nucléiques de façon soit absolue (les cinétiques sont mesurées pour différentes concentrations du gène ou transcrit cible) soit relative (un gène de référence est quantifié en même temps que le gène étudié). Le principe du temps réel en PCR repose sur la visualisation de la phase exponentielle de la réaction par fluorochrome spécifique à l'ADN ou par une sonde oligonucléotidique fluorescente spécifique à une séquence (Tse & Capeau, 2003). Dans ce travail nous avons fait une quantification relative des gènes en utilisant le SYBR Green, un fluorochrome spécifique pour l'ADN. Les étapes concernant la méthode du qRT-PCR seront décrites ci-dessous.

4.9.1 Extraction et électrophorèse d'ARN

Pour l'extraction d'ARN total, on a pris 3 à 10 ml de chaque culture en milieu de phase exponentielle de croissance ou 50 ml pour les cinétiques d'expression à 1 h et 5 h de culture. Les cellules ont été récoltées et resuspendues par vortex dans 1 ml de TRI®Regeant (SIGMA, Réf : #T9424) et versées dans un microtube contenant à peu près 800 mg de billes (à 0,5 mm de diamètre) libres de RNase (RF). Pour casser les cellules on a mis les microtubes dans un « FastPrep FP120 » (BIO101 Thermo) et on a fait 6 cycles de 40 secondes d'agitation à une vitesse de 6 $m.s^{-1}$. Entre chaque cycle on a mis les microtubes dans la glace pendant 1 minute pour les refroidir. Le surnageant a été récupéré par centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C. Pour extraire les acides nucléiques on a ajouté 200 µl de chloroforme, on a mixé en retournant les tubes plusieurs fois et on a récupéré le surnageant par centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Après une deuxième extraction avec du chloroforme, les acides nucléiques ont été précipités avec 500 µl d'isopropanol, on a agité les tubes et on a laissé à température ambiante (T.A.) pendant 10 min. On a récolté les acides nucléiques par centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 15°C. Ensuite, on a lavé deux fois les culots avec 500 µl d'éthanol à 70%, on a centrifugé à 12000 g pendant 5 min à 15°C. Les culots ont été séchés à T.A. et resuspendus dans 20 à 100 µl d'eau RF (selon la taille du culot). Les ARN ont été dosés au spectrophotomètre à 260 nm ($1.8 < A_{260}nm/A_{280}nm < 2.0$). L'intégrité des ARN a été analysée par électrophorèse dans un gel dénaturant à 1,5% d'agarose (Tableau 6). Des échantillons contenant environ 1 à 2 µg d'ARN ont été resuspendus dans un volume de tampon de charge (Tableau 6), chauffés à 65-70°C pendant 10 min et refroidis dans la glace pendant 2 min. L'électrophorèse des échantillons a été faite dans du tampon MOPS 1x (Tableau 6) à 60 volts pendant 2 h.

4.9.2 Traitement à la DNAse

Pour éliminer toute trace d'ADN génomique dans les échantillons d'ARN, on a fait un traitement à la DNAse (Fermentas Deoxyribonuclease I (DNase I), RNAse free ; Référence : #EN0521). Les réactions contenant à peu près 4 µg d'ARN, 3 µl de « Tampon DNase (10x) », 3 µl de DNase I et de l'eau RF (jusqu'à un volume de 30 µl) ont été incubées à 37°C pendant 30 min. Pour arrêter la réaction de la DNase I on a ajouté 3 µl d'EDTA (25 mM) et incubé à 65°C pendant 10 min. Les réactions ont été refroidies dans la glace et conservées a -20°C. Les ARN purifiés ont été dosés au spectrophotomètre à 280 nm ($1.8 < A_{260}nm/A_{280}nm < 2.0$).

4.9.3 Contrôle du traitement à la DNase

Afin de vérifier l'absence d'ADN génomique dans les échantillons d'ARN, on a fait une PCR en temps réel avec 5 µl des échantillons traités à la DNase. Comme témoin positif on a utilisé 5 µl d'ADN génomique de *Yarrowia lipolytica* ; comme témoin négatif on a utilisé 5 µl d'eau RF. Après le traitement à la DNase on a fait un dosage au spectrophotomètre à 280 nm ($1.8 < A_{260}nm/A_{280}nm < 2.0$).

4.9.4 Synthèse d'ADNc

Pour synthétiser l'ADNc, on a utilisé le kit Bio-Rad iScript™ cDNA Synthesis (Réf : 170-8891). On a fait des réactions d'un volume final de 40 µl contenant les composants suivants : 8 µl de « Tampon iScript (5x) » ; 2 µl de « iScript » ; 2 µg d'ARN et d'eau RF (qsp 40 µl). Les réactions ont été incubées au thermocycleur 5 min à 25°C / 30 min à 42°C / 5 min à 85 °C. Pour stopper la réaction on a ajouté 80 µl d'eau RF et on a conservé à -20°C.

4.9.5 PCR quantitative

Les qRT-PCR ont été réalisées sur 4 dilutions en cascade au ¼ des ADNc (1/4 ; 1/16 ; 1/64 ; 1/256) en utilisant du Bio-Rad iQ™ SYBR® Green Supermix (Réf : 170-8882). Pour chaque dilution, le mélange de PCR suivant a été réalisé : 5 µl d'ADNc ; 12,5 µl d'iQ™ SYBR® Green Supermix ; 2 µl d'amorces mélangées (7 pmol/ µl) ; 5.5 µl d'eau FR. Les réactions ont été réalisées dans des plaques de 96 puits, dans un thermocycleur relié à un détecteur de fluorescence et à un ordinateur permettant l'enregistrement des données grâce au logiciel iCycler. Le programme du thermocycleur qu'on a utilisé est le suivant :

●Dénaturation initiale : 3 min à 95°C.

●Dénaturation : 30 s à 95°C/ Hybridation et élongation : 30 s à 60°C/ Mesure de la fluorescence → 40 cycles.

●Melt Curve par palier de 0,5°C.

Le gène codant pour l'actine (YALI0D08272) chez *Y. lipolytica*, a été utilisé comme témoin interne de la transcription.

Pour les analyses de transcription des gènes YALI0A09196, YALI0C02981, YALI0D09185, YALI0D27214, YALI0E05819, YALI0E11077 et YALI0F18282 pendant les premières heures de culture chez les souches W29 et MTLY37, on a pris 50 ml de chaque culture à 1 h

et 5 h d'incubation dans les différents milieux de culture. Les cellules ont été récoltées et lavées 2 fois à l'eau physiologique pour éliminer les restes de lipides. Ensuite, on a procédé à l'extraction d'ARN et aux analyses de transcription par RT-PCR quantitative.

Tableau 6. Conditions d'électrophorèse de l'ARN de *Yarrowia lipolytica*.

Gel dénaturant d'agarose	**Pour 30 ml**
Agarose	0,45 g
H_2O	24,3 ml
MOPS 10x (Stérile)	3,6 ml ≥
Formaldéhyde	2,1 ml

Tampon MOPS 10x	**Pour 100 ml**
MOPS	4,12 g
Acétate de sodium	1,09 g
EDTA	0,37 g

On ajuste le pH du tampon à 7,0 avec NaOH, on le stérilise par autoclave et on le conserve protégé de la lumière.

Tampon de charge d'ARN	**Pour ≥ 1 ml**
MOPS 10x	150 µl
Formaldéhyde	180 µl
Formamide	750 µl
Bromure d'éthidium (10 mg/ml)	50 µl
Bleu de bromophénol	10 µl

On conserve ce tampon à -20°C.

RÉSULTATS

CHAPITRE I

5. RÉSULTATS

CHAPITRE I

Analyse des modifications pariétales et de l'expression des gènes de paroi cellulaire en présence d'oléate de méthyle, un modèle de substrat hydrophobe

Afin d'étudier les modifications physiologiques et moléculaires de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* en réponse à l'oléate de méthyle, nous avons travaillé avec la souche sauvage W29 de *Y. lipolytica*, les levures ont été cultivées dans un milieu de culture glucosé et dans deux milieux de culture contenant de l'oléate de méthyle comme seule source de carbone. Tout d'abord nous avons testé les propriétés d'hydrophobie des levures et leur capacité d'adhérer à des gouttelettes lipidiques. Ensuite nous avons analysé la structure pariétale et les modifications des composants pariétaux. Un des composants de la paroi cellulaire auquel nous nous sommes beaucoup intéressés est les protéines pariétales (CWP). Nous proposons que ces protéines puissent être impliquées dans les mécanismes d'adhésion et d'internalisation des substrats hydrophobes ainsi que dans les modifications éventuelles de la paroi cellulaire face aux substrats hydrophobes. Dans ce travail nous avons identifié 27 gènes codant des CWP putatives chez *Y. lipolytica* et nous avons analysé leurs profils de transcription en réponse à l'oléate de méthyle et en réponse à la composition du milieu de culture. Cette partie du travail de thèse est présenté dans la Publication I.

Pour approfondir sur la participation des CWP à l'adhésion de gouttelettes lipidiques nous avons fait des analyses complémentaires comportant une cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques et une cinétique d'expression de sept gènes codant des CWP dont les profils d'expression ont été différents dans les milieux de culture utilisés. Ces analyses ont été faites chez la souche sauvage W29 et chez une souche mutante MTLY37 affectée dans la β-oxydation. La souche mutante présente un profil d'adhésion des gouttelettes lipidiques différent de celui de la souche sauvage.

De plus nous avons fait une analyse *in silico* des CWP putatives afin de les classer en protéines de type « GPI » ou de type « PIR » et d'identifier des motifs fonctionnels qui nous donnent des informations sur leur probable fonction.

Publication 1:

Analysis of cell wall modifications and CWP coding genes transcription in *Yarrowia lipolytica* under hydrophobic growth conditions

Romero-Guido, C.*, Licandro-Seraut, H., Phan-Thi, H., Ritt, J-F., Cavin, J-F., and Waché, Y**.

Laboratoire GPMA, IFR92, AgroSup Dijon & Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. e-mail: * : cynrogui@yahoo.com.mx; ** : ywache@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

The capacity of *Yarrowia lipolytica* to uptake and metabolize diverse hydrophobic substrates is well known. Nevertheless, the first stage for HS uptake is still obscure. In this work we have analyzed the cell wall structure and the expression of cell wall protein (CWP) encoding genes under hydrophobic growth conditions in order to better understand the role of the cell wall components in the adhesion and uptake of hydrophobic substrates. Yeast cells were grown on glucose (YPD) or on methyl oleate in a rich medium (YPO) or in a minimal medium (YNBO). The adhesion of lipid droplets was observed over the surface of cells grown on YNBO but not on YPO. By transmission electron microscopy no differences were observed at the cell wall ultrastructure level between cells grown on glucose and cells grown on methyl oleate. In contrast, cells grown on both media containing methyl oleate were less sensitive to calcofluor white and Congo red than cells grown on glucose, suggesting some modifications of their cell wall components. Transcriptional analyses of 27 genes coding for putative CWP showed that 18 genes presented similar expression patterns in YPO and YNBO media and 9 genes presented differential expression patterns in YPO *vs* YNBO media. The identity of some of these genes suggests that they could be linked to the adhesion of lipid droplets to the cell wall while other genes could be induced in response to stress provoked by methyl oleate but also by nitrogen starvation.

INTRODUCTION

The yeast *Yarrowia lipolytica* degrades very efficiently hydrophobic substrates such as n-alkanes, fatty acids, fats and oil by specific metabolic pathways (Fickers *et al*., 2005). In our research team the metabolism of fatty acids and their transformation into lactones by *Y. lipolytica* has been approached (Waché *et al*., 2003; Waché *et al*., 2006; Romero-Guido *et al*., 2011). Lactones are a family of flavors and fragrances that can be applied in the food and cosmetics industry. Although extensive knowledge has been generated on the fatty acids metabolic pathways; there are not enough improvements about the mechanisms for fatty acids intake by yeast cells. Under hydrophobic growth conditions, the first contact between yeast cells and their environment/substrate is by interaction between the cell wall and the medium. This part of the process of utilization of hydrophobic substrates is not well known. The cell wall is a dynamic structure situated on the outer face of the cell. This structure plays important roles as protection, permeability, cellular rigidity, influx of nutrients, mating, morphogenesis, interaction between cells and with host cells, etc. In general, the major constituents of the fungi cell wall are β-1,3-glucan, β-1,6-glucan, chitin and glycoproteins (CWP, from cell-wall proteins). Two classes of CWP have been identified. The first class and the most abundant are the GPI proteins which are cross-linked to β-1,6-glucan via the glycan remnant of their glycosylphosphatidylinositol (GPI) moiety (Kapteyn *et al*., 1996; Lipke and Ovalle, 1998). The second class includes the PIR (proteins with internal repeats) proteins, these highly O-glycosylated proteins are apparently bound to β-1,3-glucan by an alkali-labil linkage (Mrsa *et al*., 1997; Kapteyn, 1999).

The cell wall is a flexible and dynamic organelle that can modify its structure in response to growth condition parameters such as the nature of the carbon source, nitrogen starvation, pH, temperature and aeration (Aguilar-Uscanaga and François, 2003). Aguedo *et al* (2003; 2005) proposed that cell surface modifications of *Y. lipolytica* favor the adhesion of non-soluble substrates to the cells. In fact, under hydrophobic growth conditions, the presence of protrusions has been observed over the cell surface of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* grown on *n*-alkanes (Osumi *et al*., 1975), in the oil-degrading *Y. lipolytica* 180 strain grown on crude oil (Kim *et al*., 2000), and in *Y. lipolytica* W29 grown on oleic acid (Mlíčková *et al*., 2004). These protrusions, whose biochemical nature and regulation has not been determined, have been proposed to be involved in the uptake of hydrophobic substrates from the medium. On the other hand, CWP could also play important roles on hydrophobic substrates intake since the surface hydrophobic character of *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 was

reduced after pronase digestion of its cell wall (Amaral *et al*., 2006). The aim of the present work is to gain an insight into the response of the cell wall components to understand their role during the uptake of hydrophobic substrates. Cell wall structure modifications were investigated in two different culture media containing methyl oleate as a model of hydrophobic substrate.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media

Y. lipolytica W29 (ATCC20460; CLIB89) was cultured in YPDA (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose, 20 g/l agar) for 48 h and used to inoculate glucose-liquid medium YPD (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose), oleate-liquid media YPO (YPD in which glucose was replaced by methyl oleate 5g/l, tween 80 0.2 g/l) and YNBO (yeast nitrogen base 6,7 g/l, methyl oleate 5g/l, tween 80 0,2 g/l). Yeast cells were grown at 140 r.p.m. in baffled Erlenmeyer flasks at 27°C until the mid-logarithmic growth phase (19 h for YPD and 24 h for YPO and YNBO). After cultivation and before any treatment, cells were harvested by centrifugation at 6,000 x g during 5 min at 19°C and washed two times with physiologic water (NaCl 9 g/l).

Microscopic methods

The adhesion of lipid droplets to the cell surface was observed by Nile red (NR) staining (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier). Cell suspensions were stained with 1 µg/ml of NR prepared in acetone solution at a stock concentration of 1 mg/ml. Observations were performed with a multispectral confocal microscope Eclipse TE 2000E, Nikon, with He/Ar laser multichannel system at an excitation wavelength of 561 nm. Photographic images were taken and visualized by EZ-C1 software version 3.50.

For transmission electron microscopy (TEM), mid-log phase cells were fixed with 2% (v/v) glutaraldehyde overnight at 4°. Throughout the protocol cells were pelleted by centrifugation during 3 min at 6000g. The fixed cells were washed three times with PB (0.1 M phosphate buffer; pH 7.2) and mixed with 2% agarose at 40°C. Solid agarose blocks containing the cells were cut into 5 mm^2 blocks that were embedded in a 1% (w/v) metaperiodate solution and incubated at 4°C during 30-60 min. After washing once with PB, the cells were postfixed with

0.5% (w/v) osmium tetraoxyde for 60 min at 4°C in the darkness. Then the blocks were washed once with PB at 4°C and four times with distilled water at room temperature. The blocks were dehydrated through a graded 30% to 100% ethanol and 1:99% to 67:33% resine:propylene oxyde series and embedded in resin epoxy (EmBed 812/DER 736). Ultra-thin sections of 90 nm were obtained with an ultramicrotome Reichert, Ultracut E fitted with a diamond knife. The ultra-thin sections were mounted on a grid to be stained with periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate (PATAg test). Observations were made with a Hitachi 7500 transmission electron microscope operating at 80 kV and equipped with a CCD high resolution AMT Advantage camera driven by AMT software.

Microbial Adhesion To Hydrocarbons (MATH) Test

The surface hydrophobicity of cells grown in YPD, YPO and YNBO media was evaluated by the microbial adhesion to hydrocarbons test (Bellon-Fontaine *et al*., 1996). Cells at mid-log phase were collected and washed as previously indicated and resuspended in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) at an $Abs_{600nm} = 0.7 \pm 0.02$. Glass tubes containing 1 ml of hexadecane and 4 ml of cell suspension were inverted 10 times. After 4 min, 2 ml of the aqueous phase was taken out and the Abs_{600nm} was measured. Hydrophobicity is expressed as % adhesion = 1 – A/A0, where A0 and A are the Abs_{600nm} of the aqueous microbial suspension before and after mixing, respectively. Assays were done in triplicate from three independent cultures.

Infrared spectroscopy

Attenuated Total Reflection Fourier Transform infrared (ATR-FTIR) spectra samples were measured between 4000 cm^{-1} and 900 cm^{-1} using a Vector 22 (Bruker) FTIR spectrometer. A spectrum was obtained by collecting 128 scans at a resolution of 4 cm^{-1}. Yeast cells cultured in YPD, YPO and YNBO media were harvested by centrifugation, washed and resuspended in physiologic water at an Abs_{600} of 1.2±0.1. Samples of cell suspension (15 µl) were homogenously spread on the ATR crystal and dried at 40°C during 15 to 20 min before collecting the spectra.

Calcofluor white and Congo red sensitivity assay

Cells grown in YPD, YPO and YNBO were utilized to prepare 10-fold dilution series. Spots of 5 µl containing 6.5×10^6 to 6.5×10^2 cells per ml were inoculated on plates of YPD (as a control) and YPD containing 15, 20 and 30 µg/ml of Calcofluor white (CFW) or 20, 30 and 60 µg/ml of Congo red (CR). Plates were incubated at 27°C for 24 h.

In silico identification of putative CWP coding genes

To identify putative CWP coding genes in *Y. lipolytica*, we did *in silico* analysis utilizing already known *Saccharomyces cerevisiae* CWP aminoacid sequences as query. The *S. cerevisiae* aminoacid sequences were aligned against the *Y. lipolytica* genome by BLASTp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). The nucleotide sequences of target genes were then searched at the *Y. lipolytica* "Genolevures" genome database (http://www.genolevures.org/; Dujon *et al*., 2004). The 5' untranslated regions of the *Y. lipolytica* genes were analyzed by YEASTRACT (http://yeastract.com, Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008) in order to identify *cis*-acting elements probably involved in the regulation of their expression.

RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR

RNA extraction was carried out using the TRI®Reagent (SIGMA, Cat. No. T9424) method. Yeast cells were resuspended in 1 ml of TRI®Reagent and poured into a 2 ml tube containing 0.6 ml acid washed glass beads. Cells were broken in a FastPrep FP120 (BIO101 Thermo) by using six 40 s mixing sequences at a speed of 6.0 $m.s^{-1}$. The tubes were cooled on ice for 2 min before each mixing sequence. The extraction was completed according to the protocol described by the TRI®Reagent manufacturer's protocol. RNA quality and concentration were assessed spectrophotometrically at 280 nm ($1.8 < A_{260}nm/A_{280}nm < 2.0$) and by electrophoresis under denaturing conditions. The RNA was conserved at -70°C. DNase treatment was carried out with DNaseI (Fermentas, Cat. No. EN0521) following the instructions of the manufacturer. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Cat. No. 170-8890) as described by the manufacturer. The cDNA was conserved at -20°C.

Primers used to quantify relative gene expression were designed so that they were about 17 to 22 bases long, had a melting temperature of about 60°C and amplify products ranged from 90 to 135 bp (**Table I.7**).

Table I.7. Primers used in this study.

Gene Acces No.	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (3'→5')	Product Size (bp)
[a]YALI0D08272	AACCTGGGACAAGAACATCC	CGTTATCGTATCGTCGGGTA	104
[b]YALI0F10857	CAACACTGGCACCATTGAAATC	TCGCACGGGGAAGGAGGTC	103
YALI0A09196	GCCGTCGTCACCCAAATTG	CAGAGACACCGAGGGCAG	94
YALI0A11077	TGTGGTCCGACTGGCTTAC	GGGCGACAAGTTGAACGAG	124
YALI0A17919	GACAAGGACTGCGGCGAG	CGTTCTGGTCAGCGTAGAC	115
YALI0B15510	TCCGCCATCAAGAAGTCTAC	GGAGGAAACTCGCTCACCAG	91
YALI0B18194	TATCCCTTTCGTCAACAGCC	CATCAGTCCAGTCTCTCCC	116
YALI0B18568	CCAGCAGTGAAGCAGTCTCTT	GGTTGCCCTGAGAAGTGGATG	115
YALI0B20306	TGTCACCCAGACTGTTGTTG	GTGGTCTCGGCGGCAGC	129
YALI0C02981	CCAAGGAGACTGCCCAGG	GCCATCGTGGATCTGAGAAA	122
YALI0C06644	ACGACCTGGAAGGAAATGTG	GCTCTGGGACAGCGGGG	120
YALIOC22924	GCTGCTGTCCCTGCCCC	CGGTAACAACTGCCACTCC	130
YALI0D06633	CTATCCATCGTCAACGGCG	CGGACCCTGCTTGCTAAAG	117
YALI0D07480	CAACTCACTGACCGCCCC	GATCCACTTGAGGTTTCCGA	121
YALI0D08206	AACCTGGGACAAGAACATCC	CGTTATCGTATCGTCGGGTA	104
YALI0D09185	CAGAACACACAATCTGGTGG	CAGAAGGGGTGCTTGTACC	132
YALI0D20680	CGACGCCAACGGAAACCC	AAGAGCCTCCCTCCTTCTG	131
YALI0D27214	TCCAGGCTCCCCACTCCA	ACAGCAGAGACACCAAGGG	97
YALI0E05819	CAGTGTCATTGATCCTGATGTG	GATGATGCTGGTACAAGTCTG	118
YALI0E11077	TGGAGGAGGTGGGGAAAGA	TGCCTTCTCTGTCTCCGATT	135
YALI0E16060	CGAACACCCAACGCCACC	ATGACCACAGATCCCACCAT	107
YALI0E20757	GTCGTCACCATCACCTCTTGT	GGCTTGGACTCAACAGCAG	96
YALI0E24673	TCTGGAATGGATTGGAGGAG	GGAGTTGGAGTTAGCGACGG	112
YALI0E32967	TCCATCGCTGAGTCCTACG	GCAGTGTCAACATCGTGCC	104
YALI0E33891	CCTCCGCTACTCTCCTCG	TGGCACCCTCACCACCAG	111
YALI0E34507	TTGGTCACAGCCTCGCCC	GTAGTGCTCCATCTCGTGC	123
YALI0F04213	AGAGCAACGGAGCGTGTAG	CGACGGAGGTGGTGTCTG	108
YALI0F18282	TACAAGTACACCGTCACCTCTT	TTGTCGTCCTCGTAGATGACA	84
YALI0F21450	GCCAGTGCTTCTTCGCTAG	ACCTGTATAAGTCTCGTCGC	99

a) *Y. lipolytica ACT1* gene
b) *Y. lipolytica POX2* gene

The *Y. lipolytica ACT1* gene (YALI0D07282) was chosen as an internal control to calculate the threshold cycles as previously reported for qRT-PCR experiments with *Y. lipolytica* (Blanchin-Roland *et al*., 2005; Mansour *et al*., 2008). While the *POX2* gene (YALI0F10857) coding for the acyl-CoA oxidase 2 in *Y. lipolytica* was utilized as a positive control since its transcription is induced during the metabolism of HS (Wang *et al*., 1999). All of the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed in 96 well-plates on a BioRad I Cycler instrument. Reactions were carried out in a total volume of 25 µl that contained 5 µl of cDNA, 2 µl of forward and reverse primers (7 pmol/µl), and 12.5 µl of iQ™ SYBR Green supermix (BioRad). Three serial dilutions of cDNA were performed for each sample. A non template control for each primer was included in all real-time plates. Relative expression levels were calculated using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta C_T$) method RTL = $2^{(\Delta CT \text{ of sample } - \Delta CT \text{ of reference})}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Genes with RTL > 1 are considered as overexpressed, genes with RTL < 1 are considered as underexpressed, and genes with RTL = 1 are considered to be expressed at the same level as in control medium (YPD). RTLs were determined from three independent cultures.

RESULTS

Cell wall modifications in the presence of methyl oleate

To observe the adhesion of lipid droplets to the cell surface, yeast cells grown in YPO and YNBO (both containing methyl oleate) at the mid-log phase (19 h of culture) were stained with NR. By confocal microscopy we have observed the presence of lipid droplets over the surface of cells grown in YNBO and the presence of one big lipid body or some little lipid bodies in the cytoplasm (**Figure I.14A**). While in cells grown in YPO we did not observe lipid droplets but only many big lipid bodies (**Figure I.14B**). The adherence of lipid droplets was coincident with a hydrophobicity which was higher in cells grown in YNBO than in cells grown in YPO (**Figure I.14D**). These results suggest that the cell wall is modified in the presence of methyl oleate but in a different way depending on the culture medium composition.

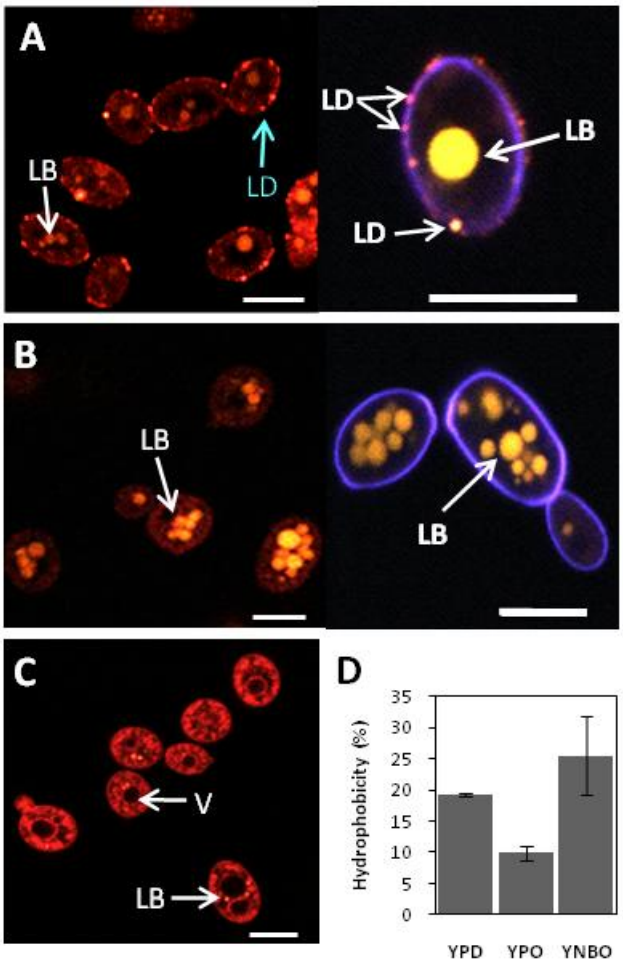


Figure I.14. Adherence and accumulation of fatty acids in *Y. lipolytica*. Yeast cells grown on methyl oleate containing medium, YNBO (A) and YPO (B) or glucose (C) were stained with nile red to be observed by confocal microscopy. Cells were also stained with calcofluor white for a better observation of the cell-wall. Arrows show lipid bodies (LB), lipid droplets (LD) or vacuole (V). Bar: 5 µm. D) MATH tests were carried out on cells grown in YPD, YPO and YNBO media. The hydrophobicity of cells was evaluated by adhesion to hexadecane.

To go deeply on the observation of the cell wall ultrastructure we did transmission electron microscopy (TEM) preparations. In this case we did not observe evident differences, since the cell wall ultrastructure and thickness in cells grown in both media containing methyl oleate seemed to be similar to those of cells grown on glucose (**Figure I.15**). Nevertheless, cells pre-grown in YPO and YNBO were less sensitive to the anionic dyes CFW (20 µg/ml) and CR (60 µg/ml) than cells pre-grown in YPD (**Figure I.16**). Even cells pre-grown in YNBO were slightly more resistant to CR than those pre-grown in YPO (**Figure I.16**). This result suggests that changes of the cell wall components in response to the presence of methyl oleate make cells more resistant to the cell wall-weakening effect of CFW and CR.

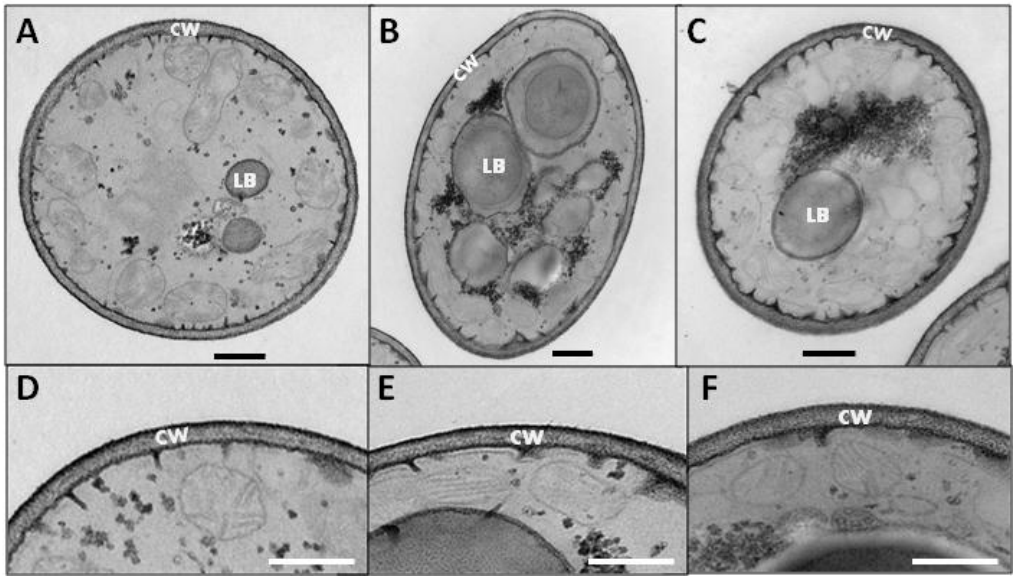


Figure I.15. Transmission electron micrographs of *Y. lipolytica*. Cells grown on YPD (A and D), YPO (B and E) and YNBO (C and F). Enlargement of micrographs were done for a better observation of the cell-wall (D, E and F). CW) Cell-wall; LB) Lipid bodies. Bar: 0.5 µm.

