



HAL
open science

Compréhension du métabolisme central et lipidique chez les plantes et les levures oléagineuses : approche fluxomique

Anthony Degournay

► **To cite this version:**

Anthony Degournay. Compréhension du métabolisme central et lipidique chez les plantes et les levures oléagineuses : approche fluxomique. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2018. Français. NNT : 2018COMP2438 . tel-01983553

HAL Id: tel-01983553

<https://theses.hal.science/tel-01983553v1>

Submitted on 5 Feb 2019

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.

Par **Anthony DEGOURNAY**

*Compréhension du métabolisme central et lipidique
chez les plantes et les levures oléagineuses :
approche fluxomique*

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 19 octobre 2018

Spécialité : Biotechnologie : Unité de recherche Génie
Enzymatique et Cellulaire - GEC (FRE-3580)

D2438

UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Ecole Doctorale Sciences pour l'Ingénieur
Laboratoire CNRS UMR 7025 : Génie Enzymatique et Cellulaire

Thèse

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Spécialité : Biotechnologie

Anthony DEGOURNAY

COMPREHENSION DU METABOLISME CENTRAL ET LIPIDIQUE CHEZ LES PLANTES ET LES LEVURES OLEAGINEUSES – APPROCHE FLUXOMIQUE

Vendredi 19 Octobre 2018

Composition du Jury

COLOMBIE S.	Chargé de Recherche INRA. UMR 1332 - Biologie du Fruit et Pathologie, Université de Bordeaux.	Rapporteur
VIROLLE M-J.	Directrice de Recherche CNRS. UMR 9198 - Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Université Paris-Sud.	Rapporteur
NICAUD J-M.	Directeur de Recherche INRA. UMR 1319 - Institut Micalis, Université Paris Saclay.	Examinateur
NONUS M.	Ingénieur de Recherche. EA 4297 - Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, Université de Technologie de Compiègne	Examinateur
VAN WUYTSWINKEL O.	Professeur des Universités. EA 39000 - Biologie des Plantes et Innovation, Université de Picardie Jules Verne.	Examinateur
THOMASSET B.	Directrice de Recherche CNRS. UMR 7025 - Génie Enzymatique et Cellulaire, Université de Technologie de Compiègne.	Directrice de thèse

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements au Dr Sophie Colombié, Dr Marie-Joëlle Virolle, Dr Jean-Marc Nicaud, Dr Maurice Nonus et Pr Olivier Van Wuytswinkel pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier le Pr Karsten Haupt, directeur du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire (CNRS UMR 7025) de m'avoir accueilli pour effectuer mes travaux de thèse à l'Université de Technologie de Compiègne.

J'adresse mes remerciements au Dr Brigitte Thomasset pour sa grande confiance, son écoute, sa disponibilité, les libertés qu'elle m'a accordé ainsi que pour l'ensemble des échanges scientifiques et conseils apportés tout au long de cette thèse.

Un grand merci au Dr Sébastien Acket pour son aide précieuse dans le développement de méthodes d'analyse, la conception des modèles de fluxomique et les nombreux échanges scientifiques. Je remercie également Franck Merlier pour son expertise analytique.

Je remercie les différents acteurs des sous-programmes 2 et 4 de l'ITE PIVERT sur lesquels mes travaux ont pu s'appuyer.

Je remercie le Dr Maurice Nonus et Dr Nabila Imatoukene, pour leurs conseils avisés et l'aide apportée pour l'étude de la levure *Yarrowia lipolytica*.

Merci à l'ensemble du personnel permanent, aux doctorants et aux post-doctorants du laboratoire pour leurs nombreux conseils, scientifiques ou non, leur gentillesse, leurs rires et leur bonne humeur : une mention spéciale pour Amel, Ghada, Nabila, Zeinab, Adrian, Bertrand, Mounir, Sébastien et Yannick, sans qui ces trois années auraient été totalement différentes.

J'exprime enfin toute ma gratitude et mon amour à ma famille et mes proches pour le soutien dont ils ont toujours fait preuve : mes parents sans qui rien n'aurait été possible, Mélanie, Alexandre, Agathe, Fabien, et tous les autres, pour leur présence dans ma vie. Merci !

Liste des Abréviations

2-PG : 2-Phospho-D-glycérate	ASPsa : Aspartate 4-semialdéhyde
3-PG : 3-Phospho-D-glycérate	ATP : Adénosine triphosphate
6PG : 6-phosphogluconate	BGL : β -galactosidase
6PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase	BHLH : Basic helix-loop-helix (facteur de transcription)
AA : Acides aminés	BSA : Bovine serum albumin
ABA : Acide abscissique	BtL : Biomass to liquid
ACA : Acétaldéhyde	CCM : Chromatographie sur couche mince
ACC : Acétyl-CoA carboxylase	CDP : Cytidine-diphosphate
AcCoA : Acétyl-CoA	CFA : Acides gras cyclopropane
ACE : Acétate	CFAS : CFA synthase
ACL : ATP citrate lyase	Cit : Citrate
ACP : Acyl-carier protein	Citru : Citruline
ACS : Acétyl-CoA synthase	CLA : Acide linoléique conjugué
ADN : Acide désoxyribonucléique	CM : Matrice correctrice
ADP : Adénosine diphosphate	CO ₂ : Dioxyde de carbone
ADPG : ADP-Glucose	CoA : Co-enzyme A
AEP : Protéase alcaline extracellulaire	CPT : Choline phosphotransférase
AG : Acide gras	CTI : <i>Cis-trans</i> isomérase
AGI : Acides gras inhabituel	CW : Paroi cellulaire
AGL : Acide gras libre	Cys : Cystéine
AKG : 2-oxoglutarate	DAG : Diacylglycérol
Ala : Alanine	DAH : L-2-amino-6-oxoheptanedioate
ALA : Acide linoléique	DEPC : Diethyl pyrocarbonate
ALD : Acétaldéhyde déshydrogénase	DGAT/DGA2 : Diacylglycérol acyltransférase
AMP : Adénosine monophosphate	DHA : Acide docosahexaénoïque
AMPK : AMP-activated protein kinase	DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	DI : Index de désaturation
Aro : précurseur des AA aromatiques	DO : Densité optique
ARN : Acide ribonucléique	DPA : (2S,4S)-4-hydroxy-2,3,4,5- tetrahydrodipicolinate
Arg : Arginine	dPG : 1,3-diphosphoglycérate
Asn : Asparagine	E4P : Erythrose-4-phosphate
Asp : Aspartate	

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique	<i>gène</i> : Nomenclature adoptée pour un gène muté
EI : Ionisation électronique	GFP : Green fluorescent protein
ELO2 : Elongase 2	GIDH : Glutamate déshydrogénase
EPA : Acide eicosapentaénoïque	GK : Glycérol kinase
EPT Ethanolamine phosphotransférase	Glc : Glucose
ER : Enoyl-réductase	Gln : Glutamine
ES : Sterol ester	Glu : Glutamate
ESI : Electrospray Ionization	GLU5P : Glutamyl-5-phosphate
EST : Expressed sequence tag	GLUSE : L-glutamate 5-semialdéhyde
F1,6bP, FBP : Fructose-1,6-bisphosphate	Glx : Glyoxylate
F6P : Fructose-6-phosphate	Gly : Glycine
FA : Fatty acid/Acide gras	GOPOD : Glucose oxidase/ peroxydase
FABP : Fatty acid binding protein	GPAT/GPD1 : Glycérol-3-phosphate acyltransférase
FAD : Flavine adénine dinucléotide	GPT : Glucose-6-phosphate/phosphate translocator
FAD 2 et 3 : Fatty acid desaturase 2 et 3	GRAS : Generally recognized as safe
FAME : Esters méthyliques d'acides gras	GSY : Glycogène synthase
FAS : Acide gras synthase/Fatty acid synthase	GUT 1 et 2 : Glycérol kinase et glycerol-3-phosphate déshydrogénase
FATA/B : Fatty acyl-ACP thioestérase A/B	HAD : Hydroxyacyl-ACP
FBA : Flux Balance Analysis	HDL : High density lipoprotein
FDA : Food and drug administration	His : Histidine
FID : Détecteur à ionisation de flamme	HK : Hexokinase
Fru : Fructose	HOG : High osmolarity glycerol
Fum : Fumarate	HPLC : Chromatographie liquide haute performance
G1P : Glucose-1-phosphate	HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
G3P : Glycérol-3-phosphate	IC : Enrichissement isotopique
G3PDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	ICit : Isocitrate
G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase	IDH : Isocitrate déshydrogénase
GAP : Glycéraldéhyde-3-phosphate	Ile : Isoleucine
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate	INCA : Isotopomer network
GC : Chromatographie en phase gazeuse	comportmental analysis
<i>GENE</i> : Nomenclature adoptée pour un gène exprimé	ITE : Institut de Transition Energétique

IUCPA : Union Internationale de Chimie
 Pure et Appliquée
 JAF : Jours après floraison
 KAR : Cetoacyl-ACP réductase
 KAS : Cétoacyl-ACP synthase
 KO : Knock out
 LA : Acide linoléique
 LACS : Long chain acyl-CoA synthase
 LB : Borne inférieure
 LCB : Bases à longue chaîne
 LDL : Low density lipoprotein
 Leu : Leucine
 LEU2 : Isopropyl malate déshydrogénase
 LIP : Lipase
 LPAAT : Lysophosphatidic acid acyl
 transférase
 LPC : Lysophosphatidylcholine
 LPCAT : lysophosphatidylcholine
 acyltransférase
 LRO1 : phospholipid-dependent
 diacylglycerol acyltransferases
 Lys : Lysine
 MAG : Monoacylglycérol
 Mal : Malate
 MCMT : Malonyl-CoA : ACP
 malonyltransférase
 mDAH : méso-2,6-diaminoheptanedioate
 MDH : malate déshydrogénase
 MDV : Mass distribution vector
 MEP1 et 2 : Capteurs d'ammonium
 MFA : Metabolic flux analysis
 Met : Methionine
 MOMA : Minimization of metabolic
 adjustment
 MS : Spectrométrie de masse/Matière
 sèche
 MYB : facteur de transcription pour le site
 c-Myb
 NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
 NADH : Nicotinamide adénine
 dinucléotide réduit
 NADP : Nicotinamide adénine
 dinucléotide phosphate
 NADPH : Nicotinamide adénine
 dinucléotide phosphate réduit
 NIST : National Institute of Standards and
 technology
 OAA : Oxaloacétate
 OGM : Organisme génétiquement modifié
 OPPP : Voie oxydative des pentoses
 phosphate
 PA : Acide phosphatidique
 PAI : Isomérase de Propionibacterium
 acnes
 PAP : Phosphatidate phosphatase
 PC : Phosphatidylcholine
 PCO₂ : Pression partielle de CO₂
 PCR : Polymerase chain reaction
 PDAT : Phospholipid diacylglycerol
 acyltransférase
 PDC : Pyruvate décarboxylase
 PDCT : phosphatidyl-choline
 diacylglycerol choline phosphotransférase
 PDH : Pyruvate déshydrogénase
 PE : Phosphatidyl-éthanolamine
 PEG : Polyéthylène glycol
 PEP : Phosphoenolpyruvate
 PEPC : PEP carboxylase
 PGAM : 2,3-bisphosphoglycérate-
 independent phosphoglycérate mutase
 PGP : Phosphatidylglycerol phosphate
 Phe : Phénylalanine
 PI : Phosphatidyl-inositol
 PIVERT : Picardie Innovations Végétales,
 Enseignements et Recherches
 Technologiques

PKC : Pyruvate kinase C
 PLA, B, C : Phospholipases A, B, C
 Pma1 : pompe à proton de type P
 PO₂ : Pression partielle de O₂
 POX : peroxisomal acyl-CoA oxydase
 PPE : Phosphopentose épimérase
 PPP : Voie des Pentoses Phosphate
 pPT : plastidic phosphate translocator
 PPT : Phosphoenolpyruvate/phosphate translocator
 Pro : Proline
 PROTEINE : Nomenclature adoptée pour une protéine
 PS : Phosphatidyl-sérine
 pTEF : promoteur TEF, facteur de traduction et d'élongation
 PUFA : Acides gras polyinsaturés
 Pyr : Pyruvate
 Q-TOF : Spectromètre de masse à temps de vol
 RE : Réticulum endoplasmique
 Ri5P : Ribose-5-phosphate
 Ri5PI : Ribose-5-phosphate isomérase
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 Rpm : rotations par minute
 Ru5P : Ribulose-5-phosphate
 RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
 S7P : Sédoheptulose-7-phosphate
 SAD : Stearoyl-ACP désaturase
 SAM : S-adenosine méthionine
 SCD : synthetic complete glucose
 SCG : Synthetic complete glycerol
 SDS : Dodécylsulfate de sodium
 Ser : Serine
 SNF : Sucrose non-fermenting
 SP : Sous-programme
 SPS : Ssy1-Ptr3-Ssy5
 SSP : Protéine de stockage des graines
 SSR : Sum-of-squared residuals
 Suc : Saccharose
 Succ : Succinate
 SuccCoA : Succinyl-CoA
 SucP : Saccharose phosphate
 SuSy : Sucrose Synthase
 TAG : Triacylglycérol
 Taldo : Transaldolase
 TCA cycle : Cycle de Krebs
 TGL4 : Triacylglycerol lipase 4
 THF : Tétrahydrofurane
 Thr : Thréonine
 TKT : Transcétolase
 TLES : Tris-HCl, LiCl, EDTA et SDS
 TP : Triose phosphate
 TPA : 2,3,4,5-Tétrahydrodipicolinate
 TPT : Triose phosphate /phosphate translocator
 Trp : Tryptophane
 Tyr : Tyrosine
 UB : Borne supérieur
 UDP : Uridine diphosphate
 UDPG : Uridine diphosphate-glucose
 URA3 : Orotidine-5'-phosphate décarboxylase
 UTC : Université de technologie de Compiègne
 UTP : Uridine triphosphate
 Val : Valine
 Vnet : Flux net
 Vxch : Flux d'échange
 WRI : Wrinkled
 WRKY : Facteur de transcription avec domaine conservé WRKYGQK
 WT : Wild type
 XPR : Protéase alcaline

XPT : Xylulose-6-phosphate/phosphate
translocator

Xy5P, X5P : Xylulose-5-phosphate

XYL1 et 2 : Xylose réductase et
déshydrogénase

YPD : Yeast extract peptone

YPG : Yeast extract peptone glycérol

YNB : Yeast nitrogen base

Liste des Figures

Figure 1 : Composition et structure de la membrane cytoplasmique, adapté de Lombard, 2014	7
Figure 2 : Structure chimique et mode de stockage des triglycérides	8
Figure 3 : La culture des oléagineux en France.....	10
Figure 4 : Filières classiques des biocarburants de première génération (IFP Énergies nouvelles)	17
Figure 5 : Différents types de biocarburants produits à partir de microalgues ou de cyanobactéries, adapté de Shuba et Kifle (2018)	18
Figure 6 : Transport des photoassimilats vers les organes de réserve, adapté de Yadav <i>et al.</i> , 2015 et Lemoine <i>et al.</i> , 2013	21
Figure 7 : Génération des précurseurs des triglycérides chez les plantes oléagineuses d'après Baud et Lepiniec, 2010.....	22
Figure 8 : La RuBisCO au sein du Cycle de Calvin, adapté de Ducat et Silver (2012).....	23
Figure 9 : Implication des différents transporteurs dans la synthèse des précurseurs de triglycérides, adapté de Ryu <i>et al.</i> , 2016	24
Figure 10 : Synthèse d'acétyl-CoA chez la levure	25
Figure 11 : Synthèse des acides gras et constitution du pool d'acyl-CoA	27
Figure 12 : Synthèse des triglycérides, phospholipides, sphingolipides et stockage	29
Figure 13 : Quatre classes de phospholipases	30
Figure 14 : Exemples de modifications des phospholipides chez la bactérie, adapté de Zhang <i>et al.</i> , 2008.....	31
Figure 15 : Voie des pentoses phosphate	33
Figure 16 : Les approches « omic » et leur domaine d'étude en biologie systémique, d'après Sánchez-Vidaña <i>et al.</i> , 2017.....	35
Figure 17 : États métabolique et isotopique stationnaires, adapté de Dieuaide-Noubhani et Alonso, 2014 (Chapitre 1).....	38
Figure 18 : Comparaison des informations collectées suite à une analyse par spectrométrie de masse (A) et résonance magnétique nucléaire (B) d'après O'Grady <i>et al.</i> , 2012	39

Figure 19 : Principe de la modélisation basée sur la contrainte par FBA, adapté d'Orth <i>et al.</i> (2010)	41
Figure 20 : Croissance de la plante de lin, d'après "Growing flax : production, management and diagnostic guide" (Anonymous, 1996).....	44
Figure 21 : Voies métaboliques sollicitées pour la synthèse d'acétyl-CoA chez différents organismes, adapté d'Alonso <i>et al.</i> (2007), Sriram <i>et al.</i> (2004), Schwender <i>et al.</i> (2003), Smith <i>et al.</i> (1992) et Alonso <i>et al.</i> (2010)	48
Figure 22 : Représentation schématique du métabolisme central durant le développement de la graine de lin, d'après Barvkar <i>et al.</i> (2012).....	50
Figure 23 : Contrôle de l'accumulation des composés de réserves dans les graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Santos-Mendoza <i>et al.</i> (2008)	51
Figure 24 : Carte de flux différentiels des embryons du mutant wril d' <i>Arabidopsis thaliana</i> contre son témoin, d'après Lonien et Schwender (2009).....	52
Figure 25 : Obtention du fragment de Mc Lafferty après fragmentation des esters méthyliques d'acides gras.....	53
Figure 26 : Cycle de développement de la levure	56
Figure 27 : Effet d'une carence en azote sur les flux métaboliques, adapté de Zhang <i>et al.</i> (2016)	61
Figure 28 : Définition des flux nets et d'échange d'après Wiechert <i>et al.</i> , 2001.....	83
Figure 29 : Caractérisation biochimique des graines de lin matures (50 JAF)	87
Figure 30 : Croissance de la graine des lignées Astral, Solal et 238.....	88
Figure 31: Cinétique d'accumulation des composés de la biomasse des graines des lignées Astral, 238 et Solal	89
Figure 32 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée Astral.....	90
Figure 33 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée 238	91
Figure 34 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée Solal	91
Figure 35 : Profil en acides gras de la lignée Astral à 50 JAF par GC-FID.....	92
Figure 36: Evolution de la composition de l'huile de lin à partir de graines des lignées Astral, Solal et 238.....	93
Figure 37 : Profil lipidique des lignées Astral, 238 et Solal, à 16, 24 et 32 JAF	94
Figure 38 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez Astral	96

Figure 39 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez 238	96
Figure 40 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez Solal.....	96
Figure 41: Voies d'incorporation du C18:2 et C18:3 chez les lignées Astral et 238	97
Figure 42 : Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée Astral	99
Figure 43: Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée 238.....	99
Figure 44: Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée Solal.....	100
Figure 45: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée Astral	101
Figure 46: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée 238	101
Figure 47: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée Solal.....	102
Figure 48 : Profil en acides aminés (majoritaires) issus de l'hydrolyse protéique chez les lignées Astral, 238 et Solal	103
Figure 50 : Analyse des flux métaboliques de la graine de lin de la lignée Astral à 24 JAF par MFA (Acket <i>et al.</i> , 2018)	110
Figure 51 : Flux majoritaires de la lignée Astral à 16 JAF obtenus par FBA	112
Figure 52 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 10 JAF	113
Figure 53 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 16 JAF	114
Figure 54 : Carte de flux différentiels FBA de graines de lin à 16 JAF.....	115
Figure 55 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 24 JAF	117
Figure 56 : Carte de flux différentiels FBA de graines de lin à 24 JAF.....	118
Figure 57 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 32 JAF	120
Figure 58 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 38 JAF	121
Figure 59 : Evolution de la vitesse d'assimilation des substrats au cours du temps	122
Figure 60 : Evolution du rapport de la vitesse de dégradation de l'amidon sur la vitesse de synthèse des TAG au cours du temps.....	124
Figure 62 : Evolution de la vitesse de génération de NADPH et son devenir	128
Figure 63 : Carte de flux différentiels entre la lignée Astral _{WT} et Astral TAG _{+25%}	130
Figure 64 : Schéma bilan de la synthèse des PUFA chez la graine de lin.....	136
Figure 65 : Schéma récapitulatif des transformations génétiques effectuées sur les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	138

Figure 66 : Croissance de la souche JMY3501 sur glucose et glycérol	139
Figure 67 : Assimilation des substrats carboné et azoté chez la souche JMY3501	141
Figure 68 : Synthèse des lipides totaux au cours du temps chez la souche JMY3501.....	141
Figure 69 : Profil en acides gras saturés, insaturés (A) et totaux (B) selon la source de carbone chez la souche JMY3501.....	142
Figure 70 : Séparation, identification et quantification des espèces lipidiques par CCM chez la souche JMY3501 sur milieu minimum glucose et glycérol	144
Figure 71 : Profil en acides gras observés sur le PC, TAG et DAG de la souche JMY3501 sur milieu minimum glucose et glycérol	145
Figure 73 : Synthèse des protéines totales au cours du temps chez la souche JMY3501	147
Figure 74 : Profil en acides aminés chez la souche JMY3501 au cours du temps.....	148
Figure 75 : Synthèse des glucides totaux au cours du temps chez la souche JMY3501	149
Figure 76 : Evolution du pH au cours du temps chez la souche JMY3501	151
Figure 77 : Composition biochimique de la biomasse de la souche JMY3501 à T72 et cultivée sur milieu minimum glucose (A) ou glycérol (B)	153
Figure 78 : Croissance des souches JMY3501, JMY5578 et JMY5289 sur glucose.....	155
Figure 79 : Assimilation des substrats carboné et azoté chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	155
Figure 80 : Synthèse des lipides totaux au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	157
Figure 81 : Profil en acides gras totaux chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	158
Figure 82 : Séparation, identification et quantification des espèces lipidiques par CCM et GC-FID chez les souches JMY3501 (A), JMY5289 (B) et JMY5578 (C) à T72.....	159
Figure 83 : Profil en acides gras des DAG, PC et TAG chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	160
Figure 84 : Observation par microscopie à fluorescence des souches JMY3501 (A), JMY5289 (B) et JMY5578 (C) colorées au rouge de Nil à T24 (x400)	161
Figure 86 : Profil en acides aminés chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 au cours du temps	164

Figure 87 : Synthèse des glucides totaux au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.....	165
Figure 88 : Evolution du pH au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.....	166
Figure 89 : Composition biochimique de la biomasse des souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 à T72.....	168
Figure 90 : Réseau métabolique d'une cellule de levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	170
Figure 91 : Carte de flux métaboliques de la levure <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY3501 cultivée en milieu minimum (glucose) à T ₂₄	174
Figure 92 : Carte de flux métaboliques de la levure <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY3501 cultivée en milieu minimum (glycérol) à T ₂₄	176
Figure 93 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY3501 et JMY5289 cultivées en milieu minimum (glucose) à T ₂₄	180
Figure 94 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY5289 et JMY5578 cultivées en milieu minimum (glucose) à T ₂₄	182
Figure 95 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY5578 et JMY5578c générée par simulation MOMA à T ₂₄	186
Figure 96 : Optimisation de l'accumulation des triglycérides et régulations relatives aux acides gras cyclopropanes chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	190

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Structure chimique des différentes classes lipidiques selon l'IUCPA	5
Tableau 2 : Exemples de plantes productrices d'acides gras inhabituels.....	11
Tableau 3 : Croissance et productivité de <i>Yarrowia lipolytica</i> en condition de carence en azote et en mode fed-batch sur glucose d'après Kavšček <i>et al.</i> (2015).....	63
Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques des lignées Astral, Solal et 238	66
Tableau 5 : Génétique des souches JMY3501, JMY5578 et JMY5289.....	67
Tableau 6 : Index de désaturation des lipides chez Astral, 238 et Solal	95
Tableau 7 : Détermination des flux extracellulaires relatifs à la biomasse	108
Tableau 8 : Génération et devenir du NADPH.....	127
Tableau 9 : Liste non exhaustive de promoteurs inductibles durant la phase de synthèse des acides gras chez la graine de différentes espèces végétales	133
Tableau 10 : Calcul des flux métaboliques externes de la souche JMY3501 sur glucose et glycérol à T ₂₄	172
Tableau 11 : Calcul des flux métaboliques externes des souches JMY5289 et JMY5578 sur glucose à T ₂₄	178

Liste des Annexes

Annexe 1 : Liste des métabolites et abréviations (modèle FBA-lin)	216
Annexe 2 : Liste des réactions et abréviations (modèle FBA-lin).	218
Annexe 3 : Calcul des flux métaboliques chez les lignées Astral, 238 et Solal par FBA	221
Annexe 4 : Normalisation des flux métaboliques chez les lignées Astral, 238 et Solal	224
Annexe 5 : Liste des réactions (modèle MOMA-lin).....	227
Annexe 6 : Analyse MOMA d'une graine de lin de la lignée Astral à 24 JAF.....	230
Annexe 7 : Exemple de chromatogramme pour la séparation des AG de la souche JMY3501 (A) et JMY5578 (B) sur glucose (T ₇₂)	233
Annexe 8 : Spectre de masse d'un échantillon de milieu extracellulaire (T ₇₂) : souche JMY3501 sur glucose.....	234
Annexe 9 : Liste des métabolites et abréviations (modèle MFA/FBA-Levure).....	235
Annexe 10 : Liste des réactions et abréviations (modèle MFA/FBA-levure sur glucose).....	237
Annexe 11 : Liste des réactions et abréviations (modèle MFA/FBA-levure sur glycérol)....	242
Annexe 12 : Comparaison des « fit » mesurés et simulés (MFA levure sur glucose)	246
Annexe 13 : Comparaison des « fit » mesurés et simulés (MFA levure sur glycérol).....	249
Annexe 14 : Calcul des flux métaboliques par MFA : souche JMY3501	252
Annexe 15 : Liste des réactions en abréviations (modèle FBA-Levure)	256
Annexe 16 : Calcul des flux métaboliques par FBA : souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578	259
Annexe 17 : Analyse MOMA de la souche de levure <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY5578 et de ses dérivées.....	261

Table des Matières

Introduction Générale	1
Synthèse bibliographique	5
1. Les lipides chez le vivant	5
1.1. L'intérêt des lipides chez les organismes vivants	6
1.1.1. Les membranes biologiques	6
1.1.2. Le stockage d'énergie.....	7
1.1.3. La signalisation cellulaire.....	8
1.2. Les organismes oléagineux	9
1.2.1. Les plantes oléagineuses	9
1.2.2. Les levures oléagineuses	11
1.2.3. Les microalgues oléagineuses	12
1.2.4. Les bactéries oléagineuses.....	13
1.3. Les domaines d'application des lipides	13
1.3.1. Nutrition-Santé	14
1.3.2. Une alternative aux produits pétrosourcés	17
1.4. Métabolisme des organismes oléagineux.....	20
1.4.1. Import du substrat dans la cellule et synthèse des précurseurs	21
1.4.2. Métabolisme lipidique : synthèse, stockage et modification.....	27
1.4.3. Synthèse de cofacteurs : le NADPH	32
2. Compréhension des systèmes : le lin oléagineux (<i>Linum usitatissimum</i>) et la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	34
2.1. Préambule	34
2.1.1. Les organismes modèles.....	34
2.1.2. L'approche « omic »	35
2.2. Le lin, un organisme modèle chez les plantes oléagineuses	41
2.2.1. Une plante oléagineuse.....	41
2.2.2. Caractérisations génomique et outils génétiques du lin	45
2.2.3. Compréhension du métabolisme chez la graine de lin par une approche « omic »	46
2.3. <i>Yarrowia lipolytica</i> , un modèle levurien d'intérêt industriel.....	55

2.3.1. Une levure oléagineuse	55
2.3.2. Compréhension du métabolisme chez <i>Yarrowia lipolytica</i> par une approche « omic »	60
Objectif de Recherche	66
Matériels et Méthodes	66
1. Matériel biologique et conditions de cultures	66
1.1. La graine de lin oléagineux	66
1.1.1. Lignées de lin sélectionnées	66
1.1.2. Conditions de culture de la plante	66
1.2. La levure oléagineuse <i>Yarrowia lipolytica</i>	67
1.2.1. Souches de <i>Yarrowia lipolytica</i> sélectionnées	67
1.2.2. Conditions de culture en fiole d'Erlenmeyer	68
2. Méthodes	69
2.1. Caractérisation de la biomasse végétale : Protocole séquentiel	69
2.1.1. Extraction et analyse des huiles	69
2.1.2. Extraction et analyse des protéines	71
2.1.3. Extraction et quantification de l'amidon	72
2.1.4. Quantification de la paroi cellulaire	72
2.1.5. Analyse des composés solubles	72
2.2. Caractérisation de la biomasse de levure	73
2.2.1. Croissance de la biomasse	73
2.2.2. Analyse du surnageant	73
2.2.3. Caractérisation de la biomasse de levure : protocole non séquentiel	75
2.3. Caractérisation des flux métaboliques	79
2.3.1. Caractérisation des flux métabolique chez la graine de lin : Méthode FBA	79
2.3.2. Caractérisation des flux métabolique chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	81
2.3.3. Minimisation de l'ajustement métabolique, ou MOMA	85
Résultats et Discussions	87
Chapitre 1. Compréhension du métabolisme central et lipidique chez le lin	87
1.1. Caractérisation biochimique de la graine de lin	87
1.1.1. La graine mature	87
1.1.2. Croissance de la graine	88

1.1.3. Accumulation des composés de réserve	89
1.1.4. Conclusion partielle : Caractérisation biochimique de la graine de lin.....	104
1.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la graine de lin	104
1.2.1. Conception d'un modèle stœchiométrique de cellule de graine de lin.....	104
1.2.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la graine de lin par une approche basée sur la contrainte	109
1.2.3. Conclusions et limites de la FBA	132
1.3. Conclusion partielle : Production d'huile chez la graine de lin	134
Chapitre 2. Compréhension du métabolisme central et lipidique <i>Yarrowia lipolytica</i>	138
2.1. Caractérisation biochimique et physiologique de la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	139
2.1.1. Impact de la source de carbone : glucose et glycérol	139
2.1.2. Impact de la production des acides gras cyclopropanes.....	153
2.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	168
2.2.1. Analyses des flux métaboliques par MFA	169
2.2.2. Analyse des flux métaboliques par FBA	177
2.2.3. Avantages et limites de la MFA et la FBA	187
2.3. Conclusion partielle : production d'acides gras cyclopropanes chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	188
Conclusions et Perspectives	191
Références Bibliographiques	196
Annexes	216

Introduction Générale

Introduction Générale

➤ Le contexte démographique et environnemental.

La population mondiale ne cesse d'augmenter depuis toujours et a franchi les 7 milliards d'habitants depuis 2011 (7,6 milliards en 2018). Avec cette dynamique, les progressions démographiques prévoient plus de 9 milliards d'individus d'ici à 2050 (World Population Prospects - Population Division - United Nations ; FAO, 2009). Cette explosion démographique concernant essentiellement les pays en développement alimente de grandes inquiétudes : la demande énergétique s'est amplifiée accélérant alors l'épuisement des ressources fossiles (prévu dans environ 50 ans pour le pétrole, 60 ans pour le gaz naturel et 110 ans pour le charbon) (EDF - L'épuisement des ressources ; Bauer *et al.*, 2016). Des solutions alternatives doivent être identifiées afin de réduire la dépense énergétique et satisfaire la demande future. Ces solutions font souvent références aux biocarburants, majoritairement issus de matières premières végétales, alimentaires ou non (amidon, sucre, lignocellulose, lipides ; Xie, 2017). Or, les projections montrent que la production alimentaire globale devra progresser de près de 70% uniquement pour nourrir cette population mondiale grandissante (FAO, 2009). Il paraît donc essentiel d'étendre les surfaces agricoles, mais également d'accroître les rendements de production afin d'envisager un avenir pour les prochaines générations. Dans cet objectif, il faudra réaliser ces exigences en tenant compte des contraintes à la fois environnementales, énergétiques et alimentaires.

➤ Les huiles végétales et microbiennes.

Certaines plantes d'intérêt agronomique sont dites « oléagineuses » et sont cultivées pour leurs graines (colza, tournesol, lin) ou leurs fruits (palme, olive, coco) riches en huiles. Elles diffèrent par leur profil en acides gras et sont de ce fait essentiellement exploitées dans l'agroalimentaire. La production mondiale des oléagineux s'élève aujourd'hui à 603,1 millions de tonnes (Mt), avec également 204,4 Mt d'huiles végétales produites par an (USDA – Oilseeds : World Markets and Trade, 2018). L'huile de palme et de soja, représentent à elles seules plus de 60% de la production mondiale (35 et 29 %, respectivement). Cependant, les huiles saturées, comme l'huile de palme, présenteraient un risque pour la santé du consommateur : elles sembleraient être directement impliquées dans l'augmentation du risque cardiovasculaire (Prasad, 2009 ; Bilato, 2013 ; Ducheix *et al.*, 2017 ; Wang et Hu, 2017). C'est pourquoi, les instances gouvernementales ont mis en place des directives européennes visant à augmenter les

teneurs en acides gras polyinsaturés (oméga-3 essentiellement) dans les préparations culinaires (ANSES, 2011). Parmi ces huiles, l'huile de lin est l'une des plus riches en oméga-3 (57% selon Jhala et Hall, 2010) : elle est alors à la fois utilisée dans l'agroalimentaire et comme agent de polymérisation pour ses propriétés siccatives.

Les huiles végétales sont également exploitées, modifiées ou non, comme une alternative aux produits pétrosourcés pour la fabrication des biocarburants, tensioactifs et biolubrifiants (Overeem *et al.*, 1999 ; Van De Mark et Sandefur, 2005 ; Durett *et al.*, 2008 ; Sharma *et al.*, 2015 ; Abdullah *et al.*, 2016). Ainsi, de par l'accroissement de la population mondiale et l'épuisement des ressources fossiles, le développement des systèmes de culture et de bioraffinerie des oléagineux pour la production de biomasses et de composés innovants constituerait un véritable enjeu stratégique pour les industriels. De plus, l'utilisation d'organismes unicellulaires hétérotrophes comme les levures oléagineuses est une voie prometteuse pour la production de biomolécules à haute valeur ajoutée (Ledesma-Amaro et Nicaud, 2016). Avec le développement du génie génétique (Dujon *et al.*, 2004 ; Celińska *et al.*, 2017), les levures constituent désormais une alternative intéressante aux ressources végétales et animales (peu de contraintes liées à leur culture : sols, climats). Cependant, les huiles microbiennes représentent un coût de production important. La commercialisation serait intéressante si leur valeur ajoutée est suffisamment élevée pour supporter le surcoût de production : le prix de vente d'une huile d'origine microbienne serait d'environ 5,8 \$/kg contre 1,3 pour une huile d'origine végétale (Wijffels *et al.*, 2010).

Actuellement, les recherches préconisent des travaux intégratifs visant à développer des sujets s'intéressant à la valorisation de l'ensemble de la biomasse traitée (plantes, levures, etc.) dans un contexte de bioraffinerie et répondant aux exigences de la société. Ainsi, les travaux porteront sur une acquisition de connaissances de manière à proposer des avancées scientifiques nécessaires pour lever certains verrous biologiques et technologiques identifiés lors du développement de la bioraffinerie oléagineuse de troisième génération. Il s'agira notamment d'optimiser la chaîne entière de production : production de la biomasse, fractionnement et transformation, puis formulation en produits industriels biosourcés pour des applications en chimie, en alimentations humaine et animale, et autres.

➤ **Le rôle du programme GENESYS dans la transition énergétique.**

C'est dans ce contexte que l'ITE PIVERT (Institut de Transition Energétique Picardie Innovations Végétales, Enseignements et Recherches Technologiques) a été créé : il a pour

finalité le développement d'une filière française compétitive dans le domaine des oléagineux. Dans cette optique, l'ITE a su fédérer différents acteurs du monde académique et industriel.

Le programme de recherche est divisé en sept sous-programmes. Parmi eux, le sous-programme 4 (SP4) « Production microbienne de lipides et dérivés » vise à accéder à une plus grande diversité moléculaire d'espèces lipidiques. L'exploitation de la biodiversité végétale et microbienne naturelle est possible par la construction de nouvelles souches capables de produire des structures lipidiques inhabituelles, et plus particulièrement des acides gras à chaînes longues ou courtes, à nombre impair de carbone, chaînes branchées, cycliques ou polyinsaturées, etc. Dans ce contexte, le projet MetalipPro (SP4) vise à :

- Acquérir une plus grande compréhension des facteurs moléculaires, métaboliques et cellulaires gouvernant la régulation de l'accumulation d'huiles usuelles et non usuelles chez deux modèles : le lin oléagineux et la levure *Yarrowia lipolytica*.
- Identifier et isoler les gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides gras inhabituels chez les plantes (le lin oléagineux et le litchi) et dans un stockage optimisé des lipides chez les levures.
- Créer des levures génétiquement modifiées et optimiser leur culture pour la production de composés dans des domaines tels que la nutrition ou les biolubrifiants.

Ce projet issu du SP4 s'est déroulé en parallèle avec le projet PREBIOL (« Procédés d'extraction couplés de biolipides à partir de levures oléagineuses ») présenté dans le SP2 (« Procédés de fractionnement et de thermochimie ») et ayant pour objectif d'évaluer la stabilité et l'extractibilité des acides gras inhabituels synthétisés par des souches de *Yarrowia lipolytica* sauvages ou recombinantes.

➤ **Compréhension du métabolisme central et lipidique chez les plantes et les levures oléagineuses - Approche fluxomique.**

Dans le cadre du développement des bioraffineries de troisième génération, mon sujet de thèse s'est alors inscrit au sein des projets de recherche MetalipPro et PREBIOL. L'objectif principal consiste alors à acquérir et à compléter nos connaissances fondamentales du métabolisme lipidique chez les plantes et les levures afin d'optimiser la production des lipides d'intérêt. Ce travail concerne à la fois le lin oléagineux, *Linum usitatissimum*, principalement cultivé pour sa richesse en acides gras polyinsaturés (90%, avec 57% d'oméga-3) trouvant une application en alimentaire ou comme liant dans les peintures (Jhala et Hall, 2010), ainsi que la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*, exploitée comme châssis biotechnologique pour la

production de nombreuses biomolécules d'intérêt et sa capacité à assimiler toutes sortes de substrats, dont des hydrocarbures (Ratledge, 2004 ; Ledesma-Amaro et Nicaud, 2016). Pour répondre aux différents livrables de ces projets, certaines questions ont donc été soulevées dans le cadre de ma thèse :

→ Quels sont les mécanismes majeurs intervenant dans l'accumulation des huiles et des oméga-3 chez la graine de lin ?

→ En exploitant la biodiversité végétale et microbienne, comment optimiser la production d'huiles riches en acides gras inhabituels (dont les CFA) chez la levure *Yarrowia lipolytica* ?

Pour répondre à ces questions, l'approche originale utilisée est la fluxomique. Elle permet d'appréhender de manière globale et dynamique le métabolisme de la cellule. Ce travail est une étude comparative portant alors sur deux modèles oléagineux : la graine de lin et la levure *Yarrowia lipolytica*.

- Dans une première partie, trois lignées de lin dont les graines présentent des teneurs en lipides et en oméga-3 différentes seront caractérisées par une approche biochimique et fluxomique. Ce travail permettra de développer un modèle prédictif afin d'appréhender des mécanismes tels que l'assimilation du saccharose et de la glutamine, la synthèse et la remobilisation de l'amidon durant la croissance de la graine, la compétition du carbone pour la synthèse des triglycérides et des autres composés de réserve, ainsi que la coordination des voies métaboliques pour la synthèse et le stockage des acides gras polyinsaturés. De plus, les réactions limitantes pour la production des huiles pourront alors être identifiées.
- Dans une seconde partie, trois souches de la levure *Yarrowia lipolytica*, produisant ou non des acides gras cyclopropanes seront étudiées par les mêmes approches. Elle visera d'une part à connaître les effets d'une source de carbone alternative sur la physiologie de la souche, mais également de comprendre les redirections métaboliques et modifications phénotypiques induites par la production des CFA. Le développement de modèles prédictifs visera ici à déterminer les facteurs génétiques, métaboliques et cellulaires gouvernant la synthèse des acides gras d'intérêt, à en identifier les étapes limitantes et à fournir des pistes d'optimisation pour l'ingénierie génétique et métabolique en réprimant notamment la synthèse de composés indésirables et la sécrétion de déchets métaboliques.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Les lipides chez le vivant.

Les lipides sont des molécules apolaires ou amphiphiles très variées. Selon leur nature et leur structure, ils peuvent être solides (les cires) ou liquides (les huiles). Les lipides biologiques peuvent être classés de différentes manières. Cependant l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUCPA) a permis une classification des lipides en huit catégories : les acides gras, les glycérides (ou glycérolipides), les phosphoglycérides (ou glycérophospholipides), les sphingolipides, les glycolipides, les polycétides (classe très diverse de composés à activité biologique), les stérols et les prénoles (assemblés par répétition d'unités d'isoprène). La structure chimique de chacune des classes lipidiques est récapitulée dans le tableau 1. La structure physicochimique des lipides leur confère des propriétés uniques, ce qui leur permet d'assurer des fonctions bien précises chez tous les organismes. Les industriels sont susceptibles d'exploiter cette diversité lipidique et physicochimique à des fins biotechnologiques.

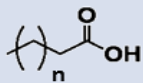
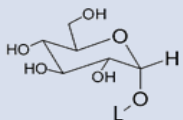
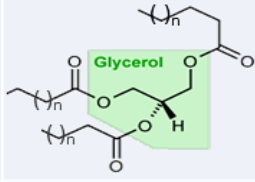
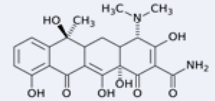
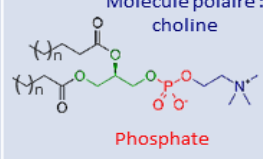
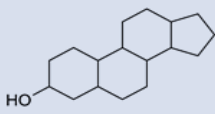
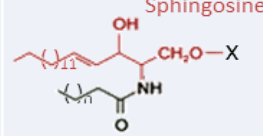
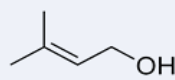
Classe lipidique	Structure chimique	Classe lipidique	Structure chimique
Acides gras		Glycolipides	 L : Lipide
Glycérides		Polycétides	 Classe très diverse : exemple de la tétracycline
Phosphoglycérides	 Molécule polaire : choline Phosphate	Stérols	 Noyaux des stérols
Sphingolipides	 Sphingosine X : H, Phosphocholine, Ose	Prénols	 Unité d'isoprène

Tableau 1 : Structure chimique des différentes classes lipidiques selon l'IUCPA.

Les acides gras sont donc des composés majeurs pour la constitution de nombreux lipides. Ils peuvent se distinguer par leur longueur de chaîne carbonée : l'acide palmitique dispose de 16 atomes de carbone (C16:0), contre 18 (C18:0) pour l'acide stéarique. Ils se différencient également par le degré d'insaturation de leur chaîne aliphatique : l'acide oléique, linoléique ou linoléique présentent 18 atomes de carbone chacun, avec respectivement une (C18:1), deux (C18:2) ou trois (C18:3) double liaisons.

1.1. L'intérêt des lipides chez les organismes vivants.

1.1.1. Les membranes biologiques.

Toute cellule vivante dispose d'une membrane plasmique, permettant de séparer le cytoplasme et ses éventuels organites du milieu extracellulaire (Lombard, 2014 ; Deamer, 2017). Les principaux composés qui la constituent sont les lipides et principalement les phospholipides, les sphingolipides et les stérols (49%). Les lipides membranaires sont pour la grande majorité amphiphiles du fait de leur tête polaire (la phosphocholine, ou PC, notamment) et de leurs queues hydrophobes (chaînes d'acides gras). Ainsi, leurs propriétés physico-chimiques leur permettent de s'auto-assembler en mono- ou bicouches lipidiques, entraînant également une asymétrie de la membrane et une organisation en deux feuillets : le feuillet interne (caractérisé par la phosphatidyl-sérine, ou PS, et la phosphatidyl-éthanolamine, ou PE) et le feuillet externe (caractérisé par la sphingomyéline et la PC). De plus, une mobilité des lipides a pu être observée, conférant une certaine fluidité à la membrane. En effet, les lipides peuvent se déplacer de manières différentes : par rotation, par diffusion latérale, ou d'un feuillet à un autre. Cette capacité est primordiale pour un certain nombre de fonctions cellulaires (communication, sécrétion, etc.). La fluidité membranaire est notamment influencée par des facteurs externes (la température) et internes (des chaînes d'acides gras courtes et insaturées augmentent la fluidité membranaire, une forte proportion de stérols en renforce la rigidité et résistance à l'alcool, et la présence d'autres composés biologiques comme les protéines diminuent la fluidité).

D'autres molécules se trouvent associées ou ancrées dans cette bicouche lipidique (figure 1). Ce sont notamment les protéines (jusqu'à 45%). Certaines peuvent être extrinsèques, intrinsèques ou transmembranaires, avec des fonctions différentes (transmission d'un signal, transport actif, catalyse). En effet, certaines enzymes transmembranaires ont besoin d'un environnement apolaire afin de catalyser leur réaction. C'est le cas de la lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPCAT), localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

Enfin, les glucides, moins représentés (<10%), sont essentiellement des glycophospholipides et glycoprotéines, liés aux lipides et aux protéines, et pour la plupart, exposés vers l'extérieur de la cellule. Ils constituent, pour certains, une fonction antigénique à la surface de la membrane.

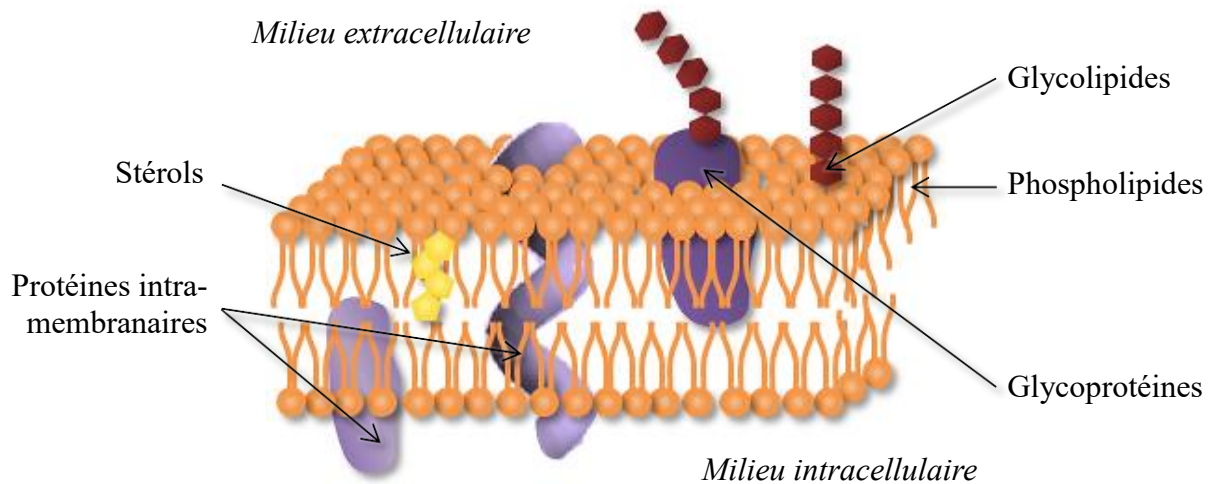


Figure 1 : Composition et structure de la membrane cytoplasmique,
adapté de Lombard, 2014.

1.1.2. Le stockage d'énergie.

Alors que les phospholipides sont associés aux lipides membranaires, les glycérides constituent une grande réserve d'énergie stockée essentiellement sous forme de triglycérides. Les triglycérides ou triacylglycérols (TAG), sont constitués d'un glycérol sur lequel sont estérifiés trois acides gras (sources d'énergie) (figure 2A). La plupart de ces corps gras sont présents sous forme de mélanges d'acides gras : courtes et longues chaînes, saturées et insaturées, ramifiées ou non. Ils sont stockés dans des corps lipidiques (figure 2B), une structure constituée de phospholipides disposés en monocouche et stabilisée par des protéines. Chez la graine, la protéine la plus abondante est l'oléosine, luttant contre la coalescence des corps lipidiques (Huang et Huang, 2017). Par la suite, ces acides gras stockés peuvent être dégradés et remobilisés, si nécessaire, sous l'action de lipases et d'enzymes de la β -oxydation (synthèse d'acétyl-CoA, d'ATP et de cofacteurs). En effet, ils sont susceptibles de procurer l'énergie nécessaire lors de la germination de la graine chez les végétaux (Huang, 1996). Ils constituent également la majeure partie de la matière grasse chez les animaux. Certains oiseaux migrateurs sont d'ailleurs capables de parcourir plusieurs milliers de kilomètres en utilisant leurs réserves lipidiques comme seul carburant métabolique (Landys *et al.*, 2005).

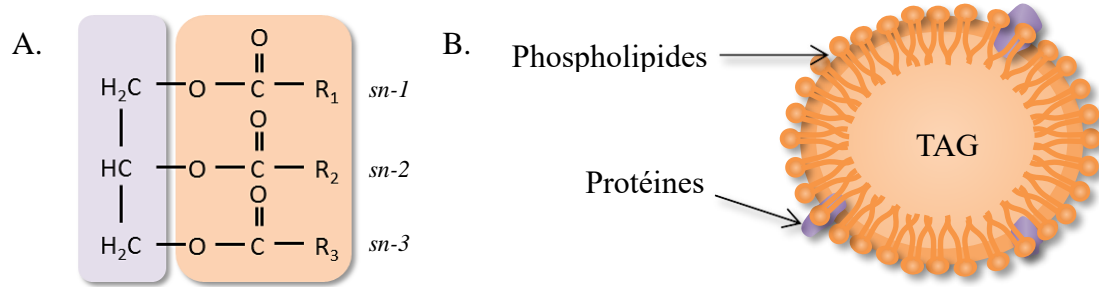


Figure 2 : Structure chimique et mode de stockage des triglycérides.

(A) Acides gras R₁, R₂ et R₃ estérifiés en position *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3 sur un glycérol.

(B) Assemblage en monocouche des phospholipides stabilisés par des protéines (oléosine, caléosine, stéroléosine) et permettant la formation de corps lipidiques contenant les lipides de réserve de type triacylglycérol (TAG).

1.1.3. La signalisation cellulaire.

Les lipides sont également impliqués dans la signalisation cellulaire. En effet, leur capacité à franchir aisément les membranes permet aux lipides de transmettre des signaux entre différentes cellules. Ils peuvent être liés à des protéines, porteuses du signal, mais inactives jusqu'à leur site d'action.

Chez les eucaryotes, il a été démontré que des dérivés de phosphatidyl-inositol (PI) étaient impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et jouaient également un rôle clé dans la régulation du calcium (Trémolières, 1998). En effet, leur phosphorylation par des kinases présentes sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique entraînerait l'activation d'une phospholipase C (PI-PLC), hydrolysant spécifiquement ces dérivés de PI. L'inositol-tri-phosphate en résultant, activerait les canaux situés sur le réticulum endoplasmique, induisant la libération du calcium (lui-même responsable de l'activation de toute une batterie de protéines kinases). D'autre part, le diacylglycérol libéré suite à l'hydrolyse, serait à l'origine de l'activation des protéines kinases C (PKC), impliquées dans des cascades de signalisation et est considéré comme un médiateur de la mémoire et un activateur des cellules T CD8.

Les acides gras peuvent également, une fois liés à des protéines, intervenir dans la régulation post-traductionnelle : c'est le cas de l'acide myristique, impliqué notamment dans la régulation de la protéine kinase SnRK1 d'*Arabidopsis thaliana* par N-myristoylation (Pierre *et al.*, 2007).

1.2. Les organismes oléagineux.

Les lipides sont une classe de molécules biologiques essentielle pour les organismes vivants. Certains d'entre eux, dits « organismes oléagineux », sont capables d'accumuler de grandes quantités de lipides de réserve, essentiellement sous la forme de triglycérides. Sur le marché, la plupart sont des plantes cultivées pour leurs graines ou leurs fruits : les organes de réserve. Néanmoins, pour des raisons économiques et environnementales, les industriels se tournent de plus en plus vers une production alternative des lipides : la culture de microorganismes unicellulaires.

1.2.1. Les plantes oléagineuses.

La production mondiale des oléagineux s'élève aujourd'hui à 603,1 millions de tonnes (Mt), avec également 204,4 Mt d'huiles végétales produites par an (USDA – Oilseeds : World Markets and Trade). On peut distinguer les graines oléagineuses produites par des plantes (les graines de lin, de tournesol ou de colza) et les fruits oléagineux plutôt produits par des arbres (la palme ou l'olive). Selon l'organisme producteur, chaque huile possède un profil spécifique en acides gras. C'est le cas de la graine de lin, très riche en C18:3 (45-70% d'acide linoléique, ALA), le principal oméga-3, conférant à son huile des propriétés siccatives. De même, l'huile de tournesol est produite pour sa forte teneur en acides gras de type oméga-6 et le colza pour ses oméga-9. Elles sont toutes deux principalement utilisées comme huile de table. Ces deux plantes agronomiques sont les oléagineux les plus cultivés en France (près de 1 500 000 hectares pour le colza, contre 618 000 ha pour le tournesol. En 2015, environ 95% de l'huile végétale produite en France provient du colza ou du tournesol. Les figures 3A et 3B représentent la surface en hectares accordée aux oléagineux en France depuis 1975, et la production des huiles végétales (en milliers de tonnes) depuis 2005, d'après le Service de la statistique et de la prospective (SSP).

L'huile de palme est constituée majoritairement d'acides gras saturés (acide palmitique à 43,5%). Elle est solide et malléable à température ambiante : son point de fusion se situe à ~ 37°C). Malgré de nombreuses polémiques liées à l'impact environnemental (déforestation des zones tropicales et destruction de l'habitat naturel de certaines espèces animales ; Vijay *et al.*, 2016 ; Afriyanti *et al.*, 2016) et à l'impact sur la santé du consommateur (maladies cardiovasculaires favorisées par les acides gras saturés ; Flock et Kris-Etherton, 2013), l'huile de palme est l'huile végétale la plus produite de la planète, avec 68 millions de tonnes par an (USDA – Oilseeds World Marker and Trade 2018). Elle est destinée à l'industrie agro-alimentaire (pâtes à tartiner, mayonnaises, chocolats, plats préparés, etc.). En effet, elle permet

de remplacer les huiles animales plus coûteuses et les huiles végétales hydrogénées, moins stables à la lumière et à la chaleur. On la retrouve également dans certains produits cosmétiques (maquillage, crèmes et soins pour cheveux), ainsi que dans le processus de fabrication de biocarburants (Mumtaz *et al.*, 2014).

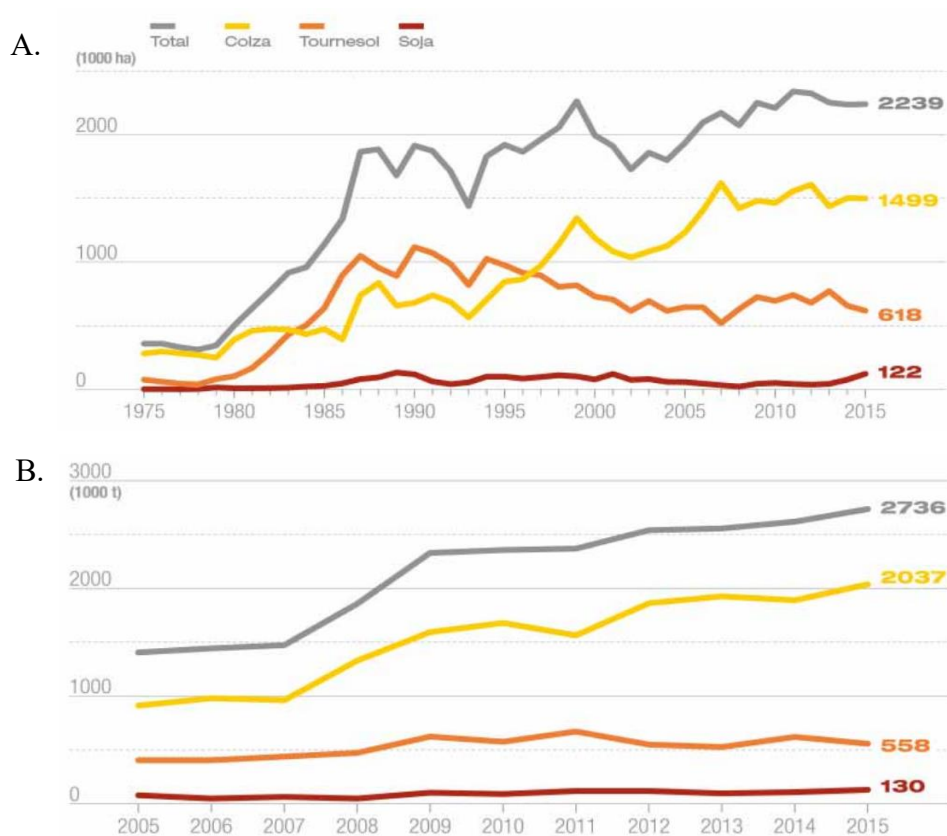


Figure 3 : La culture des oléagineux en France.

A. Surfaces oléagineux (1975-2015) Sources : SCEES puis SSP.

B. Production huiles brutes – France (2005-2015) Source : Huileries et Margarines de France.

Au-delà des plantes communes, comme le tournesol, le colza ou le palmier à huile, riches en acides palmitique ou acides gras insaturés, certaines plantes sont cultivées ou étudiées pour leur capacité à synthétiser des lipides plus atypiques. On parle d'acides gras inhabituels (AGI). Il peut s'agir d'acides gras à très longues chaînes (20 à 32 carbones), à chaînes très courtes (<14C), présentant des insaturations à des positions inhabituelles, des triples liaisons, une conformation cyclique ou encore des groupements fonctionnels peu communs (méthyl, époxyl, hydroxyl). Le tableau 2 permet d'établir une liste de certaines plantes productrices d'acides gras inhabituels. Cette liste n'est pas exhaustive.

Espèce végétale	Acides gras inhabituels	Formule chimique	Référence
<i>Brassica napus</i>	Acide érucique	C22:1- Δ^{13} (55%)	Guan <i>et al.</i> , 2014
<i>Coco nucifera</i>	Acide laurique	C22:0 (50%)	Dyer <i>et al.</i> , 2008
<i>Crepis alpina</i>	Acide crépénynique	C18:1- Δ^9 -12A (74%)	Lee <i>et al.</i> , 1998
<i>Litchi chinensis</i>	Acide cyclopropanique	C19:CA (50%)	Gontier <i>et al.</i> , 2000
<i>Ricinus communis</i>	Acide ricinoléique	C18:1- Δ^9 -12OH (90%)	Dyer <i>et al.</i> , 2008
<i>Sterculia foetida</i>	Acide cyclopropénique	C19:CE (75%)	Bao <i>et al.</i> , 2002

Tableau 2 : Exemples de plantes productrices d'acides gras inhabituels.

1.2.2. Les levures oléagineuses.

D'autres organismes oléagineux ont été étudiés et cultivés suite à cet engouement pour les lipides. C'est le cas des levures, et notamment de *Yarrowia lipolytica*, capable de produire plus de 20 g de lipides pour 100g de matière sèche (MS). Sur cette souche, les outils d'étude ne se comptent plus, incluant des modèle métaboliques (Kavšček *et al.*, 2015) et un système CRISP-Cas9 permettant l'édition du génome (Gao *et al.*, 2016).

D'autres levures oléagineuses sont également très étudiées malgré des outils génétiques moins disponibles. C'est notamment le cas pour *Rhodospiridium toruloides* et *Lipomyces starkey* (Adrio, 2017). Wang *et al.* (2017) ont démontré la capacité de *Rhodospiridium* TJUWZ4 à accumuler jusque 44% d'huile (g.100g⁻¹ de MS) dans des conditions spécifiques favorisant la production des lipides. A l'échelle industrielle, les levures sont cultivées en bioréacteurs, facilitant le contrôle des conditions de culture, telles que le pH, la température, l'aération ainsi que l'ajout de substrats en cours de culture (définissant le mode de conduite). Certains réacteurs peuvent atteindre un volume de 1 000 m³. Des études ont également montré les potentialités de bioconversion de *Yarrowia lipolytica* pour la synthèse d'acides gras inhabituels, tels que les acides linoléiques conjugués (CLA) (Imatoukene *et al.*, 2017 ; Ledesma-Amaro et Nicaud, 2016). En effet, l'enrichissement du milieu de culture en acide linoléique (LA) ou en huile de soja (57% de LA) a permis, selon la souche étudiée, une

augmentation considérable de la production de lipides totaux par litre de culture (+73%), ainsi qu'en CLA (+375%), par rapport à un milieu de néo-synthèse (glucose). Très récemment, Markham et Alper (2018) sont également parvenus à produire ~ 3 g d'acides gras cyclopropanes (ou CFA) par litre de culture de *Yarrowia lipolytica*.

1.2.3. Les microalgues oléagineuses.

Dans un contexte environnemental où les émissions de CO₂ sont en constante augmentation (plus de 6 milliards de tonnes chaque année) et où l'épuisement des ressources fossiles devient alarmant, les microalgues ont suscité un engouement tout particulier pour la production du biodiesel. En effet, ces microorganismes unicellulaires et photo-autotrophes produisent environ 60% du dioxygène atmosphérique (Show *et al.*, 2017). Les microalgues présentent un taux de croissance élevé et sont alors capables de fixer le CO₂ atmosphérique pour le convertir en composés de réserve (lipides, sucres ou protéines). Certaines espèces et souches oléagineuses, et notamment *Synechococcus sp.* PCC7942, *Schizochytrium mangrovi* PQ6, *Chlorococcum parinum* et *Chlorella vulgaris*, ont été étudiées pour leur potentielle capacité à produire du biodiesel, lorsque les concentrations en CO₂, en nutriments (notamment azote et phosphore), l'intensité lumineuse ou la température sont adaptées à la synthèse et à l'accumulation des lipides (Mondal *et al.*, 2017).

Pour des raisons économiques, certaines cultures de microalgues sont réalisées en bassins ouverts (Mondal *et al.*, 2017). Cependant, il existe des limites à ce système : la contamination, la faible utilisation de l'énergie lumineuse par les cellules en profondeur ou encore l'évaporation. Des photo-bioréacteurs ont alors été conçus pour pallier à ces problèmes et permettre un contrôle strict de chacun des paramètres de culture. Les lipides, dont la teneur se situe en moyenne à 10-30% de la MS, peuvent atteindre 60-80% lorsque les conditions de culture sont favorables. Ils peuvent ensuite être extraits de la biomasse, puis convertis en biodiesel par transestérification (synthèse d'esters méthyliques d'acides gras).

Les microalgues oléagineuses, comme *Isochrysis galbana* ou *Nannochloropsis gaditana*, sont également capables de synthétiser des phytostérols à hauteur de 3% environ (par rapport à l'huile totale). Ces composés peuvent être exploités pour leur valeur thérapeutique (traitement de l'hypercholestérolémie) ou nutritionnelle (l'ergostérol étant un précurseur de la vitamine D) (Luo *et al.*, 2015). D'autres molécules bioactives sont également produites grâce aux microalgues : l'astaxanthine (agent anti-âge), le β -carothène (agent anticancéreux et antioxydant), la phycocyanine (antioxydant), la riboflavine (micronutriment), l' α -tocophérol

(antioxydant et agent anti-inflammatoire), ou encore l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (oméga-3) (Mondal *et al.*, 2017).

1.2.4. Les bactéries oléagineuses.

Certaines bactéries sont également considérées comme oléagineuses. Le genre *Streptomyces* est habituellement connu pour sa capacité à produire des métabolites secondaires bioactifs de grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique (des antibiotiques par exemple). Cependant, il a été démontré une certaine divergence phénotypique et métabolique quant à la synthèse des antibiotiques et des triglycérides chez deux espèces du genre *Streptomyces* (*Streptomyces coelicolor* et *lividans*) (Millan-Oropeza *et al.*, 2017). En effet, *Streptomyces coelicolor* présenterait une faible quantité de lipides et un ratio ATP/ADP plus élevé que la normale pour une synthèse d'actinorhodine importante. Ceci implique un métabolisme oxydatif actif. Une analyse protéomique a mis en évidence l'abondance des enzymes présentes dans le cycle de Krebs (succinyl-CoA synthétase, malate déshydrogénase, aldéhyde déshydrogénase) et dans la néoglucogenèse (triose-phosphate isomérase, pyruvate phosphate dikinase). Au contraire, *S. lividans* est une espèce oléagineuse qui accumule plus de 20% de triglycérides au sein de sa biomasse. Il semble qu'une plus grande abondance des enzymes du métabolisme du glycérol (glycerol-3-phosphate déshydrogénase), de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (glucose-6-phosphate déshydrogénase) soit observée chez cette espèce oléagineuse par rapport à ce qui a pu être observé pour *S. coelicolor*. La redirection de certains flux métaboliques serait donc un facteur déterminant entre la synthèse de lipides de réserve et la synthèse de métabolites secondaires tels que les antibiotiques chez les bactéries oléagineuses.

Se basant sur le fait que certains animaux pouvaient se passer d'eau durant de longues périodes en métabolisant leurs corps lipidiques, une équipe s'est également intéressée aux espèces bactériennes vivant en zones arides. Une souche de *Streptomyces* sp. (G25), isolée à partir d'un échantillon de sable de Jeddah (Arabie Saoudite), a montré un taux d'accumulation des lipides de 50%, principalement des C16 et des C15 *anteiso* (Röttig *et al.*, 2016 ; Hauschild *et al.*, 2017).

1.3. Les domaines d'application des lipides.

Les lipides ont un rôle ubiquitaire dans le monde du vivant. Les caractéristiques physicochimiques liées à leur structure nous permettent de les exploiter dans de nombreux domaines et notamment en tant qu'éléments nutritifs pour l'alimentation humaine ou animale. De par leurs chaînes aliphatiques, ils constituent également une classe de choix comme

alternative aux ressources fossiles pour la pétrochimie. On parle dans ce cas d'« oélochimie ».

1.3.1. Nutrition-Santé.

1.3.1.1. Les acides gras mono- et polyinsaturés.

Les oméga-3 sont des acides gras essentiels que l'on peut retrouver en grande quantité dans certains poissons gras (saumon) et dans un grand nombre de graines oléagineuses. L'acide α -linoléique (ALA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont les principaux acides gras appartenant au groupe des oméga-3. Le terme d'oméga-3 vient du fait que la première double liaison de la chaîne carbonée de l'acide, en comptant depuis l'extrémité opposée au carboxyle, est située sur le troisième carbone. Les oméga-6 sont très présents dans les huiles végétales, les graines et les céréales, ainsi que dans la viande, le lait et les œufs. Par analogie, la première double liaison d'un oméga-6 se trouve au niveau du sixième carbone.

L'AFSSA (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, 2010) préconise de maintenir un ratio oméga-6/oméga-3 de 4:1 à 10:1, tandis que notre alimentation actuelle confère un rapport fluctuant entre 10:1 et 25:1 (Jhala et Hall, 2010). C'est pourquoi, un enrichissement de notre alimentation en oméga-3 serait nécessaire afin de pallier à cette carence ayant des conséquences sur notre santé au quotidien (ANSES, 2011).

De nombreuses études ont montré l'importance de ces acides gras dans le développement de l'enfant, et ce, dès la conception. En effet, le DHA se retrouve en grande quantité dans les membranes cérébrales et rétiniennes et serait associé positivement à la vision et aux fonctions cognitives (Jensen, 2006). Il est également recommandé aux femmes enceintes d'enrichir leur alimentation en oméga-3, et plus spécifiquement durant le troisième trimestre de gestation.

Ce réajustement de l'apport en oméga-3 réduirait également le risque de maladies cardiovasculaires. En effet, une supplémentation d'EPA/DHA diminuerait de 25 à 30% la concentration des triglycérides dans le plasma, d'après Kris-Etheron *et al.* (2003). Ils joueraient également un rôle dans la réduction de la pression sanguine. De même, une plus grande incorporation du DHA et EPA au sein des membranes cellulaires permettrait une amélioration de la fluidité des membranes des cellules cardiaques (Wilkinson *et al.*, 2005). Le développement et l'optimisation de procédés de fermentation de *Yarrowia lipolytica* ont permis la commercialisation d'un produit riche en EPA : New Harvest™ (complément alimentaire).

Les mécanismes dans lesquels sont impliqués les oméga-3 dans la prévention de différents types de cancer n'ont pas encore été totalement élucidés. Cependant, de nombreuses études ont démontré l'impact positif d'une alimentation riche en acides gras insaturés (Lee et Park, 2014) (dont les oméga-3) dans la prévention du cancer du sein (Kuriki, *et al.*, 2007) et du cancer colorectal (Caygill *et al.*, 1996), inflammations (Calder, 2017), risques cardiovasculaires (Bilato *et al.*, 2013 ; Parikh *et al.*, 2017), dépression (Thesing *et al.*, 2017).

Le cerveau étant un organe riche en lipides (25% de phospholipides), les oméga-3 contribueraient, d'après Mitchell *et al.* (2003), aux fonctions cérébrales en permettant une meilleure liaison des ligands, ainsi qu'une meilleure transduction des signaux (dues à la fluidité membranaire). Ainsi le DHA et EPA affecteraient la production et la fonction de neurotransmetteurs (tels que la sérotonine ou la dopamine). Peet et Stokes (2005) ont d'ailleurs rapporté des teneurs sensiblement plus faibles en DHA plasmatique chez des individus souffrant de schizophrénie, dyslexie, trouble de la personnalité, dépression, etc.

L'impact positif des oméga-6 sur la santé est quant à lui moins évident (Khandelwal *et al.*, 2013). Ils permettent néanmoins de se substituer aux acides gras saturés dont le caractère nocif pour la santé a été établi depuis de nombreuses années (Wang et Hu, 2017).

Enfin, les acides gras mono-insaturés, tels que les oméga-9 (première double liaison située à partir du neuvième carbone) sont également recommandés dans le cadre d'une alimentation saine, car ils préviendraient des maladies cardiovasculaires et métaboliques (Ros, 2003 ; Jenkins *et al.*, 2010). Plus spécifiquement, leur effet positif sur des patients atteints de diabète de type 2 a été démontré par Ros (2003). Une seconde étude, menée par Jenkins *et al.* (2010), a également mis en évidence l'influence des acides gras oméga-9 dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires en permettant une régulation du rapport entre le « bon » cholestérol, HDL (High Density Lipoprotein), et le « mauvais » cholestérol, LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, contrairement aux oméga-3 et oméga-6, les oméga-9 sont non essentiels : ils peuvent être synthétisés par l'homme à partir d'autres acides gras insaturés.

Prévention des maladies cardiovasculaires, du cancer ou de la dépression, tous les bienfaits sont prêtés à ces lipides polyinsaturés (Bilato, 2013 ; Parikh *et al.*, 2017 ; Calder, 2017). Cependant, certaines études vont à l'encontre de ces résultats, contredisant l'association positive entre une supplémentation en oméga-3 et la prévention contre le cancer (MacLean *et al.*, 2006), les maladies cardiovasculaires (Rizos *et al.*, 2012) ou encore les états dépressifs (Thesing *et al.*, 2017). Leurs bienfaits sur la santé seraient donc à nuancer en prenant en compte

l'apport actuel en acides gras oméga-3 et oméga-6 ainsi que l'état de santé général du patient, ses antécédents médicaux, le facteur héréditaire, etc.

1.3.1.2. Les phospholipides alimentaires.

On retrouve principalement les phospholipides sous forme de glycérophospholipides et notamment dans les produits alimentaires (soja, jaune d'œuf, lait, poissons, etc.). Ils peuvent également être ingérés sous forme de suppléments. Ils comportent aussi bien des acides gras insaturés (position *sn-2*) que saturés (position *sn-1*). Un certain nombre d'études ont identifié des effets bénéfiques pour un régime alimentaire enrichi en phospholipides (Küllenber *et al.*, 2012). Les travaux ont montré qu'un régime supplémenté en phosphatidylcholine (PC) de soja permettait une réduction des réactions d'inflammation en cas d'arthrite (chez la souris, le rat et sur des modèles biomimétiques). Les phospholipides seraient également impliqués dans l'inhibition de métastases et tumeurs : une supplémentation de PC chez le rat induirait un arrêt de la formation des nodules, éléments précurseurs du cancer du foie. Enfin, ils permettraient une régulation du profil lipidique sanguin et ainsi réduiraient les risques cardiovasculaires, spécifiquement chez les patients atteints d'hyperlipidémie (pas d'impact chez les sujets « sains »). Le taux de cholestérol LDL et celui de triglycérides seraient alors drastiquement réduits, tandis que le cholestérol HDL serait quant à lui augmenté. Enfin, d'autres effets bénéfiques ont été répertoriés, comme un effet sur le bon développement neurologique, leur implication dans les fonctions immunologiques, ainsi que leur action contre les maladies hépatiques.

1.3.1.3. Les sphingolipides.

Il n'existe aucune exigence nutritionnelle concernant les sphingolipides, une classe de lipides hautement présente chez le soja, le jaune d'œuf ou le lait. Néanmoins, des bienfaits liés à la protection contre le cancer du côlon ou le cholestérol LDL ont été énoncés (Vesper *et al.*, 1999). Une altération du métabolisme des sphingolipides est également souvent associée à des maladies dermatologiques. Ils seraient impliqués dans la maintenance de la fonction « barrière » de la peau, limitant la perte en eau et les agressions extérieures. Ils interviendraient également dans la régulation de certains mécanismes cellulaires, tels que la prolifération ou l'apoptose des kératinocytes. Les récepteurs des différents sphingolipides (dont la sphingosine-1-phosphate) sont désormais la cible de nouveaux agents thérapeutiques chez des patients atteints de psoriasis (Borodzicz *et al.*, 2016). Ces lipides sont d'ailleurs exploités dans la formulation de produits cosmétiques (notamment par L'Oréal, Montastier et Griat, 1992 - brevet n°WO1992017160

A1) pour leur rôle dans la protection de la peau ou des cheveux contre les agressions liées à la pollution atmosphérique.

1.3.2. Une alternative aux produits pétrosourcés.

Depuis l'invention du moteur à explosion à la fin du XIX^{ème} siècle, le pétrole est devenu la principale source d'énergie dans le monde et sa consommation n'a cessé de croître depuis. Par la suite, il a également été exploité dans le secteur de la pétrochimie (fabrication de plastiques, textiles, détergents, etc.). Cependant, l'agence internationale de l'énergie a prédit une augmentation de près de 45% de la demande mondiale en énergie d'ici à 2030. De plus, le pétrole et le gaz naturel tendent à disparaître et ne seront plus accessibles d'ici un demi-siècle (Bauer *et al.*, 2016). Il est par conséquent primordial d'anticiper cet épuisement des réserves en exploitant des ressources renouvelables à notre échelle. L'utilisation de la biodiversité végétale et microbienne représente une alternative à ces ressources fossiles. L'oléochimie permet notamment la synthèse de produits chimiques à partir de lipides d'origine biologique et remplaçant la filière pétrochimique.

1.3.2.1. Les biocarburants.

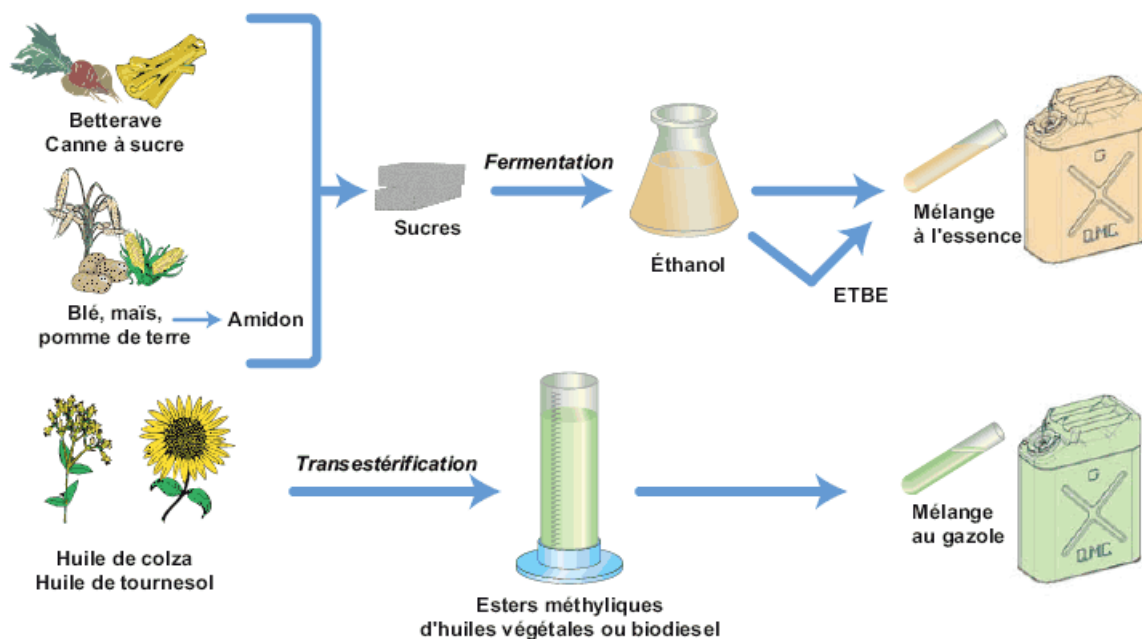


Figure 4 : Filières classiques des biocarburants de première génération (IFP Énergies nouvelles).

Dans cette démarche environnementale, l'Union Européenne a développé une filière biocarburants. L'objectif est une incorporation progressive de bioéthanol/biodiesel dans les

carburants actuels. Ces biocarburants sont divisés en trois catégories (Aro, 2016). La première génération correspond à l'utilisation de matière végétale agricole pour la production de bioéthanol à partir de sucres fermentescibles issus de la plante, ou de biodiesel à partir de graines oléagineuses. Le schéma représenté en figure 4 représente le processus de fabrication des biocarburants de première génération. La compétition entre la filière agrocarburant et la filière alimentaire de ces cultures constitue l'une des principales critiques envers les biocarburants de cette génération.

Une seconde génération a ainsi été développée. Ces carburants sont principalement obtenus à partir de plantes non alimentaires, déchets et résidus de type lignocellulosique pour la production de bioéthanol. Cette autre filière dite de seconde génération permet la valorisation de cette matière en gazole et kérosène de synthèse par transformation thermochimique : le BtL (Biomass to Liquid).

Une troisième génération est en développement concernant l'utilisation des microorganismes. C'est le cas des levures, convertissant un substrat biosourcé (généralement un co-produit de l'industrie agroalimentaire de nature cellulosique par exemple) en bioéthanol, ou en triglycérides, précurseur du biodiesel (Petrovic, 2015 ; Ko et Lee, 2018). Néanmoins, ce sont les micro-algues et cyanobactéries qui suscitent le plus d'engouement pour la production de biocarburants de troisième génération, l'énergie solaire étant la principale source d'énergie des organismes photosynthétiques (Kumar et Singh, 2016 ; Shuba et Kifle, 2018). La figure 4 suivante présente les différents biocarburants produits grâce aux microorganismes photosynthétiques.

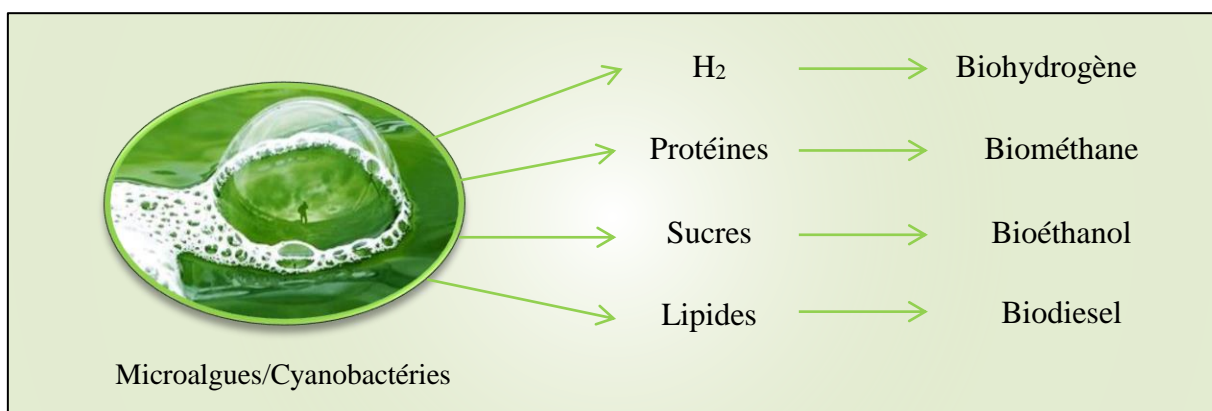


Figure 5 : Différents types de biocarburants produits à partir de microalgues ou de cyanobactéries, adapté de Shuba et Kifle (2018).

1.3.2.2. Les biosurfactants.

Les surfactants, ou tensioactifs, sont des molécules permettant de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Elles permettent ainsi de solubiliser deux phases non miscibles, faisant interagir son groupement hydrophile avec la phase polaire et son groupement lipophile avec la phase apolaire. Ceci confère aux tensioactifs des propriétés moussantes, émulsifiantes ou encore antiseptiques. Ils peuvent également être utilisés comme détergents. Ils sont retrouvés essentiellement dans le secteur alimentaire, cosmétique, mais aussi dans certaines peintures ou produits d'entretien. L'alginate de propylène glycol (E405) est par exemple employé comme épaississant dans certaines sauces. Malgré leur haute qualité technologique, les surfactants sont beaucoup critiqués pour les risques sanitaires qu'ils pourraient engendrer sur la santé. Outre leurs éventuelles propriétés toxicologiques, un grand nombre de ces tensioactifs sont issus de la pétrochimie, renforçant la nécessité d'identifier une alternative biologique plus écoresponsable.

Les surfactants d'origine biologique, tels que la phosphatidylcholine (PC), plus connue sous le nom de lécithine (extraite essentiellement du soja), sont déjà exploités dans l'industrie alimentaire. Chez les phospholipides, la queue hydrophobe peut être formée par deux acides gras, tandis que la choline et le phosphate (cas de la PC) forment la polaire tête. Il existe d'autres classes de biosurfactants, tels que les glycolipides, les lipoprotéines ou encore les surfactants polymériques, également dotés des mêmes propriétés amphiphiles (Santos *et al.*, 2016). Les lipides sont également une alternative aux molécules issues de la pétrochimie dans le domaine des cosmétiques comme agents émulsifiants, dispersants, mouillants, texturants, etc. (Duprat-de-Paule *et al.*, 2018).

Les biosurfactants sont essentiellement produits par les microorganismes lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats insolubles dans l'eau. En effet, ils rendent ces substrats plus facilement assimilables par la cellule. Cependant, ces mécanismes n'ont pas été élucidés de manière précise. Un grand nombre de microorganismes sont capables de les synthétiser : les bactéries du genre *Acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter paraffineus*) ou *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*), les levures telles que *Candida* (*Candida antarctica*, *Candida apicola*) ou *Yarrowia* (*Yarrowia lipolytica*), ainsi que les cyanobactéries (Santos *et al.*, 2016).

1.3.2.3. Les biolubrifiants.

Les biolubrifiants ont été conçus en alternative aux lubrifiants destinés à l'usinage mécanique et issus de la pétrochimie : l'huile de synthèse (polyoléfine) et l'huile minérale (distillation du pétrole). Le terme de biolubrifiant s'applique aux lubrifiants biodégradables et non toxiques. Ils peuvent être élaborés à partir d'huile végétale ou d'esters synthétiques fabriqués à partir d'huile renouvelable. Certains industriels, comme Total, ont développé une gamme de biolubrifiants répondant à des critères stricts en matière d'impact environnemental : l'écolabel européen. Le BIOTRANS BV FE 75W-80 est notamment utilisé comme biolubrifiant (boîtes de vitesse), adapté aux engins de travaux publics, forestiers et agricoles, préservant le milieu naturel en cas de fuite accidentelle. Certaines classes d'acides gras sont à l'étude pour leur conformation structurale qui leur confère une propriété intéressante dans ce domaine. C'est le cas notamment des acides gras cyclopropanes, qui, lorsqu'ils sont hydrogénés, forment des acides gras méthyl-branchés (par ouverture du cycle) (Kai and Pryde, 1982). Ce procédé a été breveté par Duhot *et al.* (1998).

Malgré l'essor de la chimie verte, certains aspects sont encore à améliorer : la performance, le coût (+30 à 40% du prix selon Jean-Louis Pauphillat, directeur de l'entreprise Molydal Lubricating Systems), ainsi que la disponibilité des cultures. Trivedi *et al.* (2015) ont récemment étudié différentes combinaisons de réactifs pour la production d'esters biodégradables par voie enzymatique (lipases) sans solvant. Un taux de 99% d'estérification a été atteint en utilisant l'acide oléique et l'alcool oléique comme substrat pour la synthèse d'un ester.

1.4. Métabolisme des organismes oléagineux.

L'intérêt croissant pour les acides gras et les lipides dans divers domaines d'application a nécessité une étude approfondie des mécanismes de synthèse de ces composés chez les organismes oléagineux. En effet, il est primordial de comprendre la manière dont ils sont produits afin de les exploiter de manière optimale. Cette partie visera donc à détailler le processus de synthèse des acides gras et leur accumulation mais précisera également la génération des précurseurs nécessaires à leur synthèse chez les plantes et les levures oléagineuses.

1.4.1. Import du substrat dans la cellule et synthèse des précurseurs.

1.4.1.1. Chez la graine.

Chez les plantes, différents substrats carbonés sont fournis à la graine pour son développement, et en particulier à l'embryon par l'intermédiaire du tégument. D'après King *et al.* (1997), le saccharose est le sucre prédominant considéré comme principale source de carbone chez le colza. Cependant, certains hexoses (fructose et glucose) et acides aminés (glutamine) peuvent également contribuer à cet apport (Schwender et Ohlrogge, 2002). Ils proviennent essentiellement des organes photosynthétiques, tels que la feuille, et sont transportés grâce au phloème. En effet, la sève élaborée circule dans ce tissu conducteur, guidée par la pression de turgescence, afin d'alimenter les cellules des organes de réserve tels que la graine. La figure 6 décrit ce mécanisme chez la plante.

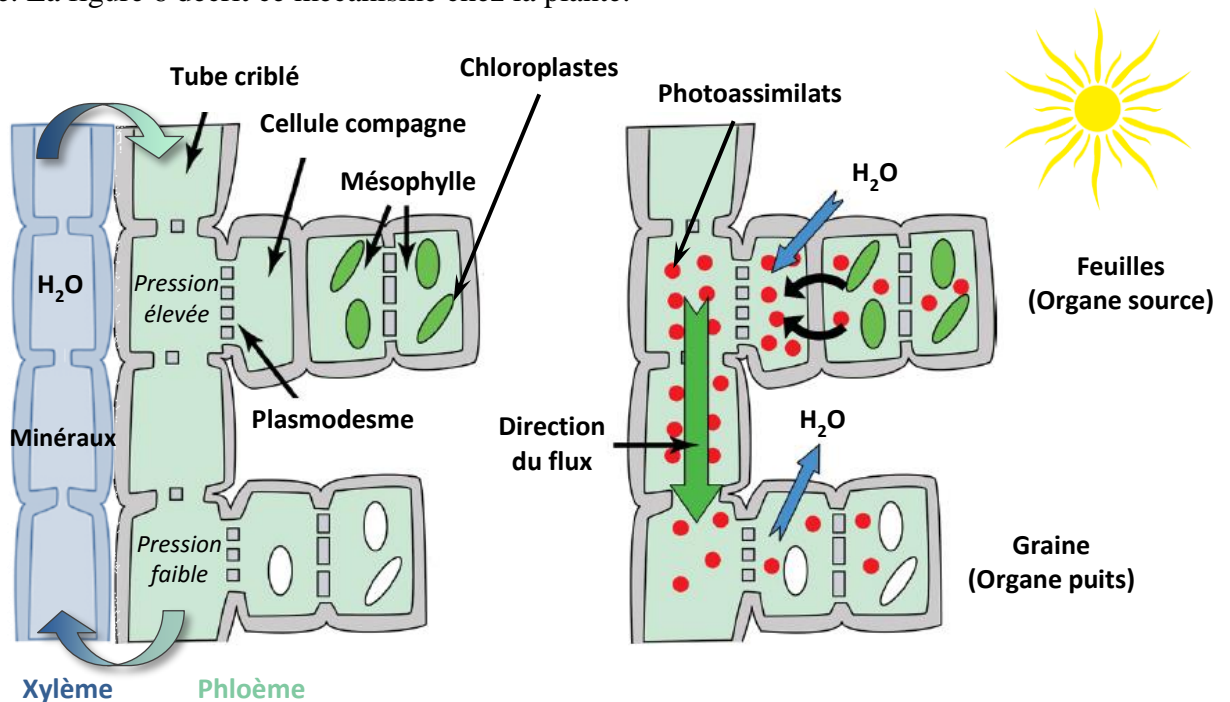


Figure 6 : Transport des photoassimilats vers les organes de réserve,
adapté de Yadav *et al.*, 2015 et Lemoine *et al.*, 2013.

De plus, un modèle a été développé par Stadler *et al.* (2005), décrivant le mode de transfert des photoassimilats dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, du funicule à l'embryon. Deux approches basées sur l'expression de la GFP (green Fluorescent Protein) sous le contrôle de différents promoteurs ont été entreprises. Ces expérimentations ont notamment permis de démontrer que les transferts entre le tégument externe et interne, le tégument interne et l'albumen, ainsi que l'albumen et l'embryon sont apoplastiques : ils nécessiteraient

l'intervention de transporteurs. Parmi ceux-ci, AtSUC2, AtSUC3 et AtSUC5 sont spécifiquement impliqués dans le transport du saccharose chez la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

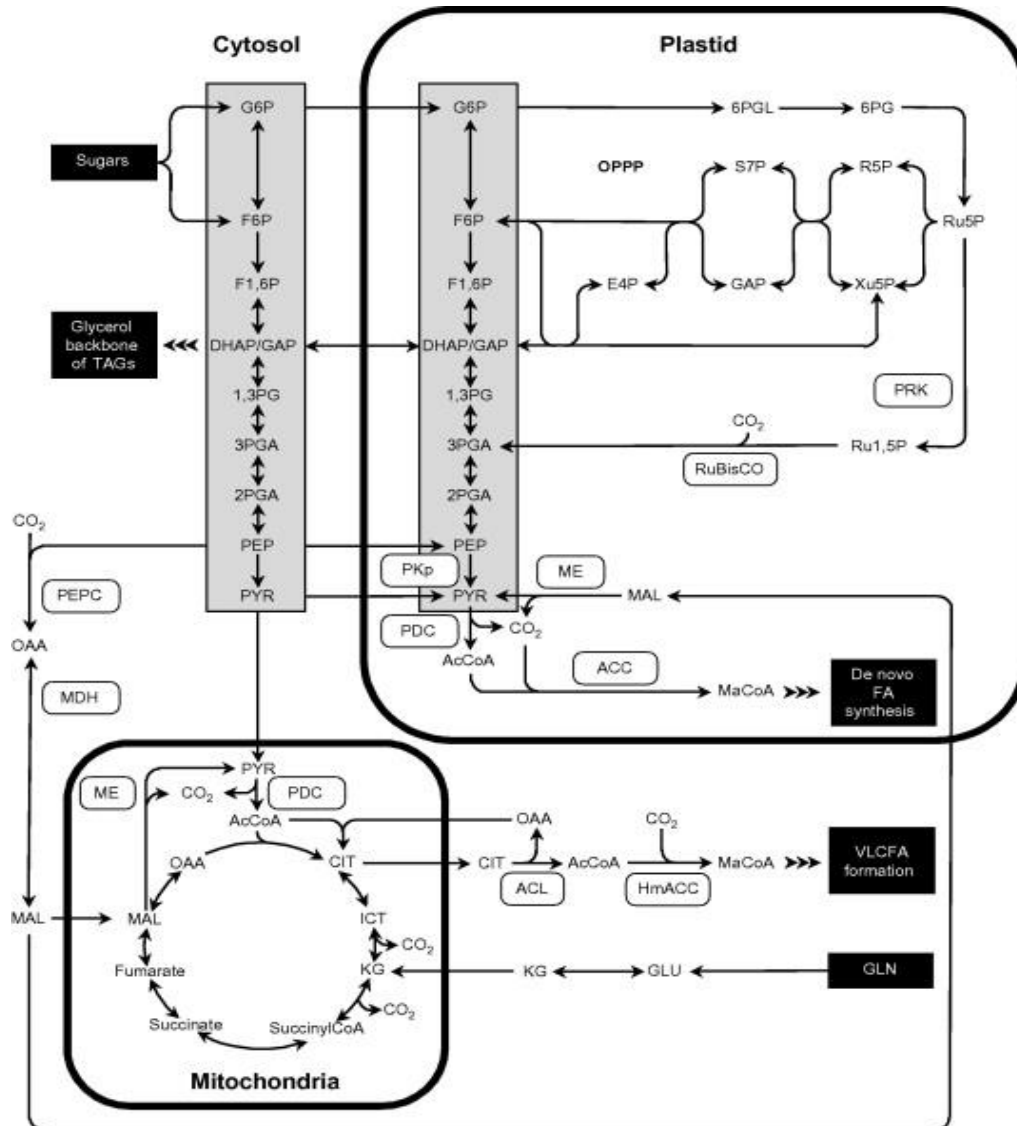


Figure 7 : Génération des précurseurs des triglycérides chez les plantes oléagineuses d'après Baud et Lepiniec, 2010.

Une fois à l'intérieur des cellules embryonnaires, le saccharose peut être converti en fructose et glucose par des invertases situées au niveau des parois, du cytosol et de la vacuole. Ainsi, ces sucres simples peuvent participer à la glycolyse, afin d'être convertis en acétyl-CoA, principal précurseur des acides gras (figure 7). La présence de l'ensemble des enzymes glycolytiques dans le cytosol et les plastes suggère l'existence d'au moins trois voies conduisant à la synthèse d'acétyl-CoA à partir du saccharose (Schwender *et al.*, 2003). De plus, l'existence de transporteurs chez les embryons d'*A. thaliana*, de colza, de ricin ainsi que de maïs corrobore

cette hypothèse. Ainsi, chacune de ces voies empreinte la glycolyse cytosolique et/ou plastidiale, avec une divergence, selon le genre et l'espèce étudiés, quant au transport des intermédiaires métaboliques à travers chaque compartiment (glucose-6-phosphate, trisose-phosphate, phosphoénolpyruvate et pyruvate). L'acétyl-CoA est alors disponible dans le cytosol pour la synthèse des acides gras. Le glycérol-3-phosphate, précurseur des glycérolipides, est synthétisé à partir de la réduction du DHAP issu de la glycolyse, par l'action de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique. Il peut également provenir de la phosphorylation du glycérol par une glycérol-kinase.