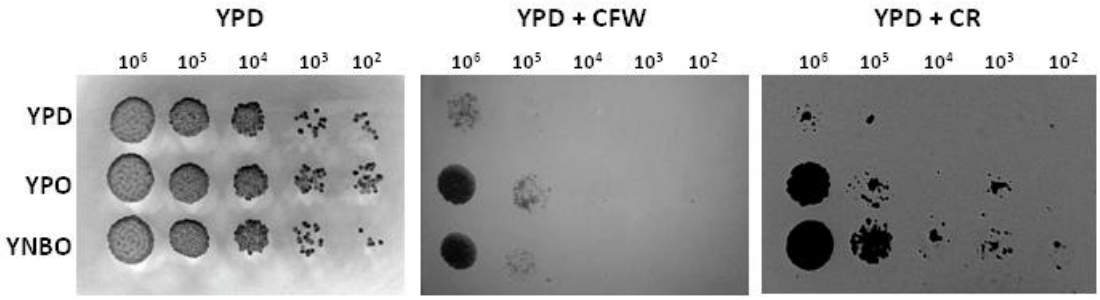


Figure I.16. Susceptibility of *Y. lipolytica* to calcofluor white and Congo red. Cells were pre-grown in liquid media containing glucose (YPD) or methyl oleate (YPO and YNBO) as the carbon source. Ten-fold dilutions of yeast suspension at 6.5 x 10^6 cells/ml, were spotted on YPD plates containing calcofluor white (CFW: 20 µg/ml) or Congo red (CR: 60 µg/ml).

To have an indication of the cell wall components that could be modified, we have performed FTIR spectroscopy. This technique has been applied to analyze cell wall of living cells giving an overview of the major components of the cell wall (Galichet *et al*., 2001; Adt *et al*., 2006). Thus FTIR spectroscopic analysis of yeast cells grown in the three media was done (**Figure I.17A**). Spectra of yeast cells cultivated in YPO and YNBO presented the bands of C-H groups at 2924 cm^{-1}, 2853 cm^{-1}, and 1465 cm^{-1}, and the C=O group at 1746 cm^{-1} typical of methyl oleate (**Figure I.17B**). These bands were more intense in cells grown in YNBO than in YPO, probably due to the presence of lipid droplets at the cell surface in YNBO. Although

the spectra profile in the 1700 to 900 cm^{-1} range (in which are detected the amide I and II bands for proteins and the bands for polysaccharides) were somehow similar between the three media, some differences at the content level were observed. Cells grown in YNBO exhibited lower absorption intensities in the 1700 to 900 cm^{-1} range. In contrast cells grown in YPO presented lower absorption intensities in the 1700 to 1200 cm^{-1} range but slightly higher levels of polysaccharides than cells grown in YPD. The presence of a band at 1140 cm^{-1} in cells grown in YPO and in YNBO was also observed. It could correspond to an increase in the β-1,3-glucan content. While in cells grown in YPD a band corresponding probably to mannans was observed at 910 cm^{-1}. These results indicate a relative decrease in the majority of the cell wall components (proteins and polysaccharides) in cells grown in the presence of methyl oleate.

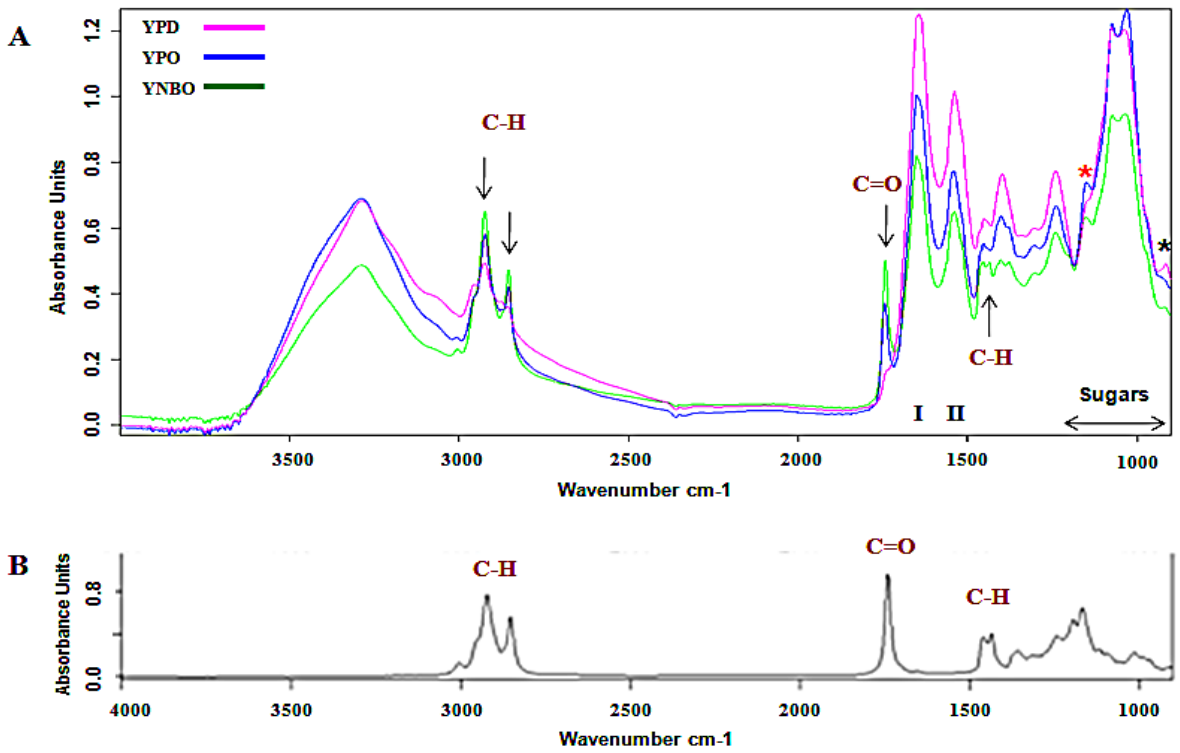


Figure I.17. Analysis of the yeast cell surface by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. A) FTIR spectra of yeast cells grown in YPD, YPO and YNBO media. B) FTIR spectrum of methyl oleate. FTIR spectra were recorded in the region between 4000 and 900 cm^{-1}. Functional groups of methyl oleate (C-H, C=O), the protein amide I and II bands, and the cell wall polysaccharides are indicated. An asterisk in red (*) indicates a band present in both media containing MO, and an asterisk in black (*) indicates a band present in YPD medium.

In silico identification of putative CWP coding genes

The participation of CWP in the intake of lipids and/or in the increased surface hydrophobicity has been evidenced in fungi as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Metharhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and in the oleaginous yeast *Y. lipolytica* strain IMUFRJ 50682 (Alimardani *et al*., 2004; de Groot *et al*., 2008; Li *et al*., 2010; Amaral *et al*., 2006). To identify new putative CWP in *Y. lipolytica*, we have done an *in silico* search for proteins presenting similarity with some already known *S. cerevisiae* CWP. The BLASTp analysis allowed us to find 27 aminoacid sequences showing CWP identity (**Table I.8**). The corresponding genes were obtained from the database "Genolevure" and their promoter regions were analyzed by YEASTRACT to know the putative transcription factor-binding sites (TFBS) that regulate the expression of these genes. Interestingly the YEASTRACT predicted some putative TFBS for transcription factors (TFs) involved in the metabolism of lipids and regulation of energy suggesting that the expression of some CWP coding genes could be directly or indirectly affected by the presence of hydrophobic substrates in the medium. Then we decided to work with those CWP coding genes presenting putative TFBS for one or more of the TFs shown in **Table I.9**.

Table I.8. *In silico* identification of putative CWP coding genes in *Y. lipolytica* and relative expression levels in methyl oleate containing media measured by real time RT-PCR.

Gene Access No.	Name	Annotation in Genolevures	BLASTp (% identity)	E-value	Reference
[a]YALI0D08272	YlAct1	YlAct1			Blanchin-Roland *et al*, 2005
[b]YALI0F10857	YlPox2	YlPox2			Wang *et al*, 1999
YALI0A09196	Cwp2	Similar to YlCwp1	66	6e-11	
YALI0A11077	Scw1	Similar to Scw14	25	2e-19	
YALI0A17919	Cwp7	Similar to Tos1	48	1e-125	
YALI0B15510	YlCrh2	YlCrh2			Hwang *et al*, 2006
YALI0B18194	Aga2	Similar to agglutinin protein	30	4e-11	
YALI0B18568		Unknown	37	3e-16	
YALI0B20306	YlPir1	YlPir1			Jaafar *et al*, 2003
YALI0C02981	Cwp6	Similar to Hsp150	44	8e-37	
YALI0C06644	Gas1	Similar to surface glycoprotein	44	2e-56	
YALIOC22924	Muc1	Similar to Flocculin/Muc1	22	2e-13	
YALI0D06633	Cwp5	Similar to YlCwp1	28	1e-11	
YALI0D07480	Ecm33	Similar to Ecm33p	41	4e-57	
YALI0D08206	Plb3	Similar to Plb3	35	1e-109	
YALI0D09185	Aga1	Similar to Aga1	27	5e-6	
YALI0D20680	Scw2	Similar to Scw4	52	1e-110	
YALI0D27214	Cwp4	Similar to YlCwp1	33	9e-11	
YALI0E05819	Muc2	Similar to GPI-flocculin/Muc1	36	2e-18	
YALI0E11077	Yak1	Similar to Yak1p	31	9e-43	
YALI0E16060	Plb1	Similar to Plb1	44	1e-159	
YALI0E20757	Ccw1	Similar to Ccw14	54	1e-15	
YALI0E24673	Crh3	Similar to Crh1p	52	7e-94	
YALI0E32967	Cwp9	Similar to YlCwp1	41	2e-4	
YALI0E33891	Cwp8	Similar to YlCwp1	40	2e-11	
YALI0E34507	Lip9	Similar to YlLip2	43	5e-56	Fickers *et al*., 2011
YALI0F04213	YlTsr1	YlTsr1			Mamoun *et al*, 1996
YALI0F18282	Cwp3	Similar to YlCwp1	30	3e-16	
YALI0F21450		Unknown	27	1e-53	

a) Housekeeping gene; **b)** Molecular control of the lipid metabolism induction (Wang *et al*.,1999a; 1999b).

Table I.9. Putative Transcription Factor binding sites identified in the promoter region of *Y. lipolytica* CWP coding genes.

Transcription Factor	Function	Documented Regulated Genes (some examples)
Adr1p	Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor, required for transcription of peroxisomal protein genes, and of genes required for ethanol, glycerol, and fatty acid utilization.	*POX1, OLE1, FLO1, TIP1, PIR3*
Ecm22p	Sterol regulatory element binding protein, member of the fungus-specific Zn[2]-Cys[6] binuclear cluster family of transcription factors; homologous to Upc2p.	*ERG1, ERG2, ERG3, ERG4, ERG6, ERG9, ERG10, ERG13, ERG25, ERG28, DAN1, DAN4, TIR1, TIR3, PIR1*
Gsm1p	Putative zinc cluster protein of unknown function, proposed to be involved in the regulation of energy metabolism.	*ERG6*
Mot3p	Nuclear transcription factor with two Cys2-His2 zinc fingers; involved in repression of several DAN/TIR genes during aerobic growth, and repression of ergosterol biosynthetic genes.	*AGA1, ERG2, ERG6, ERG9, ERG28, DAN1, DAN4, TIR1,TIR3, TIR4, TIP1, MUC1, CWP2*
Rtg1p	Transcription factor (bHLH) involved in interorganelle communication between mitochondria, peroxisomes, and nucleus.	*POX1, ERG26*
Rtg3p	Basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH/Zip) transcription factor that forms a complex with another bHLH/Zip protein, Rtg1p, to activate the retrograde (RTG) and TOR pathways.	*ERG26, POX2, FLO10*
Upc2p	Sterol regulatory element binding protein induces transcription of sterol transport and biosynthetic genes.	*ERG2, ERG3, ERG9, ERG10, ERG11, ERG24, ERG25, ERG26, TIR1, TIR2, TIR3, TIR4, DAN1, DAN4, CWP2, PIR3.*

Information source : http://yeastract.com ; Teixeira *et al*., 2006; Monteiro *et al*., 2008

Expression patterns of CWP coding genes in the presence of methyl oleate

To analyze the effect of methyl oleate (as a model of hydrophobic substrate) on the regulation of CWP coding genes we have performed transcription analyses by qRT-PCR. The results have shown different expression patterns of CWP coding genes in the two media containing methyl oleate. In **Figure I.18**, we have grouped the analyzed CWP coding genes in three groups depending on their expression pattern. It was observed that 10 genes were overexpressed and another 8 genes were underexpressed in both media (including some genes with RTL = 1 ± 0.01-0.04). While 9 genes shown differential expression patterns between YPO and YNBO, The products of the genes overexpressed in both media containing methyl oleate include two proteins with unknown function (YALI0B18568p and YALI0F21450p). The *Yl*Pir1 (Jaafar *et al*., 2003), another two Pir-proteins (Cwp4/YALI0D27214p and

Cwp8/YALI0E33891p) and a protein similar to the CWP Tos1 (Cwp3/YALI0A17919p) could be structural constituents of the cell wall integrity. A GPI-anchored protein (Gas1/YALI0C06644p) presenting a glycosyl-hydrolase motive is probably involved in the cell wall polymer cross-linking. Another Pir-protein (Cwp6/YALI0C02981p) and a GPI-anchored protein (Muc1/YALI0C22924p) are probably stress responsive; and YALI0F04213p known as *Yl*Tsr1 (Mamoun *et al*., 1996) which amino acid ORF presents a putative carbohydrate-binding domain WSC. The similarity of *Yl*Tsr1 with the *S. cerevisiae* Wsc4 (Zu *et al*., 2001) suggests its induction as a stress response and cell wall integrity maintenance. The underexpressed gene products are proteins with similarity to glucanase (Scw1/YALI0A11077p and Scw2/YALI0D20680p), and to phospholipase (Plb3/YALI0D08206p and Lip/YALI0E34507p) that could be non-covalently attached since their amino acids ORF do not present a potential GPI-modification site neither internal repeats; and four GPI-anchored proteins probably involved in different mechanisms as agglutination (Aga2/YALI0B18194p), and maintenance of the structure and cell wall integrity (Ecm33/YALI0D07480p, Ccw1/YALI0E20757p and Cwp9/YALI0E32967p). In the group of genes showing differentially expressed patterns, the YALI0E24673 gene is overexpressed in YPO, its similarity with Crh1p suggests that this protein could also play a role of β-1,3-glycosidase as *Yl*Crh1p and *Yl*Crh2p. In contrast, one of the products of the genes overexpressed in YNBO is the β-1,3-glycosidase *Yl*Crh2p important for cell wall remodeling (Hwang *et al*., 2006). The rest of the genes overexpressed in YNBO codify for proteins that could be structural constituents of the cell wall (Cwp2/YALI0A09196p, Cwp4/YALI0D06633p and Cwp3/YALI0F18282p) or could carry out different functions as agglutinin (Aga1/YALI0D09185p), flocculin (Muc2/YALI0E05819p), protein kinase (Yak1p/YALI0E11077p), and phospholipase (Plb1/YALI0E16060p). It is noteworthy that the expression of these genes in the YNBO medium correlates with the conditions of increased cell wall hydrophobicity and adherence of lipid droplets.

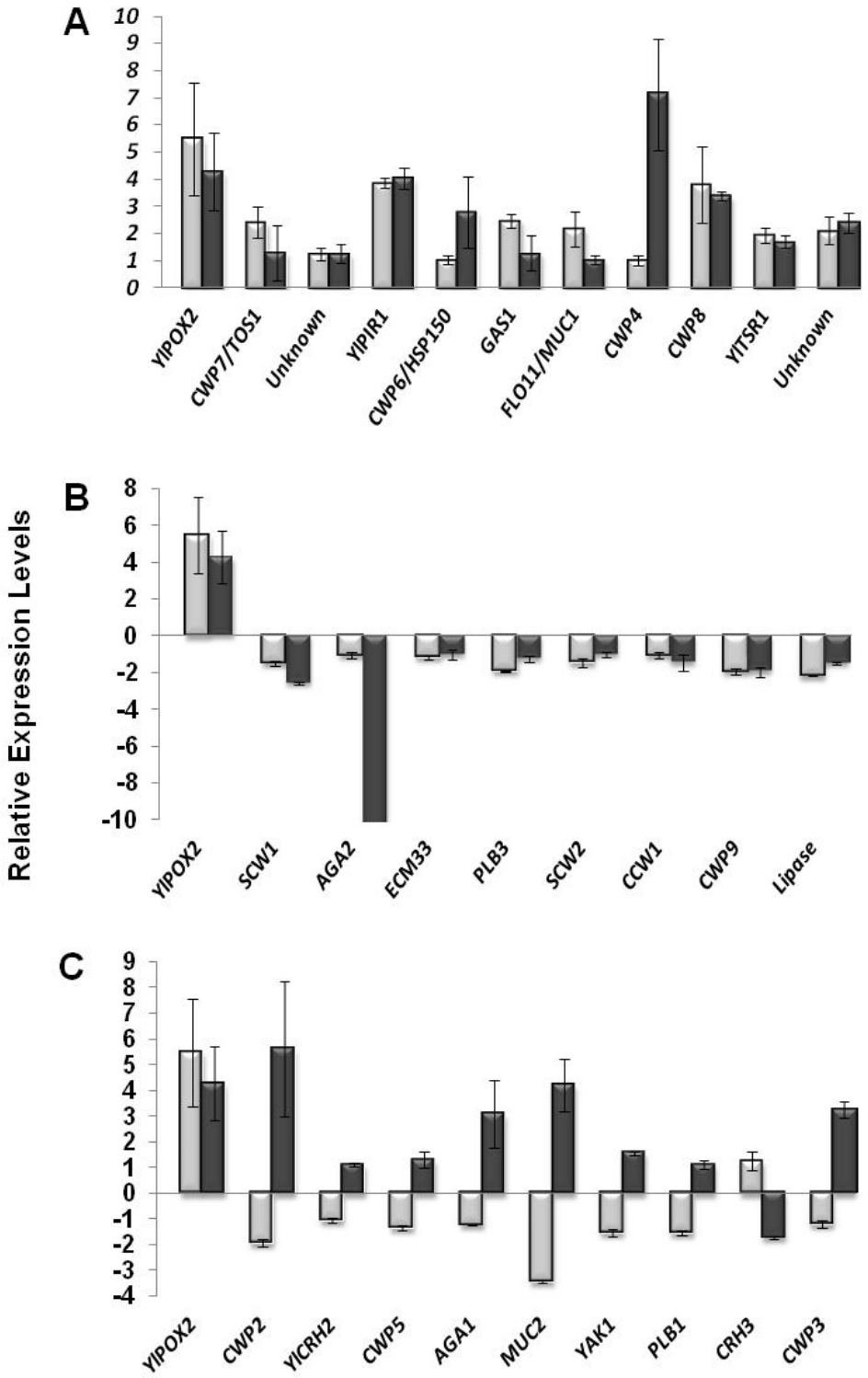


Figure I.18. Expression patterns of CWP coding genes in *Y. lipolytica* W29 grown in methyl oleate containing media. Genes are grouped in overexpressed (A), underexpressed (B) and differentially expressed CWP coding genes (C). The levels of mRNA were measured by quantitative RT-PCR in cells grown in YPO (grey bars) and YNBO (black bars) at mid-log phase. Expression levels relative to *ACT1* gene are the mean ± sd of three independent repetitions.

DISCUSSION

The cell wall is the structure that establishes the first contact between fungal cells and the extracellular environment. Therefore biosynthesis, structure, composition and modulation of the cell wall could be interesting tags for biomedical, agriculture and biotechnological improvements. In that field, important advances on the characterization of the cell wall have been done in the conventional yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in the human pathogen *Candida albicans*. Nevertheless little work has been done with other species as *Yarrowia lipolytica*, a non-conventional yeast with industrial applications that could present specific responses or mechanisms for cell wall biosynthesis, integrity and modulation due to the own species characteristics or linked to its oleaginous nature. In this work we have analyzed some of the cell wall modifications in *Y. lipolytica* grown on glucose or on methyl oleate. In YNBO, yeast cells became more hydrophobic and the adhesion of lipid droplets was observed all over the cell wall, whereas in YPO the hydrophobic property of the cells was lower and lipid droplets were not visible. These result suggested that in YPO, a rich culture medium in which besides methyl oleate there is also an alternative carbon source (from peptone and yeast extract) different than glucose, the cells satisfy their energetic needs with it and they tend to store fatty acids in lipid bodies, and probably the cell surface hydrophobicity is diminished to avoid an excessive intake of hydrophobic substrates. In contrast, in YNBO, a minimal culture medium lacking of alternative carbon source but containing methyl oleate, cells modify their surface properties by increasing their cell wall hydrophobicity to ensure both the adhesion of lipid droplets and the intake of hydrophobic substrates. A part of the internalized hydrophobic substrates could be metabolized and another part could be stored, since the presence of lipid bodies was also observed. Nevertheless, the transcription of gene *YlPOX*2 coding for a long chain Acyl-CoA oxidase (Wang *et al*., 1999) was induced in YPO and in YNBO, indicating that the metabolism of lipids was active in both culture media.

No evident modifications of the CW ultrastructure were evidenced by transmission electron microscopy (TEM) contrary to previous reports. Kim *et al* (2000) et Mlíčková *et al* (2004) observed modifications at the cell wall level that they interpreted as a cell wall thickness decrease and a periplasmique space width increase in *Y. lipolytica* grown in crude oil and oleic acid respectively. Although we observed alterations in the cell wall by testing the sensitivity of the yeast cells to the dyes calcofluor white (CFW) and Congo red (CR). Our results showed that independently of the composition of the culture medium, cells pre-grown in the presence of methyl oleate were less sensitive to the cell wall-weakening effect of CFW

and CR than cells pre-grown in glucose. In *S. cerevisiae* low chitin content is usually associated to resistance to CFW (Roncero *et al*., 1988). Although it was reported that in *Y. lipolytica* transposon mutants the sensitivity to CFW was independent of the chitin content (Ruiz-Herrera *et al*., 2003). On the other hand the disruption of cell wall proteins (CWP) alters the cell wall integrity and mutant strains are sensitive to CFW, CR, SDS (sodium dodecyl sulfate), caffeine, β-glucanases and caspofungine, all of them known as indicators of cell wall modifications (de Groot *et al*., 2001). By FTIR spectroscopic analysis we observed that cells cultured in methyl oleate containing media, thus resistant to CFW and CR, presented lower contents of carbohydrates (probably including chitin which band was masked by the amide II band) and CWP, and only a slight increase in β-1,3-glucan (band at 1140 cm^{-1}) was observed. Then the resistance to CFW and CR of cells pre-grown in YPO and YNBO is due to modifications of the content of the cell wall components induced by methyl oleate.

Up to now, our knowledge on CWP coding genes in *Y. lipolytica* is not very extensive. Even if many works have been done in *S. cerevisiae* and *C. albicans* to demonstrate the function and regulation of CWP coding genes, their products localization and attachment, for many of these genes the function is unknown. The fact that CWP gene disrupting strains are viable (therefore none CWP gene is essential), and mutations could not give an evident phenotype due to rescue by gene families, complicates the identification of their function. Besides the identification of the *Y. lipolytica* CWP *Yl*Pir1, *Yl*Cwp1 (Jaafar *et al*., 2003; Jaafar *et al*., 2004), and the β-1,3-glycosidases *Yl*Crh1 and *Yl*Crh2 (Hwang *et al*., 2006) no more CWP have been reported for this yeast. Thus, by *in silico* analysis we have identified many genes in the genome of *Y. lipolytica* coding for putative CWP. Interestingly, we also predicted the presence of transcription factor binding sites (TFBS) in their promoter regions that are probably recognized by transcription factors (TFs) previously documented as regulating not only the expression of genes involved in the metabolism of lipids but also of some CWP coding genes. Although the functionality of the TFBS remains to be demonstrated, the results of our transcriptional analysis indicated that the presence of a hydrophobic substrate could have an effect on the expression of CWP coding genes. The groups of overexpressed and underexpressed genes suggest common responses in both culture media that could be specifically modulated by methyl oleate. Based on the putative functions and characteristics of these proteins, we propose that when cells grow on methyl oleate, this is detected as an environmental stress factor that induces the expression of genes coding for stress and structural proteins that respond to maintain the cell wall integrity and, as a result, the yeast

can grow under non optimal growth conditions. In the third group there were genes mainly overexpressed in YNBO medium. Some of these genes could be induced in response to the nutrient stress; other could be needed to remedy specific cell wall integrity damages in YNBO; and the genes presenting similarity to *AGA1* and *MUC1* could play a role in the adhesion of lipid droplets to the cell wall.

This is the first work in which the expression of CWP coding genes during the uptake of a hydrophobic substrate in *Y. lipolytica* is approached. Our results indicate that the common responses in YPO and YNBO could be directly related to the presence of methyl oleate in both media. Although, we have also observed specific differences that could be due to the media composition and to the adhesion pattern of lipid droplets. So we propose that *Y. lipolytica* perceive the presence of methyl oleate and/or the nutrients starvation as a stress, then yeast cells modify their cell wall structure and physicochemical properties to maintain their viability and metabolism by the participation of the CWP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially granted by the French Agency for Research (ANR) and Romero-Guido possessed a grant from the Alβan Fellows Program of High Level for Latinamerica (Alβan, No. E07D404079MX). The authors are thankful to Thomas Karbowiak for his precious advice and to Christine Bernard-Rojas, Yann Roche and Joël Michel for technical help. Parts of the investigations were carried out in the Spectral Imaging Platform (PIMS) of the Cell Imaging Facilities of Burgundy/Franche Comté (Dimacell).

REFERENCES

Adt I., Toubas D., Pinon J.M., Manfait M., Sockalingum G.D. (2006) FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. Arch Microbiol 185:277-285.

Aguedo M., Waché Y., Belin J-M., & Texeira J.A. (2005) Surface properties of *Yarrowia lipolytica* and their relevance to γ-decalactone formation from methyl ricinoleate. Biotechnol lett. 27(6):417-422.

Aguedo M., Waché Y., Mazoyer V., Sequeira-Le Grand A. & Belin J-M. (2003) Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. J Agric Food Chem 7(10):3007-3011.

Aguilar-Uscanaga B., & François J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters Appl Microbiol, 37:268-274.

Alimardani P., Régnacq M., Moreau-Vauzelle C., Ferreira T., Rossignol T., Blondin B., & Bergés T. (2004) SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. Biochem J 381:195-202.

Amaral P.F.F., Lehocky M., Barros-Timmons A.M.V., Rocha-Leão M.H.M., Coehlo M.A.Z. & Coutinho J.A.P. (2006) Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Yeast 23:867-877.

Bellon-Fontaine M.N., Rault J., & Van-Oss C.J. (1996). Microbial adhesión to solvents: a novel method to determine the electron-donor:electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cell. Colloids Surf. B: Biointerfaces 7:47-53.

Blanchin-Roland S., Da Costa G., & Gaillardin C. (2005). ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Microbiology 151, 3627–3637.

de Groot P.W.J., Ruiz C., Vázquez de Aldana C.R., Dueñas E., Cid V.J., Del Rey F., Rodríguez-Peña J.M., Andel A., Caubín J., Arroyo J., García J.C., Gil C., Molina M., García L.J., Nombela C., & Klis F.M. (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Comp Func Genom:124-142.

de Groot P.W.J., Kraneveld E.A., Yin Q.Y., Dekker H.L., Gross U., Crielaard W., de Koster C.G., Bader O., Klis F.M. & Weig M. (2008) The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: Differential incorporation of novel adhesion-like wall proteins. Eukaryotic Cell 7(11):1951-1964.

Fickers P., Benetti P-H., Waché Y., Marty A., Mauersberguer S., Smit M.S., & Nicaud J-M. (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications. FEMS Yeast Res 5:527-543.

Galichet A., Sockalingum G.D., Belari A., & Manfait M. (2001) FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. FEMS Microbiol Lett 197: 179-186.

Hwang J-S., Seo D-H., & Kim, J-Y. (2006) Soluble forms of YlCrh1p and YlCrh2p, cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*, have β-1,3-glycosidase activity. Yeast 23:803-812.

Kapteyn J.C., Montijn R.C., Vink E., de la Cruz J., Llobell A., Douwes, J.E., Shimoi H., Lipke, P.N., & Klis F.M. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β-1,3-/ β-1,6-glucanheteropolymer. Glycobiology 6:337-345.

Kapteyn J.C., Van Egmond P., Sievi E., Van Den Ende H., Makarow M. & Klis F.M. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. Mol. Microbiol. 31(6):1835-1844.

Kim T.H., Oh Y.S., & Kim S.J. (2000) The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. J. Microbiol. Biotechnol. 10, 333-337.