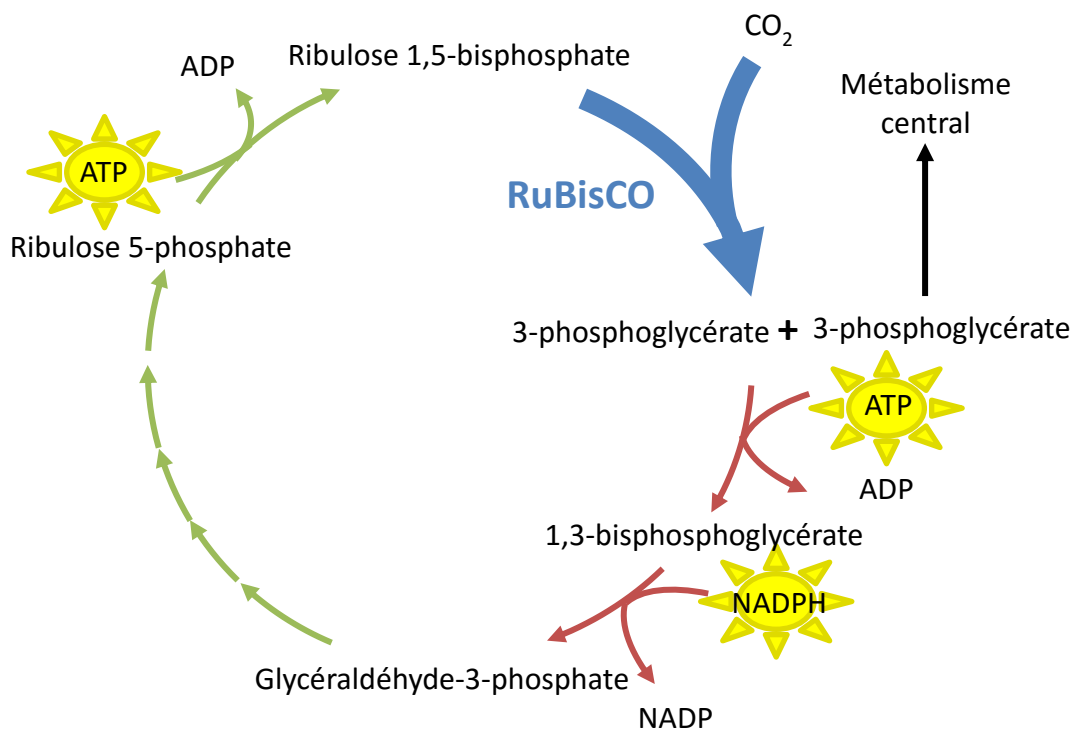


Figure 8 : La RuBisCO au sein du Cycle de Calvin, adapté de Ducat et Silver (2012).

Chez les organismes photosynthétiques, une autre voie est à prendre en considération : le cycle de Calvin. Il est effectué dans les chloroplastes et permet, par l'intermédiaire d'une enzyme, la RuBisCO (ou ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase), de fixer le CO₂ au sein de la biomasse. La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP et NADPH) via la phase claire de la photosynthèse permet l'apport en co-facteurs nécessaires à la fixation du carbone, la réduction du 3-phosphoglycérate et sa régénération en ribulose 1,5-bisphosphate (figure 8) (Ducat et Silver, 2012). Le CO₂ serait donc une autre source de carbone pour les organismes, organes, ou cellules photosynthétiques.

1.4.1.2. Chez la levure.

Contrairement à la graine, la source de carbone est en général directement présente dans le milieu de culture de la levure. Lorsqu'il s'agit de glucose, des transporteurs (HXT, GPR1, RGT2 et SNF3) permettent l'entrée de celui-ci dans la cellule (Rolland *et al.*, 2001). D'autres sucres peuvent également être assimilés en traversant la membrane (figure 9). Le xylose est assimilé via la protéine HXT2 qui rejoindra la voie des pentoses phosphate (conversion en xylitol, xylulose, puis xylulose-5-phosphate); le cellobiose peut être incorporé *via* un transporteur spécifique, puis dégradé en glucose par une β -glucosidase. Il peut également être préalablement hydrolysé par une β -glucosidase sécrétée dans le milieu extracellulaire et assimilé comme un simple glucose (Ryu *et al.*, 2016). Le glucose est donc métabolisé par voie glycolytique dans le cytosol uniquement (pas de plaste), pour la synthèse du pyruvate, puis de l'acétyl-CoA.

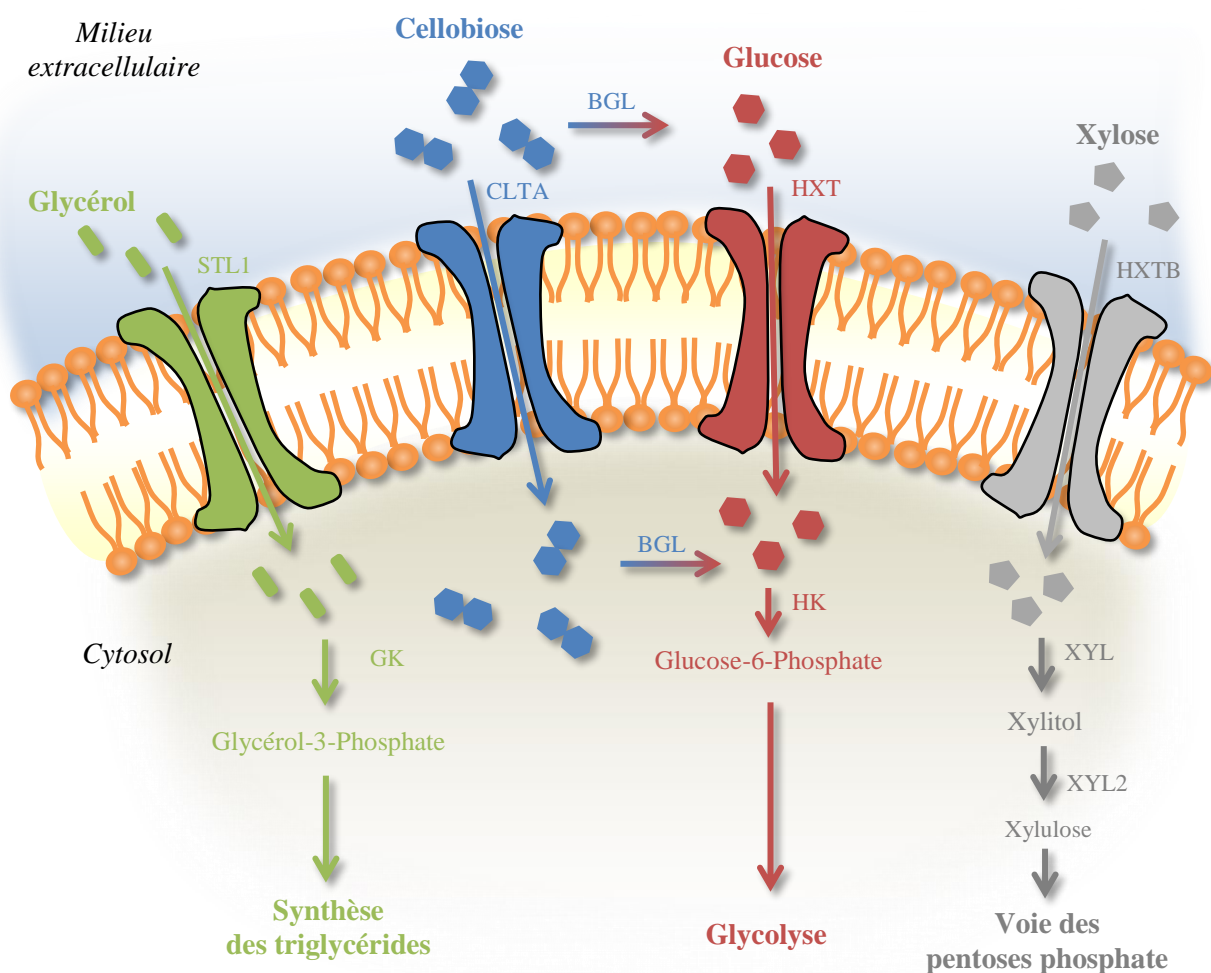


Figure 9 : Implication des différents transporteurs dans la synthèse des précurseurs de triglycérides, adapté de Ryu *et al.*, 2016.

Abréviations : STL1, CLTA, HXT et HXT B sont respectivement les transporteurs de glycérol, cellobiose, glucose et xylose. GK, BGL, HK, XY11 et XYL2 sont respectivement les enzymes glycérol kinase, β -glucosidase, hexokinase, xylose réductase et xylose déshydrogénase.

Lorsque des sucres sont utilisés comme source de carbone, la synthèse d'acétyl-CoA peut emprunter différentes voies (figure 10). La première s'effectue par conversion du pyruvate cytosolique sous l'action de la pyruvate décarboxylase (PDC1, 5 et 6) puis de l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALD2, 3, 4, 5 et 6). Il peut également provenir de l'acétate cytosolique via l'acétyl-CoA synthétase (ACS1-2) si l'acétate est présent dans le milieu extracellulaire. De plus, lorsque le citrate est en excès dans la mitochondrie (intermédiaire dans le cycle de Krebs) il est transporté vers le cytosol afin d'être clivé par l'ATP citrate lyase (ACL) et de générer l'oxaloacétate ainsi qu'un acétyl-CoA, précurseur des acides gras (Kozak *et al.*, 2014).

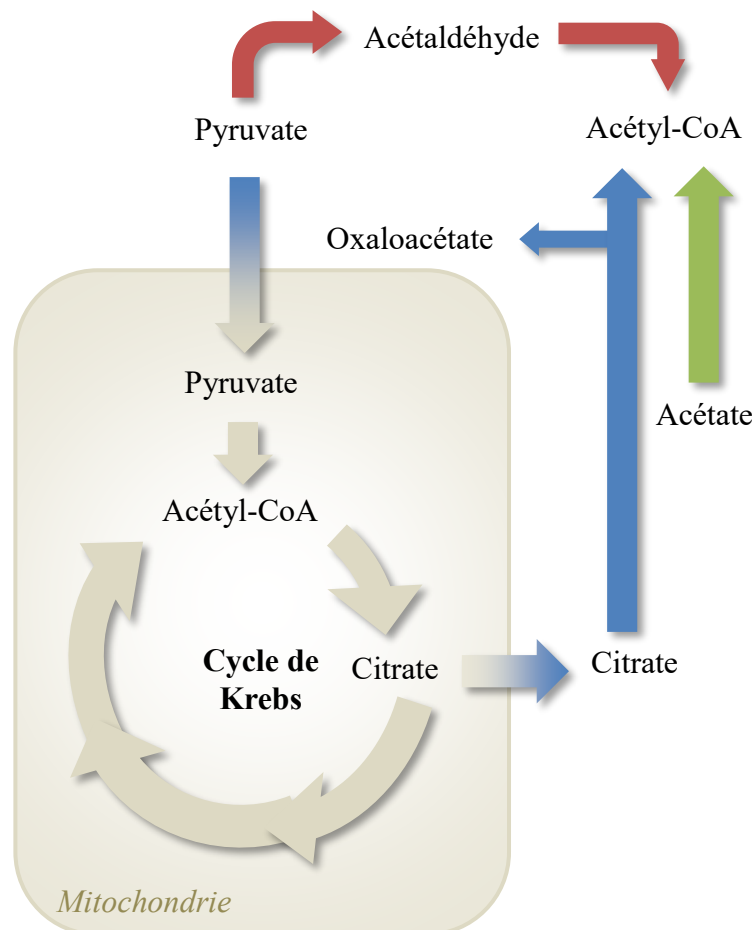


Figure 10 : Synthèse d'acétyl-CoA chez la levure.

Synthèse d'acétyl-CoA *via* la pyruvate décarboxylase et l'acétaldéhyde déshydrogénase (rouge), l'acétyl-CoA synthétase (vert) ou l'ATP:citrate lyase (bleu) par l'intermédiaire du cycle de Krebs (beige).

Le glycérol peut également être considéré comme une source de carbone pour la cellule, malgré son rôle premier d'osmoprotecteur. En effet, sa dégradation/synthèse est un facteur important dans la maintenance de la balance redox dans la cellule. Il est impliqué dans la défense contre les stress thermique et oxydatif. En cas de nécessité, la voie de réponse à haute osmolarité de glycérol (HOG) permet un import de glycérol de l'extérieur par une série de signaux (kinases), entraînant l'activation de transporteurs (STL1 : symport glycérol/H⁺ chez *S. cerevisiae*) et inactivant son export (Duskova *et al.*, 2015). Il peut ensuite être phosphorylé et donner le G3P (figure 6), précurseur important des glycérolipides. Comme chez la cellule végétale, le G3P peut également être synthétisé à partir du DHAP cytosolique (conversion NADH-dépendante via la G3PDH), intermédiaire métabolique de la glycolyse cytosolique.

La levure est également capable d'assimiler des substrats hydrophobes, tels que des alcanes, des acides gras ainsi que des huiles sous forme de triglycérides. Ficker *et al.* (2005) ont rappelé les différentes voies employées pour leur assimilation dans la cellule. Ces substrats étant non miscibles dans l'eau, leur consommation nécessite des modifications physiologiques ou morphologiques. Parmi celles-ci, la production de tensioactifs permet la solubilisation des composés apolaires dans le milieu de culture, tandis qu'une amélioration des propriétés d'adhésion à la cellule (hydrophobicité surfaciale) permet un contact et un transport facilité à travers la membrane grâce à la formation de protrusions. Ce dernier mécanisme reste relativement peu connu. Cependant, certaines études menées notamment par Kim *et al.* (2000) montrent des compositions en lipides membranaires différentes, selon la source de carbone (glucose ou alcanes) relevant donc d'un transport passif du substrat hydrophobe à travers la membrane. Le passage des acides gras peut également être facilité grâce à des protéines membranaires (translocases). De plus, des lipases extracellulaires peuvent être sécrétées afin de libérer les acides gras libres des triglycérides avant assimilation.

Après avoir traversé la membrane cellulaire, les substrats hydrophobes peuvent être activés sous la forme CoA (coenzyme A). Des protéines de type FABP (Fatty Acid Binding Proteins) sont alors susceptibles de transporter ces composés afin d'être oxydés (notamment par le cytochrome P450 pour les alcanes). Le gène *ACBI*, qui a été identifié chez *S. cerevisiae*, code pour une protéine capable de reconnaître les acyl-CoA uniquement. Les triglycérides ayant passé la membrane sont hydrolysés. Les acides gras libérés sont enfin dégradés en acétyl-CoA ou incorporés dans les différents lipides cellulaires (voies développées dans une partie postérieure).

Enfin, Imatoukene *et al.* (2017) ont par ailleurs pu confirmer une assimilation correcte de l'acide linoléique (LA) pur par la levure *Yarrowia lipolytica*, mais également de l'huile de soja (dont les triglycérides sont riches en LA) comme seule source de carbone. Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'une étude portant sur la synthèse d'acides gras inhabituels de type CLA (acide linoléique conjugué).

1.4.2. Métabolisme lipidique : synthèse, stockage et modification.

1.4.2.1. Synthèse des acides gras.

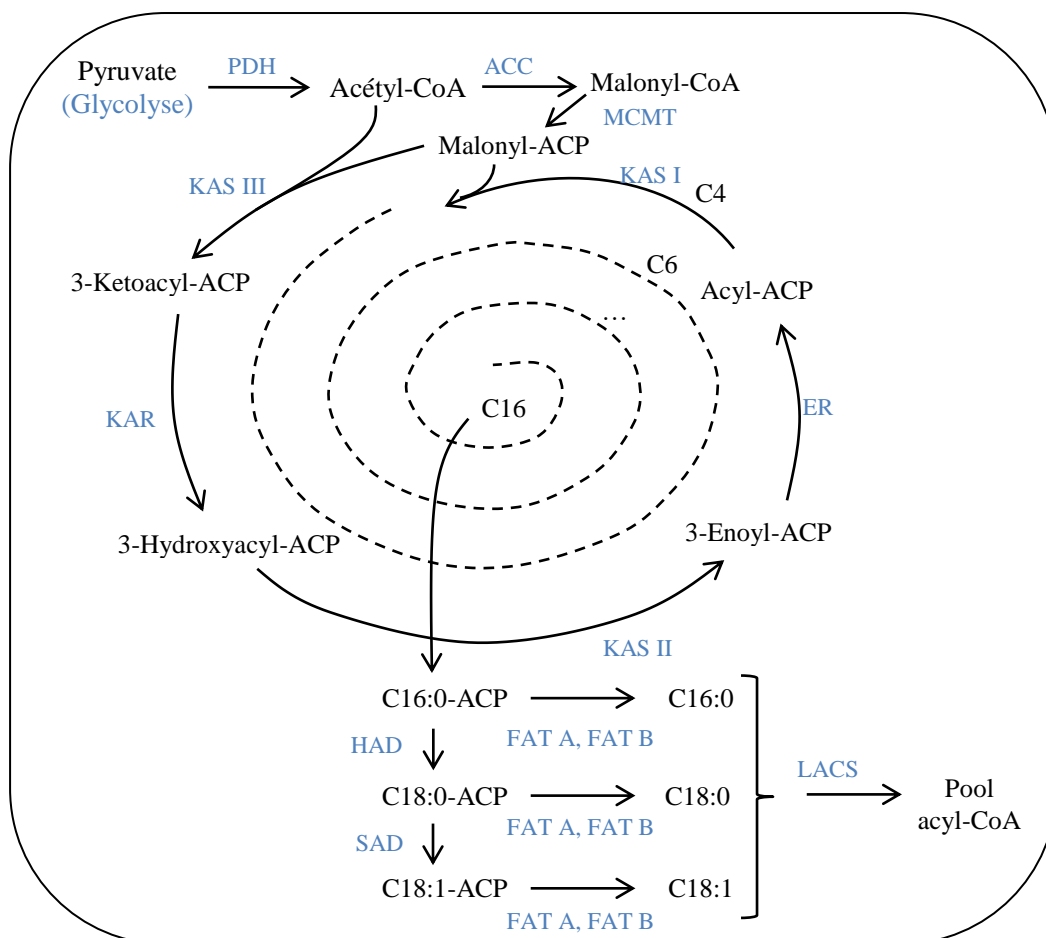


Figure 11 : Synthèse des acides gras et constitution du pool d'acyl-CoA.

Abréviations : ACC, acétyl-CoA carboxylase ; ACP, acyl carier protein ; ER, enoyl-ACP réductase ; LACS : long-chain acyl-CoA synthase ; FAT, fatty acyl-ACP thioestérase ; HAD, hydroxyacyl-ACP ; KAR, cétoacyl-ACP réductase ; KAS, cétoacyl-ACP synthase ; MCMT, malonyl-CoA: ACP malonyltransférase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; SAD, stearoyl-ACP desaturase.

Suite à la synthèse du pyruvate, produit de la glycolyse, le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) convertit ce dernier en acétyl-CoA (figure 11).

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) puis l'ACP S-malonyltransférase (MCMT) permettent la formation du malonyl-ACP. Sa condensation avec une autre molécule d'acétyl-CoA entraîne la synthèse du 3-cétoacyl-ACP (par la 3-cétoacyl-ACP synthase, KAS III) qui sera converti en 3-hydroxyacyl-ACP par la 3-cétoacyl-ACP reductase (KAR). Enfin, l'action de la 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase (KAS II) puis de l'énoyl-ACP réductase (ER) forment le premier acyl-ACP à quatre atomes de carbone. Cet acyle pourra être condensé de nouveau avec un autre malonyl-ACP afin d'atteindre la longueur de chaîne requise : deux carbones sont ajoutés à chaque cycle comportant ces quatre réactions. Ce mécanisme se déroule principalement dans le chloroplaste chez la cellule végétale (jusqu'au C18) et dans le cytosol pour la levure. Les acides gras perdent ensuite leur groupement ACP par l'intervention de fatty acyl-ACP thioestérase et sont activés sous la forme CoA *via* des enzymes spécifiques : les LACS (long chain acyl-CoA synthase). Ces acides gras activés constituent le pool d'acyl-CoA.

1.4.2.2. Synthèse des triglycérides et phospholipides.

La voie Kennedy est la principale voie pour la synthèse des triglycérides (en jaune, figure 12). La glycérol-3-phosphate acyltransférase permet l'ajout d'un acide gras activé, issu du pool d'acyl-CoA, sur le glycérol-3-phosphate pour former l'acide lysophosphatidique (LPA). L'intégration d'un second acyl-CoA (par la lysophosphatidic acid acyltransferase, ou LPAAT) suivi d'une déphosphorylation (par une phosphatidic acid phosphatase, ou PAP) entraîne la conversion du LPA en acide phosphatidique (PA), puis en diacylglycérol (DAG). Enfin, la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) permet la synthèse du triacylglycérol (TAG). Les triglycérides néoformés peuvent être accumulés dans les corps lipidiques avec les esters de stérols afin de constituer une réserve énergétique dans laquelle la cellule va pouvoir puiser (en orange, figure 12). En effet, les lipases pourront restituer un acide gras libre (AGL) et un DAG par hydrolyse de la fonction ester des triglycérides.

Néanmoins, il existe des voies alternatives à la voie Kennedy. Les phospholipides sont essentiellement synthétisés à partir du PA, DAG et TAG (en vert, figure 12). Ils peuvent conserver le squelette glycérol d'origine et seulement ajouter un groupement choline ou éthanolamine notamment (respectivement le cas de la CPT : choline phosphotransférase et de l'EPT : éthanolamine phosphotransférase). Ils peuvent également transférer directement un groupement acyl estérifié sur l'un des glycérides (cas de la PDAT : phospholipid diacylglycerol acyltransferase). De plus, les phospholipases, et notamment la phospholipase A2 (PLA2), sont

des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des glycérophospholipides au niveau de la position *sn*-2, conduisant à la libération d'un acide gras libre et d'un lysophospholipide. Elles sont impliquées dans un grand nombre de phénomènes biologiques chez la plante : mort cellulaire programmée (Canonne *et al.*, 2011), production d'acides gras inhabituels (Bates et Browse, 2011), etc. La figure 13 décrit la classification de ces phospholipases, selon la liaison à hydrolyser sur le phospholipide :

- La phospholipase A1 (PLA1) ou A2 (PLA2) clive la chaîne acyle qui estérifie, respectivement, la fonction alcool I ou II du résidu glycérol, conduisant à la libération d'un acide gras et d'un 1-lysophospholipide ou d'un 2-lysophospholipide.
- La phospholipase B (PLB) combine les deux activités enzymatiques précédentes.
- La phospholipase C (PLC) hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le phosphate, libérant un diglycéride et un phosphate d'alcool.
- La phospholipase D (PLD) lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un acide phosphatidique et un alcool.

D'autres lipides plus complexes peuvent être synthétisés à partir du pool d'acyl-CoA. C'est notamment le cas des céramides et sphingolipides (en rouge, figure 12).

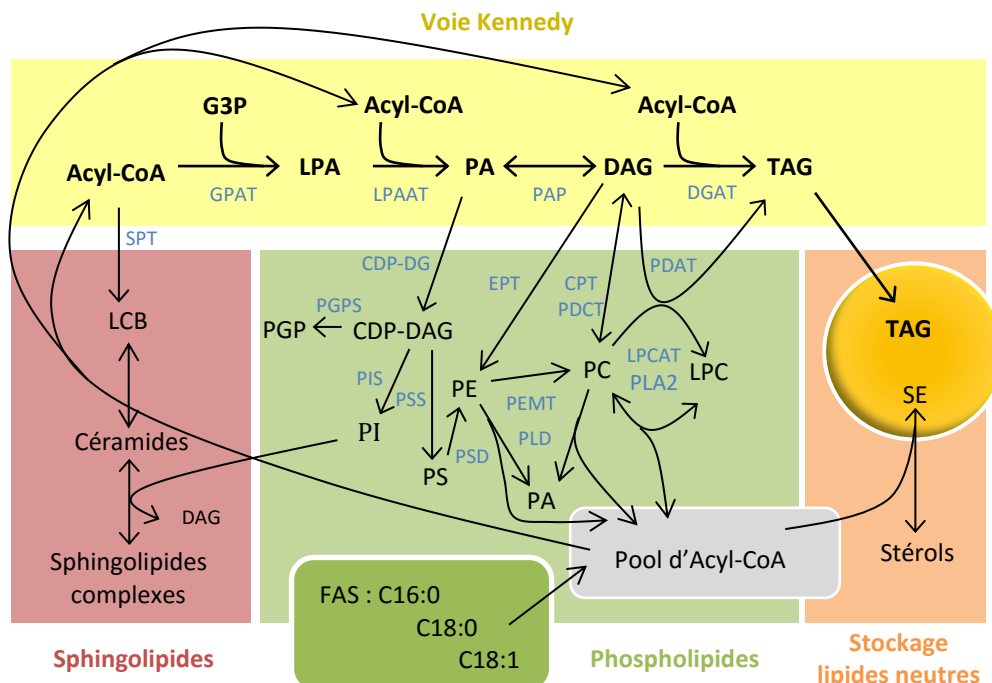


Figure 12 : Synthèse des triglycérides, phospholipides, sphingolipides et stockage.

Les enzymes sont indiquées en bleu, les intermédiaires métaboliques en noir et les réactions multiples ou peu connues sont symbolisées par des flèches en pointillés.

Abréviations intermédiaires métaboliques : AGL, acide gras libre ; C, choline ; CDP, Cytidine Diphosphate ; DAG, diacylglycérol ; E, éthanolamine ; G3P, glycérol-3-phosphate ; LCB, bases à longues chaînes (ou bases sphingoïdes) ; LPA, Acide lysophosphatidique ; LPC, lysophosphatidylcholine ; PA, acide phosphatidique ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PGP, phosphatidylglycerol phosphate ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine ; Ser, Sérine ; SE, ester de stérols ; TAG, triacylglycérol.

Abréviation enzymes : CDP-DG, CDP-DAG synthase ; CEPT, choline/éthanolamine phosphotransferase 1 ; CPT, cholinephosphotransferase ; DGAT, diglyceride acyltransferase ; EPT, éthanolaminephosphotransferase GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransferase ; LIP, lipase ; LPAAT, lysophosphatidyl acyltransferase ; LPCAT, lysophosphatidylcholine: acyltransferase ; PAP, phosphatidate phosphatase ; PDAT, phospholipid: diacylglycerol acyltransferase ; PLA2, phospholipase A2 ; PLC et D, phospholipase C et D ; PGPS, PGP synthase ; PIS, phosphatidylinositol synthase ; PSD, phosphatidylserine decarboxylase ; PSS, phosphatidylserine synthase.

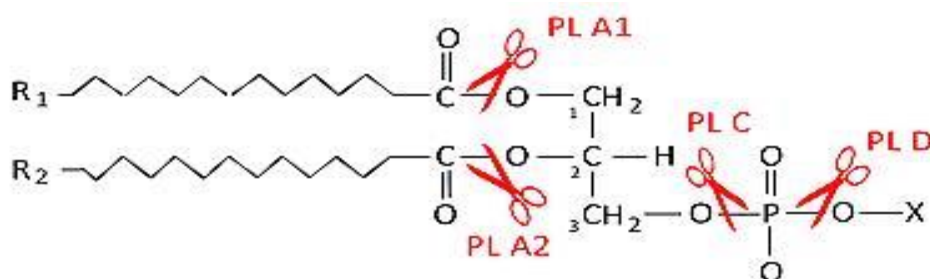


Figure 13 : Quatre classes de phospholipases.

1.4.2.3. Modification des acides gras.

Après synthèse des acides gras, activation sous forme CoA, puis estérification sur un glycérol pour la formation des glycérolipides, ces chaînes carbonées peuvent subir certaines modifications. En effet, afin de pallier à des conditions environnementales drastiques ou hostiles (température, pollution, acidité, pression), pour les cellules microbiennes ou végétales, des changements de la composition membranaire peuvent permettre une adaptation de l'organisme. D'après Denich *et al.*, (2003), une modification de la fluidité membranaire est obtenue en perturbant les ratios entre acide gras saturés et insaturés, insaturés *cis* et *trans*, branchés ou non, etc., afin de restaurer un équilibre rompu par un stress. Ces modifications peuvent s'opérer simultanément ou non. La figure 14 présente trois exemples de modifications des phospholipides membranaires, d'après Zhang et Rock (2008).

Ainsi, des désaturases telles que la DESA (phospholipid acyl-chain desaturase, chez les bactéries) permettent la formation d'une double liaison en $\Delta 5$ ou $\Delta 9$ (figure 14A). La majorité des désaturases sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et agissent spécifiquement sur les phospholipides afin de perturber directement la fluidité membranaire. En effet, les acides

gras saturés présentent un mode de regroupement très dense dans la bicouche lipidique, contrairement aux acides gras insaturés.

Certains organismes possèdent également des phospholipides *cis-trans* isomérase (CTI) permettant de remplacer une double liaison *cis* par une double liaison *trans* (figure 14B). Les acides gras insaturés dans la configuration *trans* possèdent des propriétés physicochimiques s'approchant des acides gras saturés (température de transition élevée). Les Cti sont souvent activées lors d'une augmentation de la croissance cellulaire, de température ou lors d'une exposition à des solvants organiques, par exemple.

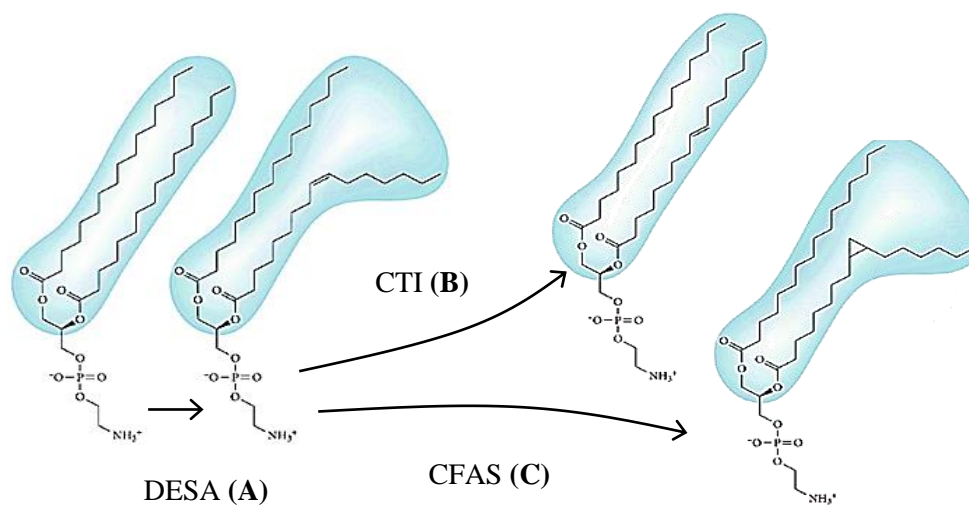


Figure 14 : Exemples de modifications des phospholipides chez la bactérie, adapté de Zhang *et al.*, 2008.

Abréviations : CFAS, cyclopropane fatty acid synthase ; CTI, phospholipid *cis-trans* isomérase ; DESA, phospholipid acyl-chain desaturase.

D'autres acides gras dits « inhabituels » (AGI) sont aussi à prendre en considération. La cyclopropane fatty acid synthase (CFAS) est une enzyme permettant l'introduction d'un cycle cyclopropane au sein d'une double liaison, conférant des propriétés similaires aux acides gras insaturés (figure 14C). Chez *E. coli*, cette modification de la chaîne d'AG s'effectue au niveau des phospholipides (PC, PE et PG) sur la position $\Delta 9$ et $\Delta 11$ de la chaîne carbonée en position *sn-2* et par l'intermédiaire d'un donneur de méthyle (la SAM, S-adenosine méthionine) (Wang *et al.*, 1992). Le principal avantage des CFA est une meilleure stabilité des membranes à une perturbation environnementale (acidité, froid). On retrouve notamment les bactéries *Lactococcus lactis* et *Oenococcus oeni* comme bactéries productrices de CFA, facteur clé de la tolérance à l'acidité (Budin-Verneuil *et al.* 2005) et à l'éthanol (Teixeira *et al.*, 2002) respectivement. Yu *et al.* (2011) ont également démontré la capacité du coton à synthétiser les

CFA dans ses tiges et racines (études transcriptomiques et biochimiques) mais très peu dans ses graines. Enfin, la graine de litchi (*Litchi chinensis*) est capable d'accumuler jusqu'à 40-50% de CFA dans son huile (Gaydou *et al.*, 1993).

D'autres structures ont été identifiées découlant de voies de biosynthèse peu communes et issues d'organismes vivant dans des environnements allant du très commun aux milieux extrêmes (fonds marins par exemple) : acides gras à très longue chaîne, hydroxylés, méthoxylés, ramifiés, acétyléniques, halogénés, etc. Les enzymes de modification des acides gras ciblent essentiellement les phospholipides, cependant des exceptions subsistent. C'est le cas de la PAI (acide linoléique isomérase de *Propionibacterium acnes*) utilisant uniquement les acides gras libres comme substrats (Imatoukene *et al.*, 2017). Lorsqu'on veut synthétiser des AGI, il est primordial de s'intéresser à la sélectivité/spécificité des enzymes ainsi que des précurseurs qui dépendent de la réaction à catalyser. Cela permet de gagner en productivité grâce à des réactions optimisées.

1.4.3. Synthèse de cofacteurs : le NADPH.

La synthèse des précurseurs est primordiale dans le cadre d'une accumulation des triglycérides. L'acétyl-CoA et le glycérol-3-phosphate sont souvent des facteurs limitant de cette synthèse. Il existe également un autre composé faisant souvent défaut, que ce soit chez les plantes ou les levures, le NADPH. La nicotine adénine dinucléotide phosphate (NADPH) est un cofacteur d'oxydoréduction qui intervient dans la voie de biosynthèse des acides gras. En effet, il est sollicité par la β -cetoacyl-ACP réductase et par l'enoyl-ACP réductase, deux des quatre enzymes du cycle (voir figure 11). Ainsi, deux molécules de NADPH sont requises pour l'élongation de deux carbones sur la chaîne des acides gras, justifiant la nécessité de produire ce cofacteur en quantité importante.

Différentes voies métaboliques sont impliquées dans la génération du NADPH et plus ou moins sollicitées selon l'organisme d'étude. La première et la plus évidente est la voie des pentoses phosphate (Stincone, *et al.*, 2015). En effet, la métabolisation d'une molécule de glucose-6-phosphate, issue de la glycolyse, permet la synthèse de deux NADPH via la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH). C'est la phase oxydative (en bleu, figure 15). La phase non oxydative, réversible, permet de générer certains sucres-phosphates grâce à la ribose-5-phosphate isomérase (Ri5PI), phosphopentose épimérase (PPE), la transcétolase (TKT) et la transaldolase (TALDO) (en rouge, figure 15). Enfin, certaines réactions sont des enzymes glycolytiques (en vert) permettant un retour au début de la voie afin de générer du NADPH en plus grande quantité. L'implication

de la voie des pentoses phosphates est donc indispensable pour la synthèse des acides gras et des triglycérides.

Les membranes étant considérées comme imperméables au NADPH, il existe des mécanismes compartiments-spécifiques impliqués dans la synthèse *de novo* ou dans le recyclage de cofacteurs. Dans le cytoplasme, le pool de NADPH peut également être renforcé par différentes isoformes d'isocitrate déshydrogénase (IDH), de glutamate déshydrogénase, d'aldéhyde déshydrogénase ou encore par l'enzyme malique. Dans la mitochondrie, la transhydrogénation du NADH et NADP^+ permet la génération de NAD^+ et NADPH afin de maintenir le ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ constant. Enfin, la synthèse *de novo*, via la phosphorylation du NADH, semble peu impliquée dans le contrôle de ce ratio.

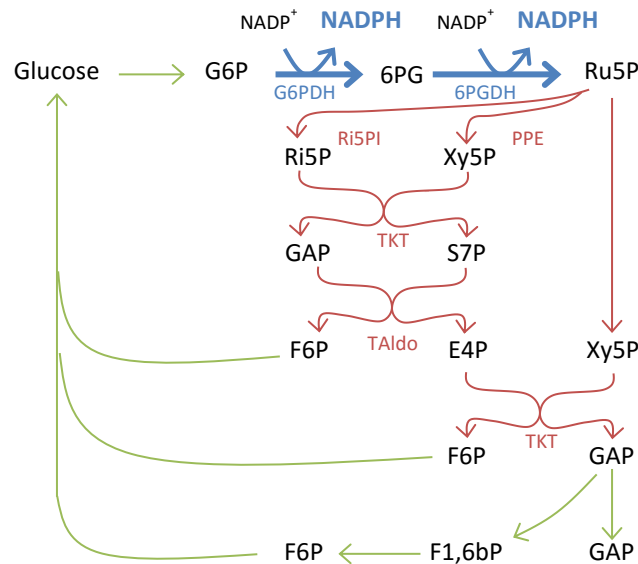


Figure 15 : Voie des pentoses phosphate.

Phase oxydative : bleu ; phase non oxydative : rouge ; enzymes glycolytiques : vert.
Abréviations intermédiaires métaboliques : 6PG ; 6-phosphogluconolactone ; E4P, erythrose-4-phosphate ; F1,6bP, fructose-1,6-bisphosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate ; G6P, glucose-6-phosphate ; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, nicotine adénine dinucléotide phosphate ; Ri5P, ribose-5-phosphate ; Ru5P, ribulose-5-phosphate ; S7P, sédoheptulose-7-phosphate ; Xy5P, xylulose-5-phosphate.
Abréviation enzymes : 6PGDH, 6-phosphogluconolactone déshydrogénase, G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; PPE, phosphopentose épimérase ; Ri5PI, ribulose-5-phosphate ; TALDO, transaldolase ; TKT, transcétolase.

2. Compréhension des systèmes : le lin oléagineux (*Linum usitatissimum*) et la levure *Yarrowia lipolytica*.

2.1. Préambule.

Le programme GENESYS, de l'ITE (Institut pour la Transition Energétique) PIVERT (Picardie Innovations Végétales, Enseignements et Recherches Technologiques) développe le sous-programme (SP4) « Production microbienne de lipides et dérivés » qui vise à développer la bioraffinerie des oléagineux. Les projets MétalipPro et Prébiol sont développés dans ce cadre. Leurs objectifs de recherche consistent en l'acquisition de connaissances relatives au métabolisme central et lipidique chez deux organismes oléagineux (le lin et la levure *Yarrowia lipolytica*), ainsi qu'à étudier l'extractabilité et la stabilité des huiles microbiennes. Dans cette partie, nous nous intéresserons à ces deux organismes et nous préciserons les différents outils et avancées technologiques ayant mené à la compréhension des différents mécanismes conduisant à la synthèse et à l'accumulation des acides gras.

2.1.1. Les organismes modèles.

En recherche, on parle d'« organisme modèle » lorsqu'on veut appréhender un phénomène biologique précis. Ceci est uniquement valable si les principes biologiques fondamentaux (génétique, métabolisme, mode de développement) sont relativement proches de l'espèce à laquelle on se réfère. Si on prend l'exemple de la souris (*Mus musculus*), la conservation génétique avec l'Homme a notamment permis des avancées majeures dans la compréhension des voies métaboliques et des maladies. Ces organismes modèles doivent également répondre à d'autres critères : facilement manipulables, culture ou élevage aisé, cycle de vie et temps de génération relativement courts, etc.

Chez les procaryotes, l'organisme modèle le plus utilisé est la bactérie *Escherichia coli* dont le génome a été séquencé par Blattner *et al.* (1997). Chez les eucaryotes, on distingue notamment *Saccharomyces cerevisiae* chez les unicellulaires (levure), premier organisme eucaryote séquencé (~ 10 Mb) grâce à une collaboration internationale (Goffeau *et al.*, 1996). Chez les pluricellulaires, on retrouve *Arabidopsis thaliana*, premier génome végétal séquencé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Au fil des années, les techniques liées au séquençage de l'ADN, ont rapidement progressé grâce au développement de nouvelles technologies (la synthèse chimique des oligonucléotides, les marqueurs radioactifs et fluorescents, la PCR ou polymérase chain reaction, les séquenceurs automatiques, l'électrophorèse capillaire, etc.). Ces développements

ont permis d'élargir les recherches à des organismes modèles plus spécifiques selon le contexte de chaque étude. Dans le cadre de recherches relatives au métabolisme lipidique, ces avancées ont conduit à se focaliser sur des plantes oléagineuses, telles que le lin, le colza ou le tournesol, mais également sur la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.

2.1.2. L'approche « omic ».

Les outils dits « omics » s'apparentent à de nouvelles technologies faisant référence à la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique, la fluxomique, etc. Le but de ces techniques est de caractériser et quantifier un certain nombre de molécules biologiques, afin de rendre compte d'une structure, d'une fonction ou d'une dynamique chez un organisme. Ces outils permettent ainsi une analyse spécifique des effets d'une condition donnée sur un organisme (stress physicochimiques notamment) par rapport à une condition contrôle. Ces approches font naître de grands espoirs dans le domaine de la toxicologie, le diagnostic, le criblage de molécules et l'identification de nouveaux médicaments.

En recherche, la combinaison d'informations issues de chaque approche « omic » est cruciale pour la compréhension des mécanismes cellulaires, tissulaires ainsi que des organes ou des organismes. La figure 16 offre un panel de nouveaux concepts « omics », comprenant des domaines plus spécifiques en biologie systémique.

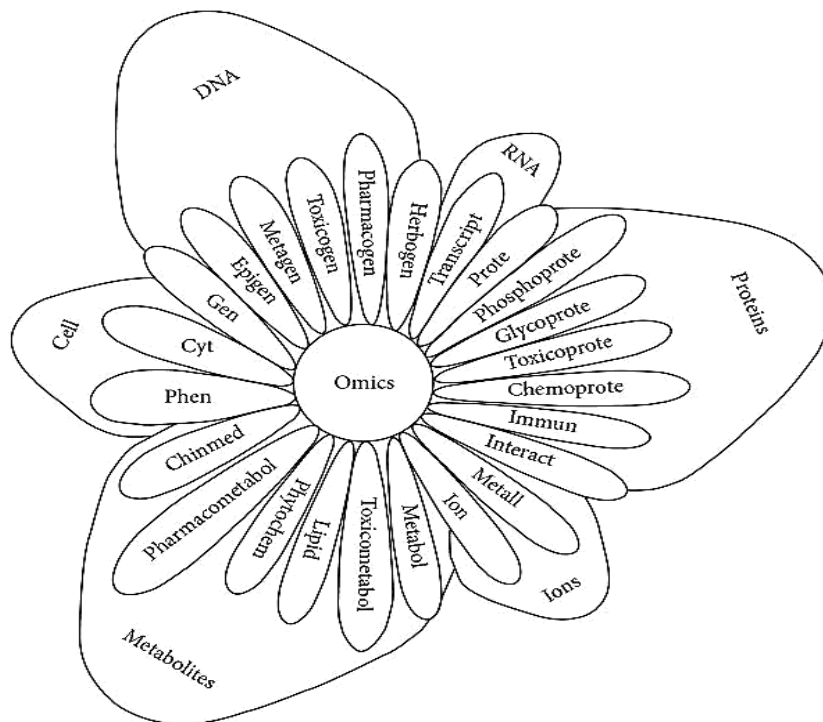


Figure 16 : Les approches « omic » et leur domaine d'étude en biologie systémique, d'après Sánchez-Vidaña *et al.*, 2017.

2.1.2.1. Les principales techniques.

Parmi ces techniques issues de l'approche « omic », la première est la génomique. Les gènes et leurs produits agissent de manière interconnectée avec un certain nombre de systèmes moléculaires. La génomique implique ainsi le séquençage et l'analyse du génome entier, ainsi que des molécules qui peuvent y être associées, telles que des facteurs de transcription (Sánchez-Vidaña *et al.*, 2017). Elle est très exploitée pour la construction d'arbres phylogéniques. D'autres disciplines plus spécifiques ont été développées pour l'identification d'altérations génétiques (épigénétique) ou l'analyse de collections de gènes issus d'un environnement (métagénomique). Cette approche métagénomique est aujourd'hui beaucoup employée pour étudier les relations entre microflore intestinale et état pathophysiologique de l'organisme hôte.

La transcriptomique comprend l'étude des ARN messagers mais également l'étude des transcrits. Elle permet de comparer l'expression des gènes d'une cellule dans une condition précise par rapport à une condition contrôle. Ainsi, on peut connaître l'implication des gènes et leur niveau d'expression (sous- ou surexpression) dans la réponse à un stress (physique ou chimique) ou à tout autre phénomène. Cette approche sert également à appréhender la régulation des gènes au cours des différents stades de développement de l'organisme. Un certain nombre de techniques permettent d'avoir accès à ce type d'informations : ce sont les puces à ADN, la PCR quantitative ou encore le séquençage systématique des ADN complémentaires.

L'analyse du protéome repose sur l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organe, tissu, etc. Elle n'est valable que sous des conditions et à un moment donné. Elle procure des informations sur la nature de chacune d'elles, leur structure, fonction, interactions, quantité, localisation et modifications post-traductionnelles éventuelles. Elle requiert certains outils, tels que l'électrophorèse bidimensionnelle (séparation) ou la GC-MS (séparation, identification, quantification) ainsi qu'une base de données de protéomique.

La métabolomique est une technique relativement récente qui permet l'analyse de l'ensemble des métabolites primaires connus (acides gras, acides aminés, sucres, acides organiques etc.), ainsi que les métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes, antibiotiques, hormones, etc.) présents dans une cellule, un organe ou un organisme. Elle repose sur l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS) ou sur la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le métabolome représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à une toxine ou à toute autre cause environnementale. Il est

néanmoins variable selon les espèces, en fonction du temps, ainsi que selon le stade physiologique ou pathologique de l'organisme étudié.

2.1.2.2. La fluxomique.

La métabolomique se réfère à une technologie permettant d'identifier et quantifier l'intégralité des métabolites. Cependant, le métabolisme est un phénomène dynamique : les métabolites sont continuellement transformés dans la cellule. Ces mécanismes, interconnectés à différents niveaux, constituent le fluxome. Ainsi, la fluxomique décrit une approche globale du métabolisme visant à déterminer les vitesses de réactions métaboliques au sein d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme. Le fluxome résulte donc de l'interaction entre le génome, le transcriptome, le protéome, le métabolome et l'environnement. Il est à la fois fonction de l'abondance des enzymes (dépendant des régulations transcriptionnelles et traductionnelles) et de leur activité (affectée par les paramètres cinétiques de l'enzyme, les concentrations en substrats et produits ou par l'interaction de l'enzyme avec d'autres molécules). La fluxomique permet ainsi une compréhension fine des différents mécanismes biologiques et est utilisée pour entreprendre l'amélioration de la production de composés d'intérêt, produits du métabolisme primaire ou secondaire.