Li J., Ying S.H., Shan L.T. & Feng M.G. (2010) A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in Beauveriabassiana. Appl Microbiol Biotechnol. 85:975-984.

Lipke P.N. & Ovalle, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J Bacteriol. 180: 3735-3740.

Livak K. J., & Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-ΔΔCt] Method. Methods. 25, 402–408.

Mamoun C.B., Beckerich J-M. & Gallairdan C. (1996) The *TSR1* gene of *Yarrowia lipolytica* is involved in the signal recognition particle-dependent translocation pathway of secretory proteins. J Biol Chem. 271(39): 23895-23901.

Mansour S., Beckerich J. M., & Bonnarme P. (2008) Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol. 74, 6505–6512.

Mlíčková K., Roux E., Athenstaedt K., d'Andrea S., Daum G., Chardot T. & Nicaud J. M. (2004) Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol. 70, 3918-3924.

Monteiro P.T., Mendes N., Teixeira M.C., d'Orey S., Tenreiro S., Mira N., Pais H., Francisco A.P., Carvalho A.M., Lourenço A., Sá-Correia I., Oliveira A.L. & Freitas A.T. (2008) YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 36, D132-D136. Oxford University Press.

Mrsă V., Seidl T., Gentzsch M. & Tanner, W. (1997) Specific labbeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 30(12):1145-1154.

Osumi M., Fukuzumi F., Yamada N., Nagatani T., Teranishi Y, Tanaka A. & Fukui S. (1973) Surface structure of some *Candida* yeast cells grown on *n*-alkanes. J. Ferment.Technol. 53, 244-248.

Romero-Guido C., Belo I., Ta T.M.N., Cao-Hoang L., Alchihab M., Gomes N., Thonart P., Teixeira J.A., Destain J. & Waché Y. (2011) Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilization for the production of flavour and fragrance compounds. Appl Microbiol Biotechnol 89(3):535-547.

Roncero C., Valdivieso M.H., Ribas J.C., & Duran A. (1988) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor White. J Bacteriol 170:1950-1954.

Ruiz-Herrera J., García-Maceira P., Castillo-Barahona L. C., Valentín E. & Sentandreu R. (2003) Cell wall composition and structure of *Yarrowia lipolytica* transposon mutants affected in calcofluor sesitivity. Antonie Van Leeuwenhoek. **84**, 229-238.

Teixeira M.C., Monteiro P., Jain P., Tenreiro S., Fernandes A.R., Mira N.P., Alenquer M., Freitas A.T., Oliveira A.L. & Sá-Correia I. (2006) The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res., 34, D446-D451, Oxford University Press.

Waché Y., Aguedo M., Nicaud J.M. & Belin J.M. (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol, 61:393-404.

Waché Y., Husson F., Feron G. & Belin J.M. (2006) Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. Antonie Van Leeuwenhoek, 89:405-416.

Wang H.J., Le Dall M.T., Waché Y., Le Clainche A., Belin J-M. & Nicaud J-M. (1999a) Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochem Biophys, 31(2):165-174.

Wang H.J., Le Dall M.T., Waché Y., Laroche C., Belin J-M., Gaillardin C. & Nicaud J-M. (1999b) Evaluation of Acyl Coenzyme A Oxidase (Aox) Isozyme Function in the n-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*. J Bacteriol **181**, 5140-5148.

Zu T., Verna J. & Ballester R. (2001) Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress condition and impairement of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics, 266(1):142-155.

5.1 Résultats complémentaires I

Á partir des analyses de transcription présentés dans la Publication I (Romero-Guido *et al*) nous avons observé un groupe de sept gènes présentant une transcription très différente entre les deux milieux contenant de l'oléate de méthyle (YPO et YNBO). Pour ces gènes dont les protéines putatives codées sont Cwp2 (YALI0A09196p), Cwp3 (YALI0F18282p), Cwp4 (YALI0D27214p), Cwp6/Hsp150 (YALI0C02986p), Aga1 (YALI0D09185p), Muc2 (YALI0E05819p), Yak1 (YALI0E11077p), la transcription a été spécifiquement induite dans le milieu minimum YNBO. Ce résultat a suggéré la participation de ces gènes dans l'adhésion des gouttelettes lipidiques au moment où les levures ayant poussé dans YNBO entrent en contact avec l'oléate de méthyle.

Pour approfondir sur la participation de ces gènes à l'adhésion des gouttelettes lipidiques, nous avons suivi l'adhésion des gouttelettes lipidiques à la paroi cellulaire des levures pendant les premières heures de culture dans les milieux YPO et YNBO. En même temps nous avons analysé l'expression des 7 gènes en question. À ce sujet on a utilisé la souche sauvage W29 et la souche MTLY37 (Tableau 2), un mutant incapable de pousser sur lipides dû à la délétion de 4 gènes codant pour les acyl CoA oxydases (Δ*pox2*Δ*pox3*Δ*pox4*Δ*pox5*) et qui présente un profil d'adhésion des gouttelettes lipidiques différent de celui de la souche sauvage, c'est-à-dire qu'à 24 heures d'incubation dans YNBO le mutant MTLY37 ne présente pas de gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire. Par contre dans le milieu YPO ce mutant présente des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire. Cas contraire à la souche sauvage W29 qui à 24 heures de culture présente des gouttelettes lipidiques dans YNBO mais non dans YPO.

5.1.1 Cinétiques d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire

L'apparition des gouttelettes lipidiques adhérant sur la surface cellulaire a été observée par microscopie confocale à 1 h, 3 h et 5 h d'induction dans le milieu glucosé YPD et les milieux lipidiques YPO et YNBO. Chez la souche sauvage W29 on a observé des gouttelettes lipidiques depuis la première heure d'induction dans les deux milieux lipidiques (YPO et YNBO) et le nombre semble augmenter avec le temps. Mais les cellules du milieu YNBO semblent montrer un nombre plus important de gouttelettes lipidiques par rapport aux cellules du milieu YPO (Figure 19). Chez la souche mutante MTLY37 on a observé aussi l'adhésion des gouttelettes lipidiques à partir d'1 heure d'induction dans les milieux YPO et PBSO. Mais

chez la souche mutante MTLY37 au contraire de la souche sauvage les gouttelettes lipidiques semblent être aussi nombreuses dans YPO que dans PBSO (Figure 20).

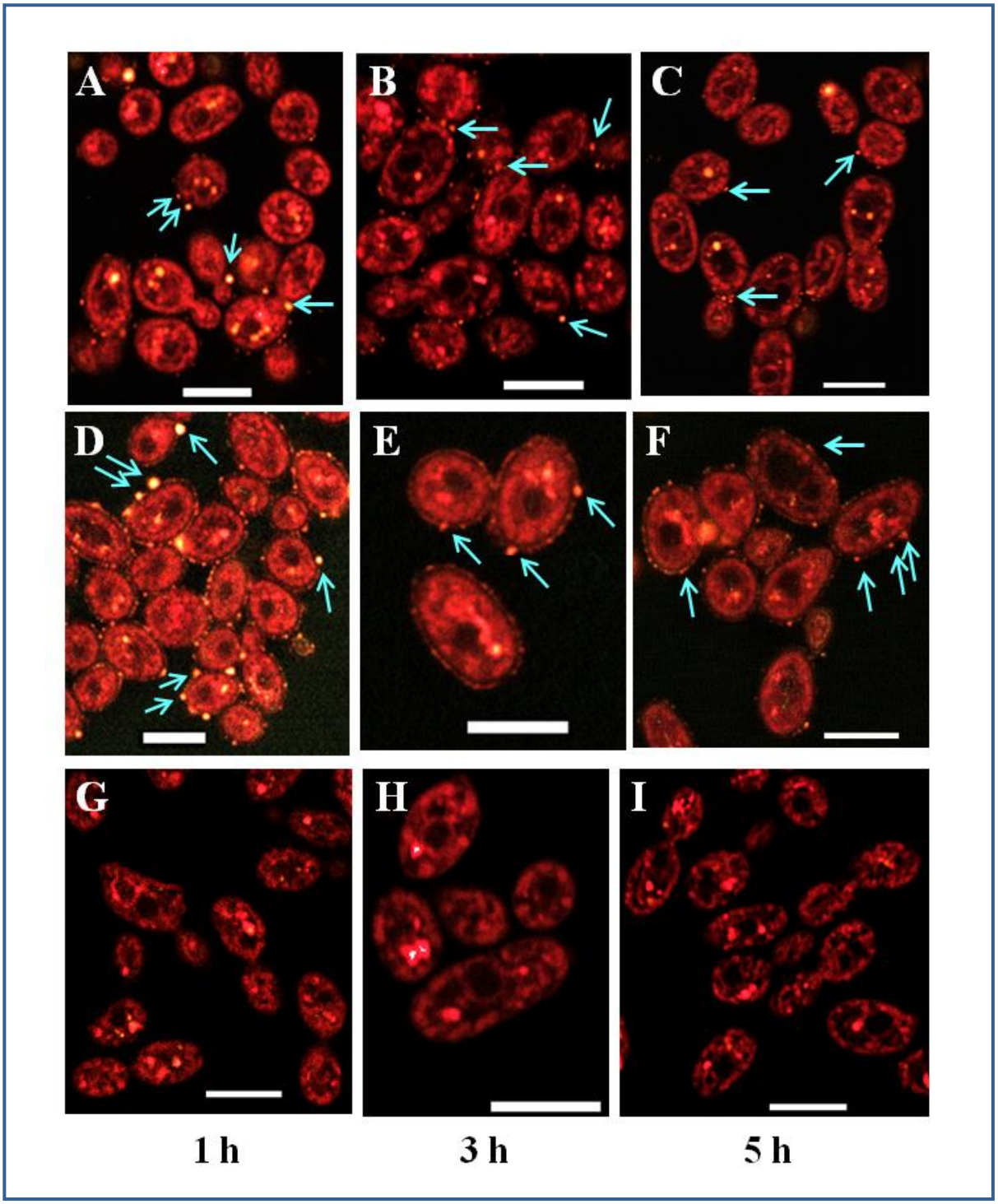


Figure 19. Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire chez la souche sauvage W29 de *Y. lipolytica*. Observations au microscope confocale à 1 heure, 3 heures et 5 heures d'incubation dans YPO (A, B, C), YNBO (D, E, F) et YPD (G, H, I). Les flèches indiquent quelques gouttelettes lipidiques. Images répresentatives de trois cultures indépendantes.

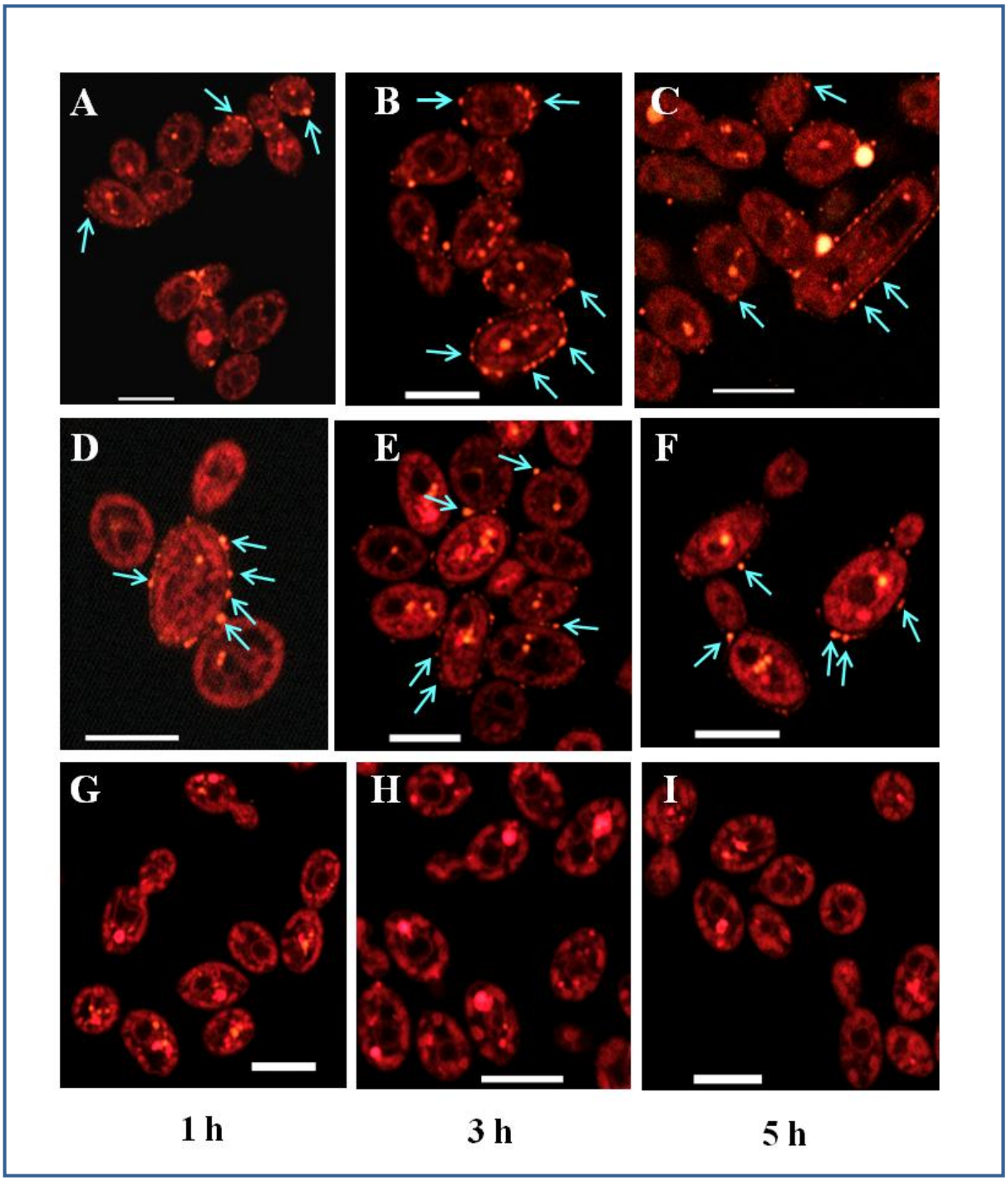


Figure 20. Cinétique d'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface celullaire chez la souche mutant MTLY37 de *Y. lipolytica*. Observations au microscope confocale à 1 heure, 3 heures et 5 heures d'incubation dans YPO (A, B, C), PBSO (D, E, F) et YPD (G, H, I). Les flèches indiquent quelques gouttelettes lipidiques. Images répresentatives de trois cultures indépendantes.

5.1.2 Cinétiques d'expression des gènes de paroi cellulaire spécifiquement induits dans le milieu YNBO

Par microscopie confocale on a observé que le nombre de gouttelettes lipidiques augmente avec le temps, alors on a fait les analyses de RT-PCR quantitative en temps réel à 1 heure et à 5 heures d'induction dans le milieu glucosé et les deux milieux contenant l'oléate de méthyle. Chez *Y. lipolytica* W29, les résultats de la RT-PCR en temps réel ont montré que dans le milieu YPO les gènes *YAK1* (YALI0E11077g) et *CWP3* (YALI0F18282g) ont une expression augmentée par rapport aux niveaux basaux à 1 heure et 5 heures d'induction (Figure 21A) et sont sous-exprimés à 19 heures. Les autres gènes sont aussi sous-exprimés comme on a observé à 19 heures de culture (Figure I.18, Publication 1). Dans le milieu YNBO on a observé un profil d'expression différent en fonction du temps d'induction. A 1 heure d'induction, les gènes *CWP6/HSP150* (YALI0C02981g) et *MUC2* (YALI0E05819g) sont sur-exprimés pendant que les gènes *AGA1* (YALI0D09185g) et *CWP3* (YALI0F18282g) montrent des niveaux basaux d'expression et *CWP2* (YALI0A09196g), *CWP4* (YALI0D27214g) et *YAK1* (YALI0E11077g) sont sous-exprimés. Par contre, à 5 heures d'induction il y a une grande augmentation des niveaux relatifs d'expression de la majorité des gènes (Figure 21B) mais surtout du gène *CWP4* (YALI0D27214g).

Chez le mutant MTLY37 de *Y. lipolytica* on a observé une sous-expression de la majorité des gènes dans le milieu YPO aux deux temps d'induction analysés, et seul le gène *AGA1* (YALI0D09185g) s'exprime à des niveaux >1 à 5 heures (Figure 21C). Dans PBSO tous les gènes sont exprimés à des niveaux basaux à 1 heure d'induction. Par contre à 5 heures d'induction une surexpression importante est observable pour les gènes *CWP2* (YALI0A09196g), *CWP4* (YALI0D27214g), *MUC2* (YALI0E05819g) et *YAK1* (YALI0E11077g) (Figure 21D).

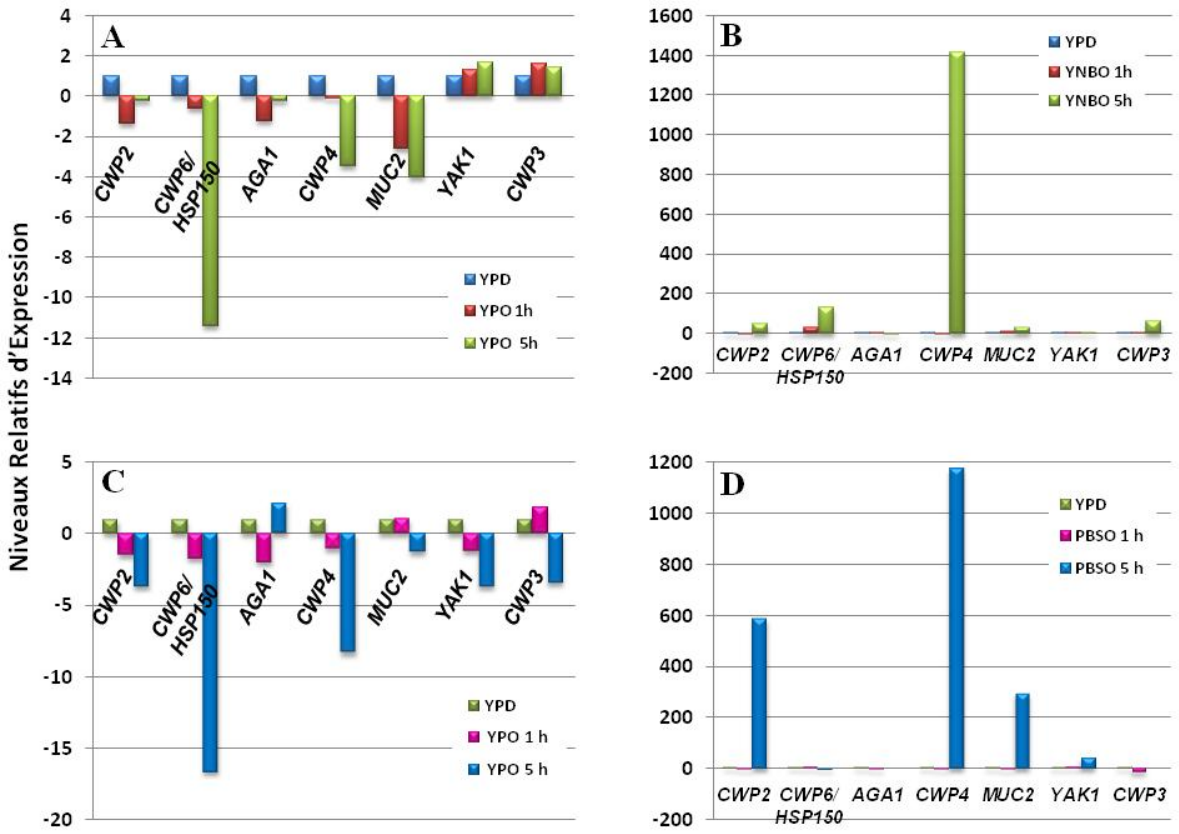


Figure 21. Expression de sept gènes codants pour des protéines putatives de paroi cellulaire de *Y. lipolytica* à 1 h et 5 h d'induction en présence d'oléate de méthyle. A et B) souche W29 incubée dans YPO et YNBO respectivement ; C et D) souche MTLY37 incubée dans YPO et PBSO respectivement.

5.1.3 Discussion et conclusion

Par RT-PCRq en temps réel on a identifié 7 gènes qui ont montré un profil d'expression intéressant dans les milieux pauvres contenant de l'oléate de méthyle (YNBO et PBSO). En prenant en compte l'information du Tableau I.8 (Romero-Guido *et al*., Publication 1) et les résultats de microscopie confocale ainsi que de l'analyse transcriptionelle, on peut faire deux groupes conformément à la fonction suggérée pour les sept gènes : **1) Protéines de réponse au stress**. Nos analyses *in silico* ont montré que les gènes *CWP2* (YALI0A09196g), *CWP4* (YALI0D27214g) et *CWP3* (YALI0F18282g) présentent une similarité avec le gène *YlCWP1*. Le produit du gène *YlCWP1* est une protéine de paroi cellulaire de type PIR. La disruption de *YlCWP1* augmente légèrement la résistance au calcofluor blanc, rouge Congo et à la zymolyase (Jaafar *et al*., 2003) mais on ne connait pas encore la fonction de sa protéine, cependant les protéines PIR sont souvent liées à des réponses au stress (Yun *et al*., 1997 ;

Boorsma *et al*., 2004). L'induction de *CWP2* (YALI0A09196g) et *CWP4* (YALI0D27214g) chez les deux souches, ainsi que l'induction de *CWP3* (YALI0F18282g) chez la souche W29 suggère que leurs produits pourraient jouer un rôle dans la réponse au stress qui serait causé par l'oléate de méthyle et par le manque de nutriments dans le milieu d'incubation. D'une manière très intéressante, le gène *CWP4* (YALI0D27214g) a montré les niveaux relatifs d'expression les plus hauts chez les deux souches analysées. Ce résultat suggère un rôle important pour cette protéine dans des conditions de culture défavorable pour la levure. L'induction du gène *CWP4* (YALI0D27214g) à des niveaux si hauts d'expression semble très intéressante pour des applications biotechnologiques. Chez la souche sauvage on a observé l'induction du gène *CWP6/HSP150* (YALI0C02981g) qui présente une similarité avec le gène *HSP150* de *S. cerevisiae*, dont la protéine est aussi de type PIR. Chez *S. cerevisiae* l'expression de *HSP150*, est induite par un stress comme un choc thermique (de 24°C à 37°C) mais aussi par la limitation d'azote (Russo *et al*., 1992 ; 1993), alors l'induction de *CWP6/HSP150* (YALI0C02981g) chez des cellules ayant poussé dans le milieu YNBO pourrait être une réponse à la faible teneur en azote du milieu. D'un autre côté, la protéine du gène YALI0E11077g a montré une similarité avec Yak1p, une protéine kinase impliquée dans une cascade de régulations pour la croissance adhésive en milieu solide et la résistance au stress thermique et acide (Hartley, *et al*., 1994 ; Malcher *et al*., 2011). Cette fonction de Yak1p et la forte expression du gène YALI0E11077g chez la souche sauvage et le mutant MTLY37 incubées dans les milieux minimaux YNBO et PBSO suggère l'induction de certaines voies de signalisation en réponse au stress par le manque de nutriments dans les milieux utilisés ici. Même si Yak1p est une protéine cytoplasmique, elle a été probablement suggérée par BLASTp comme une CWP car c'est une protéine riche en sérine/thréonine comme les protéines PIR. **2) Les protéines d'adhésion**. Le gène YALI0E05819g a montré une similarité avec *FLO11*/*MUC1*, un gène codant pour une mannoprotéine avec des propriétés d'adhésion qui jouent un rôle dans la floculation (agrégation asexuelle des cellules dépendant du calcium) chez *S. cerevisiae* (Lo *et al*., 1996 ; Douglas *et al*., 2007). L'induction du gène *MUC2* (YALI0E05819g) chez les souches W29 et MTLY37 suggère la participation de son produit dans l'adhésion des gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire. Nous n'avons pas déterminé si dans nos conditions expérimentales *Y. lipolytica* présente un phénomène de floculation, mais par microscopie confocale on n'a pas observé une agrégation des cellules.

En reprenant nos résultats d'expression des gènes de paroi cellulaire à 1 h, 5 h et 19 h de culture, et les résultats de l'essai de sensibilité aux colorants Calcofluor Blanc et Rouge

Congo (Romero-Guido *et al*., Publication 1), pour lesquels nous avons observé que les cellules ayant poussé dans YPO et YNBO sont plus résistantes à l'effet toxique de ces colorants que les cellules ayant poussé dans YPD, nous proposons que les cellules perçoivent la présence de lipide et/ou la limitation de nutriments comme un stress depuis les premières heures de culture, stress auquel elles pourraient répondre en modifiant la structure pariétale (ce qu'on a vu par FTIR) pour maintenir leur viabilité grâce à la participation des protéines de paroi cellulaire.

Nos résultats de transcription des gènes codant des CWP en présence de substrats hydrophobes sont intéressants pour des applications biotechnologiques. Nous avons observé que la transcription de certains des gènes est induite depuis les premières heures de culture dans un milieu minimum contenant de l'oléate de méthyle. A ce sujet, Yuzbasheva *et al* (2011) ont très récemment publié la localisation dirigée de la lipase *Yl*Lip2p à la surface cellulaire de *Y. lipolytica*. Les fusions traductionnelles de la protéine *Yl*Lip2 avec le carboxyle terminal 3' des protéines *Yl*Cwp1, YALI0D27214p et YALI0F18282p régulées par le promoteur *hp4d* (un promoteur fort dépendant de la phase de croissance) ont montré une localisation bien dirigée à la surface cellulaire et une très haute activité de lipase (70 fois plus importante que celle indiquée par d'autres auteurs) dans un milieu dont la composition est glucose/YNB/huile d'olive. Dans notre travail nous avons analysé l'expression des gènes codant les protéines Cwp3 (YALI0F18282p) et Cwp4 (YALI0D27214p) et nous avons observé une forte expression des ces gènes, surtout de *CWP4* (YALI0D27214g), depuis 1 heure mais beaucoup plus importante à 5 heures de culture dans un milieu minimum (YNB/oléate de méthyle). L'utilisation des promoteurs des gènes *CWP3* et *CWP4* pour réguler l'expression de protéines d'intérêt pourrait avoir un potentiel intéressant dans des méthodes de biotransformation de lipides par *Y. lipolytica*.

5.2 Résultats complémentaires II

5.2.1 Analyses *in silico* des CWP putatives de *Y. lipolytica*

Dans ce travail nous avons identifié 27 CWP putatives chez *Y. lipolytica.* Par contre, la grande majorité de ces protéines n'ont jamais été étudiées chez *Y. lipolytica*. Comme première approche pour les analyser nous avons fait des analyses *in silico* des séquences d'acides aminés afin de les classer en fonction des caractéristiques typiques des protéines GPI et des protéines PIR et d'identifier des motifs conservés. Ce groupe de protéines a présenté un certain pourcentage d'identité avec des protéines de paroi cellulaire déjà connues chez *S. cerevisiae* et chez d'autres champignons. Pour schématiser les régions similaires entre les CWP de *Y. lipolytica* et les CWP de référence nous avons fait des alignements multiples.

5.2.1.1 Motifs caractéristiques des protéines pariétales trouvés dans les CWP putatives de *Y. lipolytica*

Pour identifier le site ω potentiel pour l'addition postraductionnelle du groupe GPI, nous avons utilisé le prédicteur bioinformatique « big-PI Fungal Predictor GPI Modification Site Predictor in Funfi» (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html). Ce programme a été créé pour prédire le site ω dans le signal C-terminal des protéines GPI chez des champignons et il a été éprouvé chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* et *Schyzosaccharomyces pombe* (Eisenhaber *et al*., 2004).

L'identification des motifs PIR ainsi que la prédiction des autres motifs présents dans les CWP putatives ont été faites en analysant les séquences d'aminoacides dans la base de données ExPASy-PROSITE (Sigrist *et al*., 2010 ; http://prosite.expasy.org/). Pour certaines séquences, ExPASY-PROSITE n'a pas trouvé de motifs potentiels alors nous avons consulté les suggestions de motifs données par « KEGG » (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; Kanehisa *et al*., 2000 ; http://www.genome.jp/kegg/) chez Genolevures, ou par « CDD » chez NCBI (Conserved Domain Database ; Marchler-Bauer *et al*., 2009 ; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml).

Les résultats de nos analyses ont montré que 16 des CWP putatives de *Y. lipolytica* présentent un site ω potentiel (Tableau 10). Alors que 5 des CWP putatives présentent une ou plusieurs répétitions de type PIR (Tableau 10) et en même temps ces protéines ont aussi un site

potentiel d'addition du groupe GPI. Pour la protéine *Yl*Pir1 (YALI0B20306p) aucun motif PIR n'a été prédit par PROSITE, ce qui n'est pas surprenant car Jaafar *et al* (2003) ont observé que même si cette protéine montrait des pourcentages importants d'identité (jusqu'au 46,7%) avec les protéines Pir1-Pir4 de *S. cerevisiae* et Pir1 et Pir2 de *C. albicans*, *Yl*Pir1 ne présentait pas un motif PIR caractéristique mais peut être une variation de celui-ci.

Deux protéines n'ont présenté aucun motif. Alors que dix protéines sont probablement des protéines solubles de la paroi cellulaire ou des protéines de fonctions différentes car il n y a pas un site ω potentiel ni des répétitions PIR dans ses séquences d'aminoacides, mais elles présentent d'autres motifs ou des sites actifs qui seront décrits ensuite. Les sources de cette information sont les bases de données PROSITE, KEGG et CDD.

Union à chitine-I-1 : C'est un domaine de reconnaissance ou de signature d'union à la chitine.

Glycosyl hydrolase, famille 16 : Les enzymes O-glycosyl hydrolases hydrolysent les liaisons entre deux hydrates de carbone ou plus. La famille 16 inclut l'endo-beta-1,3-glucanase et l'endo-beta-1,3-1,4-glucanase, entre autres.