Pour réaliser une analyse de flux chez un organisme, il est primordial de décrire son réseau métabolique. Sa taille dépend essentiellement de la question biologique posée. Sa fiabilité et sa véracité sont cruciales. Le réseau est généralement basé sur des données physiologiques, biochimiques ou encore génomiques et protéomiques issues de la littérature. Deux techniques d'analyse des flux s'opposent par leur complexité de mise en œuvre, leur coût ou encore leur fiabilité : ce sont la MFA (Metabolic Flux Analysis) et la FBA (Flux Balance Analysis).

2.1.2.2.1. MFA (Metabolic Flux Analysis).

Le but de la MFA est de quantifier l'intégralité des flux métaboliques du métabolisme central grâce à l'utilisation du marquage isotopique. Cette technique consiste à remplacer un ou plusieurs atomes d'une molécule (le substrat) par un autre isotope du même élément chimique. Cet isotope a le même nombre de protons et d'électrons que celui remplacé : il n'interférera donc pas, ou peu, dans l'étude réalisée. Il n'a cependant pas le même nombre de neutrons ce qui permettra de le distinguer des autres isotopes naturels. Cette technique permet alors l'analyse de la distribution isotopique au sein des différents intermédiaires métaboliques : l'analyse est alors d'autant plus précise pour la quantification des flux métaboliques dans une

cellule. Ces expérimentations peuvent être menées avec des isotopes stables (^{13}C , ^{15}N , etc.) ou radioactifs (^{14}C). L'avantage réside ainsi dans la facilité à laquelle les informations relatives à la masse des isotopomères ou à leur position, peuvent être obtenues et ceci grâce à l'utilisation respectivement de la spectrométrie de masse et de la RMN (O'Grady *et al.*, 2012).

Des études ont permis de décrire la cinétique de marquage dans le cas d'une voie métabolique simple de type : $\text{S} \rightarrow \text{A} \rightarrow \text{B} \rightarrow \text{C} \rightarrow \text{P}$. La concentration du substrat décroît de façon linéaire au cours du temps tandis que celle du produit augmente. La concentration des intermédiaires métaboliques tend à se stabiliser. Lorsque c'est le cas, on parle d'« état métabolique stationnaire » (figure 17A). Lors d'une expérience de marquage isotopique, l'« état isotopique stationnaire » est atteint quand l'incorporation du substrat marqué à travers les différents intermédiaires est constante (figure 17B). Cependant, pour cette voie métabolique linéaire, l'expérimentation de marquage isotopique ne fournira que très peu d'information : chaque intermédiaire métabolique présente alors un marquage équivalent aux autres métabolites de la voie. Par contre, pour un réseau plus complexe, les jonctions entre deux voies métaboliques mèneront à un effet « dilution » ou « répartition » du marquage, apportant ainsi une réponse intéressante quant aux redirections de flux orchestrées (Dieuaide-Noubhani et Alonso, 2014, Chapitre 1).

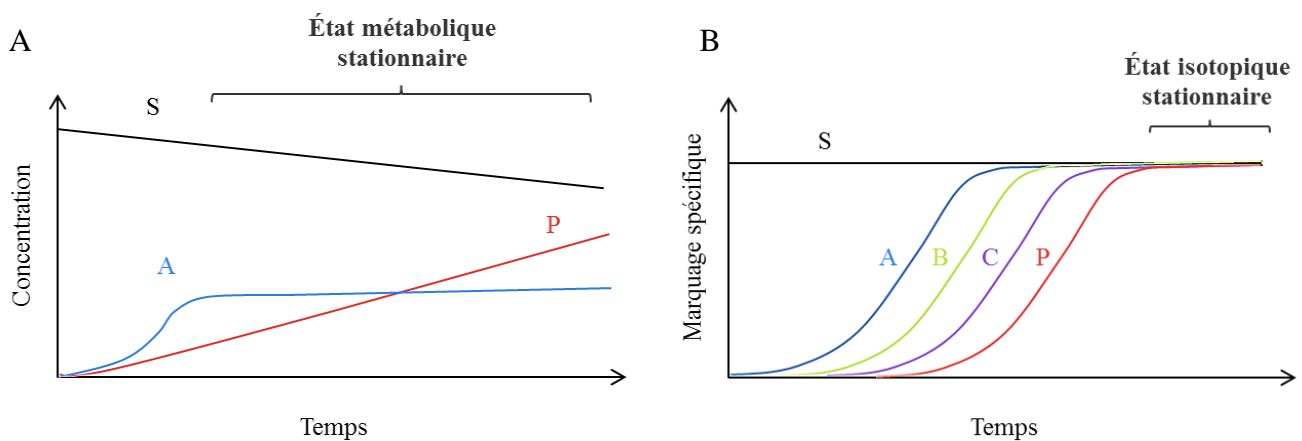


Figure 17 : États métabolique et isotopique stationnaires,
adapté de Dieuaide-Noubhani et Alonso, 2014 (Chapitre 1).

Evolution de la concentration des métabolites dans une voie métabolique linéaire (A) et cinétique de marquage des intermédiaires (B). S, substrats ; A, intermédiaire 1 ; B, intermédiaire 2 ; C, intermédiaire 3 ; P, produit.

Le choix du substrat marqué et de l'approche expérimentale représentent également un enjeu capital dans ce type d'analyse. Le substrat peut dépendre à la fois du réseau métabolique considéré ainsi que des techniques analytiques disponibles. Il peut être, soit marqué sur une position précise de la molécule ([1- ^{13}C]-glucose ou [1,2- ^{13}C]-glucose), soit marqué uniformément sur chaque atome concerné (ici sur le carbone, [U- ^{13}C]-glucose). L'association de ces deux types de substrat marqué dans un milieu de culture donne souvent le plus d'informations (Williams *et al.*, 2008). La création d'une combinaison de substrats marqués/non marqués permet aussi d'obtenir une réponse plus précise, tout en diminuant le coût des expérimentations. Les métabolites étudiés sont alors extraits suivant des protocoles adaptés et spécifiques de chaque composé, puis analysés en MS ou RMN. Les résultats d'une analyse en spectrométrie de masse sont relativement simples à collecter et à interpréter. Le principal inconvénient de cette technique analytique provient du regroupement des isotopomères par masse ne permettant pas d'obtenir des informations sur la position des atomes de carbone marqués, contrairement à la RMN (figure 18) : les trois isotopomères caractérisés par $m+2$ (marquage de deux atomes de carbone sur trois) seront confondus en MS, mais clairement distingués en RMN (O'Grady *et al.*, 2012).

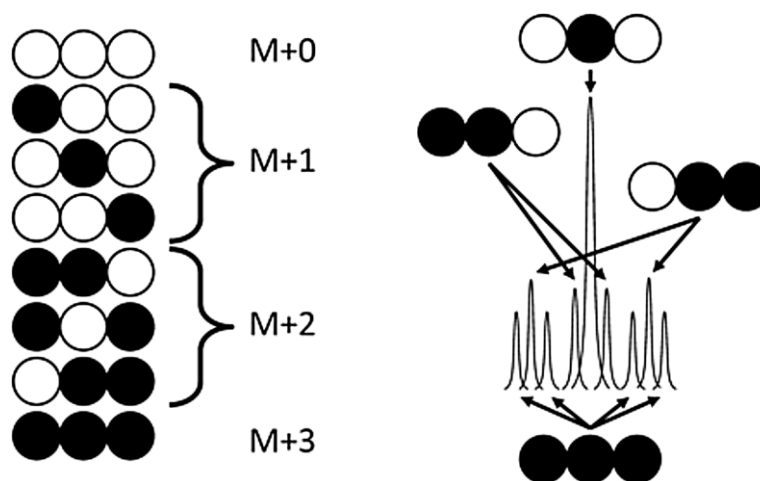


Figure 18 : Comparaison des informations collectées suite à une analyse par spectrométrie de masse (A) et résonance magnétique nucléaire (B) d'après O'Grady *et al.*, 2012.

La modélisation est basée sur la description du réseau métabolique incluant la stoechiométrie des réactions. Certains logiciels ont été développés pour le calcul des flux métaboliques. On peut citer le 13CFLUX (Wiechert *et al.*, 2001) qui est probablement le plus utilisé pour la résolution des équations mathématiques ou encore OpenFlux (Quek *et al.*, 2009). Un logiciel, Sysmetab, a aussi été développé au sein de l'UTC en étroite collaboration avec la

SAS PIVERT et exploité pour l'étude des flux métaboliques chez l'embryon de lin par ^{13}C -MFA (Acket, 2015).

La MFA est une technique très robuste permettant la compréhension du métabolisme. Cependant, elle est coûteuse et utilise des précurseurs marqués et des équipements haut-débit (MS, RMN) nécessaires à l'analyse des échantillons.

2.1.2.2.1. FBA (Flux Balance Analysis).

D'autres méthodes ont été développées pour appréhender les flux métaboliques intracellulaires. La FBA, ou Flux Balance Analysis, vise à déterminer la distribution optimale, des flux dans un réseau métabolique (figure 19). Le principe de la FBA débute par une représentation mathématique des réactions biochimiques équilibrées et stœchiométriques (figure 19A). On identifie notamment les flux dits « externes » correspondant à l'apport en substrat, la formation de la biomasse ou la libération de produits dans le milieu (déchets métaboliques). Cette reconstruction du réseau est convertie en modèle mathématique formant une matrice notée S . Chaque ligne représente un métabolite (m), tandis que chaque colonne est associée à une réaction (n). Dans ce cas et sans application d'aucune contrainte, la distribution du flux ne converge en aucun point. A l'état stationnaire ($dx/dt = 0$, où x est la concentration en métabolites et t le temps), le flux correspondant à chaque réaction est associé à l'équation $S \cdot v = 0$ (figure 19B). Cependant, le nombre de flux indéterminés est souvent plus élevé que le nombre de flux extracellulaires mesurés, ce qui implique un ensemble de solutions possibles à l'équation. L'application d'une contrainte sous la forme de fonction objective est alors nécessaire pour la résolution de l'équation mathématique (figure 19C). Cette fonction objective est définie par $Z = c^T \cdot v$ où c est un vecteur de poids, indiquant à quel point chaque réaction contribue à cette fonction. Une distribution unique optimale des flux est ainsi déterminée à partir de l'espace de solutions précédent. La fonction objective peut correspondre soit à la maximisation de la production de la biomasse ou à la minimisation de la consommation d'énergie. Elle dépend bien souvent du contexte de l'étude.

De par l'absence de donnée de marquage, la FBA est une méthode plutôt qualifiée de prédictive. Elle est employée pour la description d'une distribution optimale des flux métaboliques, pour une fonction objective donnée. Un de ses principaux avantages est d'être moins coûteuse et beaucoup plus simple et rapide à mettre en œuvre. Elle a été appliquée avec succès à différents organismes procaryotes et eucaryotes, uni- et pluricellulaires (Orth *et al.*, 2010 ; Hay et Schwender, 2011 ; Colombié *et al.*, 2015).

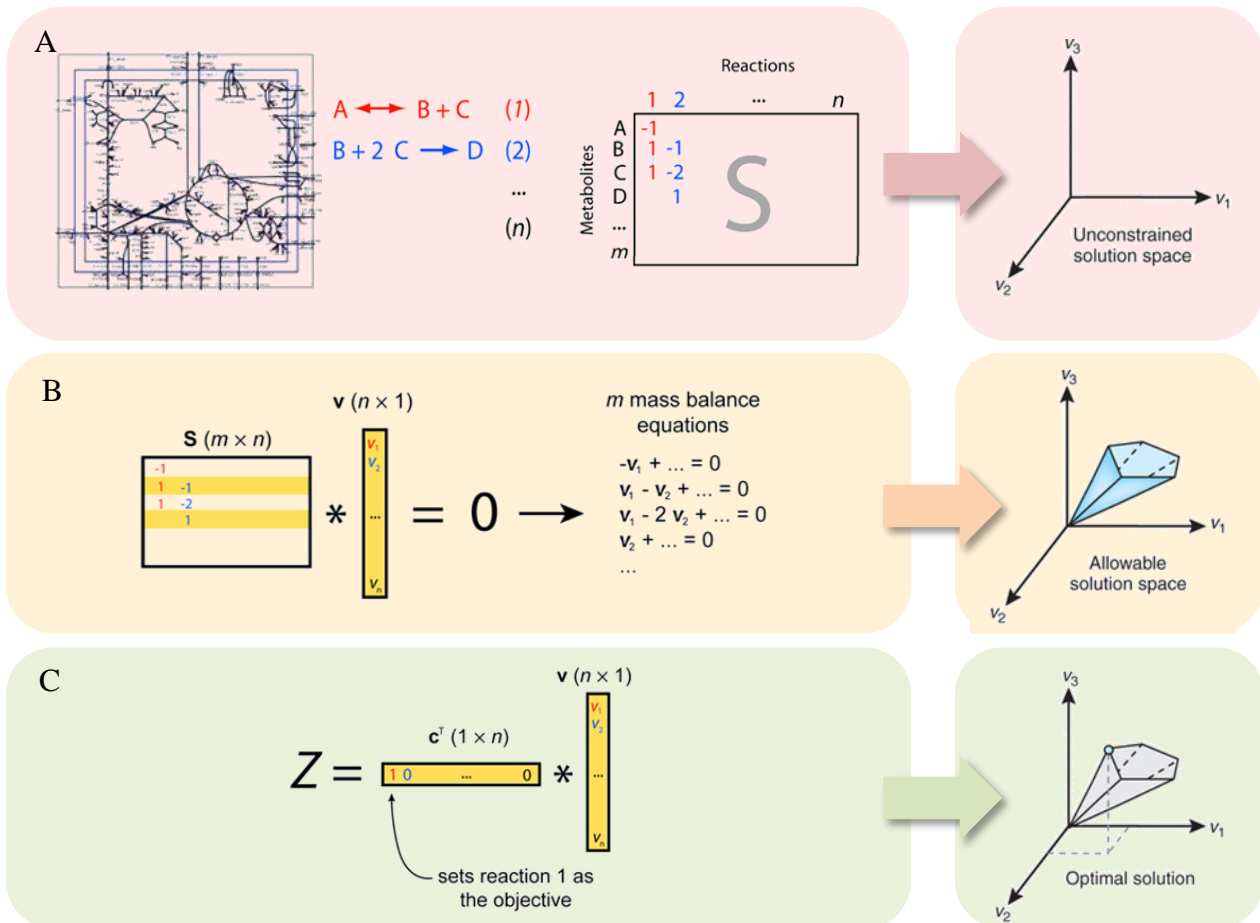


Figure 19 : Principe de la modélisation basée sur la contrainte par FBA, adapté d'Orth *et al.* (2010).

2.2. Le lin, un organisme modèle chez les plantes oléagineuses.

Dans le contexte de l'étude du métabolisme des organismes oléagineux, le modèle végétal choisi est le lin.

2.2.1. Une plante oléagineuse.

2.2.1.1. Intérêt agronomique et industriel.

Le lin, de son nom latin *Linum usitatissimum*, appartient à la famille des Linaceae. C'est une plante herbacée annuelle avec un système racinaire peu profond. C'est une des plus anciennes cultures de plantes qui semblent avoir débuté au Moyen-Orient. Le Canada présente aujourd'hui la plus grosse production de graines de lin au monde avec environ 500 000 tonnes par an (FAOSTAT 2014). Les autres pays producteurs sont la Russie (360 000 t/an), la Chine (350 000 t/an) ou encore l'Inde (150 000 t/an). Cette culture, pourtant mineure, est pratiquée dans plus de 40 pays et aux climats variés. Le lin est cultivé pour ses fibres et ses graines oléagineuses (Jhala et Hall, 2010). On peut distinguer le lin dit « fibre » du lin « oléagineux ».

Le lin oléagineux est de taille relativement petite, présente beaucoup de ramifications, et un grand nombre de capsules remplies de graines (Jhala et Hall, 2010). Il est cultivé pour sa richesse en huile (35 à 45 g.100g⁻¹) majoritairement composée d'acides gras polyinsaturés, dont 57% d'oméga-3 (ALA) et 16% d'oméga-6 (AL, acide linoléique). La trituration de la graine de lin, processus mécanique et thermique, permet la libération d'une huile végétale de qualité.

Sa composition lui confère un intérêt dans le secteur agroalimentaire (Kajla *et al.*, 2015), notamment pour ses teneurs en oméga-3 et oméga-6. En 1908, l'utilisation de l'huile de lin dans les préparations alimentaires a été restreinte en France à cause de sa forte oxydabilité. En effet, les insaturations présentes sur les chaînes aliphatiques de ses acides gras sont peu stables. Les oxydations sont susceptibles de conduire à la formation d'une liaison simple entre deux chaînes carbonées, initiant un phénomène de polymérisation : on parle de propriétés siccatives de l'huile de lin. Ainsi, cette huile peut être employée comme agent de polymérisation dans certaines peintures ou vernis (Overem *et al.*, 1999 ; Van de Mark *et al.*, 2005). L'huile de lin est souvent obtenue par pressage à froid, traitée dans un environnement pauvre en oxygène, emballée et stockée à l'abri de la lumière pour être consommée (Carter, 1993). Elle a été réintroduite sur le marché alimentaire en France par l'arrêté ministériel du 12 juillet 2010, en raison des recommandations nutritionnelles préconisées par l'ANSES. Elle peut également être utilisée dans la fabrication du biodiesel par transestérification acide, basique, enzymatique ou par utilisation de fluides supercritiques (Durett *et al.*, 2008 ; Dixit *et al.*, 2012). Ce carburant issu de l'huile de lin présenterait une densité similaire au diesel dit « conventionnel », avec cependant un pouvoir calorifique 10% inférieur, dû à sa teneur en oxygène plus importante (Dixit *et al.*, 2012).

La trituration de la graine de lin génère un tourteau qui peut être valorisé de diverses manières. Ils sont actuellement exploités en alimentation animale constituant une des principales sources de protéines pour les ruminants. La graine de lin oléagineux contient également des fibres solubles (Oomah *et al.*, 1995) et insolubles (pectine, cellulose et lignine) (Daun *et al.*, 2003) ainsi que d'autres types de composés : des acides phénoliques (essentiellement l'acide férulique ; Alu'datt *et al.*, 2013), des lignanes et notamment le SDG ou secoisolariciresinol diglucoside (associées aux phytoœstrogènes ; Basch *et al.*, 2007 ; Attoumbré *et al.*, 2010) ainsi que des antioxydants liposolubles comme les tocophérols (Oomah *et al.*, 1997).

Le lin fibre a quant à lui des tiges fines, très hautes et la plante possède beaucoup moins de ramifications (Jhala et Hall, 2010). Il est avant tout cultivé pour ses fibres longues, utilisées

dans l'industrie du textile (~ 75%) et pour ses fibres courtes (étoupe), valorisées dans la production de papier et matières isolantes (Czemplik, *et al.*, 2011). Les fibres de lin sont aussi exploitées pour la fabrication de nouvelles matières composites hybrides pour des applications en chirurgie, et notamment dans la conception de plaques osseuses artificielles (Bagheri *et al.*, 2013), et des matériaux biocomposites (Liu *et al.*, 2006 ; Alix *et al.*, 2008). Le teillage est le procédé mécanique permettant de séparer les fibres (longues et courtes) de la paille et ainsi d'éliminer la partie lignocellulosique (anas). Ces coproduits peuvent être valorisés sous la forme de litières animales, panneaux agglomérés, isolants, paillages horticoles ou combustibles pour chaufferie (Coopérative « Terre de Lin » ; Natur'Lin - LEO). Ils pourraient également présenter un futur intérêt pour la production d'énergie, par fermentation alcoolique de ses déchets, ces derniers étant majoritairement constitués de sucres fermentescibles (polysaccharides) (FitzPatrick *et al.*, 2010).

2.2.1.2. Caractéristiques développementales.

La culture du lin nécessite un climat tempéré et plutôt humide, un sol drainé et un pH de 6,0 environ. Il ne tolère que très peu les périodes de sécheresse et n'est pas particulièrement résistant aux fortes chaleurs : sa température optimale de croissance se situe entre 12 et 24°C. Sa culture est donc en adéquation avec les conditions pédoclimatiques des Hauts-de-France en général.

Après semis et germination, les cotylédons émergent et forment les premières feuilles (en marron, figure 20) (Anonymous, 1996). D'autres feuilles apparaissent ensuite et la tige s'allonge (en vert, puis jaune). La durée de la phase de croissance des tiges et des feuilles est comprise entre 45 et 60 jours. Un premier bourgeon se forme au sommet de la tige principale, donnant naissance à la première fleur. La phase de floraison (en orange) dure alors 15 à 25 jours. A la fin de celle-ci, sont formées les capsules renfermant en moyenne 6 à 8 graines chacune. S'ensuit une phase de maturation (en marron) de 30 à 40 jours où les capsules virent du vert au brun. Les graines accumulent alors les différents composés de réserve durant ces deux dernières phases (amidon, puis triglycérides). Après 50 à 60 jours après la floraison (JAF), les graines sont dites « matures ».

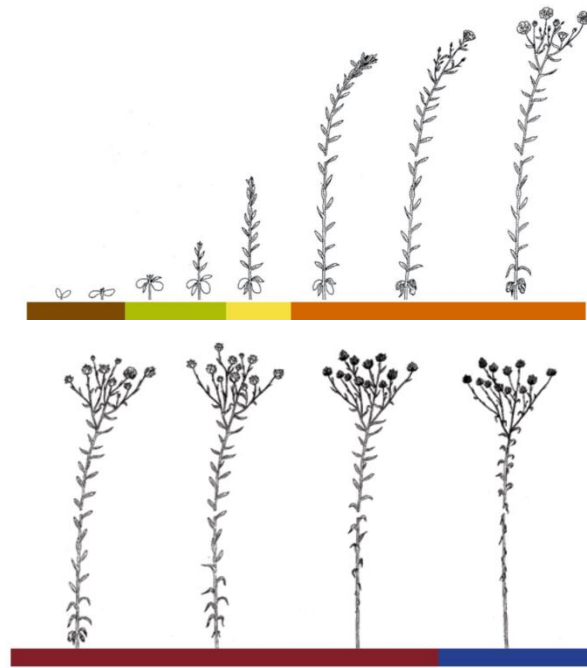


Figure 20 : Croissance de la plante de lin, d’après “Growing flax : production, management and diagnostic guide” (Anonymous, 1996).

2.2.1.3. Facteurs influençant la culture du lin et la qualité de son huile.

Les facteurs environnementaux, tels que l’ensoleillement, la température ou l’apport en eau, peuvent influencer directement la croissance de la plante. En effet, certaines études ont montré qu’un stress hydrique causé par une sécheresse provoquait un certain nombre de perturbations physiologiques : perte de turgescence, ajustements osmotiques et réduction de la croissance due au ralentissement de l’expansion cellulaire (Le Gall *et al.*, 2015). De plus, si ce stress a lieu durant la floraison, ces perturbations peuvent s’accompagner d’une perte de rendement en graines pouvant dépasser 40% (Beard et Comstock, 1980).

Un stress thermique (+10 à 15°C) peut également engendrer des dommages irréversibles sur la plante, qu’ils soient morphologiques, physiologiques ou biochimiques. En effet, des expériences effectuées en conditions contrôlées ont montré que des températures élevées pendant la phase de maturation provoquaient une réduction du nombre de graines par capsule, une diminution du poids de la graine ainsi qu’une teneur en huile plus faible et un taux d’acides gras polyinsaturés inférieur (Casa *et al.*, 1999 ; Savoie *et al.*, 2015). Cependant, l’effet de la température peut avoir un impact différent selon les cultivars et les conditions de culture. Baud et Lepiniec (2010) ont montré un effet positif de la température (augmentation de la teneur en huile de 55%) sur la culture d’embryons de soja à 35°C/27°C (jour/nuit) par rapport à une culture à 27°C/20°C. De plus, l’influence de la température sur la proportion d’acides gras

polyinsaturés est plutôt faible chez les graines de carthame, modérée chez le soja et le colza, mais critique chez le tournesol. Ces résultats pourraient s'expliquer par une sensibilité différente des désaturases à des températures plus ou moins intenses, selon l'organisme producteur. Enfin, Andrade *et al.* (1996) ont constaté qu'une diminution de l'intensité lumineuse pendant la période de remplissage pouvait également induire une réduction de 40 à 50% de la teneur en lipides.

Il semblerait que chaque facteur environnemental ait un rôle à jouer sur la croissance de la plante de lin et un impact différent selon le stade de développement durant lequel il intervient. Les effets peuvent également être dépendants de la lignée cultivée : la sélection variétale a ainsi permis de développer des lignées commerciales optimales (rendement en graines, teneur en huile, sensibilité aux stress, etc.). Des études mettant en lumière les différentes relations entre ces facteurs pédoclimatiques et génétiques existent (Savoire *et al.* 2015). Ces analyses multifactorielles sont cependant bien souvent soumises à confidentialité par les industriels et semenciers. Elles sont également très complexes à analyser, de par la multitude de facteurs contrôlés (ou non) : ensoleillement, précipitations et autres intempéries, température, nature et qualité du sol et de l'air, maladies et attaques parasitaires, etc.

2.2.2. Caractérisations génomique et outils génétiques du lin.

L'espèce *Linum usitatissimum* possède $n = 15$ chromosomes ($2n = 30$), tandis que d'autres espèces du genre *Linum* peuvent présenter entre $n = 8$ à 27 chromosomes. Son génome est constitué d'environ 350 Mb, avec 35% de séquences fortement répétées. Il a été entièrement séquencé par une approche « whole genome shotgun » (cultivar CDC Bethune) (Wang *et al.*, 2012). Une base de données publique incluant 286 294 ESTs (expressed sequence tag) est accessible en ligne (GenBank) et a été obtenue à partir de ce même cultivar.

Les outils génétiques actuellement utilisés pour la transformation du lin sont assez peu nombreux. Le plus utilisé en recherche repose sur l'infection de la plante par la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*. Elle permet alors le transfert et l'intégration d'une séquence ADN dans le génome de la plante infectée. Cette méthode a notamment permis d'étudier avec précision le rôle des microtubules dans les procédés de construction des fibres et la résistance au vent (Shysha *et al.*, 2012). Cependant, la caractérisation de gènes par transgène directement chez le lin est très contraignante : elle requiert une régénération complète de la plante transformée, et ce sur plusieurs générations, afin d'assurer une stabilité du caractère homozygote pour le gène d'intérêt. Il est alors plus fréquent d'étudier l'expression d'un gène issu du lin, chez un organisme hétérologue. Cela a notamment été réalisé chez la plante modèle

Arabidopsis thaliana (Pan *et al.* 2013 ; Wickramaratna *et al.*, 2015), mais également la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Khadake *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*, 2015).

2.2.3. Compréhension du métabolisme chez la graine de lin par une approche « omic ».

Les outils « omics » développés jusqu'à présent ont permis d'appréhender un certain nombre de mécanismes relatifs à la synthèse des acides gras, leur accumulation, ainsi que la génération de leurs précurseurs par l'intermédiaire du métabolisme central. Néanmoins, la compartimentation intracellulaire et tissulaire des plantes complexifie l'étude et la compréhension des différents mécanismes régissant ces organismes (O'Grady *et al.*, 2012). Il reste, de ce fait, un grand nombre de phénomènes à clarifier et à élucider, afin de se diriger vers une production d'huile plus importante et de meilleure qualité au sein de la graine, chez la plante de lin.

2.2.3.1. La graine, un organe autotrophe V.S. hétérotrophe.

La graine de lin est un organe de réserve accumulant séquentiellement de l'amidon et des triglycérides. Afin de synthétiser les précurseurs de ces composés de réserve, les cellules requièrent un apport en carbone important, assimilé sous forme de saccharose et glutamine essentiellement. La graine est dite hétérotrophe (organe « puits »).

Cependant, au cours du développement, la graine est un tissu vert (jusqu'à ~ 30 JAF) qui, aux stades les plus précoces, contient autant de chlorophylle qu'en contient une feuille (0,6-0,7 mg de chlorophylle.g⁻¹ de matière fraîche, d'après Browse et Slack, 1985). Des observations en microscopies électronique à transmission ont permis de montrer que les embryons de lin disposent de structures thylakoïdiennes organisées en grana à un stade précoce (14 JAF) (Troufflard, 2004). Celles-ci disparaissent progressivement dès 26 JAF, à mesure que la cellule se remplit de vésicules lipidiques. Des analyses transcriptomiques et protéomiques (Barvkar *et al.*, 2012), révèlent une expression de la RuBisCO tout au long du développement de la graine (niveau d'expression maximal à 8 JAF). L'ensemble de ces données suggère une activité photosynthétique des embryons de lin, spécifiquement pour les stades précoces (jusqu'à 26 JAF).

Néanmoins, certaines études et expérimentations ont pu remettre en question l'autotrophie des embryons de lin et l'implication de la photosynthèse dans l'accumulation des acides gras. Browse et Slack (1985) ont mesuré l'atténuation de la lumière au travers de la capsule de la graine de lin : l'intensité lumineuse traversant la capsule ne représente que 15 %

de celle extérieure. Les graines présentes dans ces capsules exposées aux rayons du soleil ne recevront jamais plus de 0,3-0,4 mmol de photons.m⁻².s⁻¹. De plus, la nécessité d'une PPF (photosynthetic photon flux density) élevée pour atteindre le point de compensation lumineux des graines en développement (0,5 mmol.m⁻².s⁻¹; Eastmond *et al.*, 1996) suggère un apport net en CO₂ (compensant la respiration) peu probable chez la graine de lin. Troufflard (2004) a également démontré une faible incorporation du CO₂ dans les acides gras (~ 0,1 %) *via* une expérimentation au bicarbonate, en présence d'ATP et de lumière.

2.2.3.2. Un métabolisme central compartimenté : rôle des transporteurs.

Suite à l'entrée des photoassimilats dans la cellule des organes de réserve, la saccharose synthase (SuSY) et l'invertase situées au niveau des parois cellulaires et du cytosol, permettent la formation de fructose, glucose et UDP-glucose (Sturm, 1999). Ces hexoses sont alors métabolisés *via* la glycolyse. Des analyses protéomiques et transcriptomiques effectuées sur des embryons d'*Arabidopsis*, de colza, de ricin et de maïs ont permis de confirmer la présence de l'ensemble des enzymes de la glycolyse dans le cytosol et dans les plastes. Il existerait donc des échanges entre ces deux compartiments (Schwender *et al.*, 2003). Une analyse des flux métaboliques par ¹³C-MFA a permis d'appréhender ces échanges au sein de l'embryon de différentes espèces oléagineuses, protéo-oléagineuses ou amylacées : le tournesol (Alonso *et al.*, 2007), le soja (Sriram *et al.*, 2004), le colza (Schwender *et al.*, 2003), le ricin (Smith *et al.*, 1992) et le maïs (Alonso *et al.*, 2010). La figure 21 représente les voies préférentiellement sollicitées chez ces organismes ou présentant une originalité (ricin notamment) par rapport aux autres espèces, pour la synthèse d'acétyl-CoA. Cette figure montre certaines divergences quant à l'implication des voies métaboliques et des différents transporteurs tout en soulignant l'importance primordiale de ces derniers pour la synthèse de l'acétyl-CoA, et par extension, des acides gras.

Ces transporteurs de la famille des pPT (plastidic phosphate translocator) catalysent l'échange de composés organiques phosphorylés contre un phosphate inorganique (Pi) (Flügge *et al.*, 2011; Facchinelli et Weber, 2011). Ils sont essentiellement localisés au sein de la bicouche des chloroplastes afin d'assurer leur fonction. On y retrouve ainsi le TPT (triose phosphate/phosphate translocator), le PPT (phosphoenolpyruvate/phosphate translocator), ainsi que le GPT (glucose-6-phosphate/phosphate translocator) ou le XPT (xylulose-6-phosphate/phosphate translocator).

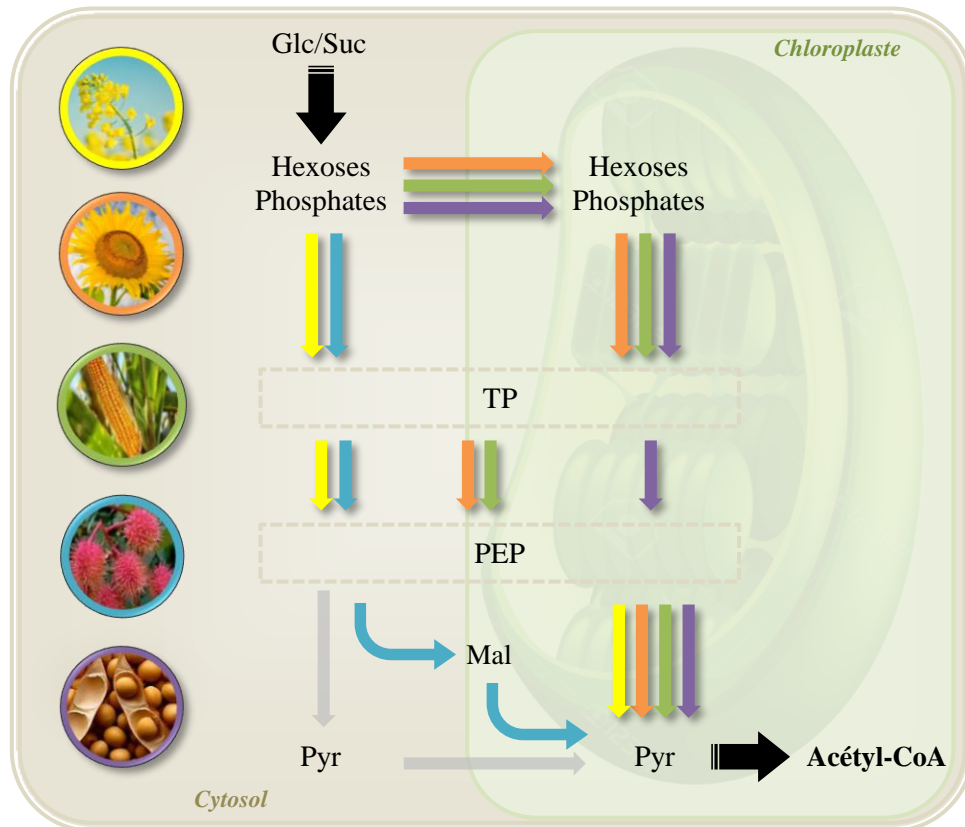


Figure 21 : Voies métaboliques sollicitées pour la synthèse d'acétyl-CoA chez différents organismes, adapté d'Alonso *et al.* (2007), Sriram *et al.* (2004), Schwender *et al.* (2003), Smith *et al.* (1992) et Alonso *et al.* (2010).

Les flèches de couleur correspondent à une voie sollicitée de manière préférentielle ou originale chez le colza (jaune), le tournesol (orange), le maïs (vert), le ricin (bleu) ou le soja (violet). La flèche grise représente une voie alternative, exploitée par d'autres organismes. Les métabolites encadrés en pointillés correspondent à un pool commun de métabolite entre le cytosol et le chloroplaste (pas de distinction lors de l'étude).

D'après une analyse protéomique de Barvkar *et al.* (2012) effectuée sur des embryons de lin durant la maturation de la graine, toutes les enzymes de la glycolyse ont été identifiées systématiquement dans le cytosol et dans le plaste. Il existe néanmoins des exceptions comme la 2,3-bisphosphoglycérate-indépendant phosphoglycérate mutase (PGAM) et l'énolase localisées dans le cytosol (interconversion du 3-PG en 2-PG, puis en PEP) et la phosphoglucomutase (interconversion du G1P en G6P) localisée dans le plaste. De plus, aucun transporteur de pyruvate n'a été identifié. Cette analyse suggère une synthèse de PEP exclusivement cytosolique, puis un transport de celui-ci dans le plaste pour la synthèse d'acétyl-CoA. De plus, les chloroplastes et la plupart des plastes des tissus non verts ne possèdent généralement pas les enzymes nécessaires pour former la PEP à partir des TP : le PEP doit être importé du cytosol, justifiant son importance capitale (Facchinelli and Weber, 2011).

Barvkar *et al.* (2012) suggèrent également l'existence d'une autre voie, empruntant la glycolyse cytosolique jusqu'au PEP, faisant intervenir une phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), une malate déshydrogénase (MDH), un transporteur de malate, ainsi qu'une enzyme malique à NADP (même voie que chez le ricin, Smith *et al.*, 1992). La figure 22 reprend l'ensemble des hypothèses émises par Barvkar *et al.* (2012).

Ces études ont montré certains points de divergence en fonction des travaux réalisés et qu'ils seraient nécessaires d'aborder. Chez la plupart des espèces, le G6P est importé du cytosol de l'embryon, vers le plaste (figure 21). Le transporteur GPT serait donc un élément non négligeable, notamment pour l'accumulation d'amidon. Une étude a pu montrer la présence de ce transporteur chez *Arabidopsis thaliana*, ainsi que le caractère létal de sa répression (Niewiadomski *et al.*, 2005). De plus, Troufflard (2004) a montré une forte incorporation de [^{14}C]-G6P pour la synthèse d'amidon chez des chloroplastes isolés d'embryon de lin, suggérant la présence du GPT au sein de la bicouche membranaire plastidiale. Ceci est en accord avec des résultats observés chez le colza et le pois (Hill et Smith, 1991 ; Eastmond et Rawsthorne, 2000). *In planta*, l'embryon de la graine de lin peut être considéré comme hétérotrophe : Bien que vert aux stades les plus précoces, son développement et sa survie dépendent de l'apport en photoassimilats (saccharose et glutamine) *via* le phloème et les organes plutôt aériens (feuilles). Or, de nombreuses études suggèrent une importance capitale du GPT dans les tissus hétérotrophes des organes de réserve (Kammerer *et al.*, 1998). Au contraire, le TPT serait plutôt retrouvé chez les tissus photosynthétiques, afin d'exporter les trioses phosphate synthétisés suite à la fixation du CO_2 (Flügge *et al.*, 2011).

Les transporteurs de malate et de pyruvate peuvent également être discutés. En effet, Acket (2015) a effectué une expérimentation d'enrichissement isotopique sur un embryon de lin par la [$\text{U-}^{13}\text{C5}$]-glutamine. L'analyse du fragment de McLafferty de l'acide palmitique n'a révélé aucun enrichissement ($m_0 = 1,00$), contrairement au malate ($m_0 = 0,51$; $m+1 = 0,15$; $m+2 = 0,10$; $m+3 = 0,07$; $m+4 = 0,17$). Le malate ne contribue d'aucune manière à l'apport en carbone des acides gras. L'interconversion du malate et du pyruvate, ainsi que la présence de transporteurs (cytosol/plaste) a été ainsi remise en question.

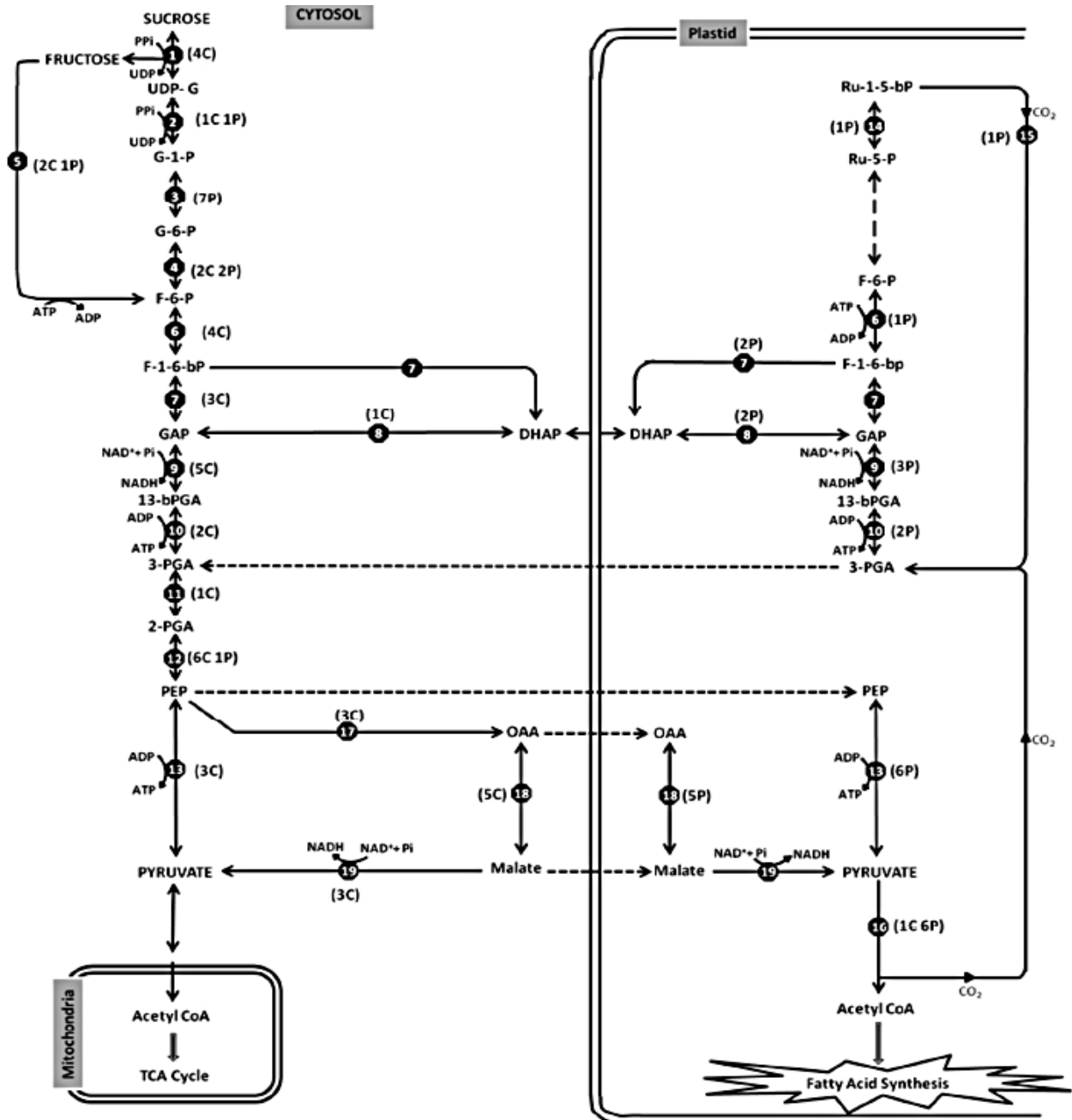


Figure 22 : Représentation schématique du métabolisme central durant le développement de la graine de lin, d'après Barvkar *et al.* (2012).

2.2.3.3. Métabolisme lipidique.

D'après une étude menée par Troncoso-Ponce *et al.* (2011), la régulation temporelle de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras serait plutôt similaire chez des plantes oléagineuses aussi distinctes que *Ricinus communis*, *Brassica napus*, *Euonymus alatus* et *Tropaeolum majus*. La régulation des mécanismes relatifs à l'accumulation des composés de réserve serait donc en partie extrapolable d'une espèce à une autre, chez les plantes oléagineuses.

Venglat *et al.* (2011) ont développé une base de données de séquences génétiques exprimées chez le lin (261 272 ESTs), issues de différents tissus et stades de développement de la graine. Au stade torpille, très peu de gènes seraient impliqués dans le métabolisme lipidique (~ 100 ESTs détectés), tandis que l'embryon mature présenterait ~ 1 500 ESTs incluant des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. Parmi ces séquences, certaines codent pour des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans l'embryogénèse et le métabolisme lipidique. LEC1 et LEC2, WRI1, FUS3 ou ABI3 sont notamment essentiellement retrouvés dans les tissus de la graine. La figure 23 présente certains d'entre eux ainsi que leur interconnexion et leur rôle en tant que régulateur du métabolisme et notamment comme médiateur de l'accumulation des composés de réserve, dont les triglycérides, chez *Arabidopsis thaliana*.

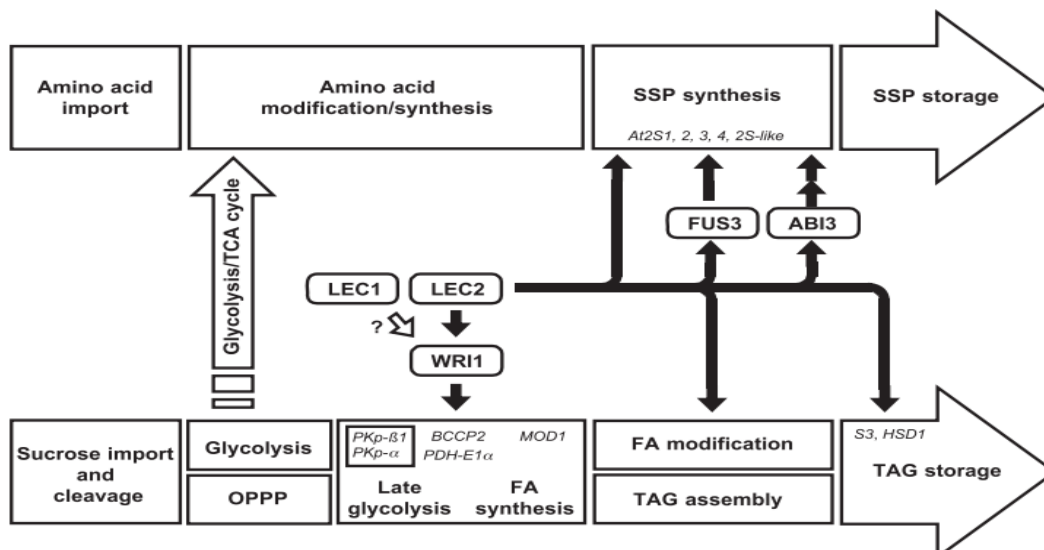


Figure 23 : Contrôle de l'accumulation des composés de réserves dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* d'après Santos-Mendoza *et al.* (2008).

Abréviations : FA : acides gras ; OPPP : voie oxydative des pentoses phosphates ; SSP : protéines de stockage des graines ; TAG : triglycérides ; TCA cycle : cycle de Krebs.

L'un des facteurs le plus important, est le facteur de transcription WRI1 (WRINKLED1) impliqué dans la régulation de la glycolyse tardive et de la synthèse des acides gras (figure 23). Le mutant délétère *wri1* d'*Arabidopsis thaliana* a été caractérisé par un tégument flétri, une diminution de 80% de sa teneur en huile, ainsi qu'une augmentation de 10% de la teneur en protéines (Lonien et Schwender, 2009). Baud *et al.* (2007) ont montré que cette mutation induisait une diminution de l'expression des gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, telles que la pyruvate kinase ou la pyruvate déshydrogénase, ainsi que de ceux codant pour des

enzymes de la synthèse des acides gras et notamment la ketoacyl-ACP synthase ou l'acyl-ACP thioestérase. La suppression de ce facteur de transcription WRI1 aurait donc un impact crucial sur la composition biochimique de la graine ainsi que sur la régulation de l'expression des gènes du métabolisme central et lipidique.