La présence du motif d'union à la chitine et du domaine glycosyl hydrolase dans la protéine *Yl*Crh2p (YALI0B15510p), dont l'activité β-1,3-glycosidase a été déjà prouvée (Hwang, *et al*., 2006), suggère un ancrage ou une reconnaissance de la chitine par *Yl*Crh2p pour faire les ramifications β-1,3-glucane entre les polysaccharides de la paroi cellulaire.

Domaine PLA2c : C'est un domaine catalytique lipase des phospholipases cytosoliques et lysophospholipases ou phospholipases B (PLB) chez les vertébrés et les champignons. Nos résultats du BLASTp ont montré que les protéines YALI0E16060p et YALI0D08206p présentent 46% et 35% d'identité avec les phospholipases Plb1 et Plb3 de *S. cerevisiae* respectivement.

Glycosyl hydrolase, famille 17 : Ce domaine présent chez les protéines de type exo-β-1,3-glucanase liées au transport et au métabolisme des hydrates de carbone. La participation des protéines de cette famille est importante pour maintenir la stabilité de la paroi cellulaire (Sestak *et al*., 2004). La présence de ce domaine chez les protéines YALI0D20680p et YALI0A11077p, et sa similarité avec les glucanases Scw11 et Scw4 respectivement, suggèrent une fonction de glucanase à ces deux protéines.

Domaine Protéine kinase et domaine serine/thréonine : La superfamille de protéines kinases est composée principalement des domaines catalytiques spécifiques de sérine/thréonine ou de tyrosine. Ces protéines catalysent le transfert du groupe phosphoryle de l'ATP au groupe hydroxyle des substrats spécifiques comme les résidus sérine, thréonine ou tyrosine des protéines. La présence de ces domaines chez la protéine YALI0E11077p et sa similarité avec la protéine kinase Yak1p suggère fortement sa participation dans une cascade de signalisation induite chez les souches W29 et MTLY37 dans les milieux de culture minimaux YNBO et PBSO respectivement.

Site actif de lipase sérine : Les lipases sont des esterases qui hydrolysent les acyl-glycérides de grande chaine en diglycérides et monoglycérides, glycérol et acides gras libres à une interface eau/lipide. La région la plus conservée des lipases est le site actif qui consiste en une triade de sérine, histidine et asparagine/glutamine. La protéine YALI0E34507p présente un site actif de lipase potentiel et une similarité avec la lipase *Yl*Lip2. Le gène YALI0E34507p n'a pas été induit dans les deux milieux lipidiques que nous avons utilisés.

Domaine WSC : Ce domaine putatif d'union à un hydrate de carbone d'environ 90 aminoacides, parmi lesquels huit cystéines sont conservées et forment probablement des ponts disulfure. Les protéines WSC1-WSC4 (de l'anglais « cell wall integrity and stress response components 1-4) contiennent un seul domaine WSC. Le gène YALI0F04213 code pour la protéine *Yl*Tsr1 localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). *Yl*Tsr1 est impliquée dans les premiers pas de la voie de translocation de protéines vers le RE, dépendant du signal de reconnaissance de particule (Mamoun, *et al*., 1996). La fonction du domaine WSC chez la protéine *Yl*Tsr1 n'est pas connue, par contre cette protéine présente une similarité avec la protéine Wsc4 de *S. cerevisiae*. Les protéines Wsc1-Wsc4 de *S. cerevisiae* sont une famille de capteurs transmembranaires impliqués dans la réponse au stress thermique, par peroxyde d'hydrogène, éthanol et composés qui abîment l'ADN. Elles sont aussi importantes pour maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire (Zu *et al*, 2001). L'induction du gène *TSR1* chez *Y. lipolytica* ayant poussé en présence d'oléate de méthyle suggère donc une activation des réponses de la voie d'intégrité de la paroi cellulaire.

DUF2401 et DUF2403 : Le domaine DUF2401 est présent chez une famille de protéines glycosyl hydrolases de type TOS1 conservées chez les champignons. Le domaine DUF2403 se situe dans la région N-terminal des protéines riches en glycine membres de la famille DUF2401. La protéine YALI0A17919p présente une similarité avec la protéine Tos1 de *S.*

cerevisiae, une protéine appartenant à cette famille et qui semble avoir une activité de β-1,3-glucanase (Steczkiewicz *et al*., 2010).

Glycosyl hydrolase, famille 2 : Cette famille contient des protéines avec une activité de beta-galactosidase, de beta-mannosidase et de beta-glucuronidase. La protéine YALI0C0664p est similaire à la beta-1,3-glucanosyltransférase Gas4p, un membre de la famille glycosyl hydrolase 2 chez *S. cerevisiae*.

5.2.1.2 Alignements multiples des CWP putatives de *Y. lipolytica* avec des CWP d'autres champignons

Pour schématiser la similarité entre les CWP putatives que nous avons identifiées chez *Y. lipolytica* et des CWP déjà connues chez *S. cerevisiae* et d'autres champignons tels que *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*, nous avons fait des alignements multiples des séquences d'acides aminés par ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). Les résultats des alignements multiples et les arbres phylogéniques correspondants sont montrés dans les Figures 22 à 28.

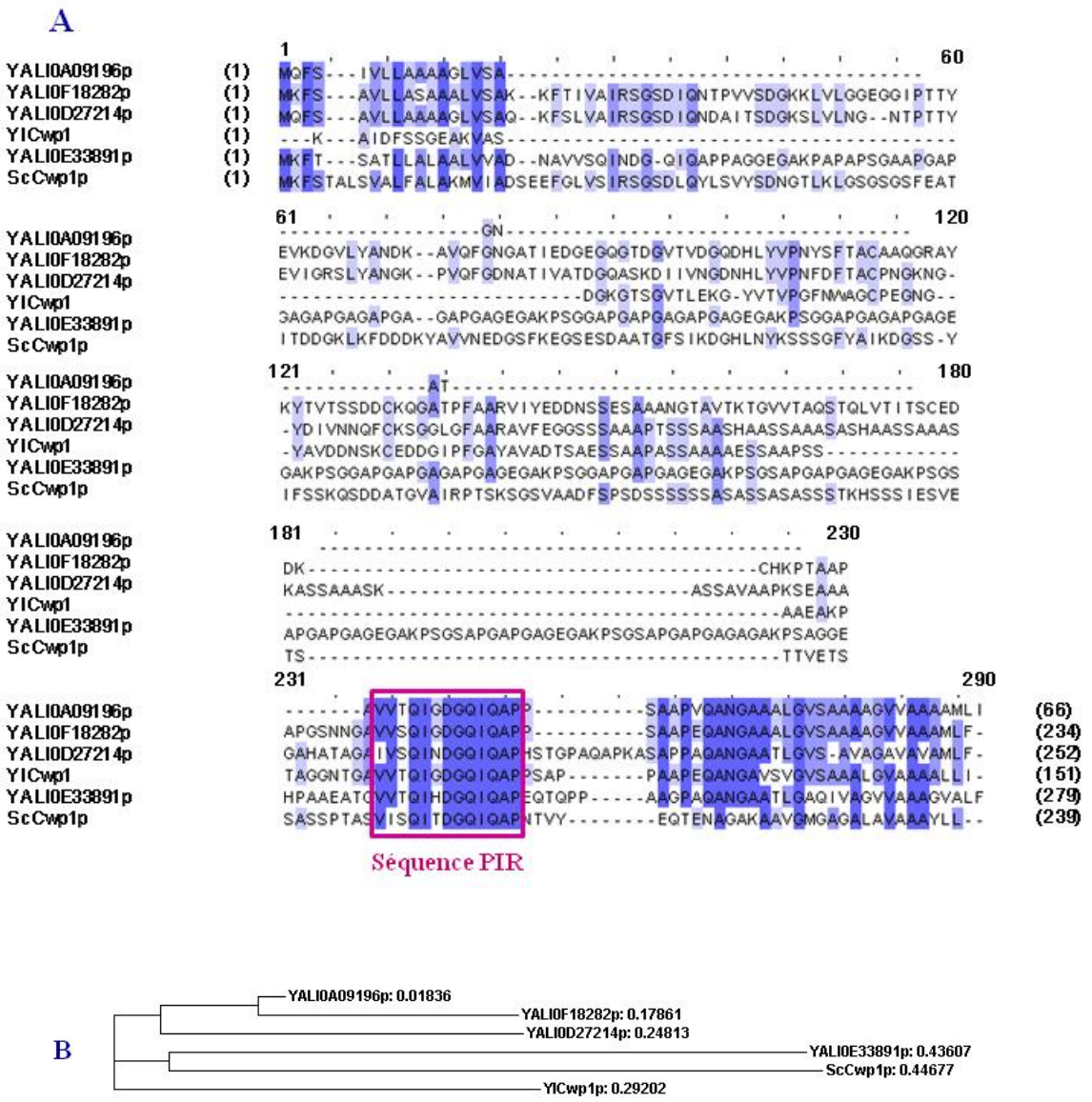


Figure 22. Alignement multiple de protéines pariétales de type Cwp. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScCwp1p, YlCwp1p, YALI0A09196p (Cwp2p), YALI0F18282p (Cwp3p), YALI0D27214p (Cwp4p) et YALI0E33891p (Cwp8p). Le cadre rose montre une séquence PIR conservé dans les six séquences d'acides aminés comparées. **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Yl) *Yarrowia lipolytica*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

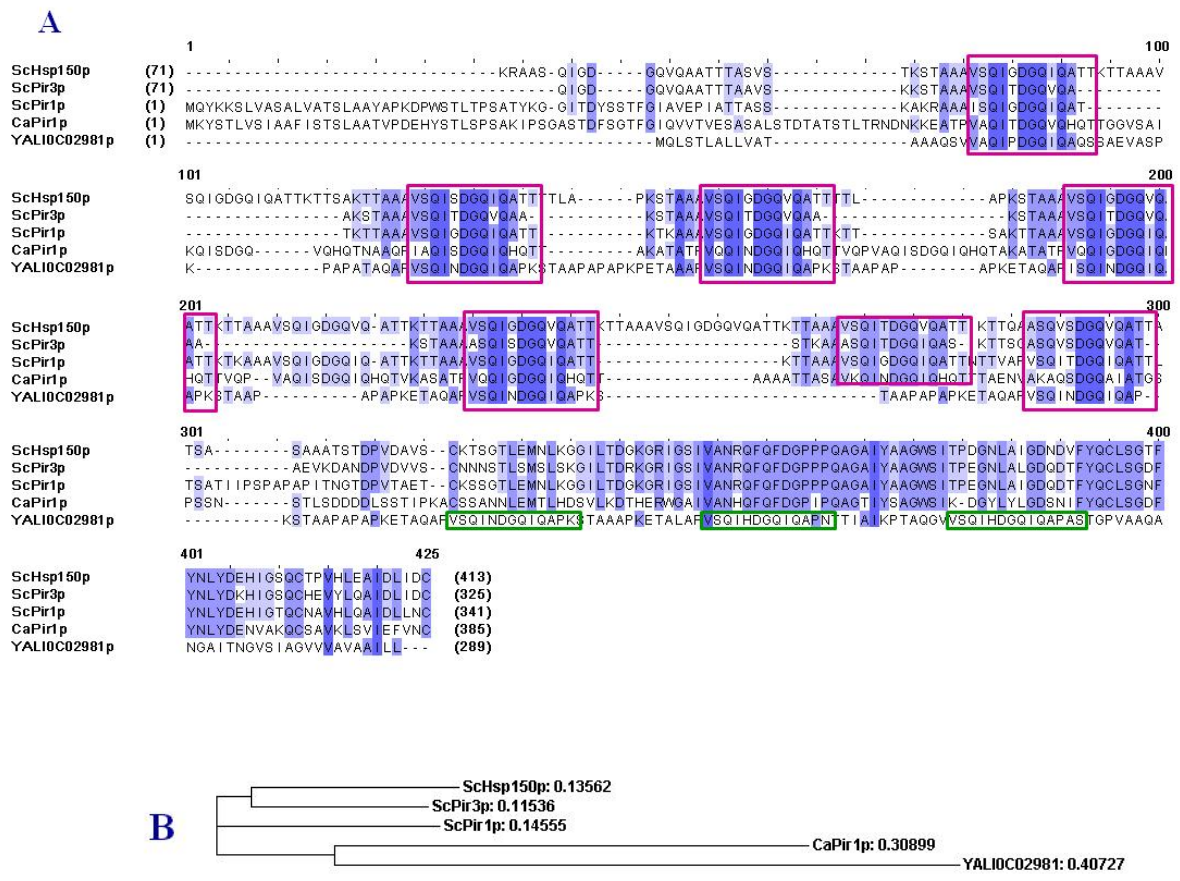


Figure 23. Alignement multiple de protéines de type Pir. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScHsp150p, ScPir31p, ScPir1p, CaPir1p et YALI0C02981p (Cwp6p/Hsp150p). Les cadres roses montrent des séquences PIR conservées dans les cinq séquences d'acides aminés comparées. Les cadres verts montrent des séquences PIR présentes dans la séquence YALI0C02981p (Cwp6p/Hsp1p) de *Y. lipolytica*. **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Ca) *Candida albicans*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

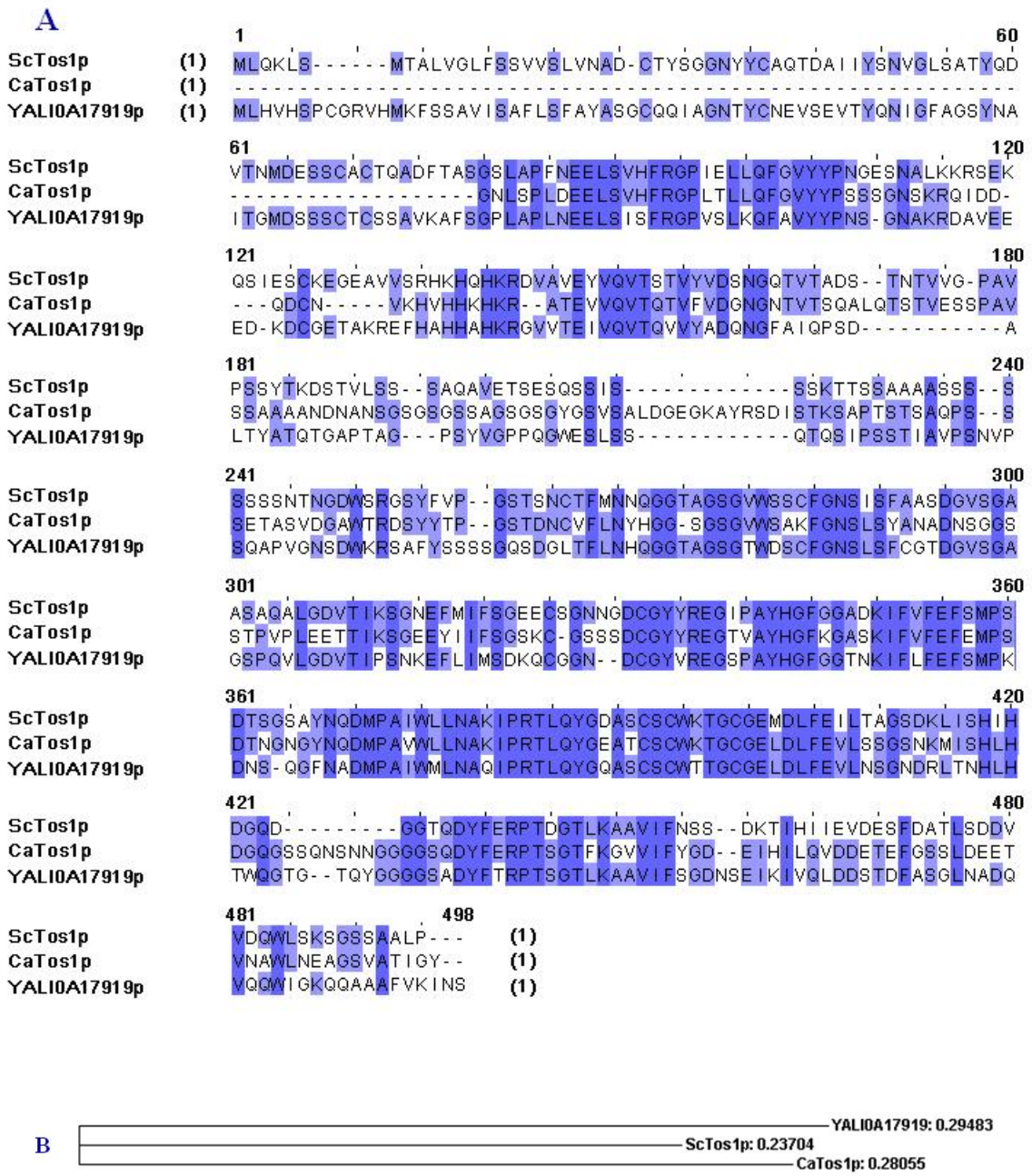


Figure 24. Alignement multiple de protéines de type Tos avec fonction de β-1,3-glucanase permuté. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScTos1p, CaTos1p et YALI0A017919p (Cwp7p/Tos1p). **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Ca) *Candida albicans*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

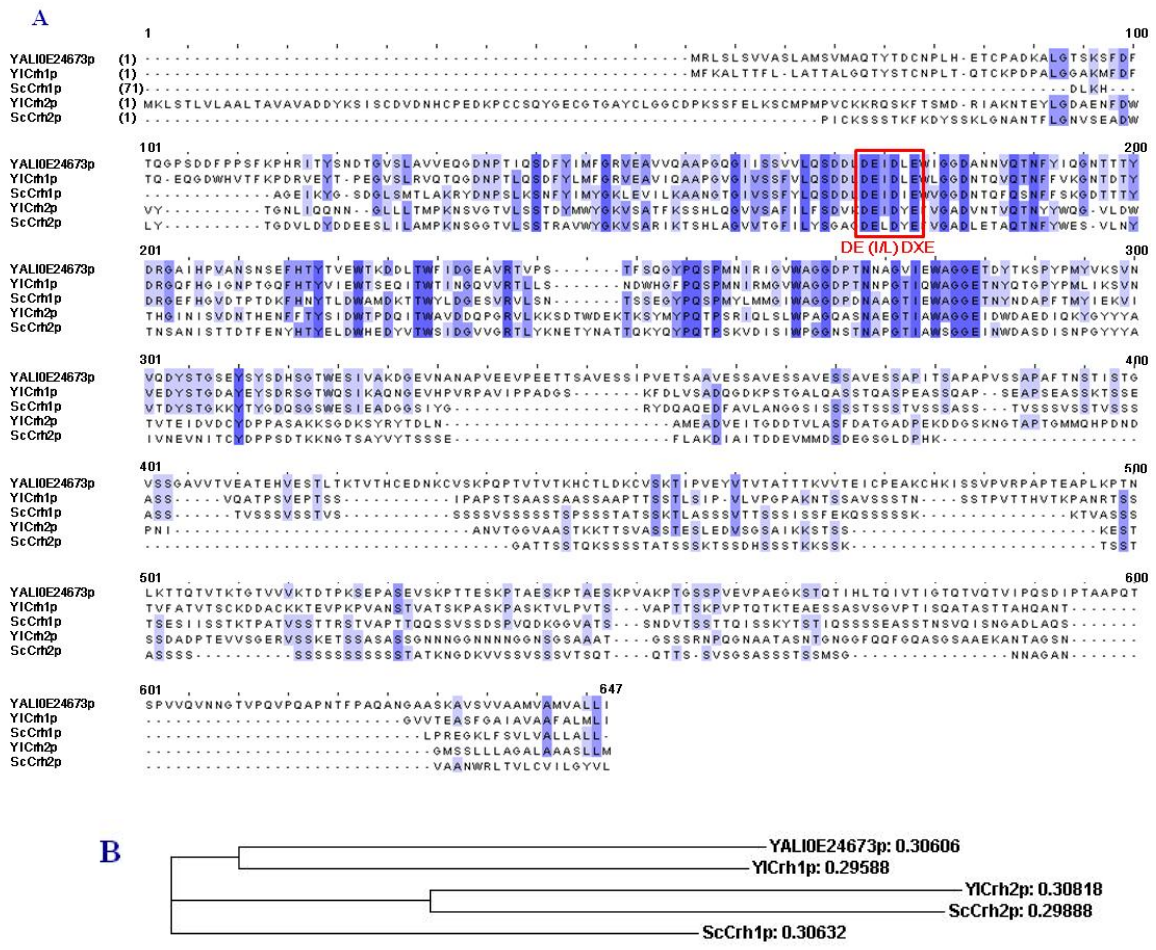


Figure 25. Alignement multiple de protéines de type Crh avec fonction de β-1,3-glycosidase. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de YlCrh1p, ScCrh1p, YlCrh2p, ScCrh2p et YALI0E24673p (Crh3p). Le cadre rouge montre le domaine catalytique des endo-β-1,3-1,4-glucanases (Hwang *et al*., 2006). Arbre phylogénique **(B)** issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Yl) *Yarrowia lipolytica* ; Sc) *Saccharomyces cerevisiae*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

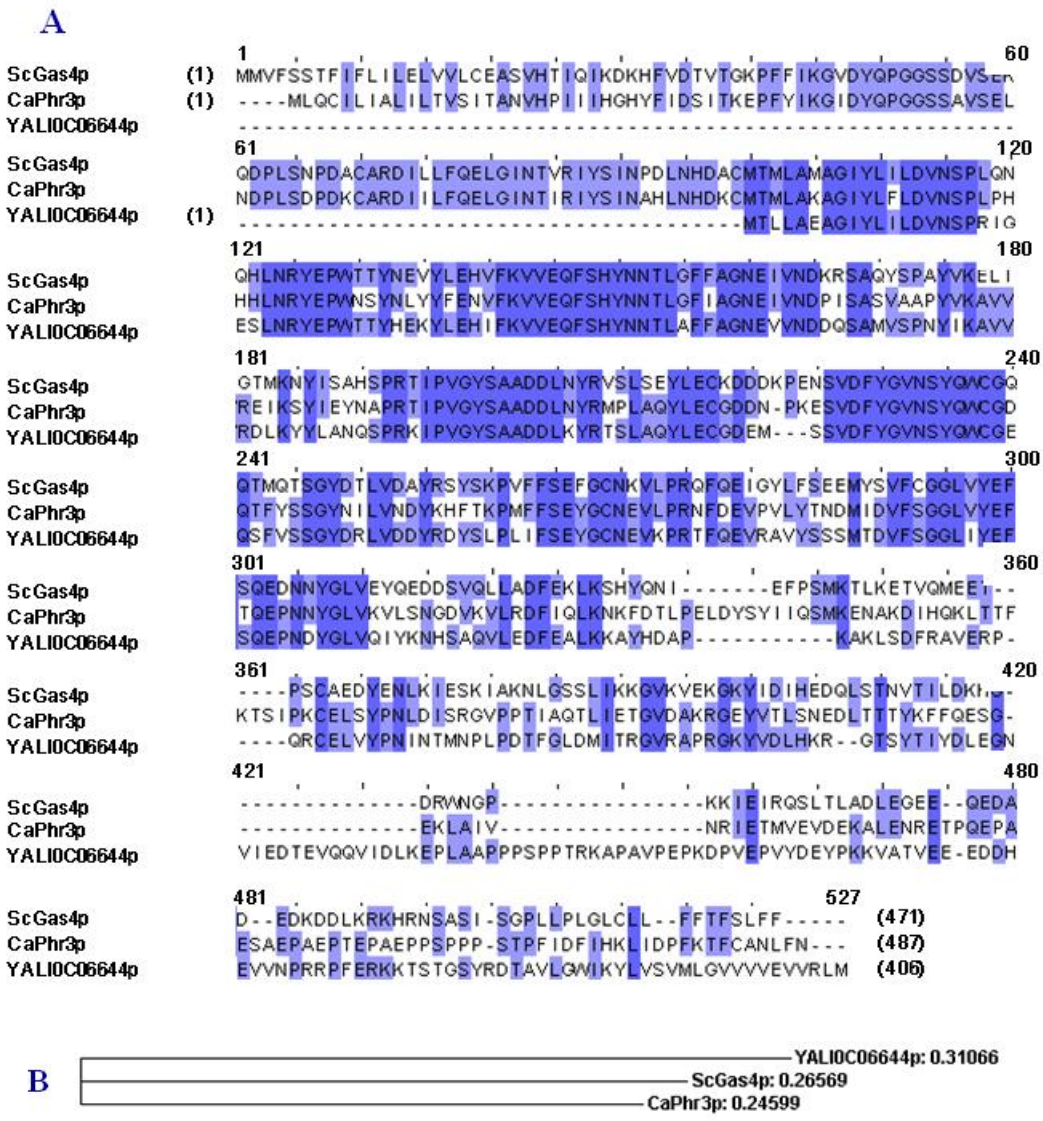


Figure 26. Alignement multiple de protéines de type Gas avec fonction de β-1,3-glucanosyltransférase. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScGas4p, CaPhr3p et YALI0C06644p (Gas1p). **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Ca) *Candida albicans*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

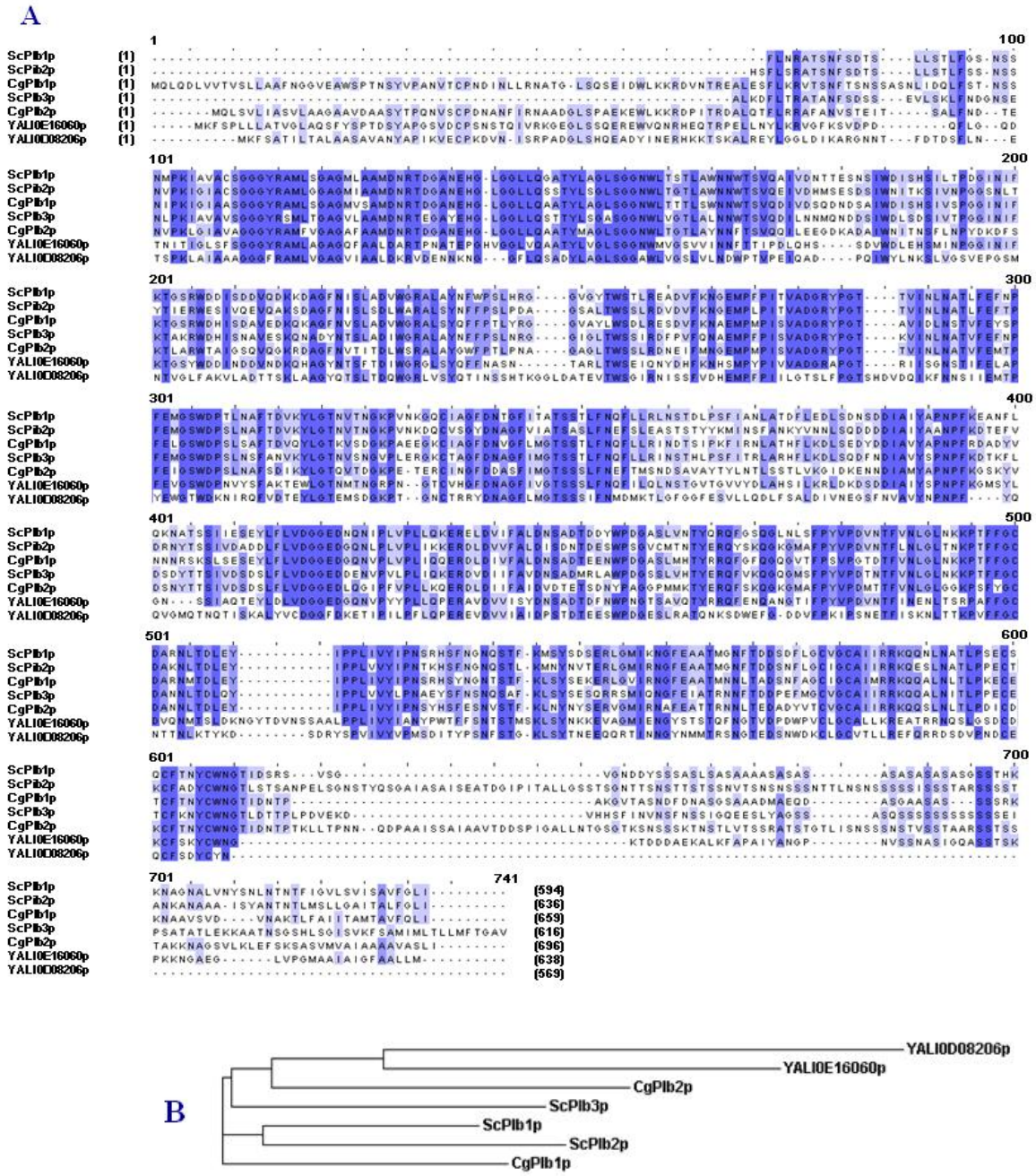


Figure 27. Alignement multiple de protéines de type Plb avec fonction de phospholipase B. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScPlb1p, ScPlb2p, CgPlb1p, ScPlb3p, CgPlb2p, YALI0E16060p (Plb1p) et YALI0D08206p (Plb3p). **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Cg) *Candida glabrata*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

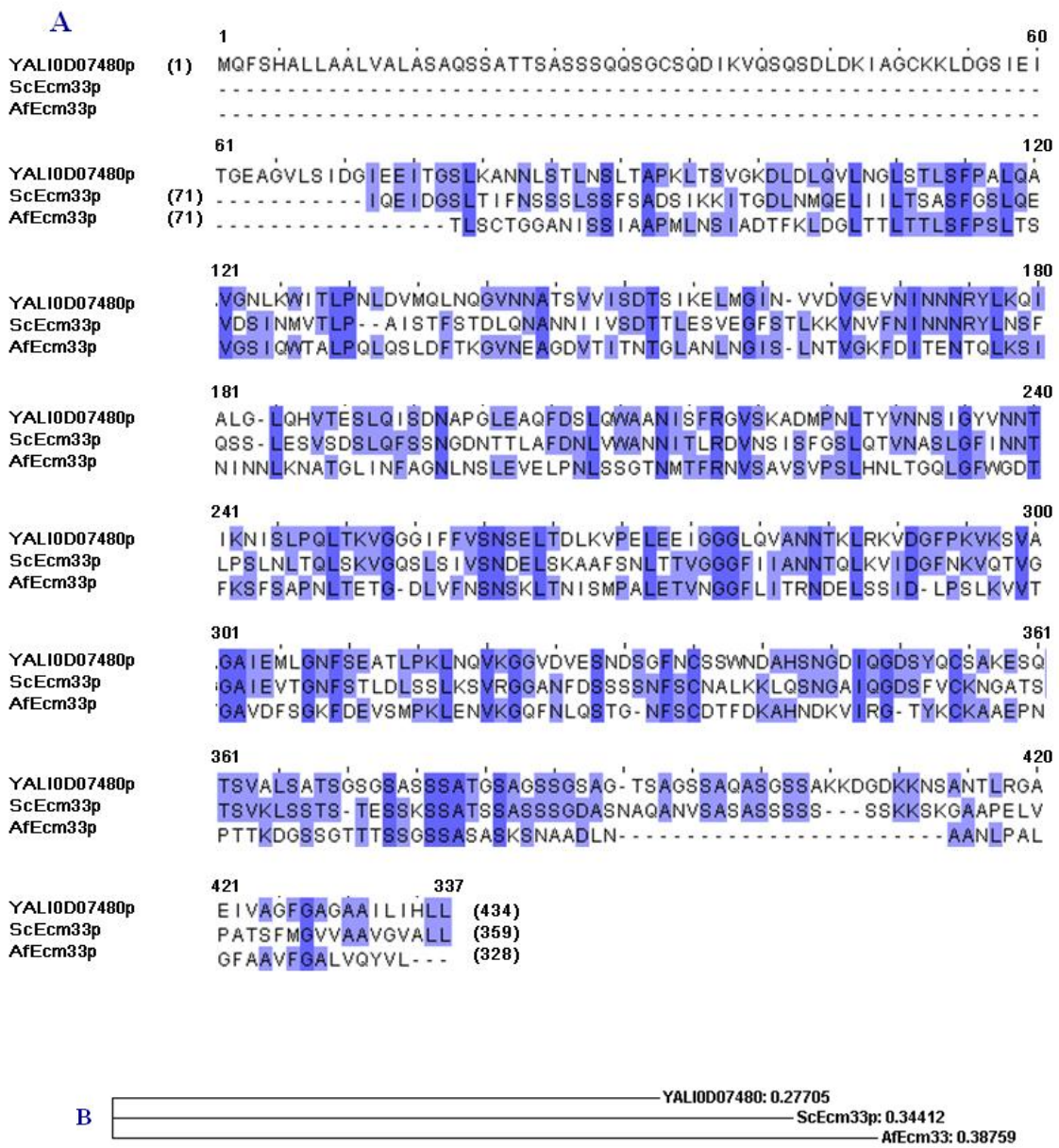


Figure 28. Alignement multiple de protéines de type Ecm33. (A) Alignement des séquences d'acides aminés de ScEcm33p, AfEcm33p et YALI0D07480p (Ecm33p). **(B)** Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). Sc) *Saccharomyces cerevisiae*, Af) *Aspergillus fumigatus*. Le pourcentage d'identité correspond à l'intensité de la couleur violette.

Tableau 10. Récapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica*.

No. Accès	Nom dans ce travail	Annotation chez Genolevures (Similaire à :)	Protéines de *S. cerevisiae ou de Y. lipolytica** utilisées pour le BLASTp	BLASTp (% identité)	E-value	Répétitions PIR (position)	Site ω pour GPI (position : aa)	Autre motif ou domaine (position)	Poids Mol. (KDa)	Facteurs de transcription putatifs	Niveaux Relatifs d'expression (%) YPO/YNBO
YALI0A09196	Cwp2	*Yl* Cwp1	Q8TFK5*	66	6e-11	**1** (21-39)	37 : S		5 ,8	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p, Upc2p	-1,9±0,2/5,6±2,6
YALI0F18282	Cwp3	*Sc* Cwp1	YKL096W	30	3e-16	**1** (190-208)	206 : S	**Flocculin_t3** (162-180)	23,3	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg3p	-1,2±0,2/3,2±0,3
YALI0D27214	Cwp4	*Yl* Cwp1	YLR390WA	33	9e-11	**1** (199-217)	232 : N		24,2	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg3p	1,0±0,2/7,1±2,0
YALI0D06633	Cwp5	Pas de similarité	Q8TFK5*	28	1e-11		317 : N		32,5	Adr1p, Mot3p, Rgt1p	-1,3±0,1/1,3±0,3
YALI0C02981	Cwp6/ Hsp150	*Sc* Hsp150	YJL159W	44	8e-37	**9** (16-34 ; 46-64 ; 76-94 ; 105-123 ; 134-152 ; 163-181 ; 192-210 ; 218-236 ; 243-261)	268 : N		28,2	Mot3p, Rgt1p	1,0±0,2/2,8±1,3
YALI0A17919	Cwp7/ Tos1	*Sc* Tos1	YBR162C	48	1e-125			**DUF2403 Riche en glycine** (44-108) **DUF2101 Glycosyl-hydrolase** (220-452)	49,1	Mot3p, Rtg1p, Rtg3p	2,4±0,6/1,3±1,0
YALI0E33891	Cwp8	*Dh* DEHA0A01298	Q8TFK5*	40	2e-11	**2** (19-37 ; 229-247)	257 : N		23,4	Adr1p, Mot3p, Rtg1p, Rtg3p, Upc2p	3,8±1,4/3,3±0,2

Dh : *Debaryomyces hansenii* ; ***Sc*** : *Saccharomyces cerevisiae* ; ***Sp*** : *Schizosaccharomyces pombe* ; ***Sp**** : *Streptococcus pneumoniae* ; ***Yl*** : *Yarrowia lipolytica* ; **aa)** acide aminé ; **KDa)** Kilodaltons ; **YPO)** milieu riche avec oléate de méthyle ; **YNBO)** milieu minimum avec oléate de méthyle ; **Genolevures)** www.genolevures.org

Tableau 10. Récapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 1)**.**

No. Accès	Nom dans ce travail	Annotation Genolevures (Similaire à :)	Protéines de *S. cerevisiae ou de Y. lipolytica** utilisées pour le BLASTp	BLASTp (% identité)	E-value	Répétitions PIR (position)	Site ω pour GPI (position : aa)	Autre motif ou domaine (position)	Poids Mol. (KDa)	Facteurs de transcription putatifs	Niveaux Relatifs d'expression (%) YPO/YNBO
YALI0E32967	Cwp9	*Sp** Cwp	Q8TFK5*	41	2e-4		286 : N		29,4	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	-1,9±0,2/-1,9±0,3
YALI0B20306	*Yl*Pir1	*Yl* Pir1 Jaafar *et al*, 2003	YJL158C	51	1e-44				29,4	Mot3p, Rgt1p	3,8±0,2/4,0±0,4
YALI0E20757	Ccw1	*Sc* Ccw14/Ssr1	YLR390W-A	54	1e-15		270 : N	**Flocculin_t3** (176-195)	27,9	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Pho4p	-1,0±0,2/-1,4±0,5
YALI0C22924	Muc1	*Sc* Muc1/Flo11/Sta1	YJL159W	22	2e-13		759 : N		73,2	Mot3p, Rtg1p, Rtg3p	2,1±0,7/1,0±0,2
YALI0E05819	Muc2	*Sc* Muc1/Flo11/Sta1	YGR189C	36	2e-18		1370 : N		129,5	Mot3p, Rtg1p, Rtg3p	-3,4±0,0/4,2±1,0
YALI0D09185	Aga1	*Sc* Aga1	YEL040W	27	5e-6				42,3	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	-1,2±0,0/3,0±1,3
YALI0B18194	Aga2	YALI0C11165	YKL163W	30	4e-11		655 : N		63,9	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	-1.0±0.2/-18,1±0,0
YALI0A11077	Scw1	*Sc* Scw11	YGR279C	25	2e-19			**Glycosyl hydrolase F17** (16-288)	32,6	Adr1p, Mot3p, Rgt1p	-1,5±0,2/-2,6±0,1
YALI0D20680	Scw2	*Sc* Scw4 (EC 3.2.1)	YGR279C	52	1e-110			**Glycosyl hydrolase F17** (352-365)	43,7	Mot3p, Rtg1p, Rtg3p	-1,4±0,3/-1,0±0,2

Dh : *Debaryomyces hansenii* ; ***Sc*** : *Saccharomyces cerevisiae* ; ***Sp*** : *Schizosaccharomyces pombe* ; ***Sp**** : *Streptococcus pneumoniae* ; ***Yl*** : *Yarrowia lipolytica* ; **aa)** acide aminé ; **KDa)** Kilodaltons ; **YPO)** milieu riche avec oléate de méthyle ; **YNBO)** milieu minimum avec oléate de méthyle ; **Genolevures)** www.genolevures.org

Tableau 10. Récapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 2)**.**

No. Accès	Nom dans ce travail	Annotation Genolevures (Similaire à :)	Protéines de *S. cerevisiae* ou de *Y. lipolytica** utilisées pour le BLASTp	BLASTp (% identité)	E-value	Répétitions PIR (position)	Site ω pour GPI (position : aa)	Autre motif ou domaine (position)	Poids Mol. (KDa)	Facteurs de transcription putatifs	Niveaux Relatifs d'expression (%) YPO/YNBO
YALI0B15510	*Yl*Crh2	*Yl* Crh2 Hwang *et al*, 2006	YGR189C	26	4e-34		494 : A	**Union chitin-I-1** (31-50) **Glycosyl hydrolase F16** (95-217)	54,4	Adr1p, Mot3p, Rgt1p	-1,0±0,1/1,1±0,1
YALI0E24673	Crh3	*Sc* Crh1 (EC 3.2.1.)	YGR189C	46	7e-94		563 : N	**Glycosyl hydrolase F16** (51-218)	61,3	Adr1p, Ecm22p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p, Upc2p	1,2±0,4/-1,7±0,1
YALI0C06644	Gas1	*Ca* Phr3 (EC 3.2.1)	YMR307W	44	2e-56			**Glycosyl hydrolase F2** (1-231)	46,2	Adr1p, Mot3p, Rgt1p	2,5±0,3/1,2±0,7
YALI0E34507	Lipase	*Yl* TAG lipase (EC 3.1.1.3)	Q8TFK5*	43	5e-56			**Lipase serine active site** (229-238)	45,5	Mot3p, Rtg1p, Rtg3p	-2,2±0,0/-1,5±0,1
YALI0E16060	Plb1	*Sc* Plb1 (EC 3.1.1.5)	YMR006C	44	1e-159		617 : N	**Domain PLA2c** (30-579)	69,4	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	-1,5±0,1/1,1±0,2
YALI0D08206	Plb3	*Sc* Plb3 (EC 3.1.1.5)	YMR006C	35	1e-109			**Domain PLA2c** (25-569)	62,7	Adr1p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p, Upc2p	-1,9±0,0/-1,2±0,2
YALI0D07480	Ecm33	*Sc* Ecm33p	YBR078W	41	4e-57		410 : S	**Domain protéine kinase** (86-421)	44,4	Adr1p, Mot3p, Rgt1p	-1,2±0,1/-1,0±0,3

Dh : *Debaryomyces hansenii* ; ***Sc*** : *Saccharomyces cerevisiae* ; ***Sp*** : *Schizosaccharomyces pombe* ; ***Sp**** : *Streptococcus pneumoniae* ; ***Yl*** : *Yarrowia lipolytica* ; **aa)** acide aminé ; **KDa)** Kilodaltons ; **YPO)** milieu riche avec oléate de méthyle ; **YNBO)** milieu minimum avec oléate de méthyle ; **Genolevures)** www.genolevures.org

Tableau 10. Récapitulatif des analyses *in silico* et de transcription des CWP putatives de *Yarrowia lipolytica* (Continuation 3)**.**

No. Accès	Nom dans ce travail	Annotation Genolevures (Similaire à :)	Protéines de *S. cerevisiae ou de Y. lipolytica** utilisées pour le BLASTp	BLASTp (% identité)	E-value	Répétitions PIR (position)	Site ω pour GPI (position : aa)	Autre motif ou domaine (position)	Poids Mol. (KDa)	Facteurs de transcription putatifs	Niveaux Relatifs d'expression (%) YPO/YNBO
YALI0E11077	Yak1	*Sp* Ser/Thr-protéine kinase	YJL141C	31	1e-39			**Domain WSC** (15-101)	49,4	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	-1,5±0,2/1,5±0,1
YALI0F04213	YlTsr1	*Yl* Tsr1 Mamoun *et al*, 1996	YMR305C	31	2e-10				47,0	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p	1,9±0,3/1,7±0,3
YALI0B18568		YALI0E18766p	YLR390W-A	37	3e-16		852 : N		60,5	Adr1p, Mot3p, Rgt1p, Rtg1p, Rtg3p, Upc2p	1,2±0,3/1,2±0,4
YALI0F21450		Pas de similarité	YJL078C	27	1e-53				45,7	Adr1p, Ecm22p, Mot3p, Rgt1p, Upc2p	2,1±0,5/2,4±0,4

Dh : *Debaryomyces hansenii* ; ***Sc*** : *Saccharomyces cerevisiae* ; ***Sp*** : *Schizosaccharomyces pombe* ; ***Sp**** : *Streptococcus pneumoniae* ; ***Yl*** : *Yarrowia lipolytica* ; **aa)** acide aminé ; **KDa)** Kilodaltons ; **YPO)** milieu riche avec oléate de méthyle ; **YNBO)** milieu minimum avec oléate de méthyle ; **Genolevures)** www.genolevures.org

RÉSULTATS

CHAPITRE II

5. RÉSULTATS

CHAPITRE II

Biosynthèse de mélanine lors de la production de lactone par *Yarrowia lipolytica*, lien avec le métabolisme des lipides

Après avoir étudié la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* dans des conditions modèles de culture, nous étions aussi intéressés à l'étudier pendant un procédé de bioconversion de substrats hydrophobes. Dans ce but nous avons analysé les modifications pariétales de la levure dans des conditions de culture utilisées pour la bioconversion d'huile de ricin en γ-décalactone. Pour cette étude nous avons utilisé deux souches mutantes de *Y. lipolytica* affectées dans la β-oxydation. Ces souches ont été mutées dans les gènes *POX* afin d'éviter la consommation de la lactone déjà produite par les acyl-CoA oxydases. Au cours de ces analyses nous avons observé qu'une des souches mutantes produisait un pigment marron pendant la biosynthèse de γ-décalactone. Pensant que ce pigment pourrait avoir un impact sur la production et/ou la purification de la γ-décalactone, nous étions intéressés à déterminer sa nature et son origine afin de pouvoir contrôler sa biosynthèse. Ce travail met en évidence pour la première fois la production de DHN-mélanine par *Y. lipolytica* ayant poussé en présence de différents substrats hydrophobes et montre l'effet de ces substrats sur la composition de la paroi cellulaire. Les résultats de cette partie du travail sont présentés dans la Publication 2.

Pour approfondir sur la biosynthèse de DHN-mélanine par *Y. lipolytica* nous avons fait une analyse *in silico* pour identifier les gènes putatifs de la voie DHN-mélanine de *Y. lipolytica*, ce qui comprend les résultats complémentaires III.

Publication 2:

Coupled phase distribution of γ-decalactone and melanin, produced by lactone-degrading or non-degrading *Yarrowia lipolytica* strains.

Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., Diop, D., Cao-Hoang, L. and Waché, Y*.

UMRA PAM, AgroSup Dijon & Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. e-mail : * ywache@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

Several yeast species are able to produce the aroma compound γ-decalactone from the ricinoleyl moiety of castor oil. However, the lactone accumulation depends greatly on strains but also on medium conditions. Understanding physiological and physicochemical events taking place during production is thus of great interest to improve biotransformation processes. In the present study, we have investigated the distribution of the produced γ-decalactone between the lipid and aqueous phase of the culture medium for two *Yarrowia lipolytica pox*-mutants. MTLY36-2p strain is able to degrade the lactone while MTLY40-2p is a non-lactone-degrading strain. We observed that for MTLY40-2p a 40% of the concentration of lactone was present in the aqueous phase compared to the lipid phase. However, for MTLY36-2p strain which is able to degrade lactone, the concentration in the aqueous phase was very low while in the lipid phase it was twice higher than for the other strain, showing that a 10% lipid phase was able to protect lactone from further degradation. These results obtained with the lactone-degrading strain suggest that the lactone transfer from one phase to the other is a slow phenomenon and that the concentration in each phase depends probably on the localisation of yeast cells. Therefore, cells localized in the aqueous phase degrade lactone while those localized in the lipid phase have still a long chain fatty acids metabolism. Interestingly, the presence of a brown pigment during the production of lactone by the strain MTLY40-2p was observed. This brown pigment was produced in oily media containing peptone and its production could be stopped by the addition of a DHN-melanin inhibitor. Analysis by fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy showed a different spectrum of the lipid phase between the mutant MTLY40-2p and the wild type W29 strains. Some differences were also observed at their cell surface level.

INTRODUCTION

After a first interest for natural products in the 1990s which was mainly localised in Europe, the whole world of food and cosmetic experiences presently a huge movement in favour of nature. Many firms are replacing all synthetic compounds from their catalogues by natural ones. Despite minor differences between regulations depending on the country or on the application, natural compounds may be generally defined as compounds that are obtained from plant, animal or microbial materials by physical, enzymatic or microbial means. This includes an important field of biotechnology which consists in the extraction of precursors of plant origin followed by the enzymatic or microbial transformation to reach the compound of interest. In the field of aroma compounds, the most produced substance obtained through this biotechnological process is γ-decalactone (Gatfield, 1999). This compound possesses fruity and fatty sensorial properties. It is naturally present in many fruits and fermented food and it is used for the formulation of the aroma of peach, apricot, strawberry and many others. The metabolic pathway used to produce this compound is β-oxidation. The precursor, a C18-hydroxylated fatty acid abundant in castor oil is degraded through the traditional fatty acid degradation pathway until the hydroxyl group interacts with the carboxylic counterpart, forming a C10-lactone (Romero-Guido *et al*., 2011). The oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* is to date the biocatalyst reported for giving the highest yields. However, it is also able to degrade the lactone through a pathway including short-chain β-oxidation (Waché *et al*., 2001). This degradation occurs when the C18-fatty acids have been transformed to medium-chain length compounds in the medium. By engineering this yeast, it was possible to stop short-chain β-oxidation while maintaining the long chain pathway. The resulting strains were no longer able to degrade γ-decalactone (Groguenin *et al*., 2004). Contrasting with this species, many types of yeast are not able to degrade γ-decalactone (Endrizzi *et al*., 1996). Conditions of production involve a heterogeneous medium as the lactone precursor is not soluble in water and forms thus another phase usually emulsified. Beside the important oxygen transfer in medium, the transfer of the lactone from cells to the fatty acid phase is also important. There have been some attempts to withdraw lactone from cell degradation by extracting it in a hydrophobic phase or by adsorbing it on some apolar materials (Romero-Guido *et al*., 2011). These processes have often resulted in interesting (although difficult to industrialize) solutions but the question of the repartition of lactone in the biotransformation emulsion has not been addressed despite its high importance for the understanding and engineering of biotechnological processes in multiphase media.

Due to the genetic modifications of lactone producing strains it is possible that the production of the compound of interest be accompanied of by-products in function of the culture medium composition, stress response to the growth conditions, and the own metabolism properties of the strain. In yeast, melanin is biosynthesized to protect cells of environment stress factors and as a virulence factor. In *Yarrowia lipolytica*, the biosynthesis of melanin was observed during the ripening process of cheese (Carreira *et al*., 1998) and in *Torula corollina* during the production of erythritol (Lee *at el*., 2003), being in both cases an undesirable by-product. Melanins are macromolecules of high molecular weight formed by oxidative polymerization of phenolic compounds. The resulting pigments are hydrophobic, negatively charged, resistant to degradation by concentrated acids, and can vary in color from brown to black but many other colors have also been observed (Langfelder *et al*., 2003). Depending on the precursors, three kinds of melanin are known in fungi: the DOPA-melanin and the pyomelanin which precursor is L-tyrosine; and the dihydroxynaphtalene (DHN)-melanin which is synthesized from acetyl-CoA and malonyl-CoA. Previous reports demonstrated that *Y. lipolytica* produces brown pigments as a result of L-tyrosine degradation leading to the extracellular accumulation of homogentisic acid (HGA) which is autooxidized and polymerized leading to the formation of pyomelanins (Carreira *et al*., 2001a; 2001b).

The objective of the present work was to study the phase repartition of lactone produced by yeast cells able or unable to degrade it. In that goal, two *Yarrowia lipolytica* engineered strains MTLY36-2p and MTLY40-2p were selected in conditions of production of several hundred of mg of lactone per ml. The concentration of lactone was then monitored in the lipid and aqueous phases of the medium. At the same time, the nature of a brown pigment and its production during the biosynthesis of lactone by the strain MTLY40-2p were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions

Strains used in this study are presented in **Table II.11**. Yeast strains were cultured for 48 h on YPDA medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) at 27°C and used to prepare precultures in 250-ml baffled Erlenmeyer flasks containing 100 ml of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) to an Abs_{600} of 0.25 (6 x 10^6 cells/ml). Flasks were incubated on a rotary shaking (140 r.p.m.) at 27°C until reaching the mid-logarithmic growth phase. Cells were harvested by centrifugation at 6,000 x g during 5 min at 19°C, washed twice with physiologic water (9 g/l NaCl) and inoculated in 250-ml baffled

Erlenmeyer flasks containing 100 ml of oily culture medium to an OD_{600} of 0.25. Five different oily culture media were used: peptone-castor oil (PCO), YNB-castor oil (YCO), peptone-methyl ricinoleate (PMR), peptone-methyl oleate (PMO), and peptone-olive oil (POL). They all contained 2 % peptone, 4-5 drops of Tween 80, and 10 % (w/v) of oily substrate. In YCO medium peptone was replaced by 0.67 % yeast nitrogen base (YNB). Cultures were incubated at 27°C and 140 r.p.m. during 4 to 8 days. Routinely, yeast-cell pellets were washed with physiologic water (9 g/l NaCl) to eliminate the oil and culture medium traces.

Table II.11. Description of strains used in this study.

Strain	Origin and/or properties	Reference
Y. lipolytica W29	MatA, wild type	Barth and Gaillardin, 1996
Derived from Po1d:		
Y. lipolytica MTLY40-2p	Δ*pox2* Δ*pox3* Δ*pox4* Δ*pox5-POX2* No lactone degradation	Groguenin *et al*., 2004
Y. lipolytica MTLY36-2p	Δ*pox2* Δ*pox3* Δ*pox5-POX2* Able to degrade lactone	Groguenin *et al*., 2004

Decalactone analysis

Samples (50 ml) were harvested and centrifuged (6,000 x g during 5 min at 19°C). The emulsion before centrifugation, the lipid, and the aqueous phase (1 ml each) were extracted separately with an equivalent volume of diethyl ether as reported previously (Waché *et al*, 2002) after the addition of HCl and undecalactone as the standard. The ether phase was then analysed in gas chromatography (GC) as described previously (Waché *et al*, 2000).

Treatment with melanin synthesis inhibitors

Kojic acid and Pyroquilon (both from Sigma-Aldrich) were diluted in ethanol. The MTLY40-2p strain was cultured in 100 ml of PCO medium containing 100 µg/ml Kojic acid or Pyroquilon during 96 h. 50-ml samples were harvested and centrifuged (6,000 r.p.m., 5 min at 19°C). Pigment production was observed or evaluated by measuring the Abs_{400} of the lipid phase.

Infrared spectroscopy

Attenuated Total Reflection Fourier Transform infrared (ATR-FTIR) spectra of samples were monitored between 4000 cm^{-1} and 900 cm^{-1} using a Vector 22 (Bruker) FTIR spectrometer. A spectrum was obtained by collecting 128 scans at a resolution of 4 cm^{-1}. Samples were homogenously spread to cover the ATR crystal surface. In the case of pure oils or pigmented-lipid-phases, a volume of 10 µl was analyzed. Yeast cells cultured in oily media during 96 h were harvested by centrifugation, washed and resuspended in physiologic water at an Abs_{600} of 1.3±0.1. 15 µl samples of cell suspension were spread on the ATR crystal and dried at 40°C during 15 to 20 min before collecting the spectra.

RESULTS

Production and distribution of γ-decalactone in the phases of the culture medium

To quantify the production of γ-decalactone by the mutant MTLY36-2p and MTLY40-2p strains in PCO medium we have performed gas chromatography analyses of the different culture extracted phases. The results showed that strains used in this study produced amounts of lactone in the same range (**Table II.12**). Nevertheless when investigating the lactone repartition between the lipid and aqueous phases, important differences were observed between the strains. For the MTLY40-2P strain, the concentration in the aqueous phase was 40% of the concentration in the lipid phase. In contrast, this ratio was very low at about 3% for the MTLY36-2P strain; in this case a very high concentration was detected in the lipid phase and almost no lactone in the aqueous phase.

Table II.12. Concentration in g/l of γ-decalactone present in the different phases of the medium after seven days of culture.

Strains	**MTLY40-2P**	**MTLY36-2P**
Lipid phase	1.00±0.30	2.03±0.30
Aqueous phase	0.40±0.01	0.06±0.01
Total medium	0.57±0.09	0.29±0.09

To explain the very original results obtained with MTLY36-2P strain, we focused on the kinetics of lactone production by both *Y. lipolytica* strains (**Figure 11.29**). Interestingly, the profiles of lactone production were rather different. The MTLY40-2P strain produced slowly an amount of lactone reaching about 500 mg.l^{-1} after one week. In contrast the MTLY36-2P strain produced rapidly in 3 days 700 mg.l^{-1} of lactone but degraded it to a value lower than 200 mg.l^{-1}.

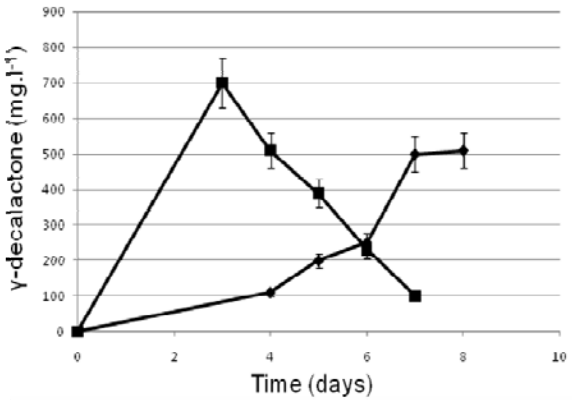


Figure II.29. γ-Decalactone accumulation in the culture medium during the culture of *Yarrowia lipolytica* MTLY36-2P (squares) and MTLY40-2P (lozenges) strains.

Production of brown pigment under different culture medium composition

During the process of lactone production we observed that when culturing the MTLY40-2p strain, a brown pigment was present at the upper surface of the medium from 96 h of culture. After centrifugation (6000 x g, 5 min at 19°C) the brown pigment was localized in the upper lipid phase (**Figure II.30A**) and it persisted in the ether phase after the decalactone extraction process. To explore if the brown pigment could be also produced from another oily carbon sources and the influence of the culture medium composition for its production, we have compared PCO medium with another four culture media in which the carbon source was castor oil, olive oil, methyl ricinoleate or methyl oleate; and the nitrogen source was peptone or yeast nitrogen base (YNB). The strains W29 and MTLY40-2p were cultured in the five media during 3 to 5 days. In PCO, the MTLY40-2p strain produced the brown pigment at the fourth day of culture (as previously observed) but not the W29 strain (**Figure II.30A**). While in YCO neither the wild type nor the mutant strains produced any color suggesting that peptone could be important for the pigment production by the MTLY40-2p strain. In figure 2A it is only shown the YCO lipid phase of the mutant strain. The pigment was observed since the third day in PMO and PMR media at the upper surface of the cultures and in the

lipid phase after centrifugation. In PMO medium, the MTLY40-2p strain produced a brown pigment, while the W29 strain produced a light-yellow pigment that was only observed at the lipid phase after centrifugation (**Figure II.30B**). In PMR medium both the wild type and the mutant strains produced a brown pigment but it was darker for MTLY40-2p than for W29 (**Figure II.30C**). In POL medium, pigment was not produced by any strain (data not shown). These results indicated that castor oil, methyl ricinoleate and methyl oleate in combination with peptone are propitious substrates for the pigment production but in a strain dependent manner. The absorbance of the lipid phases produced by the mutant strain was measured after five days of cultivation (**Figure II.31**). The colored lipid phases absorbed in a wavelength between 400-450 nm with a peak about 400 nm, showing that the higher concentration of brown pigment was produced in the PCO medium followed by PMR and PMO media. The wavelength absorbance of the colored lipid phases suggested the presence of melanin.

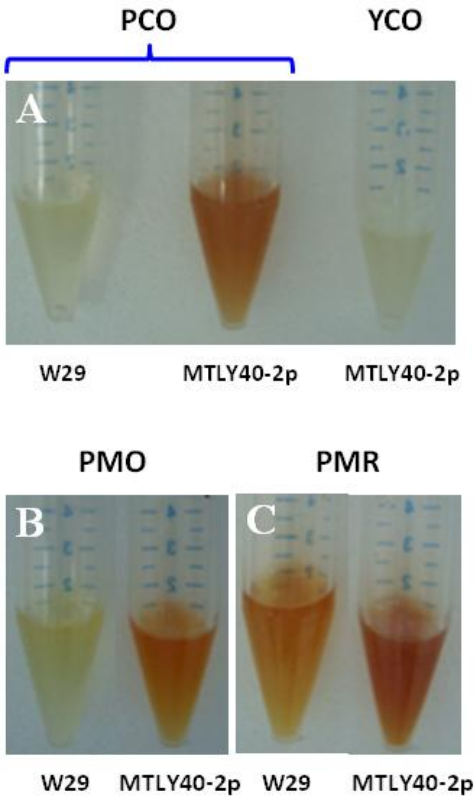


Figure II.30. Production of pigment by *Yarrowia lipolytica* in different oily culture media. W29 and MTLY40-2p strains were cultivated in the presence of peptone or YNB as nitrogen source and lipid as carbon source during 3-4 days. Pictures show the upper lipid phases recuperated after centrifugation. **A)** Peptone/Castor Oil (PCO) and YNB/Castor Oil (YCO); **B)** Peptone/Methyl Oleate (PMO); **C)** Peptone/Methyl Ricinoleate (PMR).