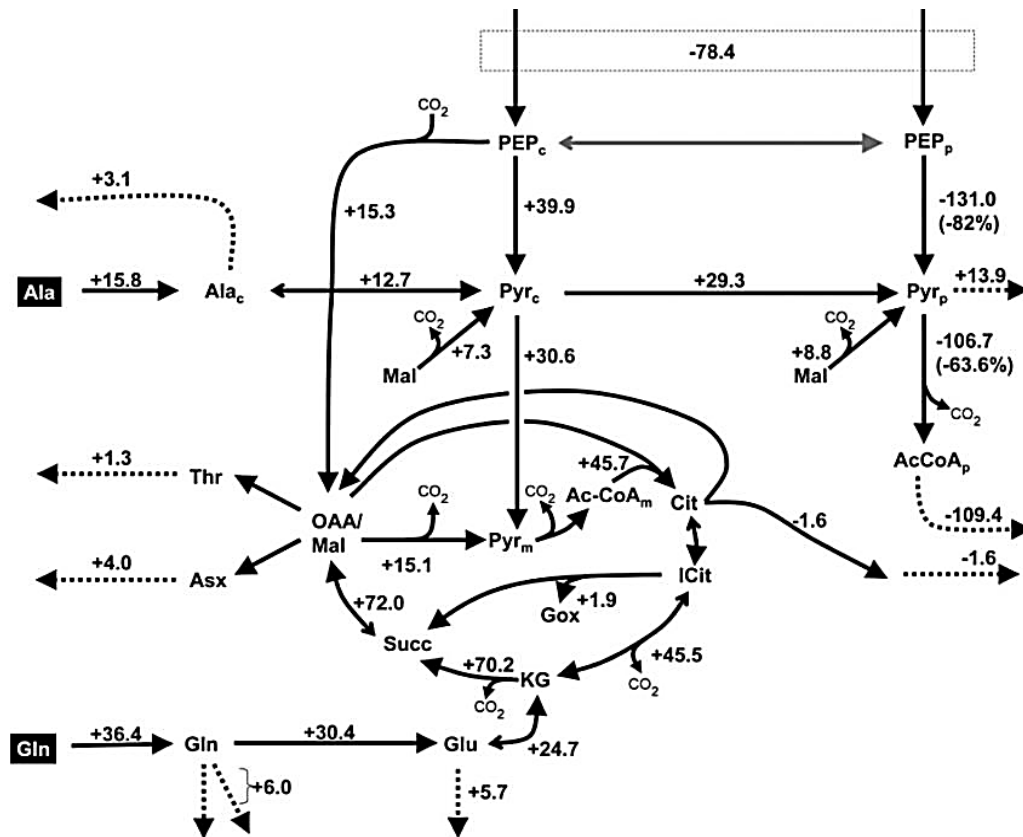


Figure 24 : Carte de flux différentiels des embryons du mutant *wri1* d'*Arabidopsis thaliana* contre son témoin, d'après Lonien et Schwender (2009).

Lonien et Schwender (2009) se sont intéressés aux flux métaboliques mis en jeu chez l'embryon du mutant *wri1* : l'assimilation du saccharose est réduite de moitié, tandis que les flux liés à l'activité plastidiale de la pyruvate kinase et de la pyruvate déshydrogénase présentent respectivement une diminution de 82% et 64%, (figure 24). Au contraire, l'absorption de glutamine (+36%), source d'azote et de carbone et la synthèse d'acides aminés (+16% pour l'Ala par exemple), présentent des flux plus importants. Cette observation témoigne d'une augmentation de la teneur en protéines chez *wri1*. Ces études mettent en évidence le rôle majeur des facteurs de transcription (notamment WRI1), dans la synthèse et l'accumulation des acides gras d'une part, mais également dans la régulation et le contrôle de la glycolyse. Métabolismes central et lipidiques sont par conséquent intimement liés.

La fluxomique n'apporte cependant que très peu d'information directe sur le métabolisme lipidique. En effet, le type d'ionisation (impact électronique, EI) ne permet pas une bonne accessibilité à l'ion moléculaire. Pour les acides gras saturés (C16:0 et C18:0), il est possible d'analyser le fragment de Mc Lafferty ($m/z = 74$), correspondant au dernier acétyl-CoA incorporé à l'acide gras (deux carbones) (figure 25). Néanmoins, cette analyse des flux métaboliques est exploitée afin de mieux comprendre l'implication du métabolisme central (glycolyse principalement) dans la synthèse des acides gras.

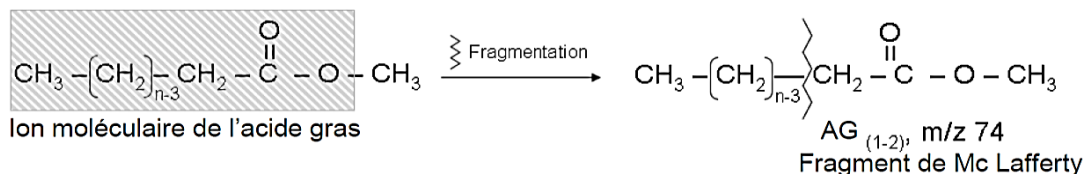


Figure 25 : Obtention du fragment de Mc Lafferty après fragmentation des esters méthyliques d'acides gras.

Abréviation : AG(1,2), carbones 1 et 2 de l'acide gras

L'analyse transcriptomique effectuée par Acket (2015) a également mis en évidence des différences d'expression de gènes entre deux lignées à 24 JAF productrices de plus ou moins d'huile : Astral ($44,6 \pm 0,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de MS) et 238 ($37,0 \pm 0,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de MS). L'embryon de la lignée Astral présenterait une surexpression des gènes codant pour des transporteurs d'hexoses (genolin_c18105 363), des protéines de stockage telles que l'oléosine (genolin_c46853 171) ou des enzymes impliquées dans la synthèse et la désaturation des acides gras (genolin_c58747 320). Au contraire, la lignée 238 présenterait une surexpression des gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés (genolin_c22289 318) ou de nitrite (genolin_c10110 1247). Ceci est en parfait accord avec la capacité de la lignée Astral à accumuler plus d'huile et moins de protéines par rapport à la lignée 238.

2.2.3.4. Génération des co-facteurs.

Le NADPH, co-facteur indispensable et souvent limitant dans la synthèse des acides gras, est produit par trois voies distinctes chez les graines oléagineuses : la voie oxydative des pentoses phosphates, celle de l'enzyme malique et par la réaction de la phase claire de la photosynthèse. L'étude des flux métaboliques par marquage isotopique a mis en évidence une implication plus importante de cette dernière voie dans les embryons photosynthétiques. A l'inverse, chez les embryons non photosynthétiques, la majeure partie du NADPH semblerait synthétisée par la voie oxydative des pentoses phosphates.

Durant sa thèse, Troufflard (2004) a montré la présence de structures thylakoïdiennes fonctionnelles dans les cellules d'embryons de lin, au moins jusque 26 jours après floraison. De plus, la couleur verte de ces embryons suggère leur caractère chlorophyllien. Elle a également démontré une forte activité de la NADP-GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à NADP), généralement associée à la photosynthèse, chez les plastes isolés d'embryons de lin par rapport aux plastes d'embryons de colza. De plus, l'expression importante du gène codant pour la RuBisCO, ainsi que sa présence en protéomique témoignent de l'implication de cette voie chez la graine de lin (Barvkar *et al.*, 2012). Néanmoins, certaines observations viennent contredire cette hypothèse. Les capacités photosynthétiques nettes des embryons de lin de 15-25 JAF peuvent atteindre $95 \mu\text{mol.mg de chlorophylle}^{-1}.\text{h}^{-1}$ *in vitro* (Browse et Slack, 1985), valeur comparable à celle obtenue avec des chloroplastes isolés d'embryons de colza ($58 \mu\text{mol.mg de chlorophylle}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ou de feuilles matures de colza ($68 \mu\text{mol.mg de chlorophylle}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Eastmond *et al.*, 1996). Or, la faible transmittance de la lumière au travers la silique et la paroi de la graine (30 %), ainsi que la nécessité d'une PPF (photosynthetic photon flux density) élevée pour atteindre le point de compensation lumineux dans les embryons ($\sim 1\ 500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), rendent peu probable l'activité photosynthétique des embryons *in planta*. De plus, Troufflard (2004) a suggéré une faible fonctionnalité de la photosynthèse chez les plastes de graines de lin en présence de lumière.

La synthèse du NADPH est néanmoins primordiale pour l'accumulation des lipides. D'après Acket (2015), la lignée accumulant le plus de lipides présenterait également une surexpression des gènes codant pour les enzymes de la voie des pentoses phosphates, démontrant ainsi la nécessité de générer du NADPH, pour l'obtention de graines présentant des teneurs en huile plus importantes.

2.2.3.5. Bilan de l'approche « omic » chez le lin.

Le métabolisme central est déterminant dans l'accumulation des triglycérides chez la graine de lin. La glycolyse cytosolique et plastidiale sembleraient toutes deux actives bien que des données contradictoires soient publiées (Barvkar *et al.*, 2012). C'est dans les plastes que la plus grande partie du NADPH, co-facteur limitant, mais indispensable pour la synthèse des acides gras, est généré *via* la voie des pentoses phosphates (Stincone, *et al.*, 2015). De plus, les facteurs de transcription sont des éléments clés dans le contrôle du métabolisme, tant central que lipidique (Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

2.3. *Yarrowia lipolytica*, un modèle levurien d'intérêt industriel.

La nécessité de travailler en système alternatif pour la production industrielle de composés d'intérêt a orienté les recherches vers l'étude de modèles d'organismes unicellulaires, et notamment les levures.

Il existe de nombreuses espèces de levures, micro-organismes eucaryotes généralement exploités pour leur faculté à réaliser la fermentation des matières organiques, notamment pour la production d'alcool, la panification, la synthèse d'antibiotiques ou tout autre métabolite d'intérêt. La plus connue est la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Une seconde levure s'est rapidement démarquée pour sa capacité à croître sur des substrats inhabituels, tels que des hydrocarbures et à accumuler une quantité très importante de lipides : *Yarrowia lipolytica*. Bien que les lipides microbiens ne puissent pas concurrencer la matière grasse dite « conventionnelle » (huiles végétales et graisses animales) de par leur coût de production généralement plus élevé (trois à quatre fois ; Wijffels *et al.*, 2010), la potentialité des levures oléagineuses s'est avérée très attractive (Ratledge, 1992).

Yarrowia lipolytica appartient à la famille des Dipodascaceae, la division des *Ascomycota* et le règne des *Fungi*. Le nom de genre *Yarrowia* a été choisi en hommage à un nouveau genre identifié par David Yarrow (Yarrow, 1972). Le nom d'espèce « *lipolytica* » provient de sa capacité à hydrolyser les lipides. Cette espèce a été choisie dans le cadre de notre étude pour sa capacité à accumuler des lipides.

2.3.1. Une levure oléagineuse.

2.3.1.1. Caractéristiques physiologiques et développementales.

Yarrowia lipolytica est capable de se diviser de deux manières différentes (figure 26). La première est une reproduction asexuée par bourgeonnement bipolaire (Kreger van Rij, 1984) : une cellule haploïde peut effectuer une mitose et former deux cellules identiques haploïdes (A). La seconde implique la fusion avec une autre cellule haploïde (B) et former un zygote diploïde. Ceci est possible si les deux cellules sont de type différent (a et α). Elle peut alors réaliser la mitose pour former deux cellules diploïdes (C). Selon les conditions de culture, le zygote diploïde peut également se développer sous la forme d'un mycélium, pour ensuite conduire à la formation d'asques, dans lesquels on peut trouver jusqu'à quatre ascospores haploïdes à l'extrémité des hyphes (D). On parle de sporulation ou de méiose. La germination entraîne enfin la libération des spores haploïdes des deux types cellulaires (E). C'est la reproduction sexuée (Wickerham *et al.*, 1970).

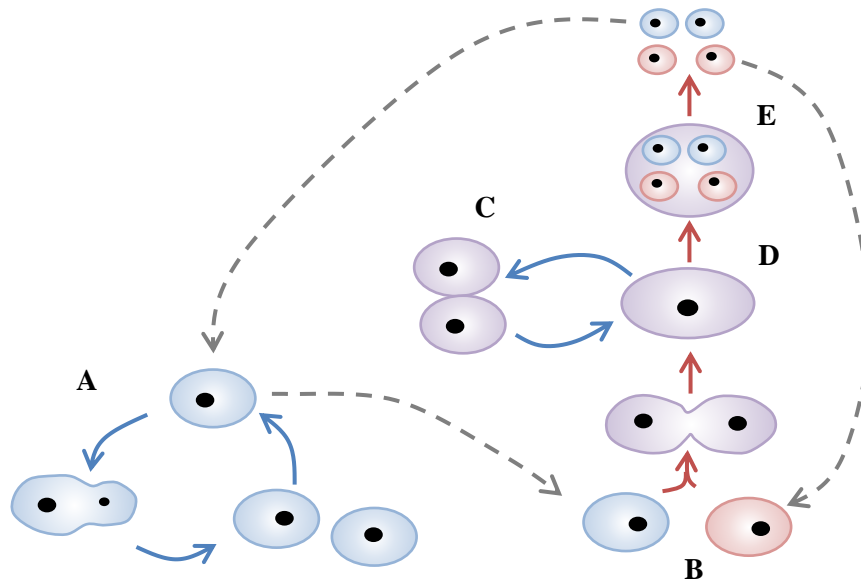


Figure 26 : Cycle de développement de la levure.

A. Mitose de la cellule haploïde par bourgeonnement. B. Fusion d'une cellule a (bleu) et α (rouge). C. Mitose d'une cellule diploïde (violette). D. Meïose de la cellule diploïde (sporulation). E. Libération des ascospores (germination). Les flèches bleues correspondent à la reproduction asexuée, les flèches rouges, une reproduction sexuée.

La température optimale de croissance de *Yarrowia lipolytica* se situe aux alentours des 28°C. Elle est cependant capable de tolérer des températures allant de 10 à 32°C (Kreger van Rij, 1984). Elle est aérobie, considérée comme halotolérante et acidophile. Elle possède une activité lipolytique (lipases et estérases) et protéolytique (protéases) d'après Zinjarde (2014).

L'une de ses principales caractéristiques est également sa capacité à assimiler des substrats hydrophobes, tels que des alcanes, des alcènes et des lipides (huiles végétales, triglycérides et acides gras) aussi bien pour la remobilisation (production d'acide citrique notamment) que pour le stockage dans les corps lipidiques (Ledesma-Amaro *et al.*, 2016). Cette propriété est possible grâce à une batterie de transporteurs protéiques (type translocases), la sécrétion de tensioactifs et de lipases ou le changement de conformation de la membrane et du profil en acides gras de ses phospholipides (voir Synthèse bibliographique, § 1.4.1.2.).

Cette levure est considérée comme oléagineuse, donc capable d'accumuler naturellement une teneur en lipides comprise entre 20 et 40 % de sa matière sèche (Ratledge, 2004). *Yarrowia lipolytica* accumule majoritairement, dans ses triglycérides, l'acide linoléique,

C18:2 (~ 50 %), l'acide oléique, C18:1 (~ 30 %) et l'acide palmitoléique C16:1 (~ 10 %) (Beopoulos *et al.*, 2011).

2.3.1.2. Caractéristiques génomiques et outils génétiques.

Le génome de *Yarrowia lipolytica* a été séquencé (souche W9, CLIB122) en 2004 par Dujon *et al.* (2004). Il possède approximativement 20,5 Mb, et est organisé en six chromosomes. Le séquençage de son génome a permis d'entreprendre un certain nombre de modifications génétiques et de développer des souches dont le métabolisme a été optimisé pour la synthèse de métabolites d'intérêt. Pour ce faire, un certain nombre d'outils génétiques existent.

Tout d'abord, le premier promoteur à avoir été développé est celui du gène *XPR2*, codant pour la protéase alcaline extracellulaire (AEP) (Nicaud *et al.*, 1989). Il est inductible à pH supérieur à 6,0 et en absence de source de carbone et d'azote. Le promoteur *POX2*, dont le gène code pour l'acyl-CoA oxydase 2, est également inductible, mais en présence d'alcanes, d'acides gras ou triglycérides pour leur remobilisation (Juretzek *et al.*, 2001). Certains promoteurs utilisés sont dits constitutifs, tels que celui du gène *TEF* (codant pour le facteur-1 α de traduction et d'élongation), utilisé par Imatoukene *et al.* (2017) pour la synthèse des CLA chez *Yarrowia lipolytica*. En effet, ce promoteur est dit « fort » et permet une expression importante du gène d'intérêt dès la phase de croissance.

La transcriptomique est un outil qui apparaît comme essentiel pour une meilleure compréhension de la cascade métabolique impliquée dans la transition entre la phase de croissance et la phase d'accumulation des lipides chez *Yarrowia lipolytica*. En effet, elle a permis d'appréhender certains mécanismes de régulation de l'expression des gènes (Morin *et al.*, 2011 ; Sabra *et al.*, 2017). Elle a également conduit à l'identification des cibles d'intérêt pour l'ingénierie génétique et métabolique (Imatoukene *et al.*, 2017). Pour ce faire, des outils sont désormais disponibles et utilisés en recherche chez *Yarrowia lipolytica* : les puces à ADN (Morales-Vargas *et al.*, 2012) et le RNA-Seq, ou séquençage de l'ARN à haut débit (Bredeweg *et al.*, 2017).

Les techniques de transformation, généralement développées pour *Escherichia coli* (souche DH5 α), sont bien connues dans la littérature et en constante amélioration (Moriguchi *et al.*, 2016). Le vecteur d'expression contenant la séquence d'intérêt dispose d'une origine de répllication ainsi que d'un système d'intégration (intégrases). La sélection des cellules recombinantes est généralement effectuée aux moyens de marqueurs de sélection. Dans le cas

des levures, les antibiotiques sont assez peu efficaces (résistance naturelle reconnue). Les marqueurs les plus utilisés en recherche comme en industrie sont les marqueurs d'auxotrophie : la délétion du gène *LEU2* (codant pour l'isopropyl malate déshydrogénase) ou du gène *URA3* (codant pour l'orotidine-5'phosphate décarboxylase) confère un caractère auxotrophe à la souche transformée vis-à-vis de la leucine ou de l'uracile respectivement (Bredeweg *et al.*, 2017). La sélection des souches transformées repose donc sur cette auxotrophie. De plus, la stratégie de clonage dite « Golden Gate » a récemment permis d'augmenter les potentialités de modifications génétiques de *Yarrowia lipolytica* en séries en rendant possible l'intégration de plusieurs gènes d'intérêt dans la même construction plasmidique (Celińska *et al.*, 2017).

Enfin, un certain nombre de souches sont disponibles pour la visualisation des différents compartiments cellulaires chez la levure : technologie très appréciée en recherche. Les outils FUN-1, Nile Red, MitoTracker, ER-Tracker, DAPI peuvent notamment être utilisés pour visualiser respectivement la vacuole, les corps lipidiques, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau. Cependant, *Yarrowia lipolytica* semble peu recommandée pour ce type d'analyse (faible pénétration des colorants, altérations morphologiques, toxicité, etc.). C'est pourquoi, une technologie basée sur l'utilisation d'un plasmide portant une cassette (sans système d'intégration) permettant l'expression de protéine fusionnée à la GFP (green fluorescent protein), a été développée (Bredeweg *et al.*, 2017). Ainsi, des études ont permis d'exploiter ce marquage pour la localisation de protéines, telles que FAT1 démontrant son implication dans l'export des acides gras à partir des corps lipidiques et favorisant ainsi leur dégradation pendant la remobilisation (Dulermo *et al.*, 2014)

2.3.1.3. Une levure d'intérêt industriel.

Yarrowia lipolytica, par ses caractéristiques multiples, est considérée comme une véritable usine cellulaire pour la synthèse de nombreux composés. De plus, elle est reconnue comme un microorganisme GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration). Elle peut donc être exploitée comme alternative pour la production de lipides : huiles ou compléments alimentaires, tels que les produits commerciaux enrichis en CLA (Imatoukene *et al.*, 2017) ou en EPA (Ledesma-Amaro *et al.*, 2016). Cette levure oléagineuse est également exploitée pour la synthèse d'arômes et notamment de la γ -déalactone, une lactone très utilisée dans l'industrie alimentaire et des boissons pour l'arôme de pêche qu'il libère (Romero-Guido *et al.*, 2011). La γ -déalactone peut également être synthétisée par bioconversion de l'acide oléique. Cette levure est également utilisée pour la synthèse d'édulcorants tels que l'érythritol (Rywińska *et al.*, 2013), d'acidifiants comme l'acide

citrique (Harzevili et Farshad, 2014) ou l'acide succinique si le substrat est le glycérol (Yuzbashev *et al.*, 2010), de tensioactifs (détergents et émulsifiants) utilisés dans l'industrie de la cosmétique, l'industrie alimentaire ou la remédiation biologique (Harzevili et Farshad, 2014), etc.

2.3.1.4. Paramètres influençant la productivité en lipides.

Dans le cas de l'exploitation de *Yarrowia lipolytica*, pour sa faculté à accumuler les lipides, plusieurs stratégies sont envisageables afin d'induire une meilleure production de lipides d'intérêt : améliorer la croissance de la biomasse, augmenter la teneur en lipides au sein de la biomasse ou modifier le profil lipidique de la souche.

L'accumulation des lipides chez *Yarrowia lipolytica* est un phénomène fortement induit lorsque le rapport C/N devient optimal. En effet, il a été démontré qu'en cas de limitation en azote, les levures orientent leur métabolisme vers la synthèse des lipides de réserve. En revanche, si ce ratio (massique) dépasse 100, l'effet inverse peut se produire. De plus, l'amélioration de la production des triglycérides est contre-balancée par une diminution du rendement en biomasse (Kolouchová *et al.*, 2016).

Malgré le rôle majeur du rapport C/N, d'autres paramètres physicochimiques peuvent intervenir dans l'accumulation des lipides chez *Yarrowia lipolytica*. Des études ont montré que la meilleure productivité en lipides avait été atteinte à une température de 28°C. Dans les conditions de cette étude, la teneur en lipides était de 44 g pour 100 g de MS (3,8 g.L⁻¹), contre 22 et 35 g.100g⁻¹ pour respectivement 24 et 33°C, (Papanikolaou *et al.*, 2002a). Contrairement à *Yarrowia*, certains organismes tels que *Mortierella alpina* voient leur teneur en acides gras augmenter lorsque la température d'incubation diminue (Jang *et al.* 2005). Néanmoins, un effet négatif des températures élevées sur le contenu en acides gras polyinsaturés semble être trouvé chez tous les organismes (plantes, levures, microalgues), altération due à la thermosensibilité des désaturases (Casa *et al.*, 1999 ; Jang *et al.*, 2005 ; Baud et Lepiniec, 2010). La température semble également intervenir dans la longueur des chaînes carbonées des acides gras. Une modification de l'activité des élongases semble intervenir et être associée à un mécanisme d'adaptation à une température non optimale.

D'autres facteurs : quantité d'oxygène dissous, pH, limitation du phosphore, ajout d'autres minéraux, sels ou vitamines, nature de la source de carbone, mode de conduite de la culture, etc., ont aussi été étudiés pour connaître leur impact sur la croissance ou la production et l'accumulation des acides gras.

2.3.2. Compréhension du métabolisme chez *Yarrowia lipolytica* par une approche « omic ».

2.3.2.1. Carence en azote et accumulation des acides gras.

Lorsqu'elle est cultivée pour la synthèse des triglycérides, la levure *Yarrowia lipolytica* présente une croissance au cours de laquelle on peut distinguer trois phases : la production de la biomasse, l'accumulation précoce des triglycérides puis leur accumulation tardive. Dès lors que le substrat azoté devient limitant dans le milieu de culture, la première phase s'achève. Durant cette période de transition, Morin *et al.* (2011) ont mis en évidence la sous-expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou de ceux impliqués dans le transport de l'ammonium. C'est le cas, par exemple, du gène *PTR3*, codant pour une sous-unité de la Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS), un complexe impliqué dans la détection de l'ammonium et intervenant également dans le contrôle de gènes codant pour des perméases. L'expression des gènes relatifs à la synthèse des acides gras ne semble que très peu affectée lors de la transition entre ces deux phases. L'accumulation des triglycérides ne serait donc pas induite au niveau transcriptionnel chez la levure oléagineuse.

Zhang *et al.* (2016) se sont intéressés à la mobilisation des flux carbonés dans le métabolisme de *Yarrowia lipolytica*, suite à un phénomène de carence en azote (non induit par son assimilation par la levure). Lorsque le milieu contient 0,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, la levure accumule jusqu'à 14,3 g.100g⁻¹ de MS contre seulement 8,7 g.100g⁻¹ avec un apport en substrat azoté trois fois supérieur. Grâce à une analyse des flux métaboliques au [U-¹³C₆]-glucose (20 %), cette équipe a permis de connaître et comprendre cette divergence métabolique et phénotypique. Le citrate mitochondrial est transporté vers le cytosol avant d'être converti en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (figure 27). Sans cette carence, ces deux phénomènes n'ont pas lieu (Zhang *et al.*, 2016). En effet, dans un milieu dépourvu de source azotée, les organismes oléagineux sont capables de convertir l'AMP en IMP, *via* une AMP désaminase. Afin de pallier à cette carence, une molécule de NH₄⁺ est libérée. Or, l'AMP est également impliquée dans la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate dans le cycle de Krebs. L'aconitase étant réversible, l'isocitrate en excès est ré-isomérisé en citrate, qui est alors transporté à l'extérieur de la mitochondrie permettant de former un oxaloacétate et un acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras (Ratledge et Wynn, 2002).

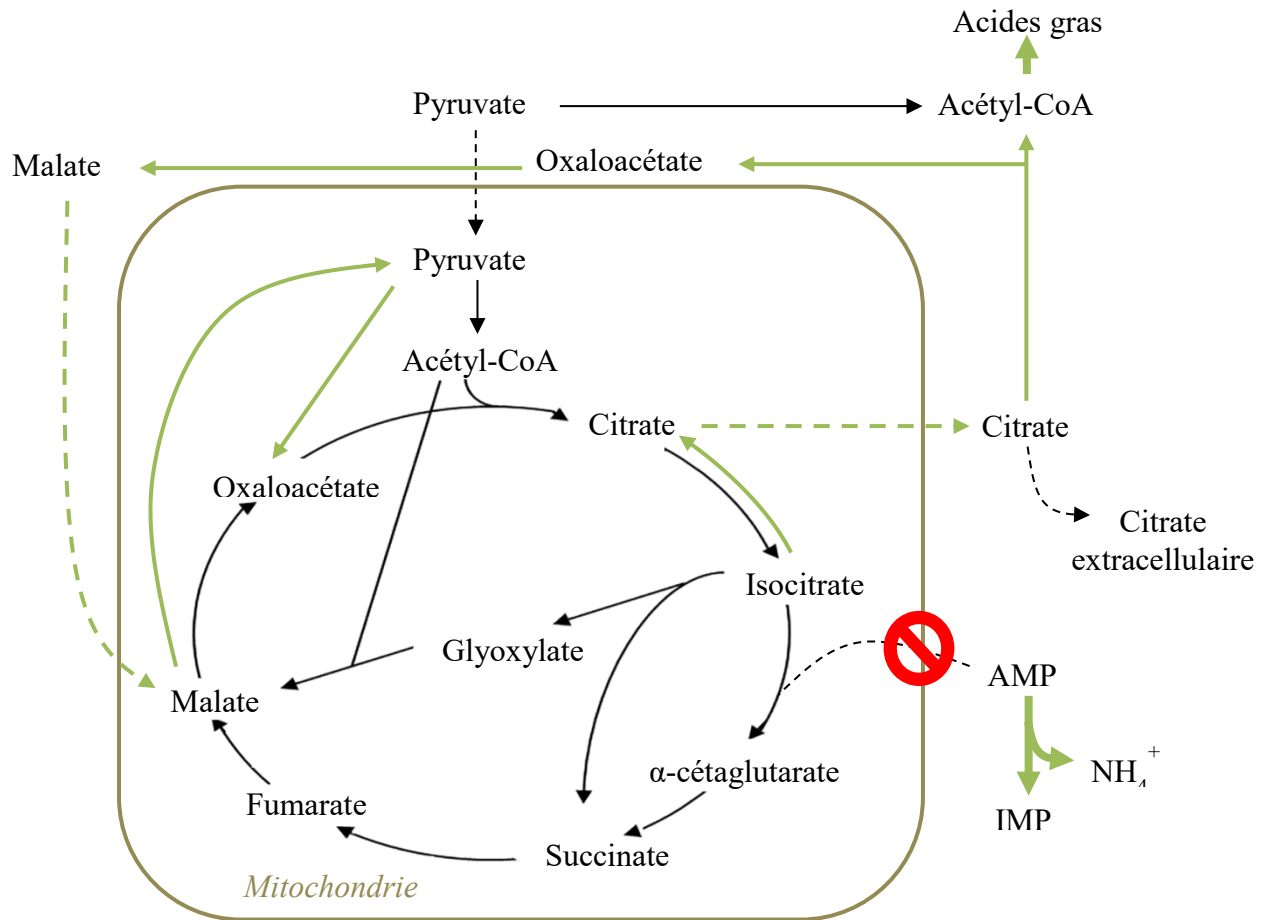


Figure 27 : Effet d'une carence en azote sur les flux métaboliques, adapté de Zhang *et al.* (2016).

Les flèches en pointillées correspondent à un transport à travers deux compartiments. Les flèches noires correspondent à des réactions dont le flux métabolique est plus important en présence d'azote. Les flèches vertes correspondent à des réactions dont le flux métabolique est plus important en absence d'azote.

L'ATP citrate lyase est considérée comme la première source d'acétyl-CoA chez *Yarrowia lipolytica*. Son action requiert la présence de CoA et d'ATP. Une étude menée sur différentes espèces de levures oléagineuses a montré une activité croissante au cours du temps de cette ATP:citrate lyase et plus spécifiquement pendant la phase d'accumulation des lipides (Holdsworth *et al.*, 1988). Ce résultat est donc en accord avec son activité intense en condition de carence en azote. Il est également intéressant de noter la surexpression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de CoA (dephospho-CoA-kinase) durant les phases précoce et tardive d'accumulation des lipides (Morin *et al.*, 2011) ainsi que ceux liés à la modification des acides gras pendant ces deux phases. Ainsi, l'accumulation du C18:1 est directement corrélée à la surexpression de la *FAD1* codant pour une delta-9-désaturase. Le

gène *DGA2*, codant pour une diacylglycéról acyltransférase ainsi que de nombreux autres gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et le stockage des lipides sont aussi surexprimés durant ces phases.

2.3.2.2. Sécrétion de citrate : une perte de carbone.

Le réseau présenté par Zhang *et al.* (2016) ne semble pas avoir intégré la sécrétion de citrate dans le milieu extracellulaire. Or, Sabra *et al.* (2017) ont analysé le fluxome de *Yarrowia lipolytica* en conditions contrôlées et optimisées pour la production d'acide organique. Ainsi, ils ont pu estimer à ~ 50 % la part du flux de carbone sortant de la cellule sous forme de citrate par rapport au flux entrant de glucose en condition de carence en azote (tableau 3). Ceci pourrait constituer un frein à la synthèse des acides gras par compétition des deux voies.

En mode fed-batch, la consommation du glucose est sensiblement diminuée par rapport à une culture en conditions non contrôlées et sous carence en azote (-90% environ) (Kavšček *et al.*, 2015). Dans ce cas, la teneur en lipides peut augmenter de plus de 50%. Cette étude a montré que seulement la moitié de la consommation du glucose aurait été requise pour la synthèse des lipides. Le substrat assimilé en excès serait alors converti en citrate, puis excrété de la cellule. Une limitation de l'activité de l'ATP citrate lyase pour la conversion du citrate en acétyl-CoA et oxaloacétate semble avoir été observée. Les auteurs ont alors entrepris une simulation de la réduction du flux glycolytique par utilisation de la FBA en relation avec une réduction de l'import de carbone. Une alimentation en glucose de 0,152 mmol.g⁻¹.h⁻¹ a ainsi été préconisée afin d'éviter la sécrétion de citrate, favorisant ainsi sa conversion en acétyl-CoA. Cette hypothèse a été vérifiée en réalisant une culture en fed-batch, avec une concentration initiale en glucose et azote respectivement de 8,0 et 0,085 g.L⁻¹. Après épuisement, le glucose a été renouvelé à une concentration et une teneur en accord avec les résultats de la simulation FBA. Cette expérimentation a permis de montrer que la production de citrate avait été supprimée dans le milieu de culture. Ces résultats confirment que la synthèse des lipides en condition de carence en azote n'est pas assez importante pour convertir l'intégralité du glucose assimilé. Le carbone en excès sort de la cellule sous la forme de citrate par manque d'efficacité de l'ATP citrate lyase. Cette sécrétion représente une perte de rendement en acides gras et est à considérer pour une amélioration de la synthèse des lipides chez *Yarrowia lipolytica*. Le tableau 3 reprend l'ensemble de ces résultats.

	Carence en Azote	Fed-batch
Biomasse initiale (g.L ⁻¹)	2,84 ± 0,04	2,9 ± 0,3
Biomasse finale (g.L ⁻¹)	3,6 ± 0,2	2,5 ± 0,2
Glucose consommé (g.L ⁻¹)	7,1 ± 0,9	1,34
Citrate excrété (g.L ⁻¹)	4,4 ± 0,5	Non détecté.
Y _{Citrate} (g.g _{glc} ⁻¹)	0,5 ± 0,2	0
Y _{TAG} (g.g _{glc} ⁻¹)	0,050 ± 0,005	0,20 ± 0,02
Teneur en lipides (%)	25,7 ± 2,6	27,9 ± 3,1

Tableau 3 : Croissance et productivité de *Yarrowia lipolytica* en condition de carence en azote et en mode fed-batch sur glucose d'après Kavšček *et al.* (2015).

2.3.2.3. Le stockage sous forme de glycogène vs triglycérides.

Yarrowia lipolytica est capable de stocker de grandes quantités de lipides sous forme de triglycérides. L'excès de carbone peut également conduire à la synthèse du glycogène, une seconde forme de stockage représentant généralement 9% de la biomasse mais pouvant facilement atteindre 16% (Dulermo *et al.*, 2015). Le glycogène est synthétisé à partir d'un intermédiaire de la glycolyse. Le glucose-6-phosphate est converti en glucose-1-phosphate via une hexokinase, puis en UDP-glucose par l'action de l'UDP-glucose pyrophosphorylase. Les différentes unités glucosidiques sont enfin assemblées par la glycogène synthase, la glycogénine, ainsi qu'une enzyme permettant le branchement du glycogène (en α -1,4 et α -1,6). Cette voie serait susceptible de constituer une limitation dans l'accumulation des triglycérides par la quantité de carbone mobilisée pour la synthèse du glycogène ainsi que par la consommation d'un intermédiaire glycolytique.

Les microorganismes ont la capacité de percevoir la qualité nutritionnelle de leur environnement, afin d'adapter leur croissance et leur métabolisme. L'accumulation du glycogène chez la levure et les bactéries est généralement induite au début de la phase stationnaire, lorsqu'une carence en azote, soufre ou phosphore se fait sentir. Néanmoins, une étude menée par Queiroz-Claret *et al.* (2000) a montré une activité de la glycogène synthase (GSY) dès la phase exponentielle de croissance avant même l'épuisement des minéraux ou de

la source azotée. Le glycogène étant considéré comme un sucre de réserve, Bhutada *et al.* (2017) se sont alors demandés si la suppression du stockage du glycogène pouvait mener à une augmentation de la teneur en triglycérides par une redirection du flux de carbone du glycogène vers la synthèse des acides gras. Pour ce faire, ils ont effectué une analyse prédictive des flux métaboliques par FBA (réseau développé par Kavšček *et al.*, 2015). Ils ont pu relever une augmentation de 7,1% du taux de synthèse des triglycérides, suite à l'élimination *in silico* de la synthèse du glycogène, chez une souche de référence (« sauvage ») qui utilisait le glycérol comme seule source de carbone. De plus, lorsque le gène unique et non essentiel codant pour la GSY a été délété ($\Delta gsy1$), une augmentation significative de la teneur en lipides a été observée (+60% à 24h sur glycérol), confirmant alors les résultats obtenus par l'analyse FBA. Les résultats sont assez similaires sur glucose Bhutada *et al.* (2017). Le glycogène et les triglycérides seraient donc deux composés de réserve pour lesquels le flux de carbone peut entrer en compétition.

2.3.2.4. Bilan de l'approche « omic » chez *Yarrowia lipolytica*.

La levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* est capable d'augmenter sa teneur en lipides lorsqu'elle est soumise à un stress tel qu'une carence en azote notamment. Dans ces conditions, la conversion du citrate en acétyl-CoA confère à l'ATP:citrate lyase un rôle majeur dans l'accumulation des triglycérides (Zhang *et al.*, 2016). Cependant, il semblerait que l'activité de cette enzyme soit l'un des facteurs limitant : le citrate non converti est transporté à l'extérieur de la mitochondrie puis sécrété dans le milieu extracellulaire engendrant une perte de productivité en acides gras. Il semblerait que cette sécrétion puisse être évitée grâce à un mode de conduite fed-batch : le taux d'assimilation du glucose serait un élément déterminant dans la conversion du citrate (Kavšček *et al.*, 2015). De plus, le stockage du carbone sous la forme de glycogène et la forme lipidique (TAG) entrent également en compétition. Dans ce cas, et contrairement au système plante, le NADPH, majoritairement produit par la voie des pentoses phosphates, n'apparaît pas être un facteur limitant dans l'accumulation des acides gras (Wasylenko *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2016).

Objectif de Recherche

Avec une population mondiale en constante augmentation et l'épuisement des ressources fossiles, les huiles végétales et microbiennes ont été identifiées comme des alternatives dans le secteur agroalimentaire et dans le domaine des bioénergies et des biolubrifiants. Des rendements, teneurs et profils intéressants sont des critères primordiaux dans cette bioproduction de lipides d'intérêt. Le but de cette étude est d'apporter les connaissances et outils nécessaires à la compréhension et à l'optimisation des systèmes « plante » et « levure », par l'intermédiaire de deux modèles biologiques, le lin et *Yarrowia lipolytica*, et d'une approche originale, la fluxomique. Deux questions ont alors été posées :

→ *Quels sont les mécanismes majeurs intervenant dans l'accumulation des huiles et des oméga-3 chez la graine de lin ?*

→ *En exploitant la biodiversité végétale et microbienne, comment optimiser la production d'huiles riches en acides gras inhabituels (CFA) chez la levure *Yarrowia lipolytica* ?*

Ce travail s'articulera autour de deux grands axes :

- **La compréhension du métabolisme central et lipidique chez le lin.**

Trois lignées de lin ont été sélectionnées pour leurs graines contenant des teneurs en huiles différentes, et produisant ou non l'acide linoléique (ALA), principal oméga-3 chez le lin. L'analyse complète des espèces lipidiques et de leurs acides gras a permis d'émettre des hypothèses quant au mécanisme de stockage des huiles polyinsaturées. L'analyse de la composition de la graine, ainsi que des flux métaboliques régissant la cellule a enfin permis comprendre le rôle de certains phénomènes dans le remplissage de la graine et plus particulièrement dans la synthèse et l'accumulation des triglycérides.

- **La compréhension du métabolisme central et lipidique chez *Yarrowia lipolytica*.**

Trois souches de levure *Yarrowia lipolytica* ont été sélectionnées pour leur teneur en lipides (optimisation de la voie Kennedy) ou en CFA (optimisation du transfert et stockage des acides gras inhabituels). Après avoir vérifié la possibilité de l'utilisation d'une source de carbone alternative (glycérol), les différentes souches ont été comparées afin de connaître l'effet de la synthèse des CFA sur la physiologie et la composition de la souche. Les lipides ont fait l'objet d'une étude approfondie afin d'étendre nos connaissances sur la synthèse des CFA. Enfin, un modèle métabolique prédictif a été développé afin d'optimiser ces souches par ingénierie génétique et métabolique.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique et conditions de cultures.

1.1. La graine de lin oléagineux.

1.1.1. Lignées de lin sélectionnées.

Les trois lignées de lin de printemps étudiées dans le cadre de cette étude ont été fournies par le sélectionneur et semencier Laboulet. Elles ont été choisies pour leurs graines oléagineuses. Leur couleur, leur teneur en huile et leur composition en acides gras sont différentes. Le tableau 4 liste les caractéristiques de ces trois lignées.

Lignée de lin	Astral	Solal	238.56
Couleur	Jaune	Jaune	Marron
Teneur en huile (g.100g ⁻¹ de MS)	44,6±0,2	47,1±0,8	37,0±0,7
Teneur en C18:3 (%)	62,9±0,2	<2,5	61,2± 2,2

Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques des lignées Astral, Solal et 238.

La lignée Astral est une variété commerciale à gros grains jaune, riches en huile et en C18:3. La lignée Solal, est issue d'un croisement entre les lignées Astral et INRA Linola 95.1 Linola étant une variété à petits grains jaunes avec une faible teneur en C18:3. Solal présente ainsi de petits grains jaunes dont le contenu en huile est important mais avec une faible teneur en C18:3. Cette lignée présente donc un intérêt pour l'alimentation humaine et le domaine des biolubrifiants notamment. Enfin, la lignée 238.56 est issue d'un croisement entre les lignées L 91 et L 52.59 de Laboulet Semences. Ses graines sont grosses et marrons et possèdent un faible contenu en huile mais une forte teneur en C18:3. Cependant, cette lignée n'a pas pu être commercialisée de par sa productivité insuffisante.

1.1.2. Conditions de culture de la plante.

Les cultures de plantes de lin ont été réalisées en serre de confinement S2 au laboratoire (GEC). Une dizaine de graines sont plantées à quelques centimètres de profondeur dans des pots de 20 cm de diamètre et remplis de terreau (Floradur[®]) préalablement stérilisé. Le taux d'humidité est de 60%, avec une photopériode de 16 h de jour (400 μmol de photons. m⁻². s⁻¹) et 8 h de nuit. La température est de 20°C le jour et de 16°C la nuit. Les plantes sont

arrosées tous les 2 jours. Dès la floraison, chaque fleur est étiquetée quotidiennement. Ainsi, les graines présentes dans les capsules peuvent être récoltées à des stades de développement précis : de 10 à 50 jours après floraison (JAF). Les graines sont alors conservées à -80°C dans l'azote liquide.

1.2. La levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.

1.2.1. Souches de *Yarrowia lipolytica* sélectionnées.

Trois souches recombinantes de *Yarrowia lipolytica* ont été utilisées lors de cette étude. Elles ont été réalisées dans le cadre du programme de recherche précompétitif GENESYS dans lequel s'inscrivent les projets MetaLipPro et PREBIOL. Les constructions ont été effectuées par l'équipe BIMLip au sein de l'institut MICALIS, afin d'étudier la synthèse des acides gras cyclopropanes (CFA) chez la levure. Le génotype de ces souches est présenté dans le tableau 5.

Souches de <i>Y. lipolytica</i>	Génotype	Prototrophie
JMY3501	$\Delta pox1-6, \Delta tgl4, pTEF-GPD1-URA3ex, pTEF-DGA2-LEUex$	U+L+
JMY5578	$\Delta pox1-6, \Delta tgl4, pTEF-LRO1-URA3ex, 4UAS-pTEF-EcCFAS-LEU2ex$	U+L+
JMY5289	$\Delta pox1-6, \Delta tgl4, pTEF-GPD1, pTEF-DGA2, pTEF-EcCFAS-LEU2ex, URA3ex$	U+L+

Tableau 5 : Génétique des souches JMY3501, JMY5578 et JMY5289.

La souche JMY3501 est une souche dont les gènes codant pour des enzymes de la voie de la β -oxydation ont été mutés (Δpox). Il en est de même pour l'une des lipases ($\Delta tgl4$). Au contraire, les gènes codant pour une GPAT, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, (*GPD1*) et une DGAT, diacylglycérol acyltransférase, (*DGA2*) ont été surexprimés sous le contrôle du promoteur TEF (pTEF). De plus cette souche est prototrophe pour l'uracile et la leucine. La souche JMY5289 découle de cette souche JMY3501 avec, en plus, le gène codant pour la CFA synthase (CFAS) d'*E. coli* exprimé sous le contrôle du promoteur pTEF.

La souche JMY5578 a subi les mêmes délétions ($\Delta pox1-6, \Delta tgl4$). Cependant, le gène *LRO1* (codant pour une PDAT, phospholipid diacylglycerol acyltransferase) a été surexprimé. Dans cette souche, le gène *CFAS* a été exprimé sous le contrôle du promoteur TEF.

1.2.2. Conditions de culture en fiole d'Erlenmeyer.

1.2.2.1. Pré-cultures et inoculum.

L'objectif de cette étape est de constituer un stock des différentes souches afin d'ensemencer les cultures avec un inoculum de qualité constante durant la suite des manipulations. La préparation des cryotubes a été réalisée selon la procédure suivante. Les souches de levures sont inoculées en condition stérile sur milieu solide et riche (YPD à 50 g.L⁻¹ et agar 65 g.L⁻¹) et incubées 48h à 28°C. Cette culture permet d'obtenir des colonies isolées qui sont ensuite prélevées et repiquées dans 50 mL de milieu liquide YPD à 50 g.L⁻¹, en fiole d'erlenmeyer de 250 mL. Les cultures sont de nouveau incubées 48h à 28°C et sous agitation (170 rpm). L'intégralité de la culture est transvasée dans une fiole de 500mL contenant déjà 50 mL de milieu YPD stérile. Cette nouvelle culture est incubée 48h. Enfin, un volume V₁ (dépendant de la DO₁) est prélevé. Ce volume constitue l'inoculum de référence et est calculé de manière à obtenir une DO de 0,5 après inoculation d'une culture de 100 mL (DO_{T0} = 0,5).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{0,5 \cdot 100}{DO_1}$$

On peut également prélever conserver ces souches dans du glycérol stérile (50%) en cryotubes à -80°C.

1.2.2.2. Culture en milieu minimum.

Le milieu de culture utilisé est un milieu minimum liquide composé de milieu YNB à 1,7 g.L⁻¹, de glucose ou glycérol à 30 g.L⁻¹ (sans NH₄Cl et sans acide aminé), de NH₄Cl à 1,5 g.L⁻¹ et de tampon phosphate pH 6,8 à 50 mM (stérilisé seul). Ce tampon est réalisé à partir de 202 mL d'une solution de KH₂PO₄ à 136,09 g.L⁻¹ et de 198 mL de Na₂HPO₄ à 141,96 g.L⁻¹ (solution tampon de 1M). Un cryotube entier est utilisé pour inoculer une fiole d'erlenmeyer bafflée, pour une meilleure aération de la culture, contenant 100 mL de milieu minimum. Chaque culture est incubée de 0 à 72h, sous une agitation de 170 rpm et à 28°C.

2. Méthodes.

2.1. Caractérisation de la biomasse végétale : Protocole séquentiel.

Suite à la culture en serre des plants de lin, les graines sont récoltées, séchées 24h à l'étuve (100°C) puis pesées afin de connaître la masse sèche de chaque échantillon. Les composés de réserve sont ensuite extraits de manière sélective et successivement selon un protocole adapté de Koubaa *et al.* (2013). Les huiles, les protéines et enfin l'amidon sont extraits séquentiellement à partir de 100 mg de graines déshydratées. Quatre à six répétitions ont été réalisées pour chaque analyse.

2.1.1. Extraction et analyse des huiles.

2.1.1.1. Extraction de l'huile.

Les graines sont broyées au Percellys[®] 30 à sec à 5 000 rpm puis trois fois 1 min à 6 000 rpm dans 1 mL de diéthyl éther. Une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm à 4°C permet de récupérer l'huile présente dans le surnageant. L'opération est répétée deux fois sur le culot afin d'optimiser l'extraction. Les trois surnageants sont alors transférés dans un tube en verre préalablement pesé. Le diéthyl éther est évaporé sous flux d'azote à 40°C. Le tube peut alors être pesé afin de déterminer la masse d'huile extraite. L'huile peut éventuellement être reprise dans 1 mL d'heptane pour une conservation à -20°C. Enfin, le culot de biomasse est séché.