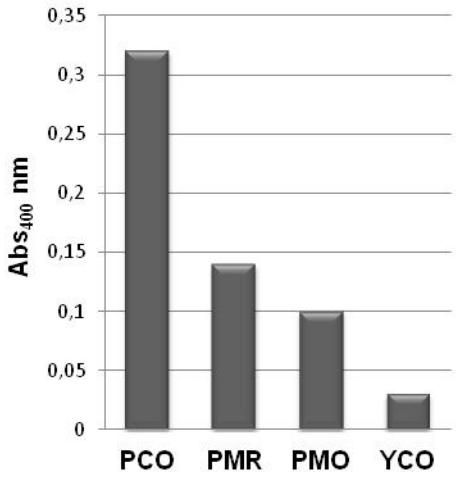


Figure II.31. Absorbance of the lipid phases produced by the MTLY40-2p strain in different oily media after five days of culture. **PCO)** Peptone-castor oil; **PMR)** Peptone-methyl ricinoleate; **PMO)** Peptone-methyl oleate; **YCO)** YNB-castor oil. Absorbance was measured by the Abs_{400}nm.

Effect of melanin biosynthesis inhibitors on the production of brown pigment

To determine if the brown pigment produced by the MTLY40-2p was melanin and which biosynthetic pathway could be implicated, we decided to test the effect of two melanin inhibitors: Kojic acid and Pyroquilon. Kojic acid inhibits tyrosinase in the DOPA-melanin pathway (Cabanes *et al*, 1994) and Pyroquilon inhibit hydroxynaphtalene reductase in the DHN-melanin pathway (Pihet *et al*., 2009). The mutant strain was cultured in PCO medium containing Kojic acid or Pyroquilon. After four days of culture it was observed that the lipid phase of the culture containing Kojic acid was brown. In contrast the lipid phase of the culture containing Pyroquilon was not pigmented. This result suggested that the brown pigment produced by the MTLY40-2p strain in the peptone/castor oil containing medium is a melanin derived from the DHN-melanin pathway.

FTIR spectroscopic analysis of the lipid phases

In order to discriminate the lipid modifications that could be responsible of the brown and yellow pigments, the lipid phases produced by W29 and MTLY40-2p strains in PCO, YCO, PMO and PMR media were analyzed by FTIR spectroscopy. In **Figure II.32A** is shown the spectra of W29 and MTLY40-2p lipid phases in PCO medium and MTLY40-2p lipid phase in YCO medium in the 4000 to 900 cm^{-1} range. The W29/PCO and MTLY40-2p/YCO spectra were very similar to that of castor oil and almost superimposed. In contrast, the MTLY40-2p/PCO lipid phase exhibited an interesting profile that conserved the same bands of =C-H

and -C-H stretching groups in the region between 3010 to 2800 cm^{-1} range and the band of -C-H bending group at 1465 cm^{-1}. Instead the band of -C=O stretching group was downshifted and a very different profile was observed from 1465 to 900 cm^{-1} range (**Figure II.32B**). This result suggests the presence of a compound different than castor oil that could be responsible of the brown pigment in the MTLY40-2p/PCO lipid phase. When analysing the lipid phases in PMO and PMR it was observed a spectrum profile similar to that of MTLY4O-2p/PCO and very similar between the two strains (**Figures II.32C** and **II.32D**). The region between 3010 to 2800 cm^{-1} range of the lipid phases of W29 and MTLY40-2p in PMO and PMR were superimposed to those of methyl oleate and methyl ricinoleate respectively. So we focused on the 2000 to 900 cm^{-1} range as many differences were observed between the lipid phases comparing with the respective pure oils. Still when the lipid phases of the wild type and the mutant strains presented similar spectra in PMO and in PMR media, the lipid phase of MTLY40-2p showed higher infrared absorption intensities coincident with the higher concentration of the brown pigment, and some specific shifts were observed (marked with asterisks in **Figures II.32C** and **II.32D**).

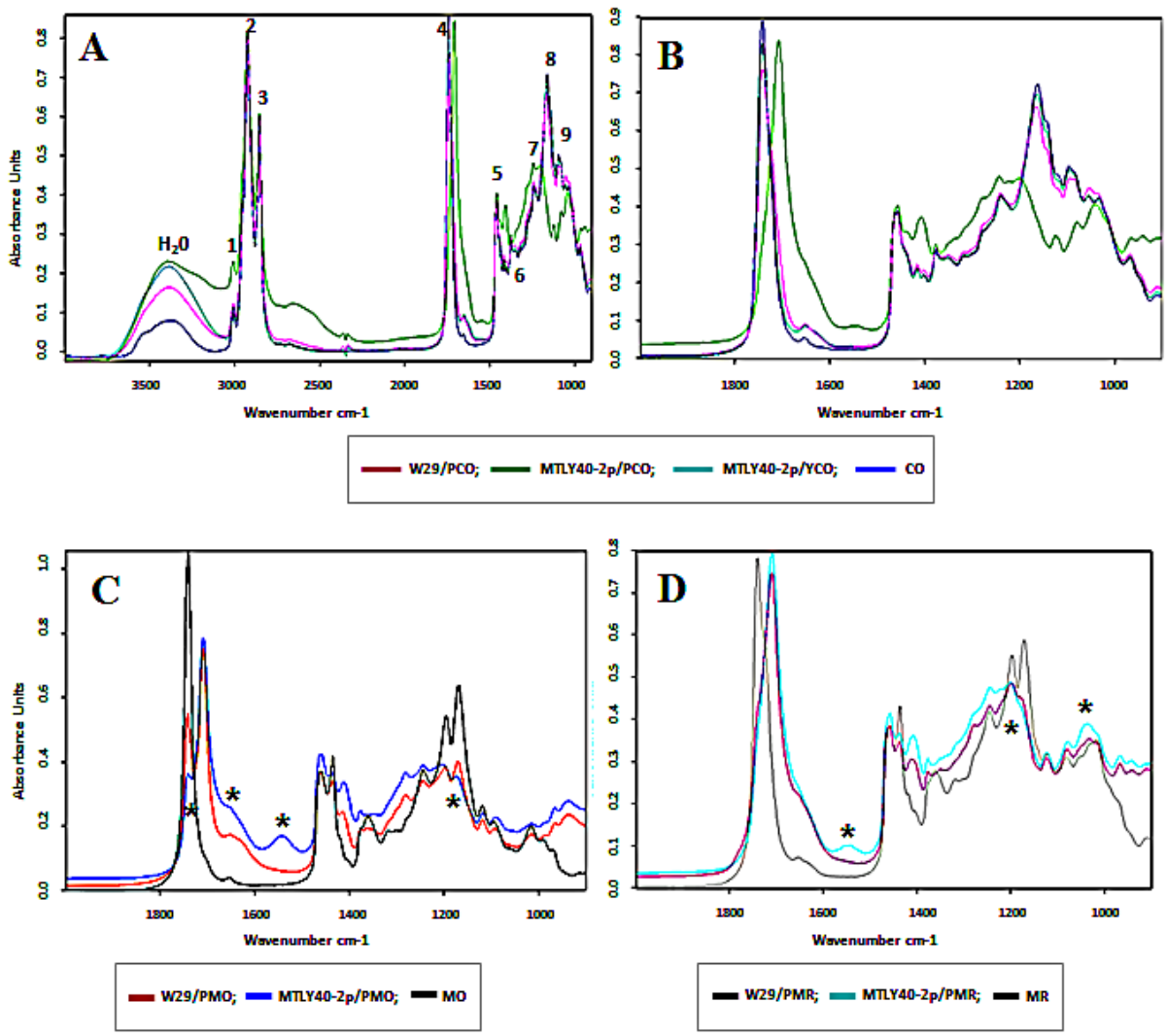


Figure II.32. FTIR spectra of the lipid phases of W29 and MTLY40-2p strains cultivated in oily media. **A** and **B)** Lipid phases in PCO (peptone/castor oil) and YCO (YNB/castor oil) in the 4000 to 900 cm^{-1} range (A) and in the 2000 to 900 cm^{-1} range (B). **C)** Lipid phases in PMO (peptone/methyl oleate) in the 2000 to 900 cm^{-1} range. **D)** Lipid phases in PMR (peptone/methyl ricinoleate) in the 2000 to 900 cm^{-1} range. Numbers indicate the functional groups of castor oil: **1)** =C–H (cis-); **2)** –C–H (CH_2); **3)** –C–H (CH_2); **4)** –C=O (ester); **5)** –C–H (CH_2, CH_3); **6)** –C–H (CH_3); **7)** –C–O, –C H $_2$–; **8)** –C–O, –C H $_2$–; **9)** –C–O ; **10)** –$(CH_2)_n$–, –HC=CH–(cis-). Asterisks (*) indicate bands that are specifically present, diminished or absent in the MTLY40-2p lipid-phase.

Due to the association of melanin to the cell wall, we were interested in determining if modifications could also be observed at the cell surface of yeast cells cultivated in the oily media. FTIR spectroscopy analysis showed that the cell surfaces of the MTLY40-2p strain cultured in PCO and YCO media, and of the W29 strain cultured in YCO conserved the bands of the =C-H stretching group at 3006 cm^{-1} and the two -C-H stretching groups at 2924 and 2853 cm^{-1} range and the band of -C-H bending group at 1465 cm^{-1} all of them from the castor oil. These bands were absent (the =C-H stretching group at 3006 cm-1) or diminished (the two -C-H stretching groups at 2924 and 2853 cm^{-1} range) in the cell surface of W29 cells cultured in PCO medium (**Figure II.33A**). In the 2000 to 900 cm^{-1} range, where the main cell wall component bands can be detected, we observed similar patterns with some differences in the concentration of the components between the two strains in the four media. The –C=O ester band of the castor oil was conserved in the cell wall of the W29 strain cells grown in PCO and YCO and in the cell wall of MTLY40-2p cells grown in YCO but in PCO this band was downshifted and a new band appeared at 1620 cm^{-1} range (both bands are indicated with asterisks in **Figure II.33B**). While in PCO and YCO media the two strains presented some differences in the proteins, nucleic acids and polysaccharides concentration levels, being the W29 cells whose presented the higher level of all of the components (**Figure II.33B**). In PMO medium, W29 and MTLY40-2p strains conserved the –C=O ester band of methyl oleate and very similar patterns for the cell wall components but with lower concentrations for all of them in the mutant strain (**Figure II.33C**). While in PMR, the cell wall of the W29 and MTL40-2p strains showed very similar patterns and concentrations of the surface components. None of the strains presented the –C=O ester band of methyl ricinoleate at the surface. But instead of the –C=O ester band, the cell wall of the MTLY40-2p strain presented a downshifted band and a new band in the range around 1620 cm^{-1}, very similar than in PCO medium (**Figure II.33D**).

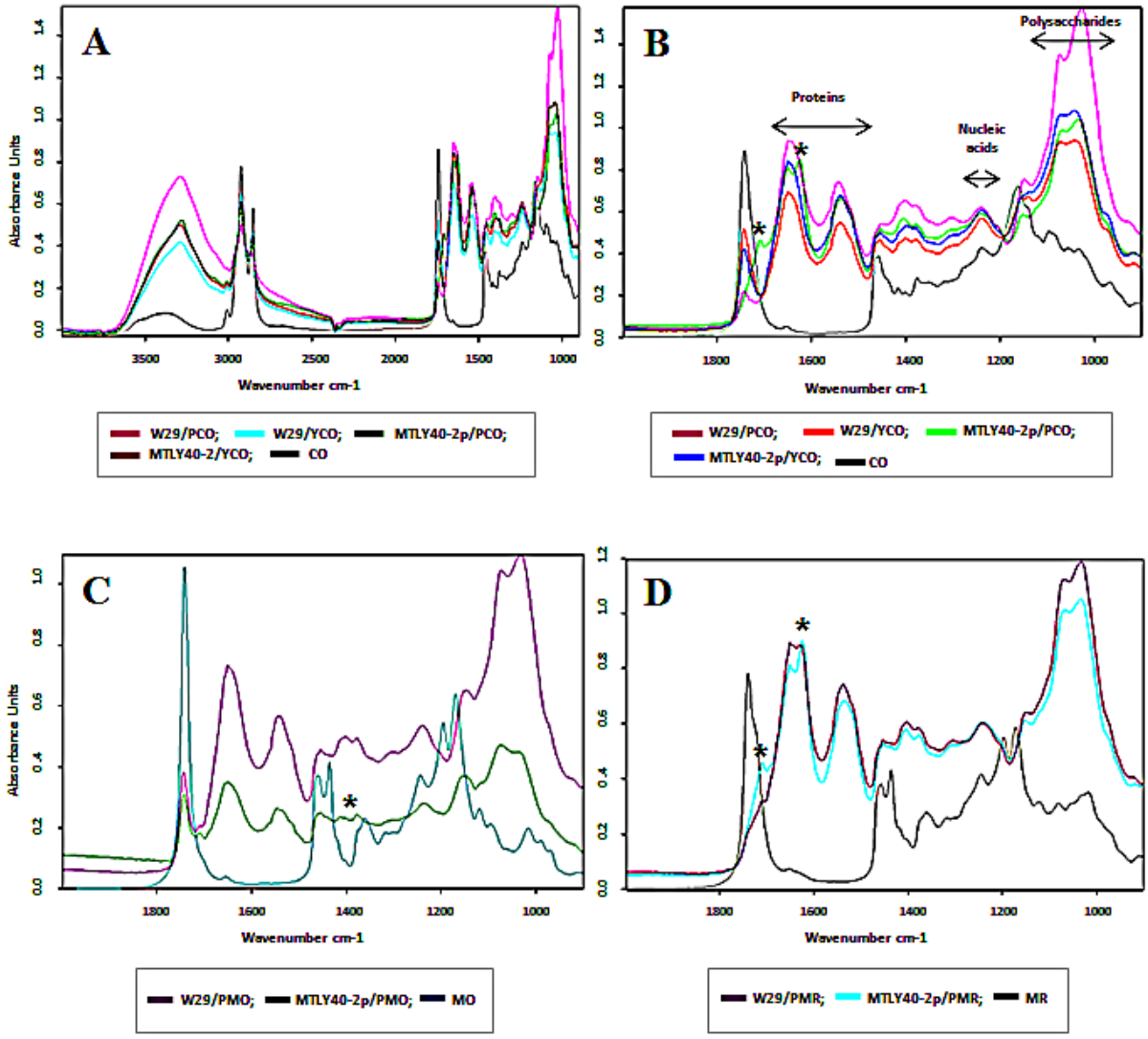


Figure II.33. FTIR spectra of the W29 and MTLY40-2p yeast cells cultivated in oily media. **A** and **B)** Spectra of cells grown in PCO (peptone/castor oil) and YCO (YNB/castor oil). **C)** Cells grown in PMO (peptone/methyl oleate). **D)** Cells grown in PMR (peptone/methyl ricinoleate). **A)** Spectra in the 4000 to 900 cm^{-1} range. **B**, **C** and **D)** Spectrum in the 2000 to 900 cm^{-1} range. For each strain 128 scans were collected at a resolution of 4 cm^{-1}. Asterisks (*) indicate bands that are specifically present or diminished in the MTLY40-2p yeast cells.

DISCUSSION

In an attempt to improve the separation methods of lactone, in the present work we have observed an interesting phase distribution of γ-decalactone produced by two β-oxidation engineered strains. The results of the kinetics of lactone production can explain both the very high concentration observed in the castor oil phase and the very low concentration in the aqueous phase. Indeed, as the concentration in the beginning of the biotransformation is higher than for other strains, it can be concluded that the concentration in all the phases but particularly in the lipid phase was very high. After that, as the MTLY36-2p cells degrade the lactone, the aroma compound dispersed in the aqueous phase is the less protected and is thus degraded very quickly. In contrast, the lactone dispersed in the oil phase is accessible to cells that can still find C18 fatty acids in their environment and thus do not degrade the C10 lactone. The degradation occurs thus very slowly leading to these surprising differences between the concentrations in the aqueous versus oily phases. This accessibility problem may also highlight an interesting point. Differences in the surface properties of the two *POX*-derivative strains of *Y. lipolytica* are not expected but indeed, the emulsion characteristics for the culture with the two strains are very different and a differential production of a surface active compound is obvious (Krzyczkowska *et al*, unpublished results). This work shows that although the repartition of lactone between the lipid and aqueous phases of the biotransformation medium are relatively stable for the non-lactone-degrading MTLY40-2p strain, the lactone degrading MTLY36-2p strain is able to degrade almost all the lactone present in the aqueous phase while the lactone present in the oily phase is not degraded. This result is interesting in the goal of designing a particular system for continuous lactone extraction. Indeed, such a system should take into account the fact that transfers from the lipid to the aqueous phase are low and thus the particular adhesion of the yeast catalyst to lipid globules is a fundamental point in the process.

Interestingly, we detected for the first time the biosynthesis of 1,8-dihydroxynaphtalene (DHN)-melanin during the lactone production by a *Y. lipolytica POX*-derivative strain. This unexpected result leads us to explore different aspects of its production. Melanin is produced as a virulence factor in human and plant pathogenic fungi such as *Cryptococcus neoformans* and *Magnaporthe grisea* respectively (Casadevall *et al*., 2000; Howard and Valent, 1996) but also as a by-product during the cheese ripening by *Y. lipolytica* and the production of economical important products such as erythritol by *Torula corallina* (Lee *et al*., 2003). In this work, melanin seems to be synthesized as a by-product and its production during the biosynthesis of γ-decalactone could be a problem for the isolation or purification of aromas.

Nevertheless the biosynthesis of melanin in the presence of high concentrations of oily substrates in the medium should be an advantageous stress response to protect yeast cells. So it should be interesting to determine if the concentration of the oily substrates plays a role in the activation of melanin biosynthesis in *Y. lipolytica*. Comparing the levels of production of melanin between the wild type and the mutant strain we observed that the production was related to the oily substrate, being castor oil the best substrate for melanin biosynthesis. In contrast olive oil was not propitious to melanin biosynthesis. But the production of melanin was also related to the genetic background since the mutant MTLY40-2p strain produced higher concentrations of melanin than the wild type strain. This property of the mutant strain is probably due to an inefficient metabolism of lipids in which some of the fatty acids could be transformed in triglycerides and steryl esters to be accumulated in lipid bodies, while the rest of the fatty acids could follow one of the two ways, β-oxidation or lactonisation. The influx of fatty acids through β-oxidation could produce the substrates for the pentaketide pathway, which final products are polymerized in melanin. In this way, Asakura *et al* (2006) have observed that in the fungi *Colletotrichum lagenarium* the integrity of the peroxisome seems to be important for DHN-melanine synthesis since the mutation of *PEX6* gene, one of the peroxine coding genes that are required for the biogenesis and proliferation of peroxisomes, melanisation is severely reduced. Our results indicated that besides the oily substrate, peptone was essential for the biosynthesis of melanin, suggesting the importance of the nitrogen source on the regulation of enzymes involved in the DHN-melanin pathway, such as laccases whose production is modulated by nitrogen (reviewed in Brijwani *et al*., 2010). In the DHN-melanin pathway the polymerisation of melanin monomers is done by the action of laccase (Pihet *et al*., 2009).

The localization of melanin in fungi can vary in agreement with the species and the biosynthetic pathway. When phenolic compounds are secreted into the culture medium they can be autooxidized and form melanin that adheres to the cell wall. In counterpart, extracellular phenoloxidases can oxidize some culture components into melanin that remains freely in the culture fluid (Langfelder *et al*., 2003). The FTIR analysis at the cell wall level, suggested that the DHN-melanin produced by *Y. lipolytica* under hydrophobic growth conditions is basically extracellular, since the presence of melanin was not apparent in the cell surface. But we do not know if the DHN-melanin of *Y. lipolytica* is synthesized in the cell and then externalized or if 1,8-dihydroxynaphtalene monomers are secreted and later polymerized into the culture medium.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially granted by the French Agency for Research (ANR) and Romero-Guido possessed a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. 188320). The authors are thankful to Thomas Karbowiak for his precious advice and to Christine Bernard-Rojas and Yann Roche for technical help. Parts of the investigations were carried out in the Spectral Imaging Platform (PIMS) of the Cell Imaging Facilities of Burgundy/Franche Comté (Dimacell).

REFERENCES

Asakura, M., Okuno, T. & Takano, Y. (2006) Multiple contributions of peroxisomal metabolic function of fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. Appl Environ Microbiol 72(9):6345-63454.

Barth G. and Gaillardin C. (1996) The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In Wolf, K. (Ed.), Non-conventional yeasts in biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, pp. 313-388.

Beopolus A., Chardot T. and Nicaud J.M. (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie 91:692-696.

Brijwani, K., Rigdon, A. and Vadlani, P.V. (2010) Fungal laccases: Production, function and applications in food processing. Enzyme Res. 21(2010):ID 149748.

Cabanes, J., Chazarra, S., and Garcia-Carmona, F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J Pharm Pharmacol 46(12):982-985.

Carreira A., and Loureiro V. (1998) Pigment producing yeasts involved in a brown discoloration of ewe's cheese. Internat J Food Microbiol 41:223-230.

Carreira A., Ferreira L.M. and Loureiro V. (2001a) Production of brown pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Appl Microbiol 90:372-379.

Carreira A., Ferreira L.M. and Loureiro V. (2001b) Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* results from extracellular accumulation of homogentisic acid. Appl Environ Microbiol 67(8):3464-3468.

Casadevall A., Rosas A.L. and Nosanchuk J.D. (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol. 3(4):354-358.

Groguenin A., Waché Y., Escamilla Garcia E., Aguedo M., Husson F., LeDall M.T., Nicaud J.M. and Belin J.M. (2004) Genetic engineering of the β-oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. J Molec Catal B 28:75-79.

Howard R.J. and Valent B. (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Ann Rev Microbiol. 50:491-512.

Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., and Brakhage A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol 38:143-158.

Lee J.K., Jung H.M. and Kim S.Y. (2003) 1,8-Dihydroxynaphtalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. Appl Environ Microbiol 69(6):3427-3434.

Pihet, M., Vandeppute, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F. and Bouchara, J.P. (2009) Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Microbiol 9:177 doi:10.1186/1471-2180-9-177.

Waché Y., Aguedo M., LeDall M.-T., Nicaud J.-M. and Belin J.-M. (2002) Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β-oxidation pathway for lactones production. J Molec Catal B 19-20:347-351.

Waché Y., Laroche C., Bergmark K., Møller-Andersen C., Aguedo M., LeDall M-T., Wang H., Nicaud J.-M. and Belin J.-M. (2000) Involvement of acyl-CoA oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica.* Appl Environ Microbiol 66:1233-1236.

5.3 Résultats complémentaires III

La biosynthèse de mélanine chez *Y. lipolytica* a été peu étudiée. Actuellement, on ne connait pas les enzymes ou les intermédiaires des voies impliquées, ni les rôles biologiques que la mélanine pourrait jouer chez *Yarrowia*. La capacité de *Y. lipolytica* à synthétiser de la mélanine à partir de tyrosine a été prouvée par Carreira *et al* (1998), ils ont déterminé que *Y. lipolytica* produisait une pigmentation brune indésirable dans un fromage traditionnel Portugais. Plus tard, le même groupe de recherche a proposé que la pigmentation brune soit le résultat de l'oxydation de l'acide homogentisique, un intermédiaire du catabolisme de la tyrosine, qui s'accumule de manière extracellulaire et qui forme la pyomélanine (Carreira *et al*., 2001b). De plus, la biosynthèse de DOPA-mélanine par *Y. lipolytica* a été mise en évidence dans un travail de production de L-DOPA pour des applications biomédicales (Ali *et al*., 2007). Dans notre travail, les résultats d'inhibition des voies de biosynthèse de mélanine ont suggéré, pour la première fois chez *Y. lipolytica,* une troisième voie de biosynthèse de mélanine (Romero-Guido *et al*, Publication 2). Apparemment cette voie n'impliquerait pas le métabolisme de la tyrosine, comme cela a été préalablement décrit par Carreira *et al* (2001b) et Ali *et al* (2007), mais impliquerait le métabolisme des acides gras. Dans ce cas là, les précurseurs initiaux pourraient être l'acétyl-CoA et/ou le malonyl-CoA alors que le produit final est la DHN-mélanine.

5.3.1 Identification de gènes putatifs de la voie DHN-mélanine chez *Yarrowia lipolytica*

Les gènes impliqués dans la synthèse de mélanine ne sont pas connus chez *Y. lipolytica*. C'est pourquoi comme première approche pour étudier la voie DHN-mélanine, nous avons fait une analyse *in silico* pour identifier les gènes putatifs de cette voie chez *Yarrowia*. À ce sujet nous avons utilisé les séquences d'acides aminés codés par les gènes de la voie DHN-mélanine d'*Aspergillus fumigatus* afin de cibler les gènes homologues chez *Y. lipolytica*. Les résultats ont montré des pourcentages d'identité de 23 à 38% entre les protéines d'*A. fumigatus* et les protéines potentielles de *Y. lipolytica* ainsi que de bonnes valeurs *E* pour quatre des protéines mais faibles pour deux autres (Tableau 13).

Tableau 13. Identification *in silico* des gènes putatifs de la voie de biosynthèse de DHN-mélanine chez *Y. lipolytica*.

Y. lipolytica **No. d'Accès**	**Poids moléculaire (KDa)**	**Annotation chez Génolevures (Similaire à :)**	***A. fumigatus*** **Nom et No. d'Accès**	**Fonction chez *A. fumigatus***	**BLASTP (% d'identité)**	***E*-value**	**Score (bits)**
YALI0F30679p	43,6	*Sc* CEM1 YER061c	Alb1p FJ406468.1	Ploycétide synthase (PKS)	23%	1e-12	65.9 (159)
YALI0E20977p	55,9	*Sc* ARO8 YGL202w	Ayg1p FJ406474.1	2-acetoacétyl 1,3,6,8 THN hydrolase	28%	0.005	26.0 (58)
YALI0E15378p	97,3	*Yl* MEF1 Q9P4D9	Arp2p FJ406479.1	Hydroxynaphtalène reductase (HNR)	32%	2e-21	85.9 (211)
YALI0B19712p	44,0	Inconnu	Arp1p FJ406486.1	Scytalone deshydratase (SCD)	38%	0.014	26.9 (58)
YALI0D06754p	67,2	*Aa* Fe-O_2 Oxydoreductase Q9P861	Abr1p FJ406491.1	Multicuivre ferre oxydase putative (MFO)	37%	9e-114	348 (844)
YALI0A20273p	79,4	*Sc* FET3 YMR058w	Abr2p FJ406495.1	Laccase putative (LCC)	25%	5e-45	162 (411)

Sc) *Saccharomyces cerevisiae* ; *Yl*) *Yarrowia lipolytica* ; *Aa*) *Arxula adeninivorans*

5.3.2 Analyse des protéines putatives de la voie DHN-mélanine chez *Yarrowia lipolytica*

Pour connaître la fonction putative des protéines que nous avons identifiées chez *Y. lipolytica* nous avons cherché les domaines fonctionnels présents dans ses séquences peptidiques d'après les bases de données Pfam (htt://pfam.sanger.ac.uk), PROSITE et CDD et nous avons fait des alignements protéiques par le logiciel Clustal W (Tompson *et al*., 1994). Les résultats seront décrits par la suite.

●La protéine YALI0F30679p qui a montré un 23% d'identité par BLASTp avec l'enzyme polycétide synthase Alb1 d'*A. fumigatus* (*Af*Alb1p), présente un domaine N-terminal et un domaine C-terminal des β-cétoacyl-ACP (de l'anglais « acyl-carrier-protein) synthases (EC 2.3.1.41), dans le domaine N-terminal il a été trouvé un site actif β-cétoacyl synthase (PF00109) (**Figure 34A**). Ces domaines sont impliqués dans les étapes de condensation et d'élongation de la biosynthèse des acides gras à partir du malonyl-CoA, ainsi que dans la dégradation des acides gras. Des gènes qui présentent ces domaines peuvent être aussi impliqués dans la synthèse de polycétides, donc des intermédiaires de la DHN-mélanine. En plus de ces domaines, la protéine *Af*Alb1p présente aussi un domaine acyle transférase, deux sites d'union à phosphopantethéine et un domaine thioestérase (**Figure 34B**), ces domaines sont absents dans la protéine YALI0F30679p dont la taille est plus petite que celle d'*Af*Alb1p.

L'alignement des protéines YALI0F030679p et *Af*Alb1p montre la région avec le niveau de similarité le plus important entre les deux séquences peptidiques et le site actif de chaque enzyme est encadré (**Figure 35**).

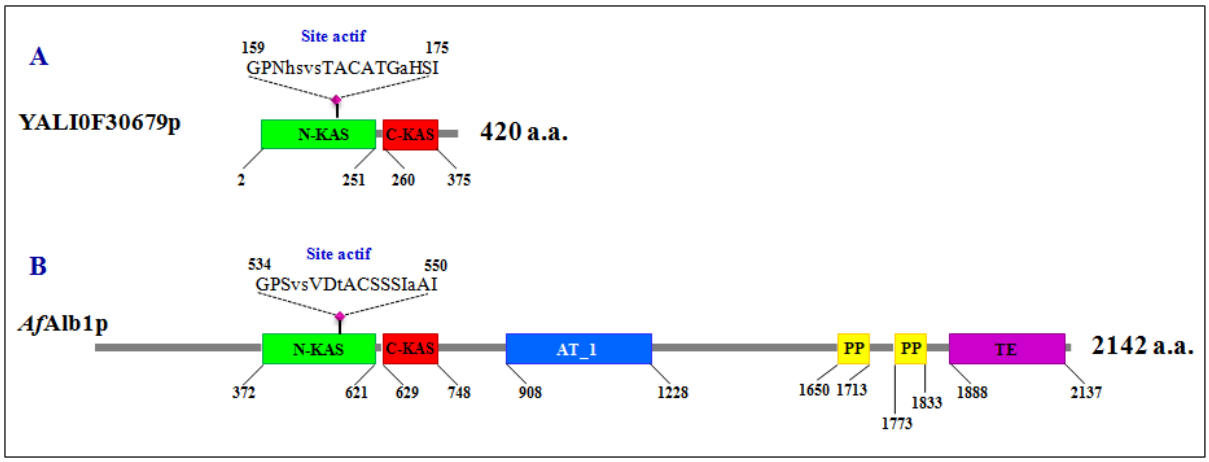


Figure 34. Représentation de la structure des protéines PKS. La position des domaines et des sites actifs est indiquée. A) Protéine YALI0F30679p de *Y. lipolytica*; B) Protéine Alb1p d'*A. fumigatus*. N-KAS) Domaine N-terminal β-cétoacyl synthase (PF00109); C-KAS) Domaine C-terminal β-cétoacyl synthase (PF02801); AT_1) Domaine acyl transférase (PF00698); PP) Site d'union à la phosphopantethéine (PF00550); TE) Domaine thioestérase (PF00975).

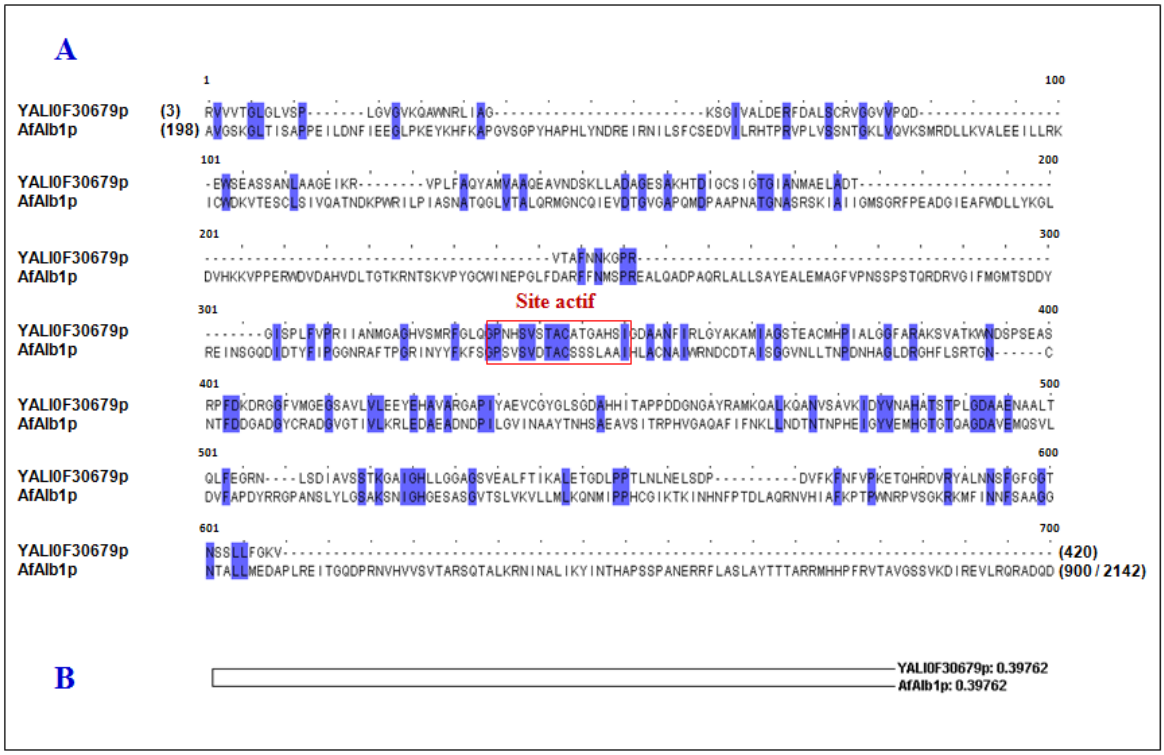


Figure 35. Alignement des protéines PKS. On montre la région avec le pourcentage de similarité le plus important entre les protéines YALI0F030679p de *Y. lipolytica* et AfAlb1p d'*A. fumigatus* (A). Le site actif de chaque protéine, prédite par PROSITE, est encadré en rouge. (B) Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées).

●La protéine YALI0E15378p qui a 32% de similarité avec l'hydroxynaphtalène réductase Arp2 d'*A. fumigatus* est l'enzyme multifonctionnelle (MFE1) qui catalyse la deuxième et la troisième étape de la β-oxydation chez *Y. lipolytica* (voir Figure 7). Entre les domaines présents dans la séquence de cette protéine, il y a deux domaines Adh_court typiquement présents dans la famille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne, un domaine zf-MaoC pour l'union du métal chez les MaoC déshydrogénases, et un domaine MaoC_déshydratase, le gène MaoC est lié à la synthèse de monoamine oxydase (Figure 36A). Alors que dans la séquence peptidique d'*Af*Arp2p il y a uniquement un domaine Adh_court (Figure 36B).

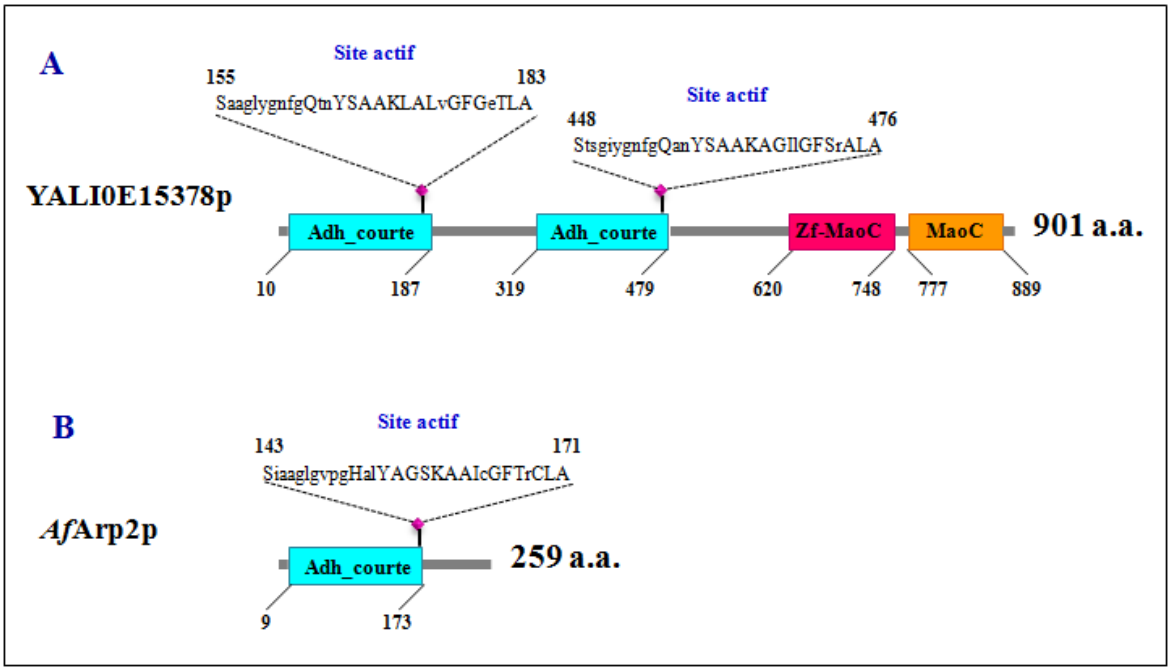


Figure 36. Représentation de la structure des protéines HNR. La position des domaines et des sites actifs est indiquée. A) Protéine YALI0E15378p de *Y. lipolytica*; B) Protéine Arp2p d'*A. fumigatus*. Adh_court) Domaine déshydrogénase à courte chaîne (PF00106); MaoC) Domaine MaoC-déshydratase (PF01575).

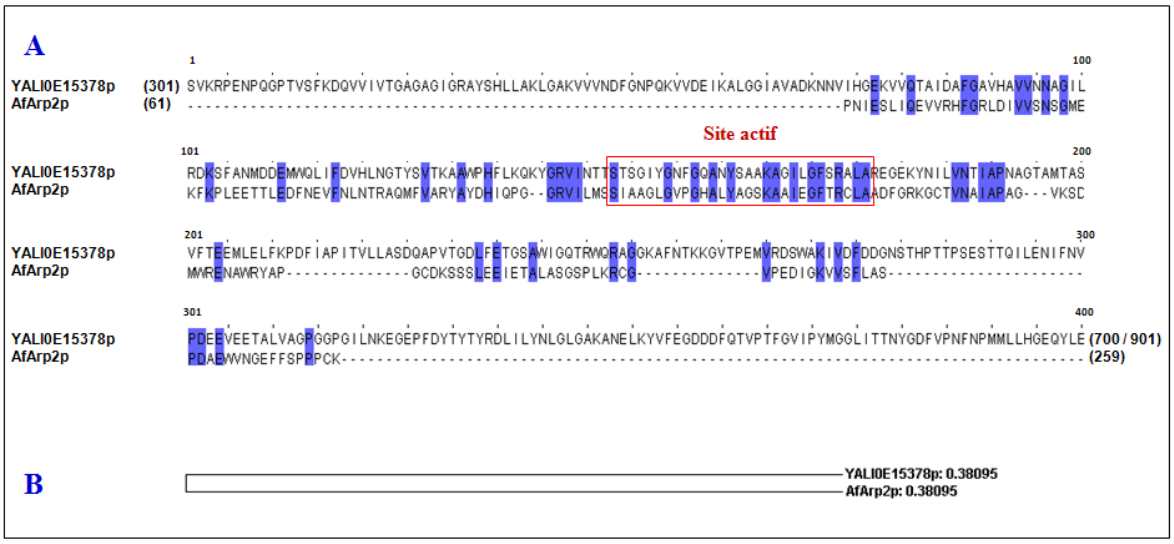


Figure 37. Alignement des protéines HNR. On montre la région avec le pourcentage de similarité le plus important entre les protéines YALI0E15378p de *Y. lipolytica* et AfArp2p d'*A. fumigatus* (A). Le site actif de chaque protéine, prédit par PROSITE, est encadré en rouge. (B) Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées).

●Les protéines YALI0D06754p et YALI0A20273p qui ont présenté un 37% et un 25% d'identité avec les protéines d'*A. fumigatus* Abr1p et Abr2p respectivement, appartiennent à la famille de protéines GL3R0104 (d'après le site

http://www.genolevures.org/fam/GL3R0104). Cette famille inclut des protéines similaires à des Fe-oxydoréductases et Multi-cuivre oxydases. D'après l'analyse bioinformatique les protéines YALI0D06754p et YALI0A20273p ainsi que les protéines Abr1p et Abr2p présentent 3 domaines conservés Multi-cuivre oxydase : Cu-oxydase, Cu-oxydase 2 et Cu-oxydase3 (**Figure 38**). Dans le groupe des Multi-cuivre oxydases il y a les laccases (EC 1.10.3.2), des enzymes qui oxydent phénols, polyphénols et diamines. Les laccases présentent trois centres de cuivre différents en spectroscopie nommés de type 1 (ou blue), de type 2 (ou normal) et de type 3 (ou binucléaire assemblé). Les laccases pourraient catalyser la polymérisation des monomères de DHN-mélanine.

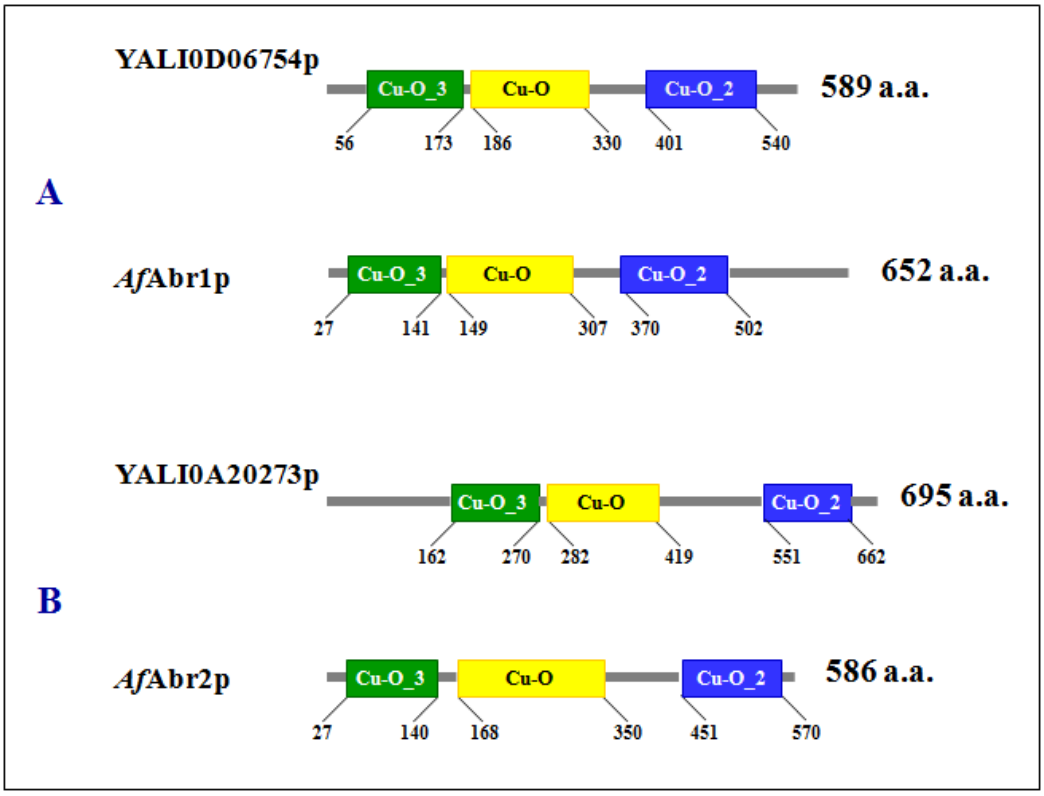


Figure 38. Représentation de la structure des protéines MFO et LCC. La position des domaines est indiquée. **A)** Protéines MFO (Multicuivre fer oxydase). **B)** Protéines LCC (laccase). **Cu-O_3)** Domaine Cuivre-oxydase 3 (PF07732); **Cu-O)** Domaine Cuivre-oxydase (PF00394); **Cu-O_2)** Domaine Cuivre-oxydase 2 (PF07731).

D'après les domaines typiques des laccases que nous avons retrouvés dans les séquences peptidiques de YALI0D06754p, YALI0A20273p, AfAbr1p et AfAbr2p, nous avons comparé ces séquences peptidiques avec des laccases identifiés chez d'autres champignons. Pour cela, nous avons utilisé les séquences peptidiques des laccases de *Trametes versicolor* (*Tv*LCC1) et *Agaricus* bisporus (*Ab*LCC1). Dans l'alignement multiple (**figure 39**) on peut observer que

les séquences de signature des laccases (L1-L4) sont présentes dans les séquences des protéines YALI0D06754p, YALI0A20273p, AfAbr1p et AfAbr2p comme chez les laccases de *T. versicolor* et *A. bisporus*.

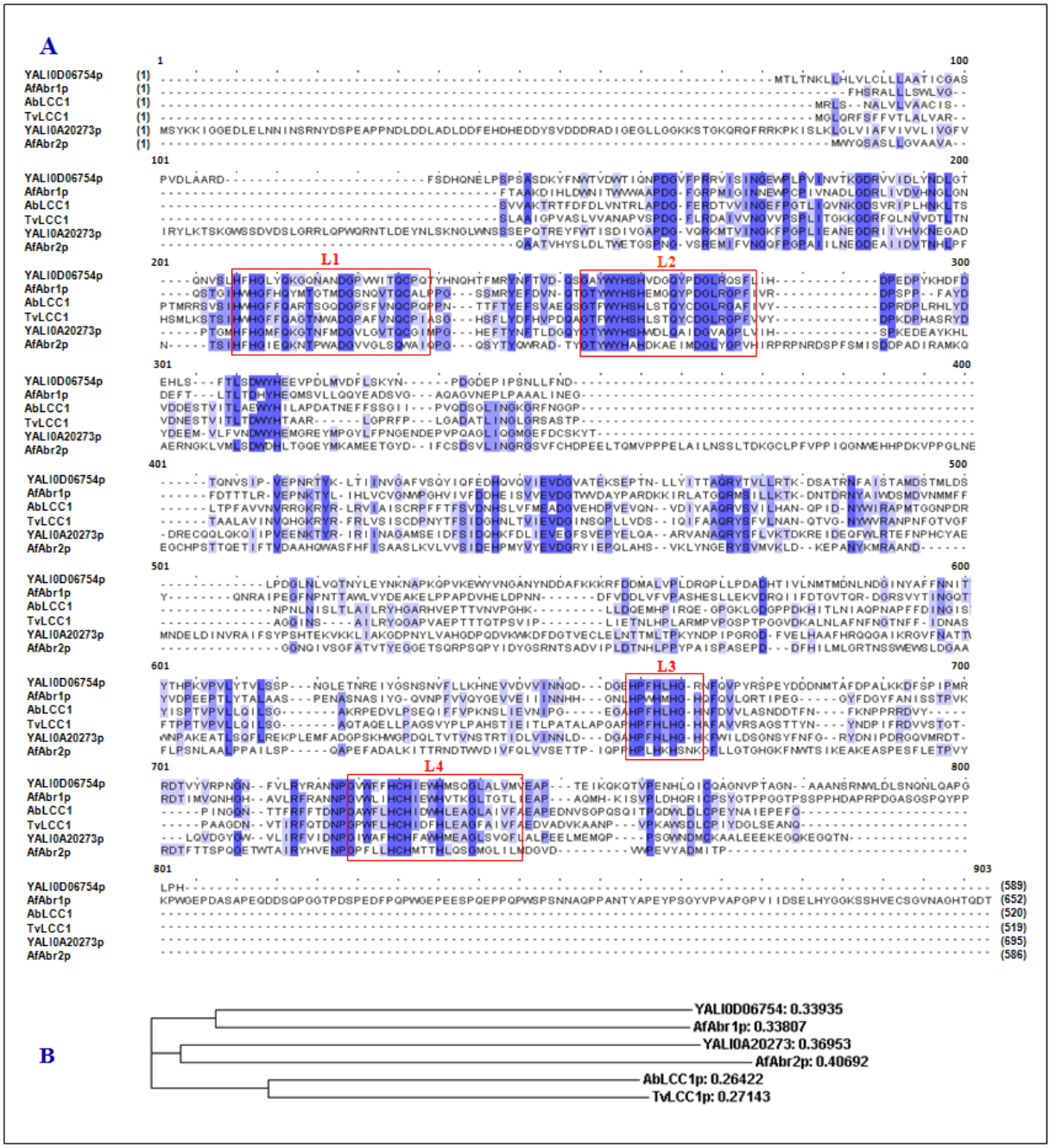


Figure 39. Alignement multiple des protéines MFO et LCC. On montre l'alignement des séquences peptidiques complètes (A). Les séquences des signatures L1, L2, L3 et L4 typiques des laccases sont encadrées en rouge. (B) Arbre phylogénique issu de l'alignement (les distances sont indiquées). TvLCC1) Laccase de *Trametes versicolor* ; AbLCC1) Laccase d'*Agaricus bisporus*.

●La protéine YALI0E20977p présente un domaine multiple des protéines de la superfamille des aspartate aminotransférases, et la protéine YALI0B19712p présente un motif d'union à un « calcium EF-hand » mais aucune des deux séquences peptidiques ne présente des domaines liés à la biosynthèse de mélanine ou au métabolisme des acides gras.

En général, les motifs trouvés dans quatre des protéines potentielles pour la biosynthèse de DHN-mélanine chez *Y. lipolytica* suggèrent des fonctions liées au métabolisme des acides gras et de synthèse de composés intermédiaires de la DHN-mélanine. De plus les fonctions de ces motifs sont similaires à celles des motifs présents dans les protéines de biosynthèse de DHN-mélanine chez *A. fumigatus*. Par contre, les protéines YALI0E20977p et YALI0B19712p qui ont montré les valeurs *E* les plus faibles n'ont pas de motifs liés à la biosynthèse de mélanine ni similaires à ceux des protéines Ayg1p et Arp1p respectivement.

5.3.3 Conclusion

D'après nos analyses *in silico* nous avons identifié quatre gènes dont les protéines pourraient participer à la biosynthèse de DHN-mélanine chez *Y. lipolytica* par une voie similaire à celle d'*Aspergillus fumigatus*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Le métabolisme lipidique de *Y. lipolytica* est un sujet de recherche très étudié du fait de ses applications biotechnologiques dans différents domaines. Par contre, la participation de la paroi cellulaire au premier contact avec les substrats hydrophobes n'a pas été beaucoup étudiée. À ce sujet, tous les composants de la paroi cellulaire tels que les mannoprotéines, les β-glucanes et la chitine peuvent jouer un rôle important pour l'adhésion, la prise en charge et l'adaptation aux substrats hydrophobes devant être métabolisés. Donc l'effet des substrats hydrophobes sur la structure et la composition de la paroi cellulaire est un sujet important à étudier. La paroi cellulaire des champignons est un organite dynamique dont la composition et la structure se modifient tout au long du cycle de vie pour permettre l'accouplement, le bourgeonnement, la division cellulaire, etc. mais aussi en réponse aux conditions environnementales.

6.1 Modifications de la paroi cellulaire en présence d'oléate de méthyle : implications dans l'adhésion de gouttelettes lipidiques

Partant du fait que la composition du milieu de culture et la source de carbone induisent des modifications de la composition et de la structure de la paroi cellulaire des levures (Aguilar-Uscanaga et François, 2003), nous avons utilisé deux milieux de culture à composition différente, un milieu riche (YPO) et un milieu minimum (YNBO), mais contenant tous les deux de l'oléate de méthyle comme source de carbone, afin de créer des différences pariétales. La présence d'oléate de méthyle en combinaison avec la composition du milieu de culture, a induit des modifications du contenu des composants pariétaux qui rendent les cellules plus résistantes à l'effet toxique du calcofluor blanc et du rouge Congo. Ces modifications, ont été déterminées par spectroscopie infrarouge (FTIR) mais n'ont pas été observables par microscopie électronique (TEM), contrairement aux travaux de Kim *et al* (2000) et de Mlíčková *et al* (2004) qui ont observé par TEM la formation de protrusions à la surface cellulaire et une augmentation de la grosseur de la paroi cellulaire et de l'espace periplasmique de *Y. lipolytica* ayant poussé sur pétrole et sur acide oléique, par rapport aux cellules ayant poussé sur glucose.

En ce qui concerne la concentration des composants pariétaux, les spectres par FTIR nous font penser que les parois cellulaires des levures ayant poussé dans YPO peuvent être légèrement plus robustes que celles des cellules ayant poussé dans YNBO. Mais probablement dans YNBO les parois cellulaires ont suivi des modifications qui compensent la

diminution de polysaccharides, peut-être par l'augmentation du taux de certaines protéines structurelles de la paroi cellulaire.

Les différences au niveau de la paroi cellulaire obtenues dans les deux milieux de culture se répercutent sur l'adhésion de gouttelettes lipidiques. Dans le milieu de culture YNBO nous avons observé l'adhésion de gouttelettes lipidiques à la surface cellulaire tout au long de la culture. De plus, en milieu de phase exponentielle, la surface des cellules est plus hydrophobe que celle des cellules ayant poussé sur glucose. L'adhésion de gouttelettes lipidiques a été aussi rapportée chez *Y. lipolytica* ayant poussé dans un milieu de culture dont la base d'azote est la même que celle que nous avons utilisée (YNB) mais la source de carbone était l'acide oléique (Mlíčková *et al*., 2004). Donc l'affinité des parois cellulaires de *Y. lipolytica* pour les gouttelettes lipidiques est probablement régulée par l'absence de glucose et le bas contenu de nutriments dans le milieu de culture plutôt que par la nature du substrat hydrophobe. Au contraire, dans le milieu riche YPO les parois des cellules semblent perdre l'hydrophobie vers les étapes avancées de la culture et la capacité d'adhésion aux gouttelettes lipidiques est diminuée.

6.2 Expression de gènes codant des CWPs de *Y. lipolytica* en présence d'oléate de méthyle

L'analyse transcriptionnelle des gènes codant des protéines de paroi cellulaire (CWP) nous a donné des indications sur le rôle que les CWP pourraient jouer au moment du contact entre les cellules de *Y. lipolytica* et les substrats hydrophobes. Nos résultats ont montré que l'expression des gènes codant des CWP est influencée par la présence d'oléate de méthyle, puisqu'un groupe de dix gènes a été sur-exprimé dans les deux milieux YPO et YNBO, leurs produits avaient des fonctions putatives de réponse au stress (Hsp150), floculation (Muc1, Muc2) et structure (Cwp2, par exemple). Mais on a aussi observé l'induction spécifique de certains gènes dans chaque milieu, probablement régulés par le contenu de nutriments dans le milieu de culture. Une protéine avec fonction putative de β-1,3-glycosidase (Crh3) a été légèrement induite dans YPO. Alors que huit gènes codant des protéines avec fonctions putatives de 1,3-glycosidase (Crh2), structurale (Cwp2, Cwp3 et Cwp5), floculine (Muc2) et agglutinine (Aga1), phospholipase (Plb1) et protéine kinase (Yak1) ont été sur-exprimés dans YNBO. Certains de ces gènes ont montré des niveaux très hauts d'expression à 5 h de culture chez les souches sauvage W29 et mutant MTLY37 ayant poussé dans les milieux minimaux YNBO et PBSO respectivement. Donc ces gènes pourraient jouer des rôles importants dans la

réponse au stress par manque de nutriments dans le milieu et probablement par d'autres stress. L'induction de ces gènes chez la souche MTLY37, où la β-oxydation est interrompue, pourrait être indépendante du métabolisme des lipides. Un troisième groupe comprenait huit gènes avec des fonctions putatives de glucanases (Scw1 et Scw2), lipase et phospholipase (Lip9, Plb3) et structurales (Ccw1, Cwp9) qui étaient réprimées dans les deux milieux lipidiques.

6.3 Réponse au stress de la paroi cellulaire et biosynthèse de mélanine chez *Y. lipolytica*

Nos résultats montrent que les cellules ayant poussé en présence d'oléate de méthyle sont plus résistantes au calcofluor blanc et au rouge Congo. Le travail de Ta *et al* (2010) réalisé dans notre équipe de recherche, a montré que les cellules ayant poussé sur oléate de méthyle sont plus résistantes au stress par choc γ-dodécalactone (un composé amphiphile qui fluidifie la membrane plasmique) et par choc thermique (Ta *et al*., 2012). De plus, ils ont observé que les cellules ayant poussé dans YPO étaient plus résistantes à la déplétion d'ergostérol par la méthyl-β-cyclodextrine. Dans leur ensemble les résultats de Ta *et al* (2010 ; 2012) et ceux de ce travail, suggèrent que la présence d'oléate de méthyle dans le milieu de culture pourrait être perçue comme un stress qui induirait certaine(s) voie(s) de signalisation MAPK dont la réponse serait l'expression des gènes codant des protéines pariétales (par exemple Hsp150 qui est induite par un manque d'azote et par choc thermique). L'identité de protéines pariétales induites dans YPO et YNBO suggère leur participation dans les modifications ou le renforcement de la paroi cellulaire pour maintenir son intégrité. Donc l'activation de la réponse au stress rend les cellules plus résistantes à un deuxième type de stress. En même temps, ces résultats suggèrent l'importance de maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire pour protéger l'intégrité de la membrane plasmique. Par exemple, les cellules ayant poussé dans YPO ont probablement une paroi cellulaire que la composition et l'ultrastructure rendent moins perméable à des composés comme la méthyl-β-cyclodextrine et ainsi avantageuse pour protéger l'intégrité de la membrane plasmique.

La biosynthèse de mélanine par *Y. lipolytica* a été rapportée comme le résultat de l'accumulation extracellulaire d'acide homogentisique sur un fromage portuguais (Carreira *et al* 2001a ; 2001b). L'acide homogentisique se polymérise en pyomélanine, un type d'allomélanine. Plus récemment, la capacité de *Y. lipolytica* à produire de la DOPA-mélanine à partir de l'oxydation de L-tyrosine a été suggérée par le travail de Sikander *et al* (2007). Ils ont réussi à produire la L-DOPA dans une suspension contenant de la L-tyrosine, des cellules

de *Y. lipolytica* et de la diatomite. D'après les auteurs l'addition de diatomite a augmenté la production de L-DOPA car c'était un support solide qu'immobilisaient les tyrosinases et ce fait pourrait améliorer son rendement. Par contre, Valiante *et al* (2009) ont déterminé qu'un stress mécanique produit par des billes en verre sur la paroi cellulaire d'*Aspergillus fumigatus* activait la voie de signalisation CWI et, en conséquence, augmentait la production de pyomélanine. Il est alors probable que la production de L-DOPA par *Y. lipolytica* est aussi augmentée en réponse au stress mécanique produit par la diatomite sur la paroi cellulaire et que la voie de signalisation CWI est impliquée. La participation de la voie de signalisation CWI dans la production de mélanine a été étudiée chez *Cryptococcus neoformans* et *A. fumigatus*, deux champignons pathogènes de l'être humain. Chez *C. neoformans* la voie des sphingolipides joue un rôle régulateur de l'activation de la Pkc1 (la première protéine kinase de la voie CWI). Il est connu que la Pkc1 est activée par le diacylglycérol ou inactivée par le phytocéramide (substrat pour la synthèse de diacylglycérol). L'activation de Pkc1 maintient la structure de la paroi cellulaire en bon état et assure l'association de la laccase à la paroi cellulaire, endroit où la laccase catalyse la production de DOPA-mélanine (Heung *et al*., 2005). Pour *A. fumigatus* la production de pyomélanine chez les cellules mutantes des protéines kinases Δ*bck1*, Δ*mkk2* ou Δ*mpkA* ayant poussé en présence de L-tyrosine, ainsi qu'en présence de billes en verre qui ont abimé la paroi cellulaire et activé la phosphorylation de MapkA chez la souche sauvage, montre la participation de la voie CWI dans la formation de pyomélanine (Valiante *et al*., 2009). Concernant notre travail, nous avons détecté pour la première fois la production de DHN-mélanine par la souche sauvage W29 et la souche mutante MTLY40-2p de *Y. lipolytica* ayant poussé dans des milieux de culture contenant de l'huile de ricin, de l'oléate de méthyle ou du ricinoléate de méthyle comme source de carbone. Par analyses de spectroscopie par FTIR nous avons observé que la souche MTLY40-2p ayant poussé dans les milieux lipidiques a présenté des modifications importantes du contenu des composants de la paroi cellulaire. Probablement ces modifications pariétales induisent la voie de signalisation CWI et cette voie est impliquée dans la production de mélanine chez *Y. lipolytica*.