2.1.1.2. Analyse des acides gras.

Afin d'analyser la composition en acides gras présents dans l'huile, il est nécessaire de réaliser une transestérification. Pour cela, un protocole adapté de Metcalfe et Wang (1981) a été utilisé. L'huile est prélevée (environ 5 mg) et reprise dans 100 µL de diéthyl éther et 5 µL de TMAH (Tetramethylammoniumhydroxide : sel d'ammonium quaternaire catalysant la transestérification). Après agitation au vortex, une centrifugation d'1 min à 3 000 rpm est effectuée. Les échantillons sont ensuite incubés 10 min à 25°C et sous une agitation de 625 rpm. L'ajout de 50 µL de décane permet de stopper la réaction. Après une centrifugation à 15 000 rpm à 24°C pendant 1 min, 20 µL de la phase supérieure aqueuse sont prélevés et dilués dans 178 µL d'heptane. Enfin, 2 µL d'acide heptadecanoïqueméthylé (C17:0) sont ajoutés à partir d'une solution à 100 mg.mL⁻¹ (concentration finale de 1 mg.mL⁻¹). Dans ce cas, le C17 sert de standard interne pour la quantification des acides gras, l'huile de lin en étant dépourvue (Jhala et Hall, 2010).

Afin de quantifier chaque acide gras présent, les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, ou GC/FID (GC-2010 Plus, Shimadzu) (Bligh et Dyer, 1959). Le mode d'injection s'effectue en « split » (250°C) avec un ratio de 50. Le gaz vecteur est le H₂ et la vitesse de flux est maintenue à 1,2 mL.min⁻¹. La séparation s'effectue durant 12,7 min en utilisant une colonne BPX 70G1402 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ; SGE analytical science). Le programme fixé pour la rampe de température est le suivant : 2 min à 120°C puis une élévation de 30°C.min⁻¹ pendant 2 min et pour atteindre 250°C.

2.1.1.3. Analyse de la diversité lipidique.

Après extraction des huiles totales, la composition en acides gras totaux peut alors être analysée directement après transestérification. Cependant, il est également possible d'identifier les espèces lipidiques présentes dans ce mélange, ainsi que de déterminer le profil en acides gras de chacune d'entre-elles.

L'analyse débute alors par la préparation d'une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) en gel de silice 60G F254 (20 x 20 cm ; Sigma). Une ligne est tracée à 2 cm du bas de la plaque, ainsi qu'un trait chaque 2 cm sur cette ligne, où seront déposés les différents composés par la suite. La plaque est plongée dans un mélange chloroforme/méthanol (1:1 v/v) pendant 2h permettant le nettoyage de la plaque. Cette plaque est ensuite séchée 5 min sous la hotte puis activée par déshydratation durant 15 min à 100°C. La cuve est vidée et le solvant préalablement évaporé remplacé par un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (90:15:10:3 v/v) destiné à faire migrer les phospholipides (lipides polaires) dans un premier temps. Les lipides précédemment extraits sont repris dans 100 µL de méthanol/chloroforme (2:1 v/v) et 20 µL sont déposés sur la ligne de dépôt (sur 1 à 1,5 cm de large environ). Des standards sont également déposés : la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), ainsi que le monoacylglycérol (MAG), diacylglycérol (DAG) et triacylglycérol (TAG) (Sigma). Quand le front de migration a dépassé la moitié, le solvant est échangé par un mélange hexane/diéthylether/acide acétique (70:30:1 v/v), dans le but de faire migrer les lipides neutres. Enfin, on incube la plaque dans un milieu confiné et en présence de cristaux d'I₂, afin de révéler les différents composés ayant migré sur la plaque (coloration jaune orangée).

Les tâches peuvent ensuite être grattées et la silice extraite est reprise directement dans 100 µL d'heptane. Après transestérification, le profil en acides gras est analysé par en GC-FID (Matériels et Méthodes, § 2.1.1.2.).

2.1.2. Extraction et analyse des protéines.

La quantification des protéines solubles présentes dans nos échantillons est basée sur la méthode de Lowry *et al.* (1951). Le culot séché obtenu lors de l'étape précédente est repris dans 1 mL de tampon d'extraction Tris-HCl à 20 mM, pH 7,5, NaCl à 150 mM et SDS 1% (Koubaa *et al.*, 2013). Après une incubation de 15 min à 42°C sous agitation de 1 400 rpm, les échantillons sont centrifugés 15 min à 13 000 rpm. Le surnageant est récupéré et l'opération est renouvelée deux fois. L'extrait protéique est alors dilué au dixième et 100 µL sont alors prélevés. 125 µL d'une solution de tampon alcalin de tartrate de cuivre BIO-RAD sont ajoutés. Après 10 min, 1 mL de réactif de Lowry est ajouté et l'absorbance est lue à 750 nm. Les concentrations en protéines sont déterminées en utilisant une gamme étalon réalisée à l'aide de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 à 1,5 mg.mL⁻¹. Le culot est de nouveau séché.

Afin de connaître la composition en acides aminés des protéines solubles précédemment extraites, celles-ci sont précipitées par ajout de 200 µL d'acide trifluoroacétique. Après 1h 30 min d'incubation dans la glace, les échantillons sont centrifugés 20 min à 13 000 rpm. Le culot est repris dans 200 µL de HCl (6N). Une incubation de 24h à 110°C permet l'hydrolyse des liaisons peptidiques, libérant ainsi les acides aminés. L'acide est neutralisé par ajout de 200 µL de NaOH 6N. Enfin, après 10 min de centrifugation à 13 000 rpm, les surnageants sont récupérés.

La quantification des acides aminés a été effectuée par HPLC-HRMS (Agilent 6538). Leur séparation est réalisée grâce à une colonne « Hypersyl Gold Phenyl » (150 x 2,1 mm x 3µm) (Thermo Scientific) durant 30 min et sous un gradient de 0,25 mL.min⁻¹. Le gradient d'élution est constitué d'une solution A (acide pentafluoropropionique anhydre à 5 mM dans l'eau) et d'une solution B (acétonitrile, 100%) selon les paramètres :

- 0 à 4 minutes : 99% solution A et 1 % solution B.
- 4 à 12 minutes : 80% solution A et 20% solution B.
- 12 à 15 minutes : 70% solution A et 30 % solution B.
- 15 à 30 minutes : 2% solution A et 98 % solution B.

En sortie de colonne, les acides aminés élués sont identifiés par spectrométrie de masse et ionisés *via* un mode dual ESI en mode positif. La température de la source est de 350°C. La valeur du fragmenteur est de 120 V et une valeur de Skimmer de 65 V. La gamme de masse détectée est de 50 à 1050 m/z avec un scan de deux spectres par seconde. Les acides aminés

sont identifiés par recherche de la masse exacte et du temps de rétention d'une solution standard (Amino acid standard AAS18 – Sigma) et un mode d'acquisition en « full scan ».

2.1.3. Extraction et quantification de l'amidon.

La quantification de l'amidon est réalisée grâce au kit « Total Starch Assay Kit (AA/AMG) » (Megazyme), basée sur des méthodes développées par Trinder (1969) et McCleary *et al.* (1997). Le culot obtenu est repris dans 600 μL d'une solution d' α -amylase (acétate de sodium pH 4.8, α -amylase 1600 U/mL (30/1), (v/v)). Une incubation de 30 min à 100°C permet la solubilisation et l'hydrolyse de l'amidon en maltodextrines non ramifiées. Une fois le mélange refroidi à température ambiante, 20 μL d' α -amylglucosidase (200 U. mL^{-1}) sont ajoutés. Les échantillons sont alors incubés 30 min à 50°C afin d'hydrolyser les maltodextrines en D-glucose. Après centrifugation (5 min à 13 000 rpm), 3 mL de GOPOD sont ajoutés. Le GOPOD est une solution tampon (pH 7,4) constituée d'acide 4-hydroxybenzoïque, d'azoture de sodium (0.095% w/v), de 4-aminoantipyrine et des enzymes suivantes : glucose oxydase et peroxydase. Une incubation de 20 min à 40-50°C permet une activité optimale des deux enzymes du GOPOD, entraînant la synthèse de quinoneimine, un composé coloré (rose) quantifiable par spectrophotométrie à 510nm. Une gamme étalon de glucose (0-100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) a préalablement été réalisée afin de déterminer la concentration en glucose équivalent amidon dans nos échantillons.

2.1.4. Quantification de la paroi cellulaire.

Après avoir extrait séquentiellement les trois types de composés majoritaires (huile, protéines et amidon), il est possible d'estimer la quantité de paroi cellulaire restant dans le culot obtenu précédemment. Ce culot est d'abord lavé trois fois à l'eau, trois fois à l'éthanol 70 % et trois fois à l'acétone par centrifugations successives (5 min à 10 000 rpm). Le culot est enfin séché 72h sous la hotte et pesé.

2.1.5. Analyse des composés solubles.

La part restante (différence entre la masse du culot avant et après les différents lavages) représente alors une estimation de la quantité de composés solubles dans la graine. Les composés solubles, représentés par les acides aminés et organiques et sucres solubles entre autres, représentent une faible proportion de la graine (Acket, 2015). Or, il a été démontré que pour des composés dont la teneur n'excédant pas 1% de la biomasse, il n'était pas nécessaire de les intégrer dans nos modèles métaboliques (Dieuaide-Noubhani et Alonso, 2014). Cette partie n'a alors pas été exploitée.

2.2. Caractérisation de la biomasse de levure.

2.2.1. Croissance de la biomasse.

Après inoculation de nos levures, le suivi de leur croissance peut s'effectuer par une lecture de DO à 600 nm (turbidimétrie). Pour cela, un faible volume (< 1 mL) est prélevé à intervalle de temps régulier, dilué selon sa concentration et mesuré contre un blanc constitué de milieu de culture sans inoculum ($DO_{luc} < 0,7$). On peut également déterminer de manière plus précise la quantité de biomasse par pesée de la matière sèche (MS). Pour ce faire, une fiole est utilisée pour chaque temps d'incubation défini. Chaque culture est alors stoppée à un temps t et l'intégralité de la fiole est centrifugée 10 min à 8 000 rpm et à 4°C. Le surnageant est prélevé et conservé à -20°C afin de caractériser la consommation des substrats carboné et azoté par la souche étudiée. Le culot est rincé deux fois à l'eau, congelé une nuit puis lyophilisé durant 48h. La biomasse sèche peut alors être pesée et caractérisée.

2.2.2. Analyse du surnageant.

Lors d'une culture de levures, il est très intéressant d'obtenir des informations concernant la consommation des substrats. L'assimilation du carbone est caractérisée par le dosage du glucose/glycérol tandis que celle de l'azote est quantifiée par le dosage de l'ammonium. De plus, le pH et la production du citrate (principal acide sécrété) sont relevés et évalués à chaque temps.

2.2.2.1. Quantification du glucose et du glycérol.

Le protocole est adapté du kit « Glucose (GOPOD Format) » de Libios, basé sur la méthode de Trinder (1969). 10 μ L de surnageant préalablement dilué (au centième) sont prélevés et mélangés à 1 mL de réactif GOPOD. Après 5-10 min d'incubation, la quantité de glucose peut être déterminée par spectrophotométrie à 510 nm, grâce à l'utilisation d'un standard de glucose à 1 g.L⁻¹ fourni dans le kit.

La quantification du glycérol non consommé par *Yarrowia lipolytica* a été adaptée du kit enzymatique « Glycerol Assay Procedure » de Megazyme, basé sur une méthode de Wieland (1988). Il est basé sur la conversion NADH en NAD⁺, dont la quantité formée par voie enzymatique est stœchiométrique avec la quantité de glycérol présent dans chaque échantillon. 1,9 mL de H₂O sont mélangés à 100 μ L d'échantillon, avec 200 μ L de tampon (pH 7,4, supplémenté d'azote de sodium à 0,02% w/v), 100 μ L de solution NADH/ATP/PEP, et à 20 μ L de suspension de PK (pyruvate kinase)/L-LDH (L-lactate déshydrogénase). L'absorbance (A_1) est lue à 340 nm. Ensuite, 20 μ L de GK (glycérol kinase) sont ajoutés afin de commencer

la réaction. L'absorbance (A_2) est lue de nouveau à 340 nm, afin de rendre compte de la consommation du NADH, permettant de déterminer la concentration en glycérol présent dans chaque échantillon.

2.2.2.2. Quantification du chlorure d'ammonium.

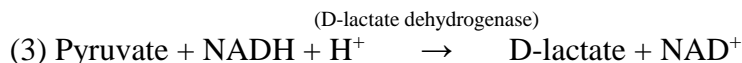
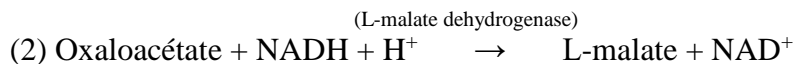
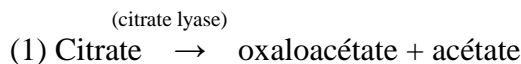
Le protocole est adapté du kit « Ammonia Assay Kit (rapid) » (Megazyme) et repose sur une méthode adaptée de Bergmeyer et Beutler (1990). Le milieu extracellulaire est prélevé (100 μ L) et dilué dans 1,72 mL de H₂O, puis 300 μ L de solution tampon (pH 8, supplémenté d'azote de sodium à 0,02 % w/v) et 200 μ L de solution de NADPH sont ajoutés. Le mélange est vortexé et incubé 4 min à température ambiante puis l'absorbance (A_1) est lue à 340 nm. Ensuite, 20 μ L de suspension de GIDH (glutamate déshydrogénase) sont ajoutés. Après agitation et 10 min d'incubation, l'absorbance (A_2) est lue à 340 nm. On mesure donc la consommation de NADPH proportionnelle à la quantité de NH₄Cl. Cette concentration est calculée grâce à la formule suivante :

$$\frac{V_f \cdot MW_{NH_4Cl}}{\varepsilon_{NADH} \cdot d \cdot v_{ech}}$$

2.2.2.3. Acidification.

Il est fréquent d'observer une acidification du milieu de culture de la levure *Yarrowia lipolytica*, même en milieu tamponné. Cette acidification est due à la capacité des souches à sécréter des acides organiques directement dans le milieu de culture (Yuzbashev *et al.*, 2010 ; Harzevili et Farshad, 2014). Le pH a alors été mesuré grâce à un pH-mètre (sympHony™ de chez VWR).

Le citrate a été quantifié par l'utilisation du kit « Citric Acid Assay Kit » (Megazyme), basé sur les réactions suivantes :



La quantité de NAD⁺ formée est proportionnelle à la quantité d'acide citrique dans l'échantillon : c'est la consommation du NADH qui est mesurée (A_1 et A_2) par la diminution de l'absorbance à 340 nm. La concentration en citrate est calculée grâce à la formule suivante :

$$\frac{V_f \cdot MW_{\text{citrate}}}{\varepsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot V_{\text{ech}}}$$

De plus, pour une analyse plus complète, le surnageant a également été analysé par HPLC-HRMS (Agilent 6538, Q-TOF) afin de révéler ou non la présence d'autres composés provoquant l'acidification du milieu de culture. La séparation des acides organiques s'effectue grâce à une colonne Dionex Acclaim OA (Agilent) (3 μm , 120 Å, 2,1 x 150 mm) avec un débit de 0,5 mL.minute⁻¹ d'acide formique à 0,2%. Les composés élués sont ionisés en « Dual ESI » en mode négatif. La température de la source est de 350°C. La gamme de masse détectée est de 100 à 3 000 m/z. Les acides organiques sont identifiés par recherche de la masse exacte et du temps de rétention.

2.2.3. Caractérisation de la biomasse de levure : protocole non séquentiel.

2.2.3.1. Analyse des lipides.

La méthode de quantification des différents acides gras présents dans l'huile a été adaptée de Folch *et al.* (1957). Elle consiste en une extraction des lipides totaux quantifiés par simple pesée, puis en une saponification permettant de rompre les liaisons entre le glycérol et les acides gras des triglycérides, et enfin, une méthylation des acides gras afin de les rendre plus volatils, stables et détectables pour une analyse détaillée de leur composition.

2.2.3.1.1. Extraction des lipides totaux.

Une masse d'environ 100 mg de culot de levure lyophilisée est d'abord pesée. Quelques billes de verres sont ajoutées. Un premier broyage à sec de trois cycles de 30 s à 6 000 rpm est effectué à l'aide du Precellys®. Un second broyage avec 1 mL de chloroforme/méthanol (2:1 v/v) est alors réalisé. Une centrifugation à 6 000 rpm pendant 3 min permet l'élimination des débris cellulaires (culot) et le surnageant est récolté dans un tube en verre de 4 mL. L'opération est répétée trois fois afin de permettre une extraction totale des lipides totaux. Le surnageant est mélangé à 2 mL d'une solution de KCl (1M)/méthanol (4:1 v/v), dont 0,034% de MgCl₂, vortexé, puis centrifugé 4 min à 5 000 rpm, afin d'éliminer les composants non lipidiques (phase supérieure). La phase inférieure est prélevée et insérée dans un tube en verre préalablement pesé. Le méthanol est enfin évaporé sous flux d'azote pendant une quinzaine de minutes, afin de quantifier les lipides par simple pesée.

Le chloroforme/méthanol est utilisé comme solvant chez la levure, de par la quantité importante de lipides polaires par rapport à ceux trouvés dans la graine de lin essentiellement constituée de triglycérides (Jhala et Hall 2010). Une grande variété de molécules non lipidiques

est également extraite et éliminée par l'utilisation du KCl/méthanol (0,034% de MgCl₂). Un protocole séquentiel n'est, de ce fait, pas imaginable à partir de notre biomasse de levure.

2.2.3.1.2. Identification et quantification des acides gras.

Après extraction des lipides totaux, la composition en acides gras peut alors être analysée directement après saponification et méthylation.

➤ Saponification.

Une masse précise de lipides est prélevée et reprise dans 200 µL d'une solution de KOH (5M)/méthanol (10%). L'échantillon est incubé 1h à 80°C. 200 µL de H₂SO₄ (10N) sont utilisés afin de permettre la neutralisation du KOH en excès. A ce mélange, on ajoute 1,5 mL de chloroforme/méthanol (1:2 v/v) afin de séparer les différentes phases. Après agitation, 500 µL de chloroforme et 1 mL de H₂O sont ajoutés. Une centrifugation de 5 min à 2 000 rpm permet ensuite de récupérer la phase inférieure (chloroforme et lipides) qui est évaporée sous flux d'azote.

➤ Méthylation.

Après évaporation du chloroforme, 750 µl d'acide méthanolique (méthanol, HCl à 4%) sont ajoutés. A cette étape, le C12:0, standard interne non méthylé, est ajouté à une concentration de 0,5 mg.vial⁻¹. L'acide dodécanoïque (C12 :0) est naturellement absent chez nos souches de levure (Beopoulos *et al.*, 2011). La méthylation peut ainsi s'effectuer à 80°C. Après 1h d'incubation, les esters méthyliques d'acides gras sont extraits à l'aide de 1,5 mL d'heptane. La phase supérieure (heptane/esters méthyliques) est récupérée. L'opération est effectuée deux fois. L'heptane est alors évaporé sous flux d'azote puis le culot est à nouveau repris dans 60 µl d'heptane. L'échantillon peut ensuite être dilué selon sa concentration et être analysé en GC-HRMS (Trace 1310 Gaz Chromatograph, Thermofisher - GC-HRMS Thermo GC Qexactive) pour identification ou en GC-FID (GC-2010 Plus, Shimadzu) pour quantification des esters méthyliques d'acides gras (FAME).

➤ Analyse par GC-HRMS.

L'identification des FAME se fait en mode EI (ionisation électronique) (30 eV à 280°C) grâce à leur séparation sur colonne IL60 (Supelco) (30 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Le volume d'injection est de 1 µL (mode split). La température initiale est de 150°C maintenue 2 min, puis elle est augmentée jusqu'à 300°C avec une rampe de 20°C.min⁻¹, température maintenue pendant 4 min. Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 2,5 mL.min⁻¹. En sortie de

colonne, les FAME sont analysés en mode full scan, sur une gamme de 50 à 500 m/z. L'identification des acides gras est réalisée grâce à la base de données (Nist, 2014).

➤ Analyse par GC-FID.

Les acides gras sont également quantifiés grâce à la séparation des FAME par GC-FID (GC-2010 Plus, Shimadzu). La colonne utilisée est une BPX 70G1203 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ; SGE analytical science). L'injection se fait à 250°C. La température initiale du four est de 120°C maintenue pendant 2 min. Elle augmente ensuite jusqu'à 220°C avec une rampe de 5°C.min⁻¹, température maintenue 2 min. Le gaz vecteur est le H₂ (40 mL.min⁻¹).

2.2.3.1.2. Analyse de la diversité lipidique.

La composition en acides gras totaux peut alors être analysée directement après saponification et méthylation. Cependant, il est également possible d'identifier et de quantifier les espèces lipidiques présentes dans ce mélange, ainsi que de déterminer le profil en acides gras de chacune d'entre-elles (protocole décrit en Matériels et Méthodes, § 2.1.1.3.).

Après migration, les tâches sont grattées et la silice extraite est reprise directement dans 200 µL d'une solution de KOH (5M)/méthanol (10%). Chaque échantillon est incubé 1h à 80°C afin d'en saponifier, puis d'en méthyler les acides gras de chaque espèce lipidique (protocole décrit en Matériels et Méthodes, § 2.2.3.1.2.). Après une analyse des FAME en GC-FID, la somme des aires de chaque pic (acides gras) pour une tâche donnée (espèce lipidique) et divisée par la somme des aires de chaque pic des autres tâches afin d'en déduire le ratio de l'espèce par rapport aux lipides totaux (Wang et Benning, 2011) :

$$[TAG] = \frac{\Sigma[FAME]_{(TAG)}}{\Sigma[FAME]_{(totaux)}}$$

2.2.3.1.1. Coloration des au rouge de Nil.

La coloration au rouge de Nil est réalisée afin de localiser et quantifier les lipides, et plus particulièrement les corps lipidiques neutres au sein des cellules de levure (Kimura *et al.*, 2004). Une solution de rouge de Nil est préparée à 1 µg.mL⁻¹ dans l'acétone. 1 mL de suspension cellulaire est prélevé et additionné de 4 mL de rouge de Nil, puis incubé 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La suspension cellulaire est lavée à deux reprises et re-suspendue dans 200 µL de tampon sodium phosphate (pH 6,8). Les cellules sont alors observées sous le microscope équipé d'un émetteur à fluorescence (Olympus BX 51). L'observation se fait grâce à un objectif x65. Un filtre N3 est utilisé pour la fluorescence (gamme d'excitation :

vert ; filtre d'excitation BP 546/12 ; miroir dichromatique 565 nm ; filtre de suppression BP 600/40).

2.2.3.2. Analyse des protéines.

Les protéines peuvent représenter plus d'un tiers de la biomasse de levure selon les conditions de culture : 35 g.100g⁻¹ en condition de carence et 40 g.100g⁻¹ en excès d'azote (Zhang *et al.*, 2016). La méthode utilisée pour la quantification des protéines repose sur la méthode de Dumas (méthode AOAC 990) qui permet, après combustion de la biomasse (100 mg) à très haute température, d'obtenir la teneur totale en azote contenue dans l'échantillon grâce à un analyseur d'azote de type « LECO FP528 ». Un facteur de conversion de 6,25 est appliqué afin de calculer la teneur en protéines dans l'échantillon.

Les protéines sont également hydrolysées afin d'en séparer les différents acides aminés. Leur identification et quantification se fait de la même manière que décrite précédemment (Matériels et Méthodes, § 2.1.2.).

2.2.3.3. Quantification des sucres totaux.

Cette analyse des sucres totaux débute par la pesée de 50 mg de lyophilisat de levure dans 1 mL de H₂O. Un broyage rapide (2 cycles de 10 sec, 6 000 rpm) est effectué. Les échantillons sont ensuite incubés 2h à 80°C sous agitation de 850 rpm. Ils sont dilués au 1/20 et la teneur en sucres totaux est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode des phénols sulfuriques développée par Dubois *et al.* (1956). 200 µL d'échantillon dilué sont mélangés à 500 µL de phénol à 5%, puis 2 mL d'une solution de H₂SO₄ concentrée (98%) sont ajoutés rapidement. Après une incubation de 5 min à 80°C, les échantillons sont refroidis à température ambiante et à l'obscurité durant 30 min. La concentration en sucres totaux est déterminée par spectrophotométrie à 492 nm. Une gamme étalon de glucose (0-500 µg.mL⁻¹) est préalablement réalisée pour cette quantification.

2.2.3.4. Analyse des acides nucléiques.

Jusqu'à 8 mg d'acides nucléiques peuvent être retrouvés dans 100 mg de biomasse de levure, d'après une étude menée par Zhang *et al.* (2016). Il apparaît alors primordial de réaliser une quantification de ces composés. Le protocole suivant a été adapté de Verwoerd *et al.*, 1989).

Une masse connue de lyophilisat de levure (50 mg) est pesée et transférée dans un tube de 15 mL contenant 2 mL de tampon TLES + 2% de PEG 8000. Ce tampon est constitué de Tris-HCl (pH 8,0) à 100 mM, LiCl à 100 mM, EDTA (pH 8,0) à 10 mM et de SDS à 5%. Après

une incubation de 10 min à température ambiante, suivi d'une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min, le surnageant (2 mL) est transféré dans un nouveau tube. 2 mL de phénol (80°C) sont ajoutés. Le pH de celui-ci détermine la nature de l'acide nucléique extrait : pH 8,0 pour l'ADN et 4,3 pour l'ARN. Après homogénéisation, 2 mL de chloroforme:isopentanol (24:1) sont mélangés aux échantillons, avant d'être centrifugés 10 min à 12 000 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et un volume de LiCL (4M) est ajouté, avant d'être stocké une nuit à 4°C. Une centrifugation de 30 min à 12 000g et à 4°C permet de récupérer le culot d'acides nucléiques qui est dissout dans 125 µL de H₂O (préalablement traitée au DEPC, afin d'inhiber les potentielles RNases et DNases. 12,5 µL d'acétate de sodium (pH 5,2) à 3M et 250 µL d'éthanol 70% sont ajoutés. Après 1h à -80°C, puis 20 min de centrifugation à 12 000 g et à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol, évaporé, puis repris dans 20 µL de H₂O (traitée au DEPC). La quantification de l'ADN et de l'ARN au NanoDrop est effectuée à partir d'1 µL.

2.3. Caractérisation des flux métaboliques.

2.3.1. Caractérisation des flux métaboliques chez la graine de lin : Méthode FBA.

Le principal avantage de la FBA (Flux Balance Analysis) sur la MFA (Metabolic Flux Analysis) est l'absence de marquage du carbone pour l'analyse des flux. Il n'est alors pas nécessaire de réitérer les expérimentations relatives à la culture, l'extraction, l'identification et la quantification des différents composés de la graine. Cette méthode se divise en trois étapes : (1) la représentation mathématique des réactions biochimiques afin de construire le réseau, (2) l'application des contraintes liées à la composition biochimique de la biomasse et enfin (3) la définition d'une fonction objective pour déterminer une distribution unique et optimale des flux dans l'espace de solutions (Orth *et al.*, 2010)

2.3.1.1. Construction du réseau.

Le réseau a été défini à l'aide d'études réalisées sur des embryons de lin par des analyses biochimiques (Troufflard, 2004), transcriptomiques (Acket, 2015 ; Barvkar *et al.*, 2012), protéomique (Barvkar *et al.*, 2012) et fluxomique (Acket, 2015 ; Acket, 2018, résultats internes). Le réseau est notamment défini par des flux externes (extracellulaires) correspondant d'une part à l'entrée de métabolites dans le réseau (photoassimilats) et d'autre part à leur sortie sous forme de biomasse. Les flux intracellulaires retracent les différentes voies métaboliques. Le réseau tient alors compte de la stœchiométrie des réactions ainsi que des cofacteurs. La construction du réseau est convertie en modèle mathématique comme suit : la matrice S (figure 19A), dont chaque ligne représente un métabolite (*m*) et chaque colonne représente une réaction

(n) (figure 19A). Le réseau métabolique est alors entré dans le logiciel INCA (« Isotopomer Network Compartmental Analysis »). INCA utilise l'interface de calcul Matlab (Young, 2014). Il est nécessaire de vérifier la nature de chacun des métabolites : « source » pour les « entrées », « sink » pour les « sorties » et « internal » pour les métabolites intracellulaires. Cependant, en absence de contrainte, la valeur des flux peut se trouver en tout point d'un espace de solutions.

2.3.1.2. Calcul et application des contraintes.

A l'état stationnaire ($dx/dt = 0$, où x est la concentration en métabolites intracellulaires et t le temps), le flux intracellulaire correspondant à chaque réaction est associé à l'équation $Sv = 0$ (figure 19B). Les flux extracellulaires dits de « sortie » se réfèrent en réalité à une vitesse moyenne d'accumulation ou de dégradation d'un composé. Cette vitesse correspond au rapport entre la variation de la concentration du composé mentionné et le temps. Elle est donc définie par l'équation :

$$V = \frac{dx}{dt}$$

V : Vitesse de la réaction, exprimée en $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$.

dx : Variation de la concentration en composé, exprimée en nmol.graine^{-1} .

dt : Variation du temps, exprimée en jour.

Sur une courbe d'accumulation ou de dégradation, cette équation correspond au calcul du coefficient directeur de la tangente à un temps t . Les valeurs de flux extracellulaires relatifs à la production de la biomasse représentent ainsi des contraintes au modèle puisqu'elles fixent une borne inférieure (LB) et supérieure (UB) à ces flux (où $LB = UB$).

La fonction objective est définie par l'équation suivante :

$$Z = c^T \cdot v$$

Z : fonction objective

c : vecteur de poids

Le vecteur de poids indique à quel point chaque réaction contribue à cette fonction. Elle permet de déterminer une distribution unique des flux métaboliques à partir de l'ensemble de solutions défini précédemment. Différentes fonctions objectives sont testées afin d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus *via* la MFA, dont la fiabilité est plus avérée par rapport à la FBA (Dieuaide-Noubhani et Alonso, 2014).

2.3.1.3. Outil de visualisation des flux métaboliques.

Le réseau métabolique et les cartes de flux ont été effectués grâce au logiciel Omix Visualization, utilisé pour des représentations transcriptomique, métabolomique et fluxomique (Droste *et al.*, 2011).

2.3.2. Caractérisation des flux métabolique chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

2.3.2.1. Analyses des flux métaboliques : MFA.

2.3.2.1.1. Milieux de culture.

La composition du milieu minimum utilisé dans cette partie est identique à celui utilisé précédemment (§ 1.2.2.2). Le milieu YNB ne contenant aucune source de carbone, seul le glucose ou le glycérol pourra permettre un apport en ^{13}C . De ce fait, la concentration en glucose étant fixée à 30 g.L^{-1} , un mélange de glucoses marqués [U- $^{13}\text{C}_6$] (20%) et non marqués (80%) a été réalisé. De même, un mélange de deux glycérols marqués, [U- $^{13}\text{C}_3$] (5%) et [$2\text{-}^{13}\text{C}$] (5%), et non marqués (90%) a été effectué. La pureté des composés est de 99% (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). La culture a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (Matériels et Méthodes, § 1.2.2.2.), avec 3 réplicats sur milieu glucose et 2 sur milieu glycérol, avec un témoin négatif non marqué pour chaque condition.

2.3.2.1.2. Caractérisation des enrichissements isotopiques.

➤ Les protéines.

La biomasse (~ 120 mg) est d'abord déshuilée par une extraction au diéthyl éther (trois extractions successives via 1 mL de solvant). Une hydrolyse acide (250 μL de HCl, 6N) de 36 h à 100°C va permettre la libération des acides aminés, neutralisés par 250 μL de NaOH (6N). Une filtration par l'intermédiaire de seringues équipées de filtres de $0,45 \mu\text{m}$ (Acrodisc®) permet d'éliminer les petites particules présentes dans l'échantillon. Les acides aminés présents sont alors séparés par HPLC et identifiés par spectrométrie de masse, dans les mêmes conditions qu'exposées précédemment (Matériels et Méthodes, § 2.1.2.). L'enrichissement isotopique est déterminé à partir du massif isotopique de l'ion moléculaire pour chacun des acides aminés (Nanchen *et al.*, 2007) : on mesure l'abondance relative de chaque isotopologue. $M+0 = 1$ correspond alors à un acide aminé exclusivement constitué de ^{12}C . La distribution de la masse isotopique peut alors être notée MDV (mass distribution vector) :

$$MDV_{\alpha} = \begin{bmatrix} (m+0) \\ (m+1) \\ \vdots \\ (m+n) \end{bmatrix} \text{ avec } \sum_{i=0}^n m_i = 1$$

➤ Les lipides.

L'extraction des lipides totaux et des acides gras reprend la méthode utilisée précédemment (Matériels et Méthodes, § 2.1.2. ; Folch *et al.*, 1957). Pour une analyse plus sensible et plus précise, la dérivatisation se fait par la méthode des esters picolinyls développée par Destailats et Angers, 2002, consistant à ajouter la molécule de 3-hydroxyléthylpyridine sur la fonction carboxyle d'un acide gras.

On solubilise les FAME dans 1 mL de dichlorométhane. L'ajout de 100 µL de tert-butoxide de potassium préparé dans du THF (à 1M) permet de catalyser la réaction. On ajoute alors 200 µL de 3-hydroxyméthylpyridine. Après 30 min à 40°C, les esters picolinyls sont extraits à l'aide de 2 mL d'heptane et 1 mL d'eau. Une décantation permet de récupérer la phase supérieure qui est évaporée puis reprise dans 100 µL d'heptane pour être analysée en GC-MS (Trace 1310 Gaz Chromatograph, Thermofisher - GC - HRMS Thermo GC Qexactive). L'enrichissement isotopique est déterminé à partir du massif isotopique de l'ion moléculaire pour chacun des acides gras.

➤ Les acides organiques.

Les acides organiques sont extraits à partir de 120 mg de biomasse lyophilisée et déshuilée au chloroforme/méthanol (2:1 v/v). Le culot est repris dans 1 mL d'éthanol 80%, puis chauffé à 100°C durant 1h. Après centrifugation (5 min à 10 000 rpm), le surnageant est repris. L'opération est répétée deux fois. Une quatrième extraction est effectuée avec de l'eau et à 50°C. Après lyophilisation, l'échantillon est repris dans 500 µL, puis analyser en HPLC-MS selon la méthode décrite précédemment (Matériels et Méthodes, § 2.2.2.3.).

➤ Correction de l'abondance naturelle.

Les enrichissements isotopiques des acides aminés, acides gras et acides organiques sont mesurés grâce à l'abondance relative de chaque isotopologue en fonction de l'incorporation ou non de ¹³C dans la molécule *via* le substrat marqué. Or, il est important de noter la présence d'autres isotopes présents naturellement sur Terre. Il est important de les soustraire afin de ne pas surévaluer l'enrichissement dû au substrat marqué. Le logiciel IsoCor est utilisé pour

effectuer la correction directe de chaque enrichissement (Millard *et al.*, 2012). La correction est effectuée à l'aide d'une méthode matricielle dépendant de l'équation suivante :

$$IC_{cor} = CM^{-1} \cdot IC_{meas}$$

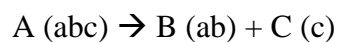
IC_{cor} : correction de l'enrichissement isotopique

CM : matrice correctrice

IC_{meas} : enrichissement isotopique mesuré

2.3.2.1.3. Construction du modèle.

Le modèle a été élaboré après une étude approfondie de la bibliographie relative aux analyses en fluxomique réalisées sur *Yarrowia lipolytica* : Kavšček *et al.*, 2015 ; Liu *et al.* 2016 ; Sabra *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Bhutada *et al.* 2017). Ce modèle est basé sur un réseau regroupant les différentes réactions compartimentées, équilibrées et stœchiométriques nécessaires au métabolisme de la levure. Ces réactions sont entrées dans le logiciel INCA (Young, 2014). Néanmoins, à chaque métabolites (A, B et C) on associe un certain nombre de lettres (a, b et c) correspondant aux carbones constituant le métabolite (transition atomique) :



Ou



Le flux net correspond à la différence entre la valeur de flux s'effectuant dans un sens et celle s'effectuant dans le sens inverse pour les réactions réversibles. Il correspond à la valeur du flux direct pour les réactions irréversibles. Le flux d'échange correspond au minimum entre le flux s'effectuant dans un sens et celui s'effectuant dans l'autre sens (figure 28).

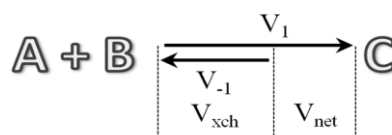


Figure 28 : Définition des flux nets et d'échange d'après Wiechert *et al.*, 2001.

$$V_{net} (\text{flux net}) = V_1 - V_{-1}$$

$$V_{xch} (\text{flux d'échange}) = \min (V_1, V_{-1})$$

2.3.2.1.4. Données expérimentales de marquage.

Une fois le réseau construit, il est nécessaire d'entrer les données expérimentales afin de contraindre le modèle. La première étape est de paramétrer les informations relatives à l'enrichissement isotopiques des traceurs (glucose/glycérol) et des métabolites analysés (acides aminés, acides organiques, acides gras). Pour un métabolite disposant de six atomes de carbone, A (abcdef), on renseigne alors l'enrichissement de chacun d'eux, de m+0 (100% de ^{12}C), à m+6 (100% de ^{13}C). Les flux externes relatifs à la consommation des substrats et à l'accumulation de biomasse ou à la libération de métabolites dans le milieu extracellulaire sont également renseignés.

2.3.2.1.5. Calcul des flux métaboliques.

Une estimation est réalisée afin de définir une valeur de flux ainsi qu'une erreur standard pour chacune des réactions du modèle. Pour ce faire, il faut résoudre un « problème inverse » impliquant une optimisation des paramètres de fluxomique qui minimisent les résidus totaux (SSR, Sum-of-Squared Residuals) entre les mesures simulées par le logiciel et les mesures déterminées expérimentalement (Wiechert *et al.*, 2001). Ce problème inverse peut être représenté par l'expression mathématique suivante :

$$\begin{aligned} \min_{u, c, h} \Phi &= r^T \cdot \Sigma^{-1} \cdot r \\ \text{s. t. } K \cdot u &\geq 0, c \geq 0, h \geq 0 \\ \text{avec } r &= m(u, c, h, t) - \hat{m}(t) \end{aligned}$$

La fonction objective de SSR (Φ) est minimisée par l'ajustement du vecteur des flux libres (u), le vecteur des tailles de pools (c) et le vecteur du coefficient MS (h). Ce dernier est utilisé pour normaliser chaque MDV (seules les abondances relatives des isotopomères de masse sont importantes pour l'estimation du flux), ce qui permet au programme de prendre en compte facilement les mesures d'isotopomères de masse manquantes. La fonction objective est calculée par simulation du vecteur m relatif aux mesures (taille des pools, distribution du massif isotopique), fonction de u, c, h et t. Le vecteur résiduel r peut ensuite être construit par opposition au vecteur de mesures simulées m et expérimentales \hat{m} . Pour former la fonction objective Φ , chaque résidu r_i est pondéré par l'inverse de son erreur standard de mesure σ_i . Les carrés de ces résidus sont ensuite additionnés. Pour que le « fit » soit accepté, la valeur de SSR calculée doit être comprise dans un intervalle de confiance défini de la manière suivante :

$$\left[X^2_{\alpha/2}(n-p), X^2_{1-\alpha/2}(n-p) \right], \text{ avec } \alpha = 0,05$$

De plus, un intervalle de confiance peut être calculé grâce à l'utilisation de l'analyse de Monte Carlo afin de définir des valeurs haute et basse à chaque flux. Cette approche a été décrite par Press *et al.*, 1992.

2.3.2.2. Analyses des flux métaboliques : FBA.

L'élaboration du modèle FBA chez la levure a été fait d'une manière équivalente à celui élaboré pour la graine de lin (Orth *et al.*, 2010 ; Matériels et Méthodes, § 2.3.1.) :

- Représentation mathématique des réactions biochimiques.
- Application des contraintes liées à la composition biochimique de la biomasse ou les composés extracellulaires.
- Définition d'une fonction objective pour déterminer une distribution unique et optimale des flux dans l'espace de solutions.

La construction du réseau se base sur celui réalisé en MFA (Matériels et Méthodes, § 2.3.2.1.) et sur les précédentes études (Kavšček *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016 ; Sabra *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Bhutada *et al.*, 2017). Les réactions sont entrées dans le logiciel INCA (Young, 2014). La valeur du flux d'entrée ou de sortie de carbone correspond à une vitesse de consommation ou de sécrétion d'un composé et est calculée en utilisant la pente de la courbe à un temps donné. La vitesse d'accumulation des composés de la biomasse est calculée grâce à l'équation suivante :

$$V_X = 10^6 \cdot \frac{[X]}{100 \cdot M} \cdot \mu$$

V_X : Vitesse d'accumulation du composé X en $\mu\text{mol.gMS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

X : Teneur en composé X en g.100gMS^{-1}

M : Masse molaire de X en g.mol^{-1}

μ : taux de croissance en h^{-1}

Les contraintes fixées, la fonction objective est ensuite définie suivant les résultats obtenus dans la bibliographie et en MFA afin d'obtenir un modèle le plus fidèle et robuste possible.

2.3.3. Minimisation de l'ajustement métabolique, ou MOMA.

Suite aux analyses FBA effectuées sur la graine de lin ou sur la levure *Yarrowia lipolytica*, la MOMA a été utilisée dans le but de prédire le phénotype de mutants pour les lignées et souches étudiées (Segre *et al.*, 2002). Cette méthode présume cependant qu'une

cellule régule son métabolisme de manière à limiter l'impact d'une quelconque perturbation génétique sur le métabolisme central. Ainsi, le flux des autres réactions que celle ciblée par la délétion sera aussi faiblement altéré que possible, afin de minimiser les redirections métaboliques dérivant de la modification génétique réalisée *in silico*. Ainsi, la prédiction d'un vecteur flux KO (V_{KO}) via la MOMA est obtenue par la minimisation de la fonction objective :

$$Z = \|V_{KO} - V_{WT}\|^2$$

Cette prédiction est alors soumise à la contrainte d'équilibre des masses N . $V_{KO} = 0$ et aux bornes supérieure et inférieure des autres flux. Ici, V_{WT} est le vecteur flux de la souche ou de la lignée d'origine (« Wild Type »). Ce problème est résolu par la méthode des moindres carrés linéaires grâce à l'interface Matlab et « oblige la solution KO » à dévier de son WT. Les réactions ciblées pour subir ce type d'analyse sont définies grâce aux résultats obtenus en MFA et FBA.

Résultats et Discussions

Chapitre 1.

*Compréhension du métabolisme central et
lipidique chez le lin.*

Résultats et Discussions

Chapitre 1. Compréhension du métabolisme central et lipidique chez le lin.

Dans un contexte de bioraffinerie des oléagineux, il est essentiel d’appréhender les différents mécanismes régissant le remplissage en huile des graines. Ainsi, l’objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes impliqués dans l’accumulation des triglycérides et la synthèse des acides gras chez la graine de lin. Pour ce faire, trois lignées ont été sélectionnées : Astral, Solal et 238. Elles ont essentiellement été retenues pour la capacité qu’ont leurs graines à accumuler des teneurs et compositions différentes en huile.

1.1. Caractérisation biochimique de la graine de lin.

1.1.1. La graine mature.

Cette caractérisation a été réalisée en quantifiant les différents composés constituant la biomasse de la graine. Un protocole d’extraction séquentiel a été utilisé (adapté de Koubaa *et al.*, 2013) afin d’obtenir une quantification systématique des teneurs en huiles, protéines solubles, amidon, composés solubles et paroi végétale. Ces analyses ont été effectuées sur des graines matures entières. La figure 29 présente la caractérisation biochimique des graines matures de lin à 50 JAF.

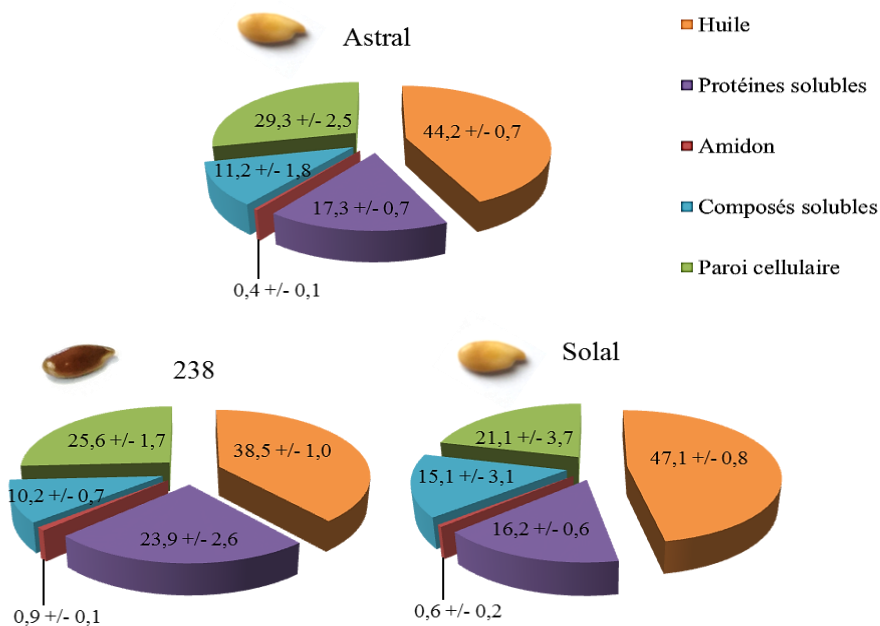


Figure 29 : Caractérisation biochimique des graines de lin matures (50 JAF).

Les valeurs sont exprimées en g.100g⁻¹ de matière sèche (MS)

Les lignées Astral et Solal sont les deux lignées accumulant le plus d'huile au sein de leurs graines : respectivement $44,2 \pm 0,7$ et $47,1 \pm 0,8$ g.100g⁻¹ de matière sèche (MS). Au contraire, elles ne disposent que de $17,3 \pm 0,7$ et $16,2 \pm 0,6$ g.100g⁻¹ de MS en protéines solubles. La lignée 238 produit quant à elle $38,5 \pm 1,0$ et $23,9 \pm 2,6$ g.100g⁻¹ en huile et en protéines respectivement. Ces résultats suggèrent une moins bonne accumulation des huiles chez cette lignée dont la synthèse en protéines est la plus importante, laissant ainsi penser qu'il existe une compétition entre la synthèse de ces deux classes de composés. Chez la graine de lin mature, la teneur en amidon est relativement faible (< 1 g.100g⁻¹), toutes lignées confondues. Enfin, les teneurs en composés solubles et en paroi cellulaire ne semblent pas directement liées à la teneur en huile ou à celle en protéines solubles. Elles fluctuent entre $10,2 \pm 0,7$ et $15,1 \pm 3,1$ g.100g⁻¹ de MS pour les composés solubles, et entre $21,1 \pm 3,7$ et $29,3 \pm 2,5$ g.100g⁻¹ de MS pour la paroi cellulaire.

1.1.2. Croissance de la graine.

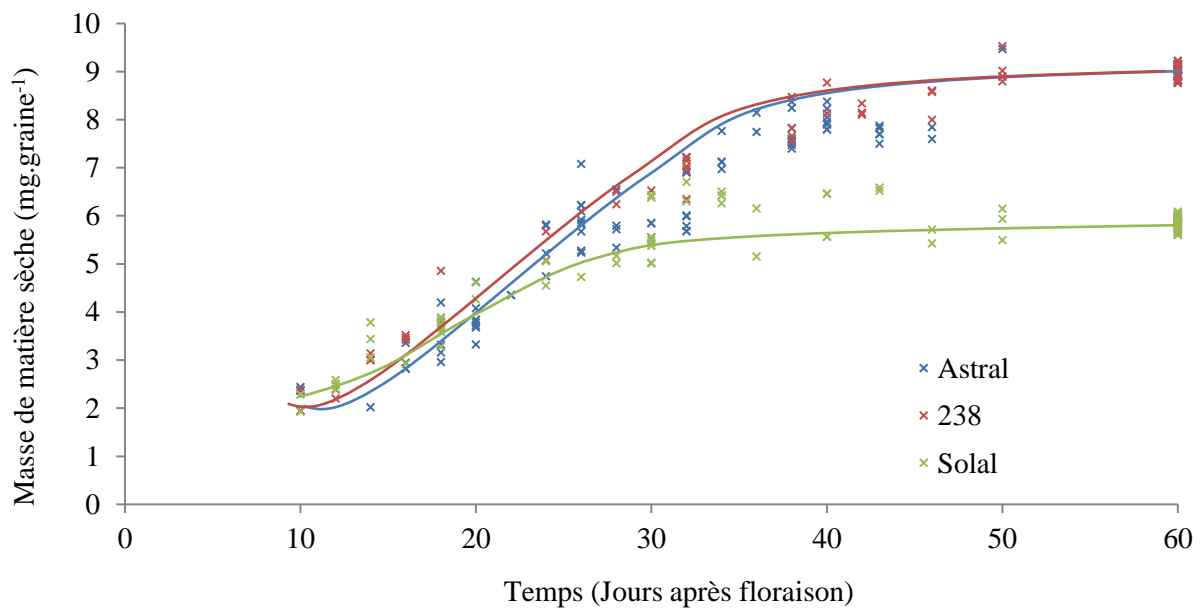


Figure 30 : Croissance de la graine des lignées Astral, Solal et 238.

La croissance de la graine de lin des lignées Astral et 238 semble similaire (figure 30). Leur masse est en constante augmentation et n'atteint un réel palier qu'après 45-50 jours après floraison (JAF). Une fois matures, leurs graines pèsent respectivement $9,6 \pm 0,1$ et $9,1 \pm 0,3$ mg. Au contraire, la masse des graines de la lignée Solal se stabilise à $7,4 \pm 0,6$ mg dès 30-32 JAF. Cette différence pourrait s'expliquer à différents niveaux :

- Par un transport plus lent et moins abondant des photoassimilats *via* le phloème qui pourrait conduire à une réduction de l’apport en carbone et azote pour le développement de la graine de la lignée Solal.
- Par une sous-expression de certains gènes du métabolisme central (glycolyse et cycle de Krebs par exemple) qui pourraient également être mis en cause, et conduirait ainsi à un catabolisme moins efficace du saccharose et de la glutamine.

1.1.3. Accumulation des composés de réserve.

Afin d’appréhender de manière plus efficace les mécanismes de remplissage de la graine de lin, une caractérisation biochimique a été effectuée à différents stades de développement de 10 à 50 JAF. Une cinétique d’accumulation des différents composés constituant la biomasse a ainsi pu être obtenue pour chacune des trois lignées (figure 31).

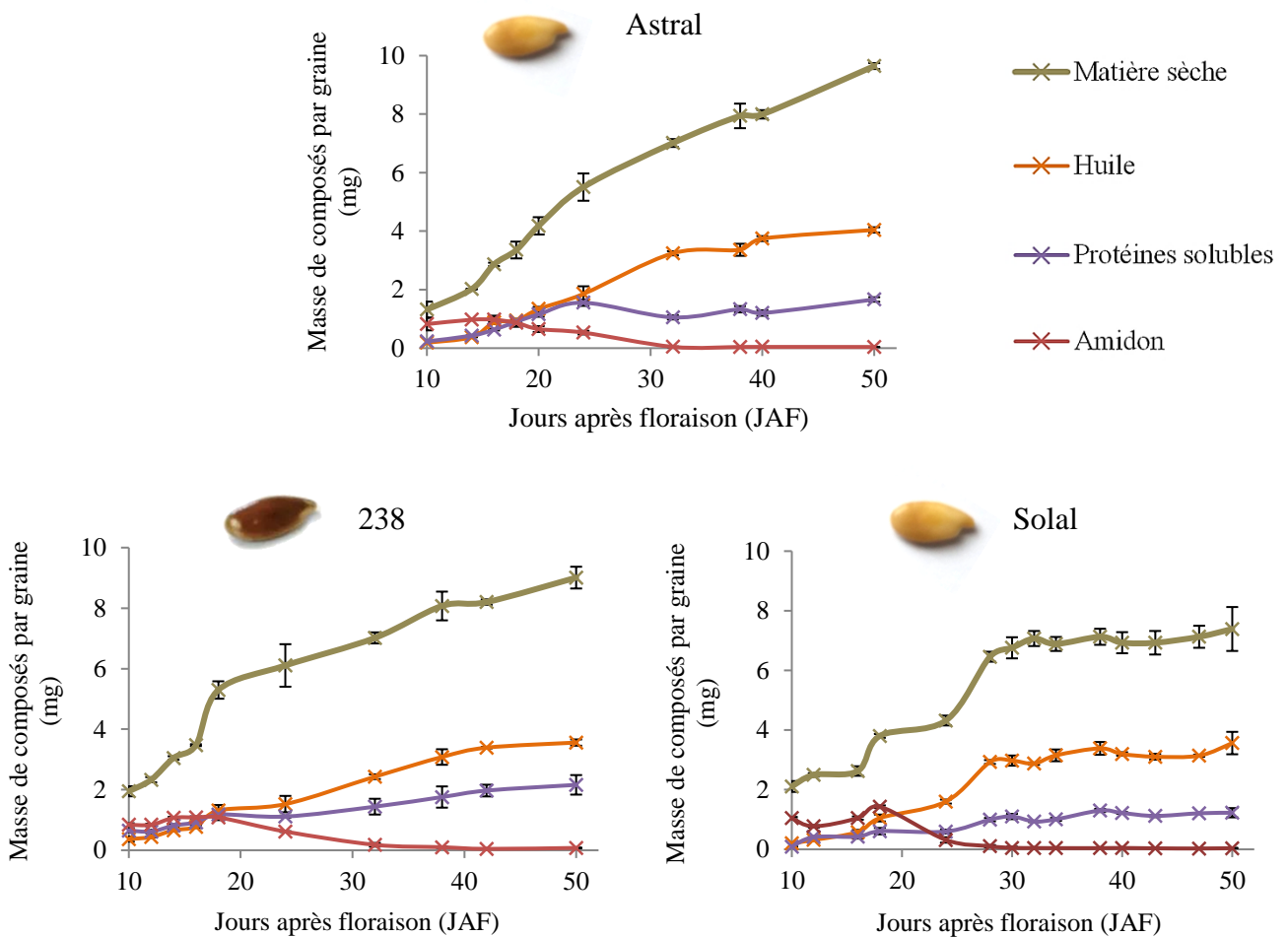


Figure 31: Cinétique d’accumulation des composés de la biomasse des graines des lignées Astral, 238 et Solal.

L'amidon semble être majoritaire en début de croissance chez Astral, 238 et Solal (10-16 JAF). Après 16 JAF, l'huile devient très vite le principal constituant de la graine. Les protéines solubles sont quant à elles essentiellement synthétisées en début de cinétique, puis de manière assez faible après 20 JAF pour Astral et Solal, et après 38 JAF pour 238. Afin d'appréhender au mieux les mécanismes d'accumulation de ces trois types de composé, leurs cinétiques seront détaillées dans les parties suivantes.

1.1.3.1. Les huiles.

1.1.3.1.1. Accumulation des huiles.

La cinétique d'accumulation des huiles chez la graine de lin peut être scindée en trois phases : la morphogénèse (avant 15 JAF), la synthèse des acides gras (15-35 JAF) puis la maturation de la graine (35-60 JAF). Les figures 32, 33 et 34 décrivent la synthèse des huiles chez nos trois lignées, au cours de leur développement. Deux représentations graphiques seront alors exposées :

- La variation de la teneur en composés pour 100 g de MS et par jour pour une identification des différentes phases de synthèse.
- La variation de la teneur en composés par graine et par jour rendant compte des synthèses et dégradations réelles au sein de l'organe.

Chez la lignée Astral (figure 32), la phase de morphogénèse s'achève dès ~14 JAF, où l'huile représente déjà 18,6% de la matière sèche (0,38 mg pour 2,02 mg de MS). Débute alors une phase de synthèse des acides gras durant 18 jours. La courbe est linéaire et la vitesse de synthèse est maximale (~ 0,17 mg d'huile.jour⁻¹). La phase de maturation commence à 32 JAF et la vitesse de synthèse des huiles a diminué (~ 0,03 mg d'huile.jour⁻¹).

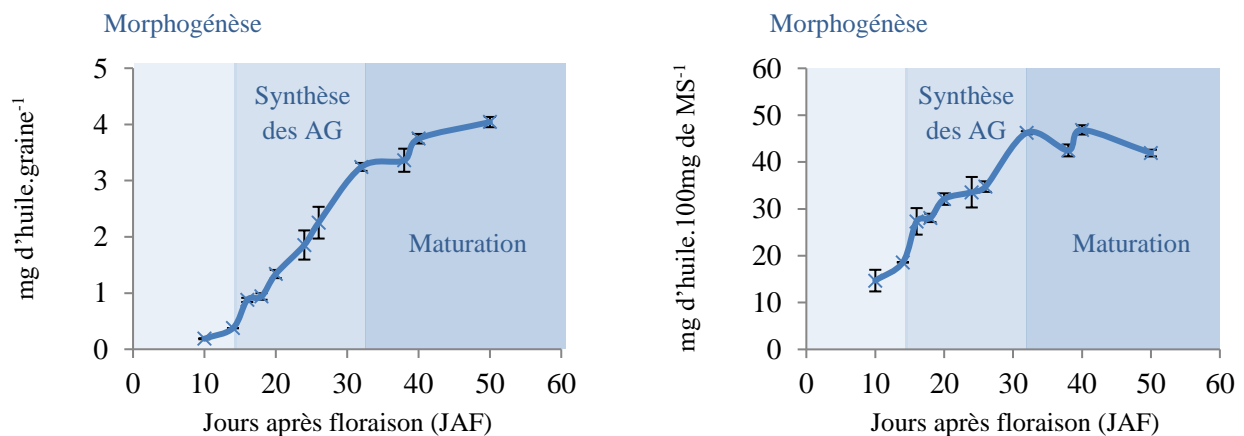


Figure 32 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée Astral.

Chez la lignée 238 (figure 33), la phase de synthèse est un peu plus tardive (après 16 JAF). La vitesse de synthèse ne dépasse pas $0,11 \text{ mg d'huile.jour}^{-1}$ durant cette période. Puisque la croissance des lignées Astral et 238 semble être similaire, la synthèse des huiles semblerait être défavorisée chez la lignée 238 au profit d'un ou plusieurs autres composés. Durant la maturation, cette synthèse ralentit jusqu'à $0,02 \text{ mg d'huile.jour}^{-1}$. Ces remarques justifient une différence dans la teneur en huile pour ces deux lignées à la fin de la maturation ($44,2 \pm 0,7$ et $38,5 \pm 1,0 \text{ g.100g}^{-1}$ respectivement pour Astral et 238).

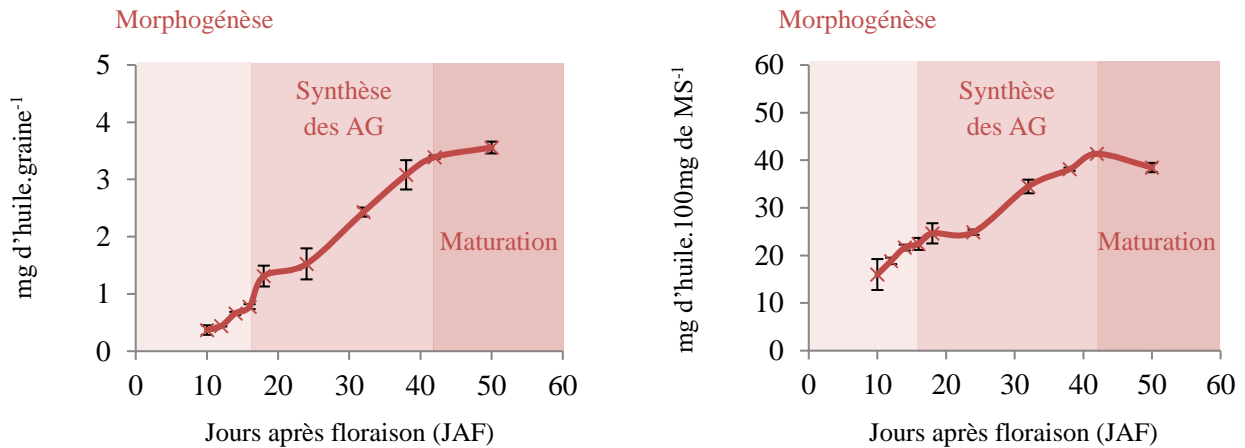


Figure 33 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée 238.

Chez la lignée Solal (figure 34), la phase de synthèse semble également débuter plus tardivement (16 JAF), mais serait plutôt liée à la croissance de sa graine plus lente (-30% par rapport à Astral : figure 34). Elle est cependant compensée par une vitesse de synthèse des huiles plus importante ($\sim 0,17 \text{ mg d'huile.jour}^{-1}$) par rapport à celle observée chez 238. Dès le début de la phase de maturation (30 JAF), la graine contient plus de 40% d'huile. Par la suite, alors que la croissance est déjà interrompue, cette valeur tend à se stabiliser à $\sim 47\%$.

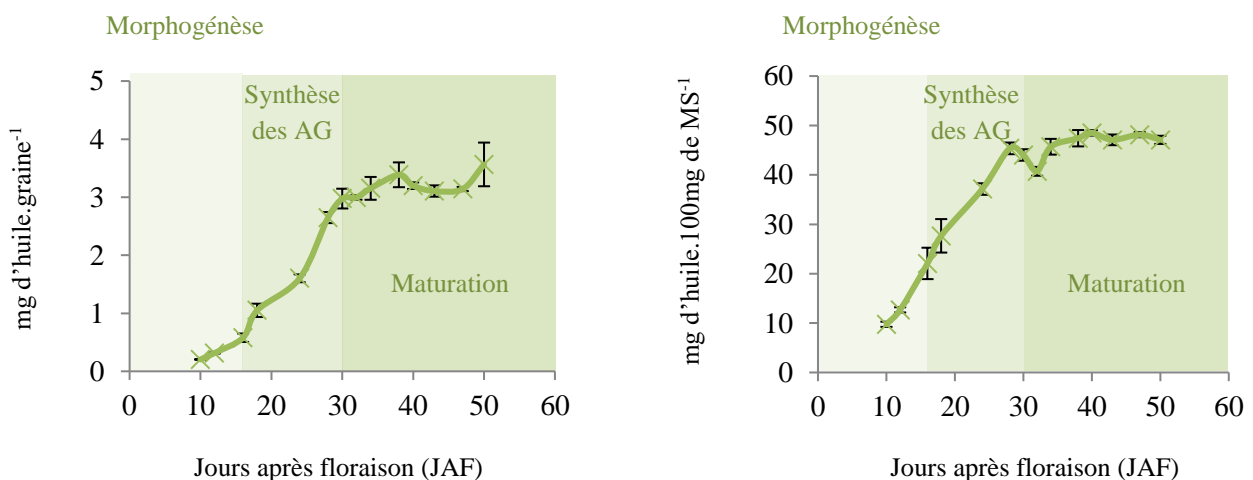


Figure 34 : Accumulation des huiles par les graines de la lignée Solal.

La comparaison des cinétiques d'accumulation des huiles chez nos trois lignées a permis de démontrer des vitesses de synthèse différentes en adéquation avec la teneur en huile de la graine mature, mais également avec les courbes de croissance (MS) (figure 30). Ces résultats suggèrent également de légères différences au niveau du début des phases de synthèse. Une régulation temporelle des gènes codant pour des enzymes du métabolisme central et lipidique serait probablement l'une des causes de ce retard de synthèse. Ce type de régulation a déjà été observé par Troncoso-Ponce *et al.* (2011) chez des espèces telles que *Ricinus communis*, *Brassica napus*, *Euonymus alatus* et *Tropaeolum majus*. Venglat *et al.* (2011) ont également montré un plus grand nombre d'ESTs relatifs à des gènes codant pour des enzymes impliquées dans l'élongation (KAS1, KAS2 et KAS3) et le transfert des acides gras (FATA et FATB) au stade torpille (~ 10 JAF). C'est également le cas pour les facteurs de transcription tels que LEC1-like et FUS3 (principaux régulateurs de l'embryogénèse). Au contraire, les ESTs liés à la synthèse d'oléosine, d'acyltransférases et de désaturases seraient plus abondants chez la graine mature, confirmant ainsi une régulation temporelle très contrôlée des gènes du métabolisme lipidique.

1.1.3.1.2. Profil en acides gras.

Les acides gras composant cette huile ont également été analysés grâce à une préparation d'esters méthyliques d'AG. La figure 35 présente les différents acides gras présents dans l'huile de lin chez la lignée Astral à 50 JAF, le C17:0 étant un standard interne.

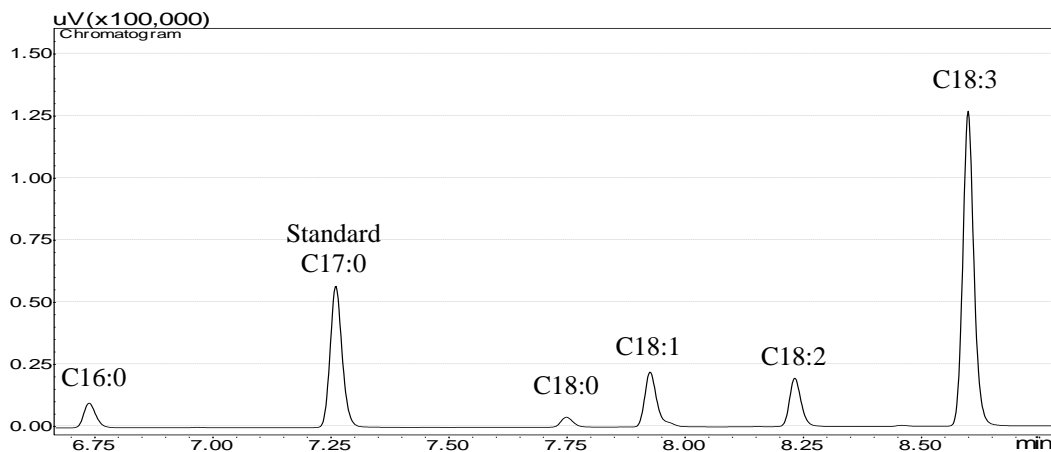


Figure 35 : Profil en acides gras de la lignée Astral à 50 JAF par GC-FID.

Cette quantification au cours du temps est représentée en figure 36. Chez les lignées Astral et 238, l'acide gras majoritaire est le C18:3, ou acide linoléique (ALA), principal oméga-3 chez la graine de lin. Dès 10 JAF, sa teneur augmente plus ou moins rapidement, pour

tendre à se stabiliser pendant la phase de maturation de la graine ($> 55 \text{ g.100 g}^{-1}$ d'huile). Pour ces deux lignées, les deux acides gras saturés sont plutôt minoritaires ($< 10 \text{ g.100 g}^{-1}$ d'huile). Ils servent probablement de précurseurs pour la synthèse des acides gras insaturés (C18:1, C18:2 et C18:3).

Contrairement aux deux premières lignées, la lignée Solal ne synthétise que très peu de C18:3 ($< 5 \text{ g.100g}^{-1}$ d'huile). Cette lignée recombinante a été caractérisée pour cette faible synthèse de C18:3. Chez cette lignée, la régulation du gène codant pour la désaturase FAD3 semblerait être affectée. En effet, son principal substrat, le C18:2, est l'acide gras majoritaire chez cette lignée ($73,7 \pm 0,4 \text{ g.100 g}^{-1}$ d'huile). La teneur du C18:2 correspond approximativement à la somme des teneurs en C18:2 et C18:3 chez les lignées Astral et 238, renforçant cette hypothèse. La teneur en acides gras saturés semble cependant conservée entre les lignées.

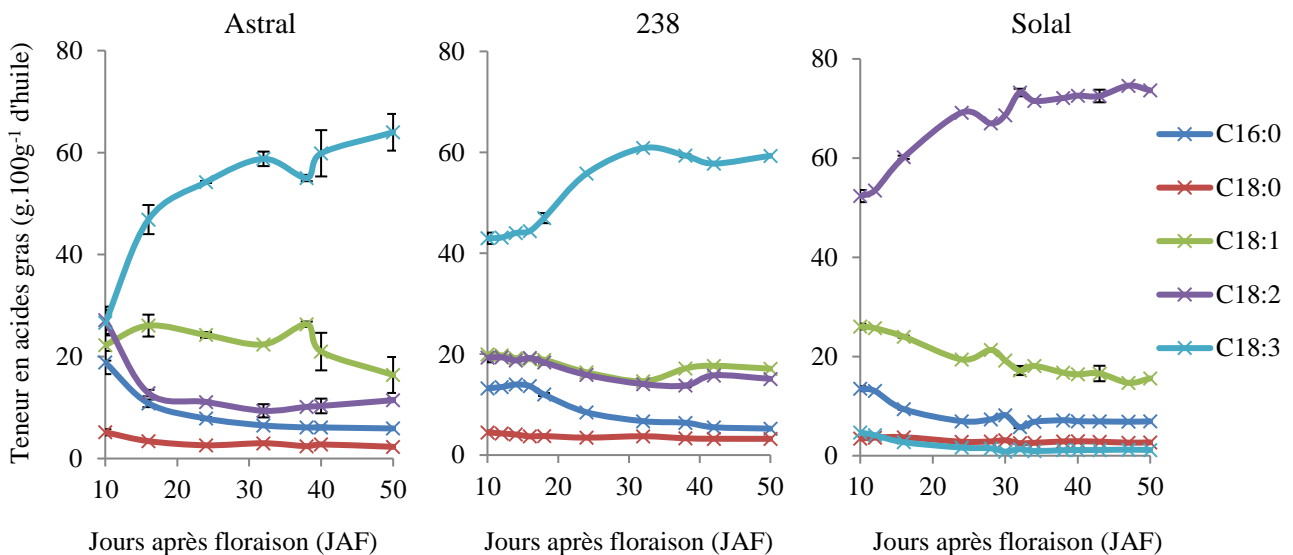


Figure 36: Evolution de la composition de l'huile de lin à partir de graines des lignées Astral, Solal et 238.

1.1.3.1.3. Espèces lipidiques et composition en acides gras.

Afin de vérifier l'accumulation des lipides sous la forme de triglycérides au sein de la graine, une analyse des composés lipidiques a été réalisée par CCM.

Une première séparation des lipides apolaires a tout d'abord permis de montrer une diversité plus importante de DAG à 16 et 24 à partir d'un dépôt de 1 mg d'huile (figure 37A et B) par rapport au stade 32 JAF. En effet, deux tâches plutôt étalées et correspondant à la migration des DAG (1,2, puis 1,3-DAG, d'après Bodennec *et al.*, 1997) sont visibles pour les

trois lignées. Cela suggère donc une diversité des DAG potentiellement importante, différant notamment de par leur degré d'insaturation ou leur longueur de chaînes et ayant un impact direct sur leur polarité et leur migration (figure 37A). Au contraire, à 32 JAF, les DAG semblent plus localisés sur la CCM : cela rend alors compte d'une plus faible diversité dans la polarité de chaque espèces de DAG. On remarque également une quantité de TAG croissante au cours des stades de développement (intensité croissante des tâches pour un dépôt identique).

Chez les phospholipides, le PC est le phospholipide majoritaire, avec du PI et du LPC parfois observables (figure 37B). Le révélateur (I_2) ciblant essentiellement les acides gras insaturés, rend assez compliquée la quantification (relative ou absolue) des espèces lipidiques par exploitation de la CCM et de l'intensité de chacune des tâches.

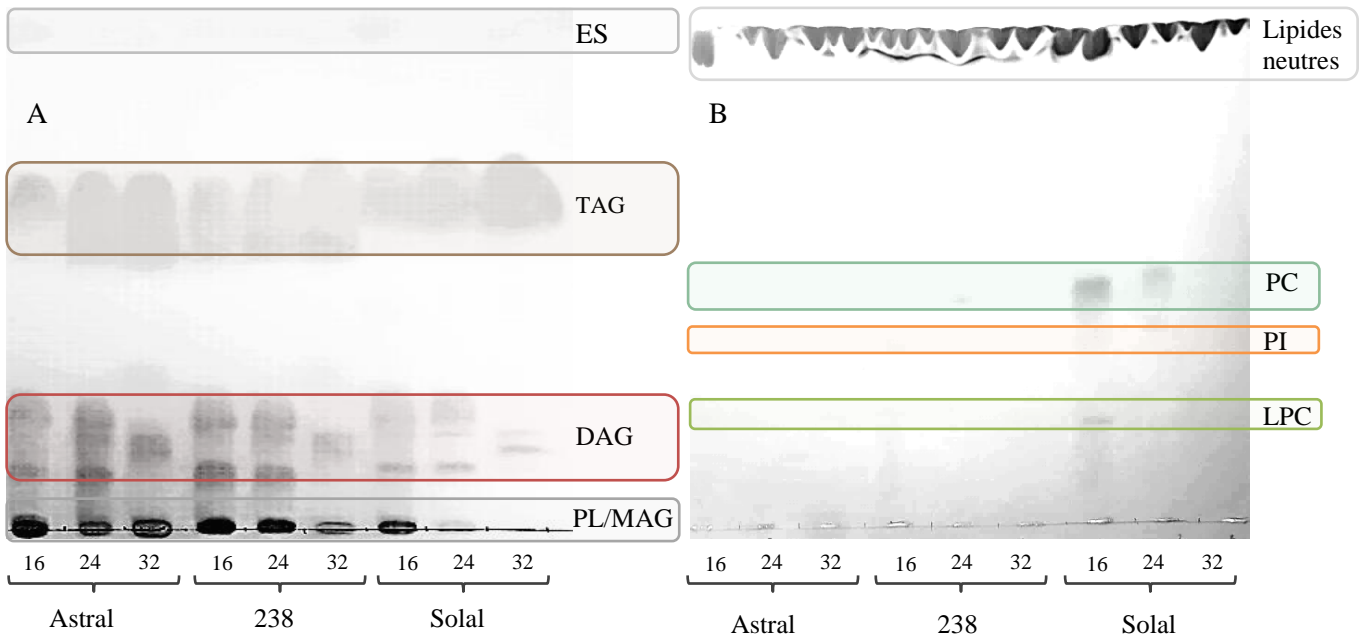


Figure 37 : Profil lipidique des lignées Astral, 238 et Solal, à 16, 24 et 32 JAF.

- A. Séparation des lipides apolaires par un mélange hexane/diethylether/acide acétique (70:30:1 v/v).
- B. Séparation des lipides polaires par un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (90:15:10:3 v/v).

Après avoir gratté les différentes tâches, transestérifié les glycérolipides et séparé, identifié et quantifié les acides gras, un index de désaturation (DI) a été calculé (selon la méthode utilisée par Bhutada *et al.*, 2017) pour chaque classe lipidique (tableau 6). De même, le profil a été dressé pour chaque condition (figure 38, 39 et 40).

	16 JAF			24 JAF			32 JAF		
	DAG	TAG	PC	DAG	TAG	PC	DAG	TAG	PC
Astral	0,6	4,0	4,8	0,9	6,2	8,6	0,9	9,8	13,6
238	0,8	3,7	4,4	0,8	6,2	7,5	0,8	9,8	11,8
Solal	0,7	2,7	3,4	1,0	4,3	3,6	0,9	5,1	5,5

Tableau 6 : Index de désaturation des lipides chez Astral, 238 et Solal.

Les DAG semblent, toutes conditions confondues, assez pauvres en acides gras polyinsaturés ($DI \leq 1,0$) et au contraire très riches en acides gras saturés ($> 59,0\%$) ou monoinsaturés ($> 18,0\%$). Les diglycérides semblent essentiellement ($\sim 90\%$) contenir des acides gras (C16:0, C18:0 et C18:1) synthétisés dans les plastes (figures 38, 39 et 40). Au contraire, le pool C18:2/C18:3 ne dépasse jamais 15,0%. Cela s'expliquerait par un pool d'acyl-CoA contenant alors très peu d'acides gras polyinsaturés ou par une mauvaise spécificité de la GPAT et LPAAT pour ces acides gras. Alors, il aurait pu être intéressant d'analyser le profil de chaque DAG (1,3 et 1,2-DAG) pour en apprendre davantage sur leur formation.

Les TAG se caractérisent par des teneurs décroissantes en C16:0 et C18:0 au cours du temps. De plus, les teneurs en C18:3 sont multipliées par deux entre 16 et 24 JAF. Les acides gras précurseurs sont donc pris en charge par les désaturases (SAD, FAD2 et FAD3) afin d'être incorporés dans les triglycérides sous la forme de C18:3 (figures 38 et 39). L'index de désaturation est alors croissant pour chaque lignée (tableau 6). On remarque des teneurs dix fois plus importantes en C18:3 dans les TAG que dans les DAG chez les lignées Astral et 238. De même, près de quatre fois plus de C18:2 seraient présents au sein des TAG que des DAG chez la lignée Solal (figure 40). Ces résultats suggèrent une spécificité des acyltransférases pour les acides gras polyinsaturés.

Enfin, les PC présenteraient un index de désaturation supérieur aux autres classes (jusqu'à 13,6 chez Astral à 32 JAF) (tableau 6) et des teneurs en acides gras saturés plus faibles (teneurs $< 32,0\%$, toutes lignées confondues) (figures 38, 39 et 40). Le C18:1 serait alors pris en charge par la voie d'acyl-editing pour y être désaturé en C18:2 puis C18:3 par les FAD2 et FAD3, d'où des teneurs élevées en acides gras insaturés sur les PC (les désaturases 2 et 3 agissant préférentiellement sur les PC, d'après Li-Beisson *et al.*, 2013).

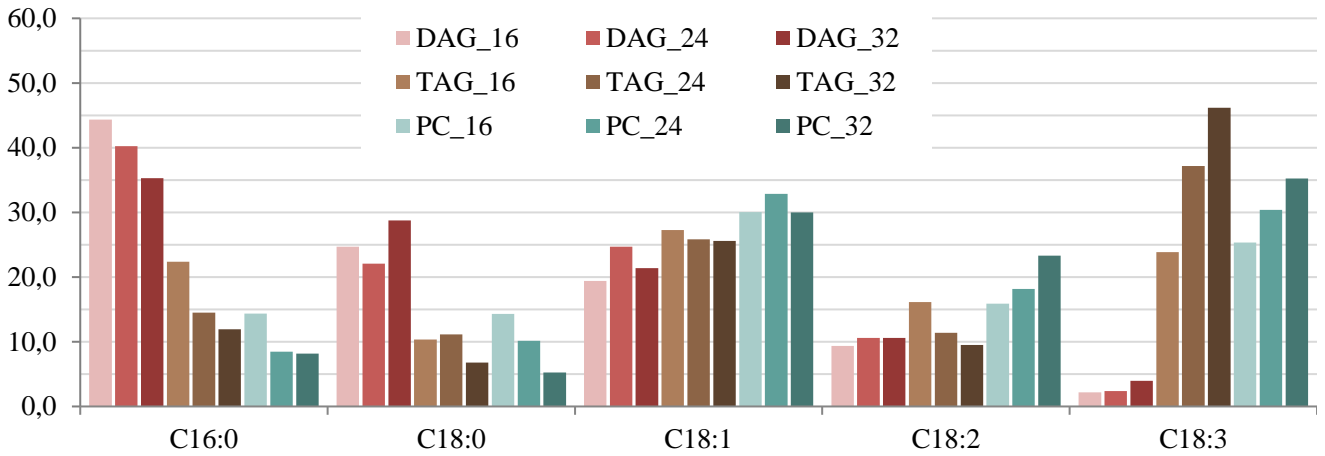


Figure 38 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez Astral.

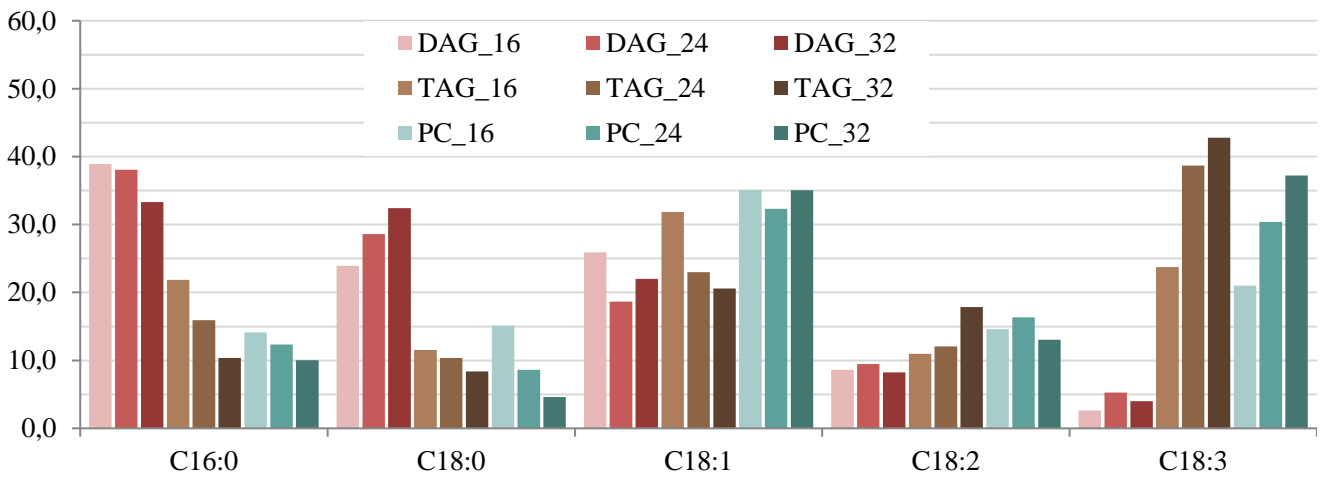


Figure 39 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez 238.

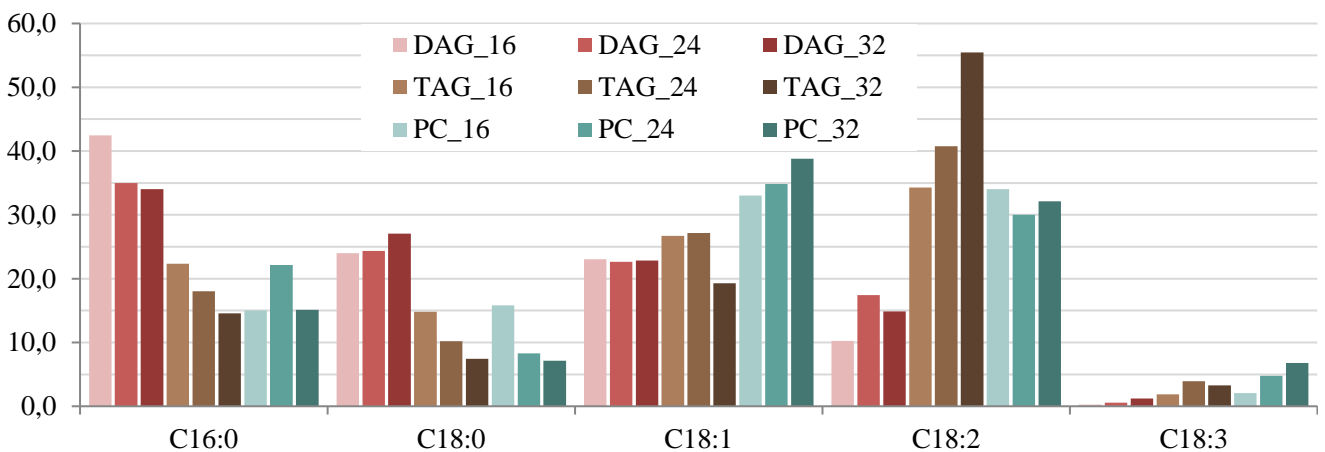


Figure 40 : Profil en acides gras des espèces lipidiques majoritaires chez Solal.

Ces résultats sont plutôt cohérents et confortent l’hypothèse d’un transfert des acides gras polyinsaturés des PC vers les triglycérides. Cela est possible par l’implication de deux voies distinctes :

- Hypothèse 1 : suite à la désaturation du C18:1 sur le PC, les acides gras polyinsaturés sont alors transférés sur les triglycérides *via* la PDAT.

- Hypothèse 2 : l’action de phospholipases permettrait un transfert des acides gras polyinsaturés vers le pool d’acyl-CoA. L’activité des DGAT permettrait l’incorporation de ces acides gras au sein des triglycérides, à condition qu’elles soient alors plus spécifiques pour ceux-ci que les LPAAT et GPAT.

Le schéma en figure 41 (dérivant de la figure 12) représente les deux voies privilégiées pour la synthèse d’acides gras polyinsaturés (C18:2 et C18:3) d’après nos hypothèses formulées ci-dessus.

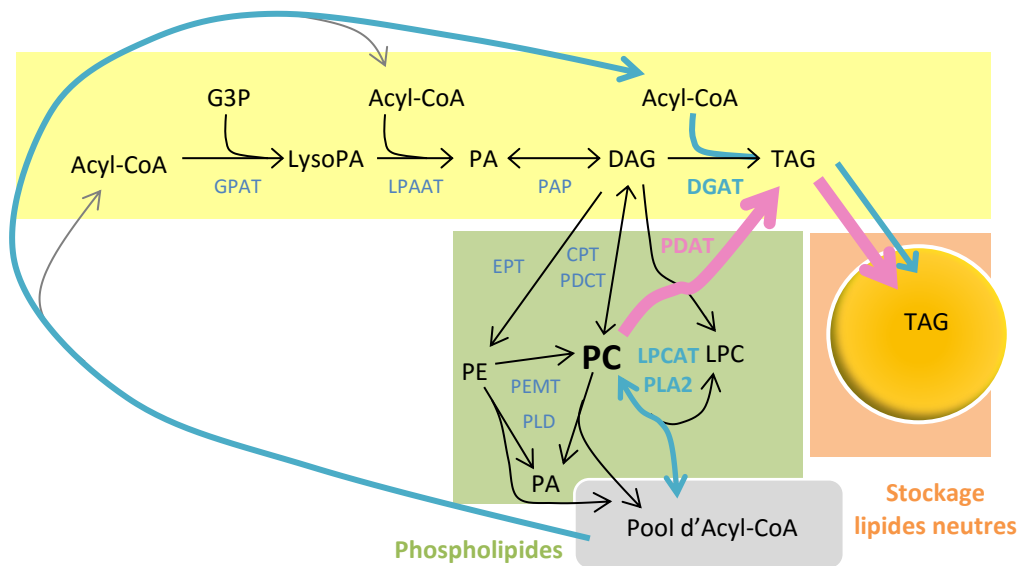


Figure 41: Voies d’incorporation du C18:2 et C18:3 chez les lignées Astral et 238.

Cette figure dérive de la figure 12, où les voies conduisant la l’incorporation du C18:2 et C18:3 d’après nos observations ont été tracées en rose (hypothèse (1) : implication de la PDAT) et en turquoise (hypothèse (2) : implication des phospholipases et DGAT spécifiques des PUFA).

Ces résultats sont plutôt en accord avec les résultats obtenus par Nlandu-Mputu (2009) : les LPAAT de lin incorporent le C18:3-CoA plus de trois fois moins bien que le C18:1 en position *sn*-2 du LPA (spécificité de 30%). La sélectivité des LPAAT de lin est également très faible vis-à-vis du C18:3-CoA lorsqu’il est en compétition avec le C18:1-CoA (11%).

D'après cette même étude, les DGAT seraient également assez peu spécifiques et sélectives pour le C18:3-CoA (sélectivité de 20%). Des expériences de radiomarquage réalisées à partir d'embryon de lin incubés avec du $^{14}\text{C18:1-CoA}$, $^{14}\text{C18:3-CoA}$, $\text{PC-}^{14}\text{C18:1}$ et $\text{PC-}^{14}\text{C18:3}$ (données non publiées) ont également permis de démontrer l'absence d'incorporation du C18:1 dans les TAG à partir du PC et l'absence d'incorporation du C18:3 dans les TAG à partir du pool d'acyl-CoA. Au contraire, il a été montré une forte incorporation de $^{14}\text{C18:1-CoA}$ et du $\text{PC-}^{14}\text{C18:3}$ au sein des TAG. Ces résultats confortent alors l'hypothèse 1 : le C18:1, une fois estérifié sur la PC, est désaturé en C18:2, puis en C18:3 avant d'être transféré vers les triglycérides. Les phospholipases seraient alors assez peu actives pour la libération d'acides gras polyinsaturés dans le pool d'acyl-CoA : la prise en charge du C18:3 par la DGAT semble alors peu probable.

Il serait néanmoins nécessaire de vérifier la composition en acides gras du pool d'AG libres et de tester l'incorporation d'autres substrats marqués au ^{14}C pour le C18:2. Seul, le $^{14}\text{C18:3}$ a été testé, ne permettant pas la discrimination par rapport à l'hypothèse 2 pour l'incorporation du C18:2 dans les TAG *via* l'implication des phospholipases et DGAT spécifique du C18:2. De plus, il serait également intéressant de vérifier la spécificité et la sélectivité des PDAT de lin pour les PUFA et confirmer l'hypothèse 1 comme voie privilégiée pour l'accumulation des acides gras polyinsaturés.

1.1.3.2. L'amidon.

Composé majoritaire durant les stades les plus précoces (un à deux tiers de la biomasse), l'amidon est un élément qui d'après notre étude jouerait un rôle important dans la remobilisation des réserves. D'après les différentes courbes de synthèse et de consommation (figures 42, 43 et 44), le stade de morphogénèse semble couplé à la phase de production de sucre de réserve (jusqu'à 16 JAF), quelle que soit la lignée étudiée. De même, la phase de synthèse des acides gras est concomitante à la dégradation de l'amidon (figures 42, 43 et 44). Il semblerait donc que celui-ci soit mobilisé pour la synthèse des acides gras.

La vitesse de dégradation de l'amidon est de $0,08 \text{ mg d'amidon.jour}^{-1}$ pour la lignée Astral au début de cette phase par rapport à $0,06 \text{ mg d'amidon.jour}^{-1}$ chez 238 (figures 42 et 43). Chez ces deux lignées, cette phase s'interrompt dès l'épuisement de l'amidon ($\sim 32 \text{ JAF}$). Les acides gras seraient ici premièrement réalisés par la remobilisation des réserves. En effet, ces deux voies métaboliques sont essentiellement réalisées dans le plastide, limitant le nombre de réactions sollicitées et ainsi, l'apport en énergie nécessaire à la synthèse d'acétyl-CoA. Ne

représentant que $37,2 \pm 3,6 \text{ g.100g}^{-1}$ chez la lignée 238 par rapport à $61,7 \pm 3,6 \text{ g.100g}^{-1}$ chez Astral, cette différence pourrait être à l'origine de la divergence biochimique et phénotypique observée dans leur capacité à accumuler les acides gras.

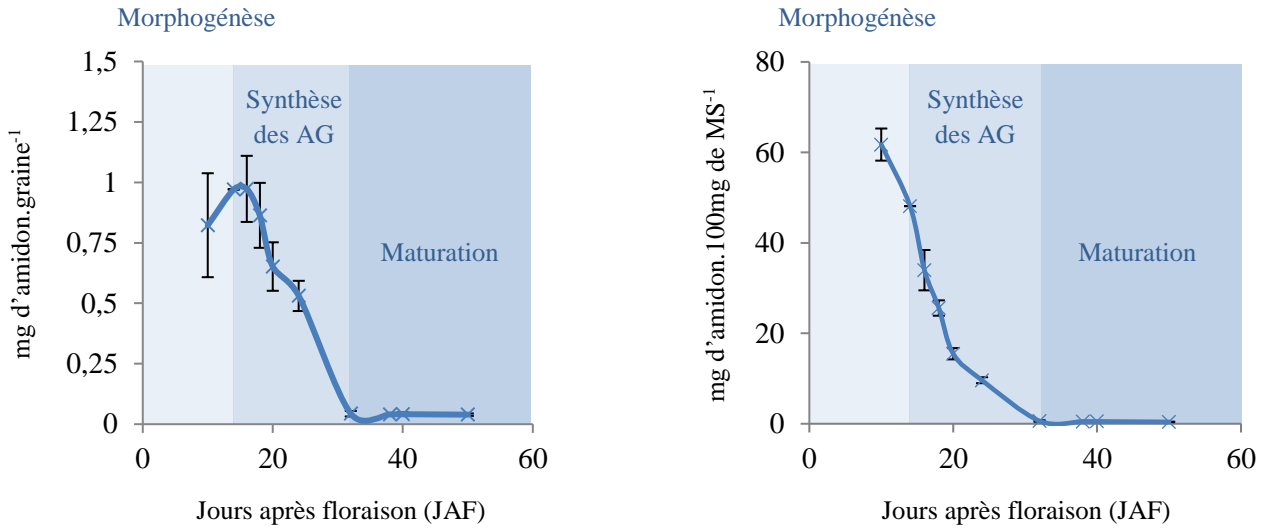


Figure 42 : Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée Astral.

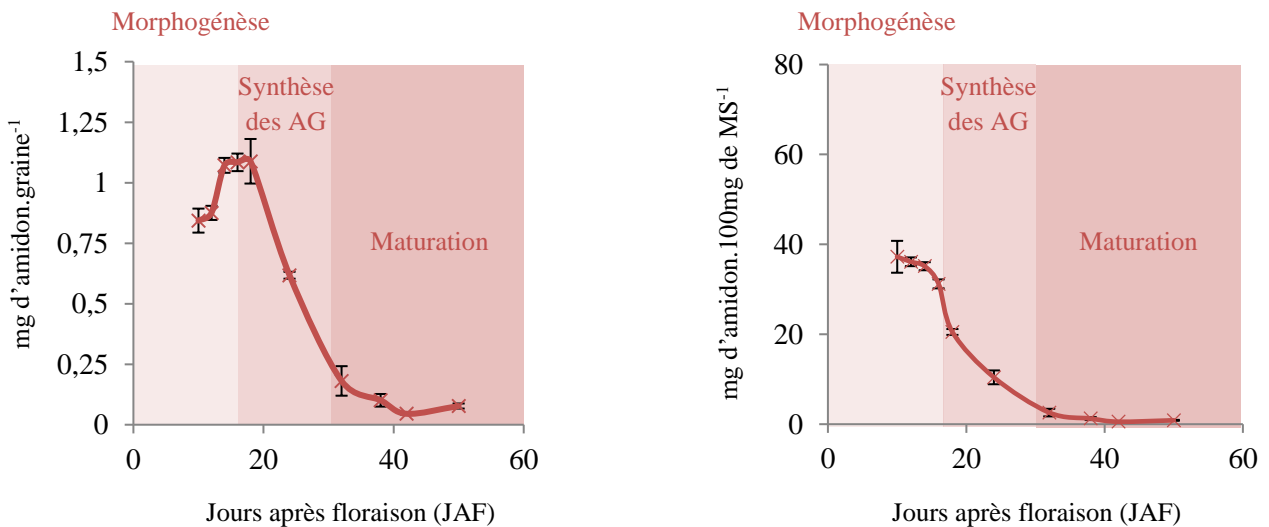


Figure 43: Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée 238.