En résumé, on peut dire que les substrats hydrophobes et le manque de nutriments sont détectés par *Y. lipolytica* comme des stress qui activent probablement des voies de signalisation MAPK, donc les facteurs de transcription activés par le module MAPK pourraient réguler l'expression de gènes de paroi cellulaire chargés des modifications pariétales pour maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire et pour permettre l'adhésion de

gouttelettes lipidiques. De plus, la production de DHN-mélanine par *Y. lipolytica* semble être une réponse au stress par la présence de substrats hydrophobes.

CONCLUSION

7. CONCLUSION

Pour conclure ce travail, on peut noter certains résultats importants qui ont été mis en avant. Tout d'abord, la levure *Y. lipolytica* modifie la composition et les propriétés d'adhésion de sa paroi cellulaire en fonction de la source de carbone (glucose vs oléate de méthyle), de la composition du milieu de culture et du temps. Par analyses *in silico* nous avons identifié 27 gènes codant des protéines putatives de la paroi cellulaire chez *Y. lipolytica*. Cette analyse a montré la présence du site ω dans les séquences de seize protéines, parmi lesquelles quatre ont aussi présenté 1 à 9 répétitions PIR. Huit protéines ont présenté d'autres motifs ou sites actifs, la majorité avec des fonctions enzymatiques. Alors que trois protéines n'ont présenté aucun motif de ce type. Lors d'un transfert des cellules vers un milieu riche ou minimal avec oléate de méthyle comme source de carbone, les analyses de transcription des 27 gènes putatifs de la paroi cellulaire ont montré un profil d'expression similaire pour la majorité des gènes (soit induction ou répression) probablement dû à la présence d'oléate de méthyle, la source de carbone commune dans les milieux YPO et YNBO. Par contre, un groupe de neuf gènes présentait un profil d'expression différent entre les deux milieux lipidiques et cela semblait être indépendant de la source de carbone mais dû à d'autres paramètres de la composition de base du milieu de culture. Les fonctions putatives des protéines de paroi cellulaire suggèrent que leur induction dans nos conditions expérimentales a eu lieu pour maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire face au stress par l'oléate de méthyle et le manque de nutriments. D'une manière intéressante, il a été montré que les huiles oléate de méthyle, ricinoléate de méthyle et huile de ricin induisent des modifications du contenu des composants pariétaux (protéines et/ou polysaccarides) chez la souche mutante de la β-oxydation MTLY40-2p par rapport à la souche sauvage W29. L'oléate et le ricinoléate de méthyle induisent la biosynthèse de mélanine chez les souches sauvage W29 et la souche mutante MTLY40-2p de *Y. lipolytica*, alors que l'huile de ricin induit la biosynthèse de mélanine uniquement chez le mutant MTLY40-2p. L'inhibition de la biosynthèse de mélanine par le Pyroquilon, un inhibiteur spécifique de la voie DHN-mélanine, suggère que *Y. lipolytica* biosynthétise de la DHN-mélanine en présence de certains substrats hydrophobes. La biosynthèse de mélanine par *Y. lipolytica* est affectée par l'absence de peptone dans le milieu de culture.

Ces résultats mis ensemble montrent que, si la présence d'oléate dans le milieu nécessite des modifications de la cellule au niveau pariétal pour favoriser la prise en charge du substrat, cette présence peut également constituer un stress pour la cellule en fonction de la composition du milieu et de la capacité métabolique de la cellule à prendre en charge ces

substrats. La réponse à ce stress se manifeste par la synthèse de DHN-mélanine, qui a été mise en évidence chez *Y. lipolytica* pour la première fois dans cette étude, et par la transcription de différents gènes comme par exemple *CWP2* (YALI0A09196g), *CWP3* (YALI0F18282g), *CWP4* (YALI0D27214g), *CWP6/HSP150* (YALI0C02981g).

PERSPECTIVES

8. PERSPECTIVES

Chapitre I

Dans la première partie de ce travail nous avons identifié et analysé la transcription de 27 gènes codant des protéines putatives de paroi cellulaire chez *Y. lipolytica*. La similarité des protéines correspondantes avec des protéines de paroi cellulaire de *S. cerevisiae*, *C. albicans* et même de *Y. lipolytica*, ainsi que la présence du site ω et des répétitions PIR ou de motifs caractéristiques de protéines de paroi cellulaire, suggèrent que la plupart des gènes que nous avons analysés codent des protéines de paroi cellulaire. Afin d'approfondir les données sur la localisation, la fonction, la régulation de l'expression et les applications des protéines de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* nous proposons les perspectives suivantes :

● Pour prouver la localisation de ces protéines dans la paroi cellulaire ainsi que, d'une manière plus précise, la zone de la paroi dans laquelle se localisent, on peut faire des essais d'immunolocalisation par microscopie électronique, ou observer l'adressage de protéines rapporteuses (par exemple les protéines vert fluorescent (GFP) ou jaune fluorescent (YFP)) dirigées par la séquence signal de sécrétion N-terminal et le site C-terminal d'ancrage pour le GPI (site ω) par microscopie de fluorescence. Une autre stratégie possible serait d'extraire les protéines de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica,* de les fractionner et de les séquencer.

● Pour connaitre la fonction des protéines putatives de la paroi cellulaire que nous avons suggérées dans ce travail, nous proposons de muter les gènes analysés et de tester la sensibilité des souches mutantes à différents composés et conditions de culture indicateurs de modifications de la paroi cellulaire, d'analyser leur capacité d'accouplement, d'adhésion, de floculation et de tester les activités enzymatiques glucanase, chitinase, lipase, phospholipase, etc.

● Pour continuer l'analyse de l'expression des protéines de paroi cellulaire chez *Y. lipolytica* ayant poussé en présence d'oléate de méthyle, il est intéressant de déterminer la régulation postraductionnelle en comparant la transcription des gènes de paroi cellulaire avec l'abondance des protéines pariétales.

● Nos résultats ont montré que les levures ayant poussé en présence d'oléate de méthyle (YPO et YNBO) ont présenté des modifications pariétales au niveau du contenu des polysaccharides et de l'expression de gènes codant des protéines putatives de la paroi cellulaire, dont certaines avaient des similarités avec des protéines de paroi cellulaire de

réponse au stress. En général, chez les champignons, les modifications pariétales en réponse au stress sont régulées par la voie de signalisation MAPK d'intégrité de la paroi cellulaire (CWI). Cette voie de signalisation n'a pas été étudiée chez *Y. lipolytica*. Déterminer si cette voie intervient dans la régulation des gènes de paroi cellulaire dans nos conditions expérimentales est donc un point intéressant pour mieux comprendre la régulation des modifications de la paroi cellulaire de *Y. lipolytica* en présence de substrats hydrophobes.

● L'expression de protéines hétérologues à la surface cellulaire des levures est une méthode qui se développe de plus en plus grâce à ses applications biotechnologiques. Dans ce travail nous avons identifié cinq gènes intéressants car voyant leur niveau d'expression augmenté de manière importante pendant les premières heures de culture. Nous proposons d'utiliser leurs promoteurs et leurs signaux d'adressage pour diriger l'expression et la localisation à la paroi cellulaire de protéines d'intérêt biotechnologique, pour incrémenter et accélérer par exemple le rendement de méthodes de biotransformation de substrats hydrophobes par *Y. lipolytica*.

Chapitre II

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons observé la production de mélanine par une souche mutante de *Y. lipolytica* ayant poussé en présence de différentes huiles. Le test d'inhibition a suggéré l'existence d'une voie de biosynthèse de mélanine qui n'a pas encore été étudiée chez *Y. lipolytica*. Pour approfondir sur la biosynthèse de mélanine en présence de substrats hydrophobes, nous proposons les perspectives suivantes :

● Étudier l'expression des gènes putatifs de la voie DHN-mélanine que nous avons identifiés *in silico* chez *Y. lipolytica*. Comme première approche, faire une cinétique d'expression des gènes dans le milieu PCO (Peptone/Huile de ricin) car dans ce milieu la souche mutante produit de la mélanine mais pas la souche sauvage, on pourrait donc utiliser cette dernière souche comme un témoin négatif. On propose aussi de tester différentes conditions de culture, par exemple : modifier la concentration des substrats hydrophobes, changer la source d'azote, etc., afin d'identifier les facteurs inducteurs de la biosynthèse de mélanine.

● Chez les champignons *Cryptoccocus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*, la protéine kinase Pka et le module MAPK de la voie CWI respectivement, sont liés à la régulation de la biosynthèse de mélanine (Singh & Del Poeta, 2010 ; Valiante, *et al*., 2009). Pour déterminer la probable participation de ce type de protéines à la biosynthèse de mélanine chez *Y.*

lipolytica, nous proposons d'étudier la biosynthèse de mélanine chez la souche mutante Δ*tpk1*, car le gène *TPK1*code la sous-unité catalytique de la protéine kinase Pka chez *Y. lipolytica* (Cervantes-Chávez *et al*., 2009).

BIBLIOGRAPHIE

9. BIBLIOGRAPHIE

1) Aguedo, M. (2002) Biotransformation de lipides en arômes par *Yarrowia lipolytica*: interactions avec le substrat, excrétion et toxicité des métabolites produits. Ecole National Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, France: Université de Bourgogne.

2) Aguedo, M., Waché, Y., Mazoyer, V., Sequeira-Le grand A. & Belin, J. M. (2003) Increased Electron-Donor and Electron-Acceptor Characters Enhance the Adhesion Between Oil Droplets and Cells of *Yarrowia lipolytica* as Evaluated by New Cytometric Assay. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51(10): 3007-3001.

3) Alchihab, M., Destain, J., Aguedo, M. & Thonart, P. (2010) Production d'arômes de type lactone par des levures.

4) Amaral, P.F.F., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Rocha-Leão, M.H.M., Coelho, M. A.Z. & Couthinho, J.A.P. (2006) Cell Surface Characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Yeast 23: 867-877.

5) Barth, G. & Scheuber, T. (1993) Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. Mol Gen Genet. 241:422-430.

6) Barth, G. & Gaillardin, C. (1996) The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In Wolf, K. (Ed.), Non-conventional yeasts in biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, pp. 313-388.

Barth, G. & Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev 19:219-237.

7) Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M-T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T. & Nicaud, J-M. (2008) Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. App Environ Microbiol. 74(24):7779-7789.

8) Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J-M. (2009) Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie 91(6):692-696.

9) Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña J.M., Rodríguez de la Concepción, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. & Arroyo, J. (2008) The sequential activation of the yeast HOG an SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. Mol Biol Cell. 19(3):1113-1124.

10) Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. R. & Gaillardin, C. (1994) Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Mol Cell Biol. 14:327-338.

11) Bon, E., Casaregola, S., Bladin, G., Llorente, B., Neuveglise, C., Munsterkotter, M., Guldener, U., Mewes, H.W., Van Helden, J., Dujon, B., & Gaillardin, C. (2003) Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. Nucleic Acids Res. 31:1121-1135

12) Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Hellingwerf, K.J., & Klis, F.M. (2004) Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 15:413-427

13) Bowman, S. M. & Free, S. J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays. 28(8): 799-808.

14) Cappellaro, C., Mrsă, V. & Tanner, W. (1998) New potential cell wall glucanases of Saccharomyces cerevisiae and their involvement in mating. J Bacteriol. 180:5030-5037.

15) Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., & Klis, F.M. (1997) *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13: 1477-1489.

16) Carreira, A., Paloma, A. & Loureiro, V. (1998) Pigment producing yeast involved in a brown surface discoloration of ewe's cheese. Int J Food Microbiol 41:223-230.

17) Casadevall, A., Rosas, A.L. & Nosanchuk, J.D. (2000) Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr Opin Microbiol 3:354-358.

18) Casaregola, S., Neuvéglise, C., Lépingle, A., Bon, E., Feynerol, C. Artiguenave, F., Wincker, P. & Gaillardin, C. (2000) Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17 *Yarrowia lipolytica*. FEBS Letters 487:95-100.

19) Castillo, L., Martínez, A.I., Garcerá, A., Elorza, M.V., Valentín, E. & Sentandreu, R. (2003) Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3 : the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β-1,3-glucan. Yeast 20:973-983.

20) Cervantes-Chávez, J.A. & Ruiz-Herrera, J. (2006) STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 6(5):801-815.

21) Cervantes-Chávez, J.A., Kronberg, F., Passeron, S. & Ruiz-Herrera, J. (2009) Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. Fung Genet Biol. 46: 390-399.

22) Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. & Oudot, J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in Microbiology 155: 587-595.

23) Davidow, L. S., Kaczmarek, F. S., Dezeeuw, J. R., Conlon, S.W., Lauth, M. R., Pereira, D. A. & Franke, A. E. (1987) The *Yarrowia lipolytica* Leu2 gene. Curr Genets. 11(5):377-383.

24) Douglas, L.M., Li, L., Yang, Y. & Dranginis, A.M. (2007) Expression and Characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* Mannoprotein with Homotypic Properties of Adhesion. Eukaryotic Cell 6(12):2214-2221.

25) Djordjevic, J.T. (2010) Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptoccoccus neoformans*. Frontiers Microb. 1:1-13.

26) Dufossé, L., Latasse, A. & Spinnler, H.M. (1994) Importances des lactones dans les arômes alimentaires: structure, distribution, proprieties sensorielles et biosynthèse. Sc Aliments. 14:17-50.

27) Dujon, B., Sherman, D., Fisher, G., Durens, P., Casaregola, S., Lafontain, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S.,Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C. Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Huller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalageropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C.,

Waissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J.L. (2004) Genome evolution in yeasts. Nature 430:35-44.

28) Ecker M., Deutzmann R., Lehle, L., Mrsă, V., & Tanner, W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β-1,3-glucane by a new protein-carbohydrate linkage. J Biol Chem 281:11523-11529

29) Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. & Eisenhaber, F. (2004) A sensitive predictor for the potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. J Mol Biol 19;337(2):243-253.

30) Endrizzi-Joran, A. (1994) Thèse, ENSBANA, Université de Bourgogne, Dijon.

31) Endrizzi, A., Pagot, Y., Le Clainche, A. Nicaud, J.M. & Belin, J.M. (1996) Production of lactones and peroxysomal β-oxidation in yeasts. Crit Rev Biotechnology 16:301-329.

32) Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Kondo, H. & Matsumoto, H. (1998) Protective roles of two aluminium induced genes, *HSP150* an *SED1* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. FEMS Microbiol Lett. 159:99-105.

33) Fikers, P., Le Dall, M. T., Gaillardin, C., Thonart, P. & Nicaud, J. M. (2003) New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods. 55(3):727-737.

34) Fikers, P., Benetti, P.H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. & Nicaud, J.M. (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research 5:527-543.

35) Fikers, P., Marty, A., & Nicaud, J.M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnology Adv. 29(6):632-644.

36) Firon, A., Lesage, G. & Bussey, H. (2004) Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. Curr Opin Microbiol. 7(6):617-623.

37) Fournier, P., Guyaneaux, L., Chasles, M. & Gaillardin, C. (1991) Scarcity of ars sequences isolated in morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Yeasts. 7:25-36.

38) Frieman, M.B. & Cormack, B.P. (2003) The ω-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. Mol Microbiol 50(3): 883-896.

39) Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G. & Ebizuka, Y. (2000) Enzymatic synthesis of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalene solely from malonyl coenzyme A by a fungal iterative type I polyketide synthase PKS1. Biochemistry 39:8853-8858.

40) Fujii, I., Yasuoka, Y., Tsai, H.F., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. & Ebizuka, Y. (2004) Hydrolytic polyketide shortening by Ayg1p, a novel enzyme involved in fungal melanin biosynthesis. J Biol Chem 22(43):44613-44620.

41) Gaillardin, C., Ribet, A. M. & Heslot, H. (1985) Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr Genet. 10:49-58.

42) Gaillardin, C. & Ribet, A. M. (1987) Leu2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. Curr Genet 11:369-375.

43) García, R., Rodríguez-Peña J.M., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. (2009) The high osmotic response and cell wall integrity patways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 284(16):10901-10911.

44) Gatfield I.L. (1999) Biotechnological production of natural flavor materials. In: Teranishi R, Wick E L, Hornstein I, editors; Teranishi R, Wick E L, Hornstein I, editors. Flavor chemistry, thirty years of progress. New York, N.Y: Plenum Press. pp. 211–227.

45) Hartley, A.D., Ward, M.P., & Garrett, S. (1994) The Yak1 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* moderates thermotolerance and inhibits growth by a Sch9 protein kinase-independent mechanism. Genetics 136:465-474.

46) Helm, D., Labishinski, H., Schallehn, G. & Naumann, D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infra-red spectroscopy. J. Gen. Microbiol 137:69-79.

47) Heung L.J., Kaiser, A.E., Luberto, C. & Del Poeta M. (2005) The role and mechanism of diacylglycerol-protein kinase C1 signaling in melanogenesis by *Cryptococcus neoformans*. The J Biol Chem. 290(31):28547-28555.

48) Hwang J-S., Seo D-H., & Kim, J-Y. (2006) Soluble forms of YlCrh1p and YlCrh2p, cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*, have β-1,3-glycosidase activity. Yeast 23:803-812.

49) Igual, J.C., Johnson, A.L. & Johnston, L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor SWI4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. EMBO J. 15(18):5001-5013.

50) Iida, T., Sumita, T., Ohta, A. & Takagi, M. (2000) The cytochrome P450ALK multigene family of an *n*-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. Yeast 16:1077-1087.

51) Jaafar, L., Moukadiri, I. & Zueco, J. (2003) Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. Yeast 15;20(5):417-426

52) Jacobson, E.S. (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev. 13(4):708-717.

53) Jung, U.S. & Levin, D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signaling pathway. Mol Microbiol. 34(5):1049-1057.

54) Kanehisa, M. & Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucl Acids Res. 28(1): 27-30.

55) Ketela, T., Green, R. & Bussey, H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. J Bacteriol. 181(11):33330-3340.

56) Klis, F.M., Pieternella, M., Hellingwerf, K. & Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 26:239-256.

57) Klis, F.M., Boorsma, A. & De Groot P.W.J. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23: 185-202.

58) Kohlwein, S.D. & Paltauf, F. (1984) Uptake of fatty acids by the yeasts Saccharomyces uvarum and Saccharomycopsis lipolytica. Biochim Biophys Acta 792 (3):310-317.

59) Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. & Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-6)-glucan

interconnects mannoprotein, beta(1-3)-glucan, and chitin. J Biol Chem 11;227(28):17762-17775.

60) Kreger van Rij, N. (1984) The yeasts, a taxonomic study. Elsvier Science & Technology.

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G. & Brakhage, A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol. 38:143-158.

61) Le Clainche, A. (1997) Maîtrise de la production de γ-lactone par la levure Yarrowia lipolytica: mise en evidence de l'existence d'une famille multigénique d'acyl-CoA oxydases. ParisGrignon, France: Institute National Agronomique.

62) Le Dall, M. T., Nicaud, J. M. & Gaillardin, C. (1994) Multiple-coppy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr Genet. 26:38-44.

63) Lesage, G. & Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Mol Biol Rev. 70(2):317-343.

64) Levin, D. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Mol Biol Rev. 69(2):262-291.

65) Lipke, P. N. & Kurjan, J. (1998) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. Microb Rev. 56(1):180-194.

66) Lipke, P. N. & Ovalle, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J. Bacteriol. 180(15): 3735-3740.

67) Lo, W. S. & Dranginis, M. (1996) *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* Genes, encodes a novel cell surface flocculin. Journal of Bacteriology 178(24):7144-7151

68) Luo, Y.S., Wang, H.J., Gopalan, K.V., Srivastava, D.K. Nucaud, J-M. & Chardot, T. (2000) Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Arch Biochem Biophys.384:1-8.

69) Ly, M.H., Naïtali, M., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M., Le, T.M., Belin, J-M. & Waché, Y. (2006) Importance of the surface charge of bacteria to control the stability of emulsions. International Journal of Food Microbiology 112:26-34.

70) Mafakher, L., Mirbagheri, M., Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. & Emtiazi, G. (2010) Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. New Biotechnology 27(4):337-340

71) Malcher, M., Schladebeck, S. Mösch, H.U. (2011) The Yak1 protein lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 187(3):717-730.

72) Marchler-Bauer, Anderson J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, Ch. Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N. & Bryant, S.H. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. Nucleic Acids Res. 37:D205-D210.

73) Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. & Latgé, J-P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. J Biol Chem. 275:14882-14889.

74) Mrsă, V., Seidl, T. Gentzsch, M. & Tanner, W. (1997) Specific labelling cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-manosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13(12):1145-1154.

75) Naumann, D., Helm, D. & Labishinski, H. (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351:81-82.

76) Neuveglise, C., Feldmann, H., Bon, E., Gaillardin, C. & Casaregola, S. (2002) Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeats. Genome Res. 12:930-943.

77) Nicaud, J-M., Belin, J-M., Pagot, Y. & Endrizzi-Joran, A. (1996) Bio-conversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound. Fr Patent FR2734843.

78) Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I. & Brown, A.J.P. (2009) Phylogenetic diversity of stress signaling pathways in fungi. BMN Evolution Biol. 9(44):doi:10.1186/1471-2148-9-44.

79) Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol 5:203-223.

80) Okui, S., Uchiyama, M. & Mizugaki, M. (1963) Metabolisme of hydroxyl fatty acids: 1. Metabolic conversion of ricinoleic acid by a certain microorganism to 8-D-(+)-hydroxr tetradec-cis-5-enoic acid. J Biochem. 53:265-270.

81) Osmudsen, H., Bremer, J. & Pedersen, J.I. (1991) Metabolic aspects of peroxisomal β-oxidation. Biochim Biophys Acta 1085:141-158.

82) Osumi, M., Fukuzumi, F., Yamada, N., Nagatani, T., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, S. (1975) Surface structure of some *Candida* yeast cell grown on n-alkanes. Journal of Fermentation Technology 53(4): 244-248.

83) Ota, Y., Oikawa, S., Morimoto, Y., & Minoda, Y. (1984) Nutritional factors causing mycelia development of *Saccharomycopsis lipolytica*. Agric Biol Chem 48: 1933-1939.

84) Pagot, Y., Le Clainche, A., Nicaud, J.M., Waché, Y. & Belin, J.M. (1998) Peroxisomal β-oxidation activities and γ-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol. 49(3):295-300.

85) Papanikolaou, S. & Aggelis, G. (2003) Modeling mipid accumulation and degradation in Yarrowia lipolytica cultivated on industrial fats. Curr Microbiol 46:398-402.

86) Pihet, M., Vandeppute, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F. & Bouchara, J.P. (2009) Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Microbiol 9:177 doi:10.1186/1471-2180-9-177

87) Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C. & Gil, C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. Mol. Cell Proteomics 1: 967-982

88) Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2008) Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. Methods Mol Biol 425:217-239

89) Plonka, P.M. & Grabacka, M. (2006) Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. Acta Biochem Polinica 53(3):429-443.

90) Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. & Klis, F.M. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. Yeast 10:1019-1030.

91) Ram, A.F. & Klis, F.M. (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on calcofluor white and congo red. Nat Protocols 1(5):2253-2256.

92) Richard, M.L., & Plaine, A. (2007) Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. Eukaryot Cell 6(2): 119-133.

93) Rodríguez, C. & Domínguez, A. (1984) The growth characteristics of Saccharomycopsis lipolytica: morphology and induction of mycelium formation. Can J Microbiol 30:605-612.

94) Rodríguez-Peña, J.M., García R., Nombela, C. & Arroyo, J. (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay : a yeast dialogue between MAPK routes. Yeast 27:495-502.

95)Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J., & Makarow, M. (1992) A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glucoprotein. Proc Natl Acad Sci 89:3671-3675.

96) Russo, P., Simonen, M., Uimari, A., Teesalu, T., & Makarow, M. (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast *HSP*150 gene encoding a secretory glycoprotein. Molecular and General Genetics 239(1-2):273-80.

97) Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T. & Brakhage, A.A. (2009) Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microb. 75(2):493-503.

98) Šesták, S., Hagen, I., Tanner, W., Makarow, & Strahl, S. (2004) Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 150:3197-3208.

99) Shahinian, S. & Bussey, H. (2000) β-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 35(3):477-489.

100) Sherman D.J., Martin T., Nikolski M., Cayla C., Souciet J.L., & Durrens P. Génolevures Consortium (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. Nucleic Acids Res. 37 (Database issue) D550-4.

101) Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., de Castro E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A. & Hulo, N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. Nucl Acids Res 38(Database issue):161-166.

102) Singh, A. & Del Poeta, M. (2010) Lipid signaling in pathogenic fungi. Cell Microbiol 13(2):177-185.

103) Soares, E.V. (2010) Flocculation in Saccharomyces cerevisiae: a review. J Appl Microb 110:1-18.

104) Steczkiewicz, K., Knizewski, L., Rychlewski, L., & Ginalski, K. (2010) TOS1 is circularly permuted 1,3-β-glucanase. Cell Cycle 9(1):201-204.

105) Ta, T.M., Cao-Hoang L., Phan-Thi, H., Tran, H.D., Souffou, N., Gresti, J., Maréchal, P.A., Cavin, J.F. & Waché, Y. (2010) New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. Appl Microbiol Biotechnol. 87(3):1089-1099.

106) Ta, T.M., Cao-Hoang L., Romero-Guido, C., Lourdin, M., Phan-Thi, H., Goudot, S., Maréchal, P.A. & Waché, Y. (2012) A shift of 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and elevate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol. 93(5):2125-2134.

107) Teparić, R., Stuparević I. & Mrša, V. (2004) Increased mortality of Saccharomyces cerevisiae cell wall protein mutants. Microb 150:3145-3150.

108) Thevenieau, F., Nicaud, J.M., & Gaillardin, C. (2008) Application of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In: Kunze SA, Satyanarayana T (eds) Diversity and potential biotechnological applications of yeasts. Elsevier, Amsterdam.

109) Thiéry, J.P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie 6:987-1018.

110) Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. & Matsui, Y. (1993) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other; and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. Yeast 9(5):481-494.

111) Tompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignement through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

112) Tse, C. & Capeau, J. (2003) Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps reel. Annale Biol Clinique. 61:279-293.

113) Valiante, V. Jain, R., Heinekamp, T. & Brakhage, A.A. (2009) The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 46:909-918.

114) Waché, Y., Bergmark, K., Courthaudon, J-L., Aguedo, M., Nicaud, J-M. & Belin, J-M. (2000a) Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. Lett of Appl Microbiol 30:183-187.

115) Waché, Y., Laroche, C., Bergmark, K., Moller-Andersen, C., Aguedo, M., Le Dall, M-T., Wang, H., Nicaud, J-M. & Belin, J-M. (2000b) Involvement of acyl CoA oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol. 66(3):1233-1236.

116) Waché, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J-M. & Belin, J-M. (2001) Role of β-oxidation enzymes in γ-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol. 67(12):5700-5704.

117) Waché, Y., Aguedo, M., Le Dall, M.T. Nicaud, J-M. & Belin, J-M. (2002) Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β-oxidation pathway for γ-decalactone production. J Mol Catal B: Enzym. 19-20:347-351.

118) Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J-M. & Belin, J-M. (2003) Catabolisme of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol. 61:393-404.

119) Wang, H.J., Le Dall M.T., Waché, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Gaillardin, C., & Nicaud, J.M. (1999a) Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the *n*-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Bacteriology 181(17):5140-5148.

120) Wang, H.J., Le Dall M.T., Waché, Y., Laroche, C., Belin, J.M., & Nicaud, J.M. (1999b) Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochemistry and Biophysics 31:165-174.

121) Wickerman, L.J., Kurtzman, C.P., Herman, A.I. (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. Science 167:1141-1147.

122) Yarrow, D. (1972) Four new combinations in yeasts. A Van Leeuw 38:357-360.

123) Yun, D.J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., & Bressan, R.A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. Proc Natl Acad Sci 24; 94(13):7082-7087.

124) Yuzbasheva, E.V., Yuzbashev, T.V., Laptev, I.A. Konstantinova, T.K. & Sineoky, S.P. (2011) Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnology DOI 10.1007/s00253-011-3265-8

125) Zu, T., Verna, J. & Ballester, R. (2001) Mutations in *WSC* genes for putative stress receptors resunl in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics 266(1):142-155.

http://www.yeastract.com (Mars, 2009)

http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html (Juin, 2011)

http://www.genome.jp/kegg/ (Juin, 2011)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml (Juin, 2011)

http://prosite.expasy.org/ (Juin, 2011)

http://www.genome.jp/kegg/ (Juin, 2011)

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2 (Avril 2012)

htt://pfam.sanger.ac.uk (Avril 2012)