Chez la lignée Solal (figure 44), le sucre de réserve semble être consommé plus rapidement. Sa vitesse de dégradation est de $0,16 \text{ mg d'amidon.jour}^{-1}$ et devient limitant dès 32 JAF tandis que la synthèse des acides gras se poursuit encore dans les 10 jours suivants. L'apport en photoassimilats pourrait alors prendre le relai dès l'épuisement précoce de l'amidon. Ceci pourrait expliquer un remplissage plus faible et est en accord avec les résultats relatifs à la croissance de la graine de la lignée Solal (croissance achevée dès 30-32 JAF d'après la figure

30). Un défaut de régulation *via* des facteurs de transcription pourrait être à l'origine de cette remobilisation rapide de l'amidon (surexpression des amylases et amyloglucosidase).

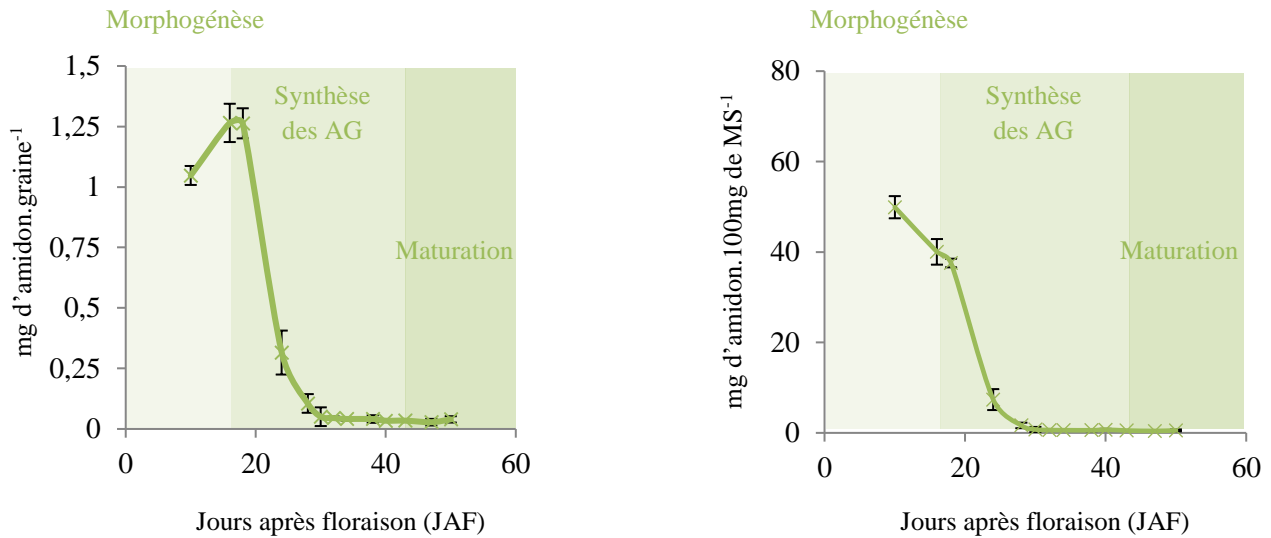


Figure 44: Accumulation et dégradation de l'amidon chez les graines de la lignée Solal.

D'après ces résultats, la quantité d'amidon et le couplage de sa dégradation avec la phase de synthèse des acides gras renforcent son rôle central dans la remobilisation du carbone et l'accumulation des triglycérides.

1.1.3.3. Les protéines solubles.

1.1.3.3.1. Accumulation des protéines solubles.

Les protéines solubles semblent essentiellement synthétisées durant la morphogénèse et la première partie de la phase de synthèse des acides gras (jusqu'à 24 JAF) chez la lignée Astral (figure 45).

La vitesse de synthèse des protéines équivaut à 0,13 mg de protéines.jour⁻¹. La fin de cette phase est concomittente avec l'épuisement de l'amidon (figure 42), suggérant une possible implication de la remobilisation du sucre de réserve dans la synthèse des acides aminés. On pourrait aussi émettre l'hypothèse d'une légère dégradation des protéines en adéquation avec la production continue d'huile. Il resterait néanmoins à vérifier cette hypothèse par une analyse protéomique, et notamment avec la présence potentielle de protéases.

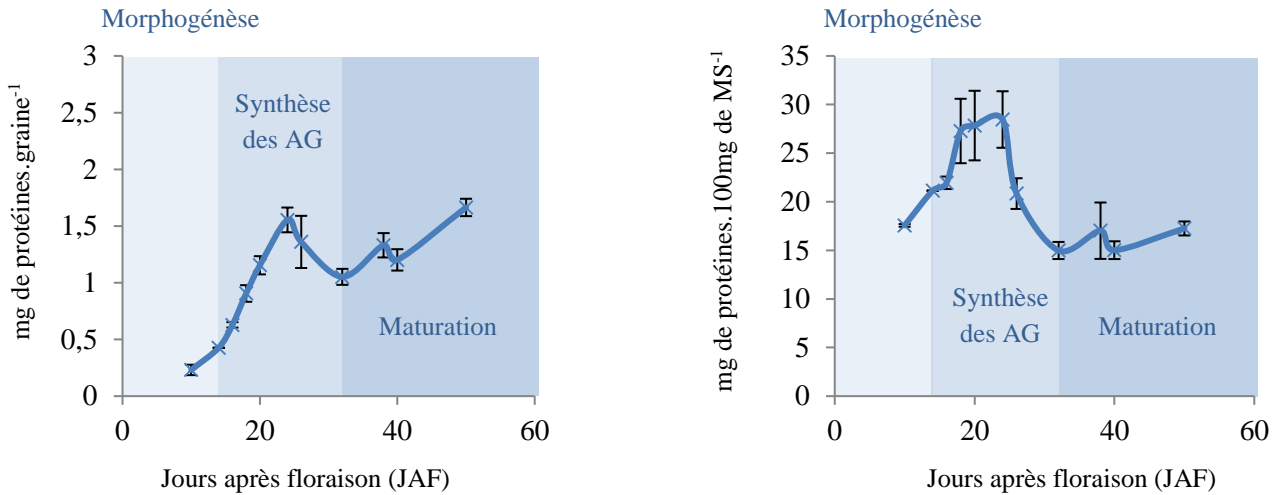


Figure 45: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée Astral.

Chez la lignée 238, la synthèse protéique semble s’effectuer de manière continue si on se réfère à la variation de la teneur par graine (figure 46). La vitesse de synthèse avoisine 0,05 mg de protéines.jour⁻¹. Malgré une vitesse d’accumulation plus lente, l’absence de dégradation et d’arrêt de synthèse conduit à une teneur supérieure en protéines chez la graine de la lignée 238 par rapport à celle obtenue chez la lignée Astral ($23,9 \pm 2,6$ contre $17,3 \pm 0,7$ g.100g⁻¹) (figures 45 et 46).

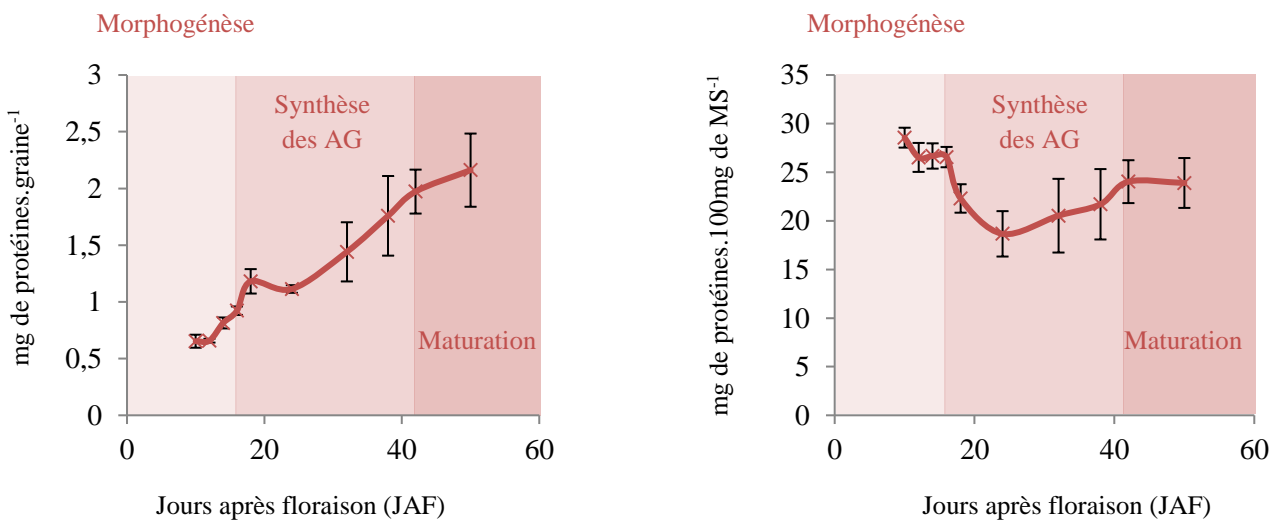


Figure 46: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée 238.

Chez la lignée Solal, les protéines sont synthétisées durant les deux premières phases avec une vitesse moyenne équivalente à celle observée chez la lignée 238. Cependant, durant la maturation de la graine, la vitesse se stabilise afin de conserver une teneur globale en protéines solubles de $16,2 \pm 0,6$ g.100g⁻¹.

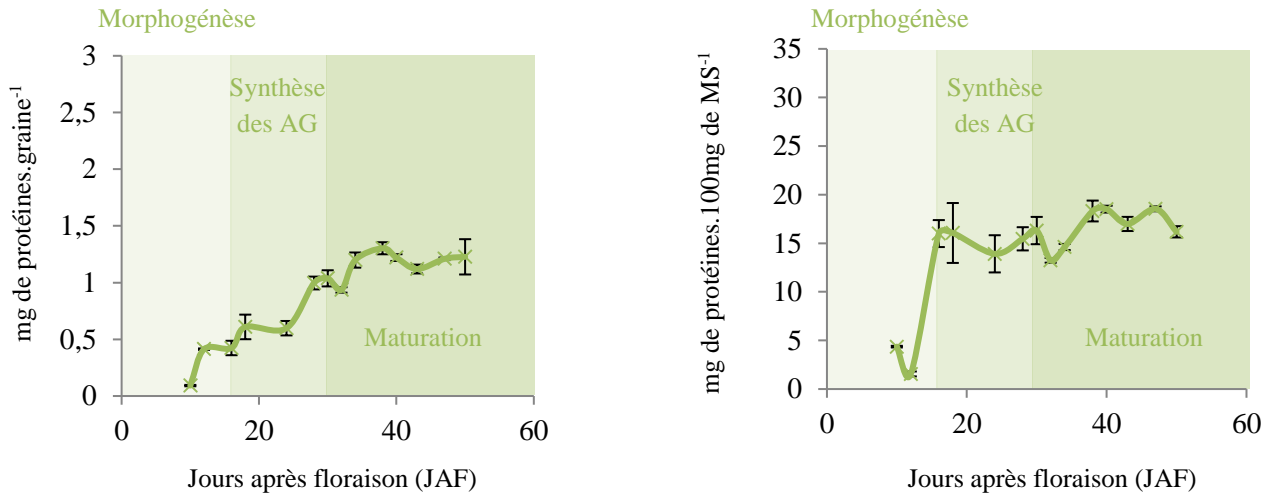


Figure 47: Accumulation des protéines chez les graines de la lignée Solal.

Les protéines seraient, d’après ces différentes constatations, également un élément clé dans la divergence métabolique et phénotypique observée entre nos deux lignées les plus oléagineuses (Astral et Solal) et la lignée 238. En effet, après la consommation de l’amidon, une synthèse protéique régulière est observée exclusivement *via* l’apport en photoassimilats dans les graines de la lignée Solal.

1.1.3.3.2. Profil en acides aminés.

L’analyse des acides aminés constituant les protéines solubles a également été réalisée (figure 48). Seuls, les acides aminés majoritaires chez les trois lignées seront présentés dans cette partie. Chez la lignée Astral, l’Asn (asparagine) et l’Arg (arginine) sont des acides aminés majoritaires au cours du développement de la graine (entre 14,1 et 31,2% pour l’Asn et entre 10,8 et 47,6% pour l’Arg). Le Glu (glutamate) devient cependant majoritaire à 16 JAF (36,9%) tandis que la Phe (phénylalanine) l’est à 24 JAF (27,6%). L’Asn et l’Arg semblent être deux acides aminés également prédominants tout au long du développement de la graine. Des observations similaires peuvent être faites chez la seconde lignée oléagineuse, Solal, exceptées celles concernant la Phe et le Glu.

Chez la lignée 238, l’Asn et l’Arg sont également très présentes au stade 24 JAF et pas aux stades 16 JAF (teneur en Arg de 5,1%) et 38 JAF (teneur en Asn de 3,0%). On peut ainsi en déduire que ces deux acides aminés seraient des éléments indispensables au bon développement de la graine de lin. Néanmoins, la Tyr serait également synthétisée de manière importante au cours de la morphogénèse et durant le début de la phase de synthèse des acides gras chez la lignée 238 (28,0 à 37,0% entre 10 et 24 JAF).

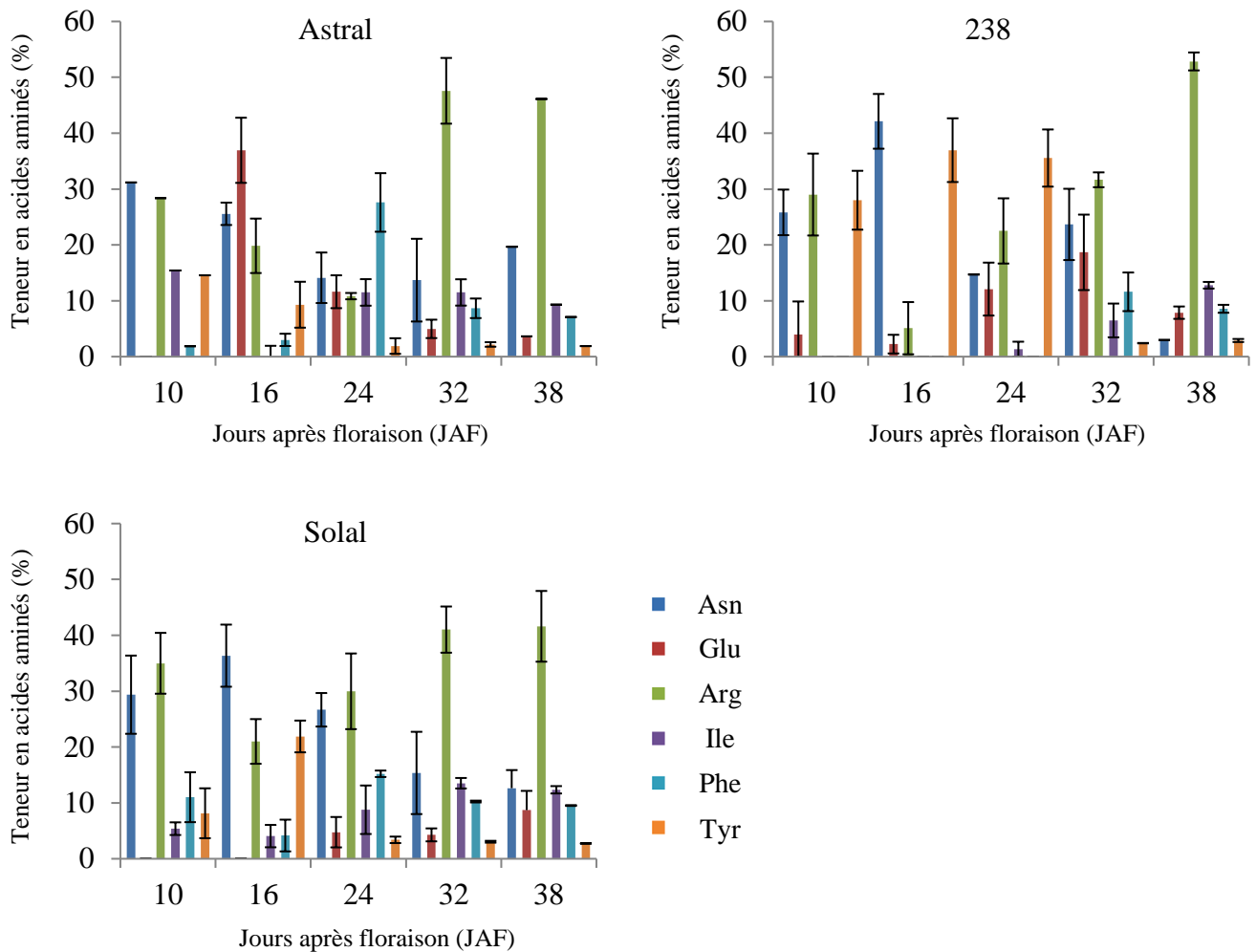


Figure 48 : Profil en acides aminés (majoritaires) issus de l'hydrolyse protéique chez les lignées Astral, 238 et Solal.

Le profil en acides aminés de la lignée 238 paraît plutôt original compte tenu de celui observé chez les deux autres lignées. On peut ainsi émettre l'hypothèse d'une mobilisation plus importante des ressources carbonées pour la synthèse de Tyr pour la lignée 238. Or, la Tyr est majoritairement synthétisée à partir du PEP (phosphoénolpyruvate) et de l'E4P (érythrose-4-phosphate). Ces observations ne permettent cependant pas d'affirmer si cette originalité est la cause ou la conséquence de la divergence phénotypique des lignées les plus oléagineuses vis-à-vis de la lignée 238. En effet, le PEP est l'intermédiaire impliqué dans la synthèse d'acétyl-CoA et l'E4P est un métabolite primordial dans la voie des pentoses phosphates, la voie privilégiée dans la génération de NADPH. Les autres acides aminés ne dépassent, quant à eux, jamais une teneur supérieure à 15% des protéines solubles.

1.1.4. Conclusion partielle : Caractérisation biochimique de la graine de lin.

La quantification des différents composés constituant la graine de lin à différents stades de développement a permis de mettre en évidence certains phénomènes intéressants dans le cadre de notre étude :

- Une forte teneur en amidon aux stades les plus précoces de la graine et une dégradation lente de celui-ci conduiraient à une plus grande accumulation des lipides de réserve.
- Une assimilation ou remobilisation trop rapide des substrats durant la phase de synthèse des acides gras induirait une accumulation de composés non désirés (protéines notamment) : les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides ne seraient pas en mesure de prendre en charge cet excédent de carbone entrant dans la cellule.
- Les acides gras polyinsaturés seraient majoritairement issus de la désaturation du PC-C18:1, puis incorporés directement et majoritairement.

1.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la graine de lin.

1.2.1. Conception d'un modèle stœchiométrique de cellule de graine de lin.

Le modèle FBA d'une cellule de graine de lin a été construit par intégration d'un grand nombre de données physiologiques et biochimiques qui vont permettre d'établir la stœchiométrie des réactions et les différentes contraintes au modèle. Ce modèle établi ici décrit le métabolisme central et comprend les différentes voies d'assimilation et de transformation des nutriments nécessaires à la production d'énergie et à la synthèse des précurseurs métaboliques pour la formation de la biomasse.

1.2.1.1. Conception du réseau.

1.2.1.1.1. Flux extracellulaires.

Le réseau est notamment défini par des flux externes (extracellulaires) dits d'« entrée » et de « sortie ». Les flux d'entrée correspondent à un transport des photoassimilats des cellules des organes photosynthétiques vers les organes « puits » (dont la graine). Cet apport se traduit par un flux de saccharose et de glutamine provenant de l'extérieur de la cellule. Ce sont les principales sources de carbone et d'azote de la graine. Les racines et les feuilles sont également capables d'assimiler l'azote minéral sous forme de nitrates (NO_3^-), nitrites (NO_2^-), ammoniac (NH_3), ammonium (NH_4^+) et dihydrogène (N_2). Ici, on utilisera le NH_3 pour une raison de simplification du modèle. Un flux d'entrée de CO_2 a également été ajouté, permettant une

potentielle fixation du carbone via le cycle de Calvin (RuBisCO), deuxième étape de la photosynthèse. Les flux de « sortie » ont été définis par la synthèse des principaux composés de la biomasse : triglycérides, protéines, paroi cellulaire et amidon. Une sortie de CO₂ permet de libérer l'excédent de carbone à l'extérieur de la cellule (respiration).

1.2.1.1.2. Flux intracellulaires.

Afin de convertir les différents substrats métaboliques en biomasse, il est nécessaire de répertorier un certain nombre de réactions enzymatiques. Le réseau défini par celles-ci s'appuie principalement sur celui constitué par Acket (2015) et Acket (2018 ; résultats internes). Il inclut le métabolisme du saccharose et de l'amidon, la synthèse de paroi cellulaire, la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphate, ainsi que la biosynthèse des différents acides aminés.

Certaines réactions sont néanmoins absentes du réseau. C'est notamment le cas de la RuBisCO, pour laquelle Barvkar *et al.* (2012) suggèrent une implication certaine dans la fixation du carbone à travers le cycle de Calvin et son expression durant l'embryogénèse. Malgré cela, cette réaction n'a pas été ajoutée au sein du réseau. En effet, il a été démontré qu'un apport net de CO₂ était peu probable chez la graine de lin : seule une faible incorporation de celui-ci dans les acides gras (~ 0,1%) a pu être décelée (Troufflard, 2004). Les expérimentations MFA menées par Acket (2015) ont également conduit à une valeur de flux net de $0,0 \pm 0,5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$.

Suite aux résultats de protéomique, Barvkar *et al.*, (2012) ont pu identifier un certain nombre de transporteurs plaste/cytosol (trioses, PEP et 3-PGA) et cytosol/mitochondrie (OAA et malate). Chez d'autres graines oléagineuses, telles que le colza (Schwender *et al.*, 2003), le tournesol (Alonso *et al.*, 2007), le soja (Sriram *et al.*, 2004), le ricin (Smith *et al.*, 1992) et le maïs (Alonso *et al.*, 2010), la présence de deux pools de métabolites (hexoses, trioses et PEP) a été mentionnée pour le cytosol et le plaste, ainsi que l'existence de leurs transporteurs. Troufflard (2004) a notamment confirmé l'importation de G6P à travers le plaste et son incorporation au sein de l'amidon par utilisation de [1-¹⁴C]-G6P. Enfin, d'après Acket (2015), le malate ne contribuerait à la synthèse des acides gras remettant en cause son transport et celui de l'OAA entre les deux compartiments. Dans le modèle développé pour cette étude, seuls les transporteurs de G6P, DHAP et PEP ont été insérés. La figure 49 représente le réseau métabolique d'une cellule de graine de lin. Les annexes 1 et 2 correspondent à la liste des métabolites et des réactions du réseau présenté ici.

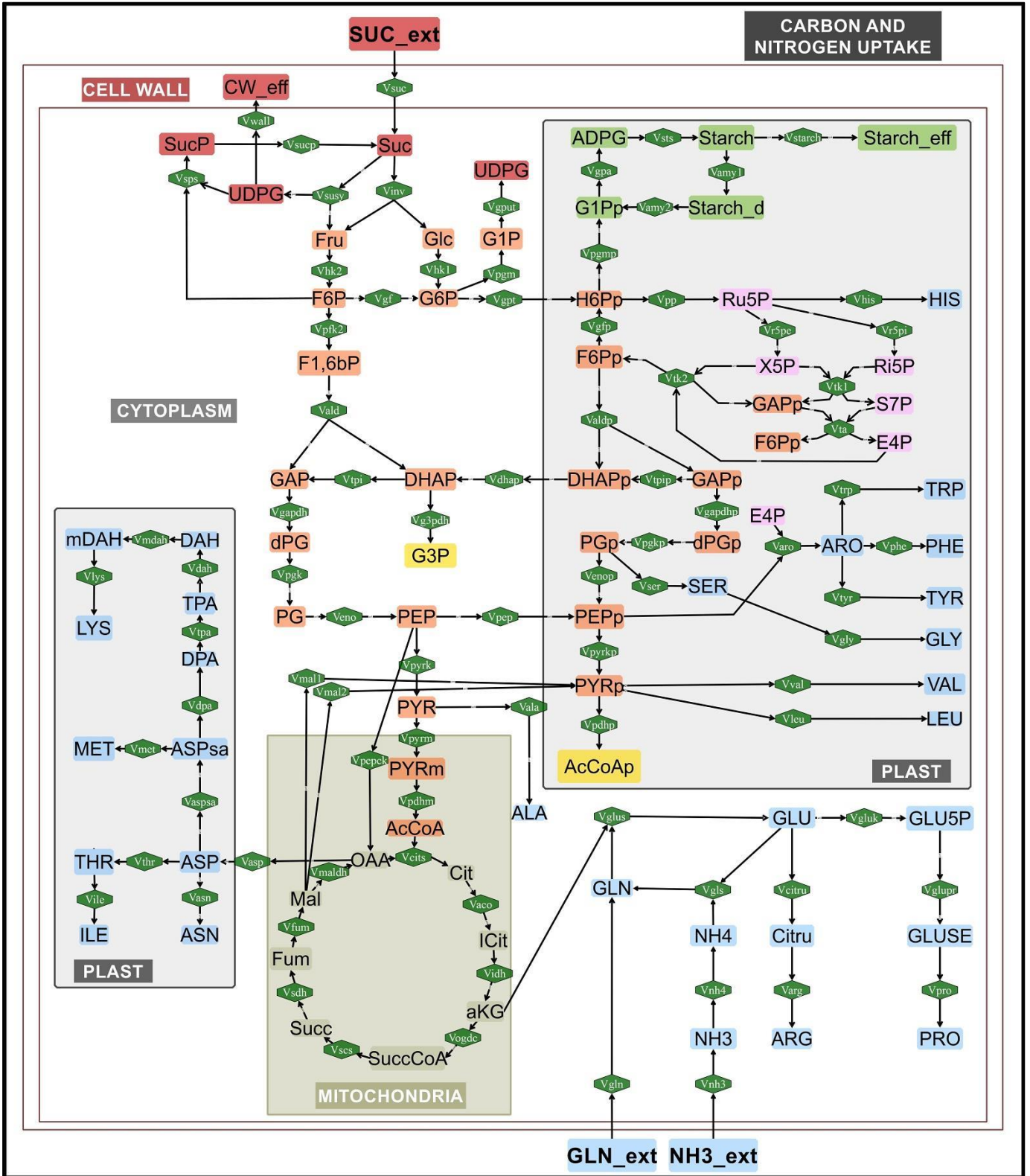


Figure 49 : Réseau métabolique d’une cellule de graine de lin.

Abréviations intermédiaires métaboliques : ADPG, Adénosine Diphosphate-Glucose ; aKG, 2-oxoglutarate ; Ala, Alanine ; AcCoA, Acétylcoenzyme A ; Arg, Arginine ; Aro, Précurseur d’acides aminés aromatiques ; Asn, Asparagine ; Asp, Aspartate ; ASPsa, L-Aspartate 4-semialdéhyde ; Cit, Citrate ; Citru, Citruline ; CO₂, Dioxyde

de carbone ; CW, Paroi cellulaire ; DAH, L-2-Amino-6-oxoheptanedioate ; DHAP, Dihydroxyacétonephosphate ; DPA, (2S,4S)-4-Hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate ; dPG, 1,3-bisphosphoglycérate ; E4P, Erythrose-4-phosphate ; F16bP, Fructose-1,6-biphosphate ; F6P, Fructose-6-phosphate ; Fru, Fructose ; Fum, Fumarate ; G1P, Glucose-1-phosphate ; G6P, Glucose-6-phosphate ; GAP, Glycéraldéhyde-3-phosphate ; Glc, Glucose ; Gln, Glutamine ; Glu, Glutamate ; GLU5P, Glutamyl-5-phosphate ; GLUSE, L-Glutamate 5-semialdéhyde ; Gly, Glycine ; G3P, Glycérol-3-phosphate ; His, Histidine ; ICit, Isocitrate ; Ile, Isoleucine ; Leu, Leucine ; Lys, Lysine ; Mal, Malate ; mDAH, méso-2,6-Diaminoheptanedioate ; Met, Méthionine ; OAA, Oxaloacétate ; PEP, Phosphoénolpyruvate ; PG, 3-ou 2-Phosphoglycérate Phe, Phénylalanine ; Pro, Proline ; Pyr, Pyruvate ; Ri5P, Ribose-5-phosphate ; Ru5P, Ribulose-5-phosphate ; S7P, Sedoheptulose-7-phosphate ; SER, Sérine ; Starch_d, Starch dégradation ; Suc, Saccharose ; Succ Succinate ; SuccCoA, Succinyl-Coenzyme A ; SucP, Saccharose phosphate ; Thr, Thréonine ; TPA, 2,3,4,5-Tétrahydrodipicolinate ; Trp, Tryptophane ; Tyr, Tyrosine ; UDPG, Uridine diphosphate-glucose ; Val, Valine.

1.2.1.2. Application des contraintes.

1.2.1.2.1. Détermination des flux extracellulaires.

A 24 JAF, on peut calculer une vitesse d'accumulation des huiles (TAG) chez la lignée Astral de 171,57 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹ comme suit (Matériels et Méthodes, 2.3.1.2.) :

$$V_{TAG} = \frac{(2,25 - 1,34) \times 10^6}{\frac{884}{6}}$$

Dans cette partie, on a estimé la masse molaire moyenne des différents composés selon nos résultats précédents, des données de la bibliographie, ou d'après la masse molaire des unités de répétition constituant la molécule :

- La masse molaire moyenne des TAG chez la graine de lin a été fixée à ~ 884 g.mol⁻¹.
- La masse molaire moyenne des protéines a été fixée à ~ 130 g.mol⁻¹ par acide aminé (masse molaire moyenne et pondérée pour chaque acide aminé).
- La masse molaire moyenne de l'amidon a été fixée à ~ 162 g.mol⁻¹ correspondant à celle de son unité de répétition (D-glucose).
- La masse molaire moyenne de la paroi cellulaire a été fixée à 155 g.mol⁻¹ correspondant à celle de l'unité de répétition de ses deux composants majoritaires (cellulose : 162 g.mol⁻¹ par unité de glucose ; hémicellulose : 148 g.mol⁻¹ par unité de xylose).

Le tableau 7 reprend l'ensemble des calculs de flux extracellulaires pour chaque composé constituant la biomasse, à chaque stade de développement et pour chaque lignée étudiée.

Stade de développement	10 JAF	16 JAF	24 JAF	32 JAF	38 JAF
Flux extracellulaires (nmol.graine ⁻¹ .jour ⁻¹) – Astral					
Lipides	53,73	158,37	171,57	104,64	72,12
Protéines	384,62	923,08	269,23	358,97	144,23
Amidon	180,56	-152,78	-435,19	-64,81	0,00
Paroi cellulaire	247,31	322,58	870,97	685,48	184,33
Flux extracellulaires (nmol.graine ⁻¹ .jour ⁻¹) – 238					
Lipides	44,12	183,82	127,26	125,24	108,60
Protéines	192,31	711,54	317,31	357,14	403,85
Amidon	88,89	26,61	-630,56	-190,00	-77,78
Paroi cellulaire	35,48	838,71	496,77	221,20	96,77
Flux extracellulaires (nmol.graine ⁻¹ .jour ⁻¹) – Solal					
Lipides	67,87	137,63	212,67	234,73	9,43
Protéines	615,38	256,41	300,00	307,69	25,64
Amidon	333,33	125,00	-643,33	-13,89	-6,48
Paroi cellulaire	129,03	107,53	96,77	112,90	43,01

Tableau 7 : Détermination des flux extracellulaires relatifs à la biomasse.

1.2.1.2.2. Autres contraintes.

De la même manière, il est possible de fixer une valeur nulle pour certaines réactions à discriminer du modèle. En effet, suite à sa conception globale, certaines données de la bibliographie ont attiré notre attention sur la possible absence de certaines réactions.

Parmi celles-ci, Acket (2015) a notamment suggéré l'absence d'enzyme malique grâce à une expérimentation de marquage ([U-¹³C5] glutamine). En effet, lors de cette analyse, les acides gras n'auraient pas subi d'incorporation de ¹³C (m+0 = 1,00), contrairement au malate (m+0 = 0,51 ; m+1 = 0,15 ; m+2 = 0,10 ; m+3 = 0,07 ; m+4 = 0,17). De plus, l'analyse protéomique de Barvkar *et al.* (2012) a montré la présence de la 2,3-bisphosphoglycérate-independent phosphoglycérate mutase (PGAM) et de l'énolase dans le cytosol mais pas dans le plaste. Au contraire, la phosphoglucomutase serait uniquement localisée dans ce compartiment. L'interconversion du 3-PG en 2-PG puis la synthèse du PEP ne s'effectuerait donc que dans le cytosol. De même, la synthèse de G1P à partir de G6P serait réalisée seulement dans le plaste.

1.2.1.3. La fonction objective.

L'application des contraintes permet de restreindre l'espace total des solutions à un sous-espace de solutions représenté sous la forme d'un cône. Grâce à l'optimisation par la fonction objective, l'analyse de la balance des flux permet de calculer une distribution optimale du flux au sein de l'espace de solution (figure 19 ; Orth *et al.*, 2010). Elle correspond à un objectif à atteindre par la cellule. Dans le cadre de notre étude, c'est la minimisation de la consommation des substrats qui a été choisie. En effet, les résultats obtenus à partir de cette fonction objective sont les plus conformes à ceux obtenus par les analyses effectuées en MFA (figure 50) et permettant d'avoir une plus grande cohérence vis-à-vis des mécanismes physiologiques existant au sein de la cellule.

1.2.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la graine de lin par une approche basée sur la contrainte.

1.2.2.1. Les flux majoritaires conduisant à la synthèse des acides gras.

Après conception du modèle et application des différentes contraintes au réseau, les flux métaboliques de l'ensemble des réactions ont été calculés grâce à INCA et l'interface Matlab. Ces valeurs sont répertoriées en annexe 3. Elles ont ainsi permis de dresser différentes cartes de flux, afin de comparer l'implication des voies métaboliques au cours de la croissance des trois lignées analysées (figures 52, 53, 55, 57 et 58). L'épaisseur de chacune des flèches est relative à l'intensité du flux correspondant. Les flèches et métabolites grisés représentent des voies peu ou pas sollicitées chez la graine de lin, d'après le modèle étudié.

D'après la figure 51, le flux métabolique majoritaire chez la graine de lin de la lignée Astral provient de l'hydrolyse du saccharose, lui-même issu du phloème alors chargé en différents photoassimilats. Cette hydrolyse s'effectue à l'aide d'invertases, générant alors du glucose et du fructose, ou par l'intervention de la sucrose synthase, produisant du fructose et de l'UDP-glucose (avec consommation d'un UDP). Des expérimentations préliminaires au ¹³C-glucose ont montré le rôle majeur du saccharose dans l'approvisionnement en carbone pour la synthèse des acides gras, notamment chez l'embryon de lin (Troufflard, 2004 ; Acket, 2015), le colza (Schwender *et al.*, 2003), le maïs (Alonso *et al.*, 2010) et le tournesol (Alonso *et al.*, 2007). Au contraire, d'après une étude des flux par MFA, l'apport en glutamine ne représenterait en moyenne pas plus de 5% du flux d'entrée (Acket, 2015) ce qui semble être en accord avec les résultats présentés ici.

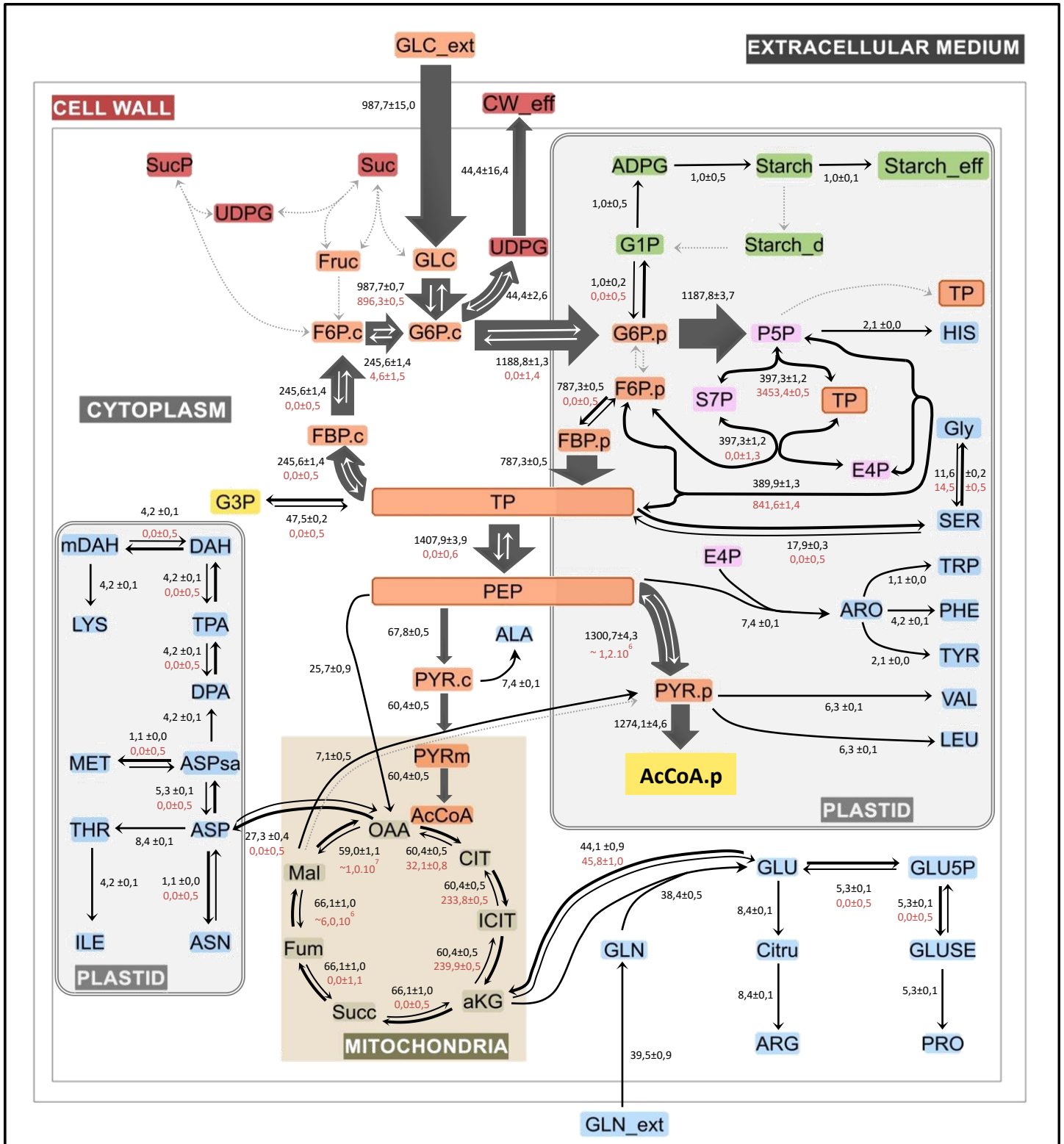


Figure 50 : Analyse des flux métaboliques de la graine de lin de la lignée Astral à 24 JAF par MFA (Acket *et al.*, 2018).

La valeur de chaque flux est représentée à côté de chaque réaction : en noir les flux bruts, en rouge les flux d'échange. Les grosses flèches correspondent aux flux majoritaires, tandis que les grisées en pointillées correspondent aux réactions non sollicitées dans ce modèle.

Après phosphorylation, le fructose est catabolisé *via* la glycolyse cytosolique. Le glucose est alors transporté vers le plaste, afin de générer le NADPH nécessaire à la synthèse des acides gras *via* la voie des pentoses phosphates. On a alors déshydrogénation du G6P et décarboxylation oxydative du 6-PG. L'implication des différents transporteurs plaste/cytosol est notamment conditionnée par l'absence de la 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (PGAM) et de l'énolase plastidiales (Barvkar *et al.*, 2012), empêchant la prise en charge des trioses phosphates par la glycolyse plastidiale. Ils sont alors transférés vers le cytosol où ils rejoignent le pool de trioses issus de la glycolyse cytosolique. Celle-ci se poursuit jusqu'à la synthèse de PEP, alors principalement transporté vers le plaste, pour y être converti en pyruvate, en acétyl-CoA, puis en acides gras.

Ainsi, une faible proportion du PEP cytosolique rejoint le cycle de Krebs *via* sa conversion en pyruvate mitochondrial. Cette voie ne serait que très peu sollicitée, malgré son rôle habituellement important dans la génération des cofacteurs (Geigenberger et Fernie, 2014). En effet, le NADH et l'ATP seraient ici synthétisés en quantités très importantes *via* le flux glycolytique (actions de la glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase et de la phosphoglycérate kinase). Le NADPH est synthétisé *via* la voie des pentoses phosphates. Ces cofacteurs essentiels à la physiologie cellulaire sont consommés durant la synthèse de glycérol-3-phosphate (ATP et NADH) ou durant la synthèse et l'élongation des acides gras (NADPH ou NADH selon la nature de l'énoyl-ACP réductase, susceptible d'utiliser l'un ou l'autre ; Li-Beisson *et al.*, 2013).

La figure 51 nous montre donc que deux glycolyses coexistent partiellement chez la cellule de la graine de lin faisant intervenir à différents niveaux les pools cytosolique et plastidial d'hexoses et de trioses phosphates ainsi que les enzymes correspondantes. Ceci est en accord avec les résultats de protéomique avancés par Barvkar *et al.* (2012) et les expérimentations de marquage isotopique conduites par Acket (2015). La graine de lin se comporte alors de manière similaire aux graines de tournesol (glycolyse essentiellement plastidiale : Alonso *et al.*, 2007) et en partie comme celles de colza (glycolyse essentiellement cytosolique : Schwender *et al.*, 2003).

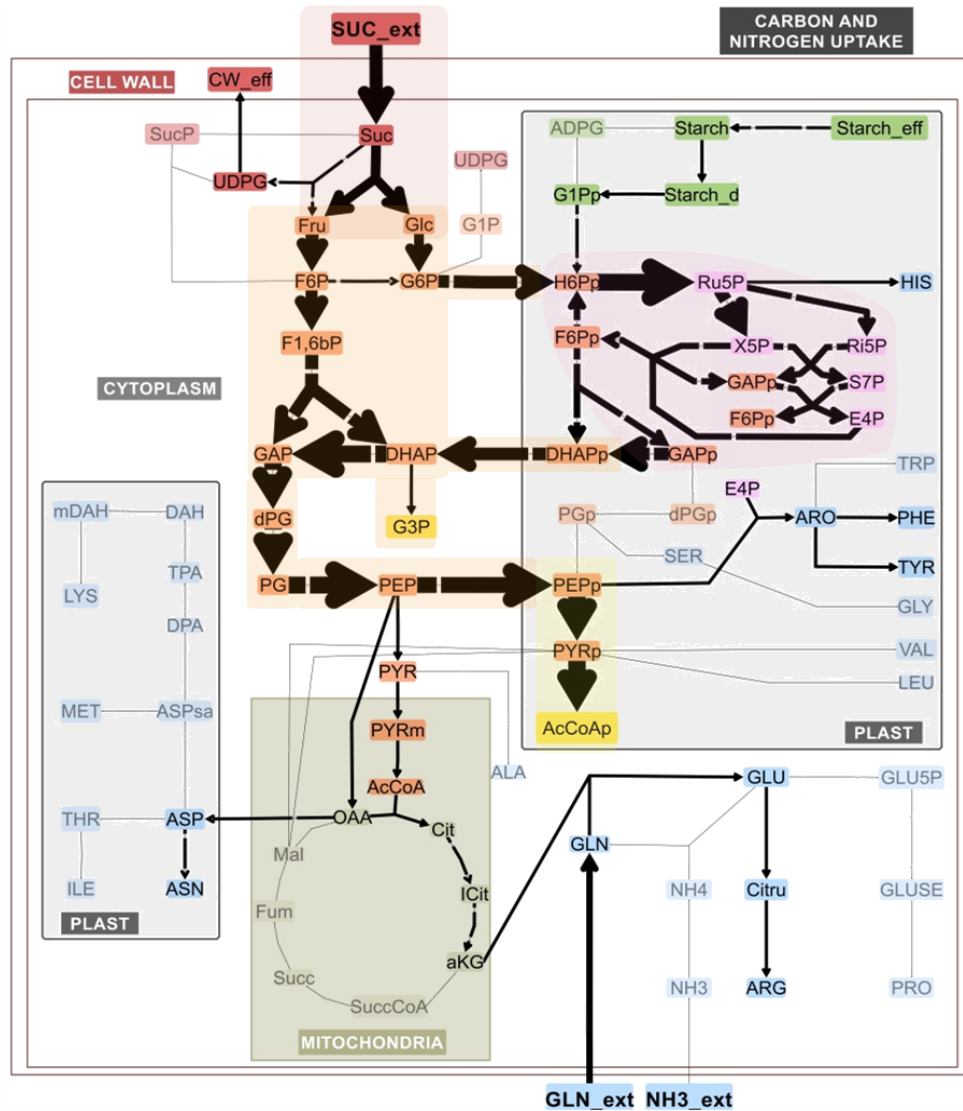


Figure 51 : Flux majoritaires de la lignée Astral à 16 JAF obtenus par FBA.

1.2.2.2. Cartographie des flux au cours de la croissance de la graine.

1.2.2.2.1. Stade 10 JAF.

Au stade le plus précoce étudié (10 JAF), l'apport en carbone provient essentiellement du saccharose (figure 52). En effet, on relève un flux de 496, 813 et 1063 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹ respectivement chez 238, Astral et Solal, soit 82,4, 75,5 et 72,8% du flux total d'entrée. Malgré des courbes de croissance similaires entre les lignées Astral et 238, ces résultats sont assez surprenants : l'apport en photoassimilats devrait être plutôt équivalent entre ces deux lignées. Or, on remarque chez la lignée 238 un flux total d'entrée inférieur de 44,1% à Astral. On peut alors remettre en cause l'exploitation de la tangente dans le calcul des flux externes de par l'absence de point avant 10 JAF.

En effet et à ce stade, la glycolyse cytosolique et plastidiale et la voie des pentoses phosphates sont les voies majoritaires. De plus, une portion non négligeable du flux entrant

dans le plaste est employée pour la synthèse d'amidon (16,0% chez 238 ; 20,9% chez Astral ; 25,5% Solal ; annexe 3). Proportionnellement au flux entrant dans la cellule, la lignée 238 semble moins solliciter la voie de biosynthèse de l'amidon que les autres lignées. Plus limitée dans sa capacité à accumuler les triglycérides, on peut alors s'interroger sur le rôle de l'accumulation d'amidon chez la graine immature et son impact sur la synthèse des acides gras au cours du développement.

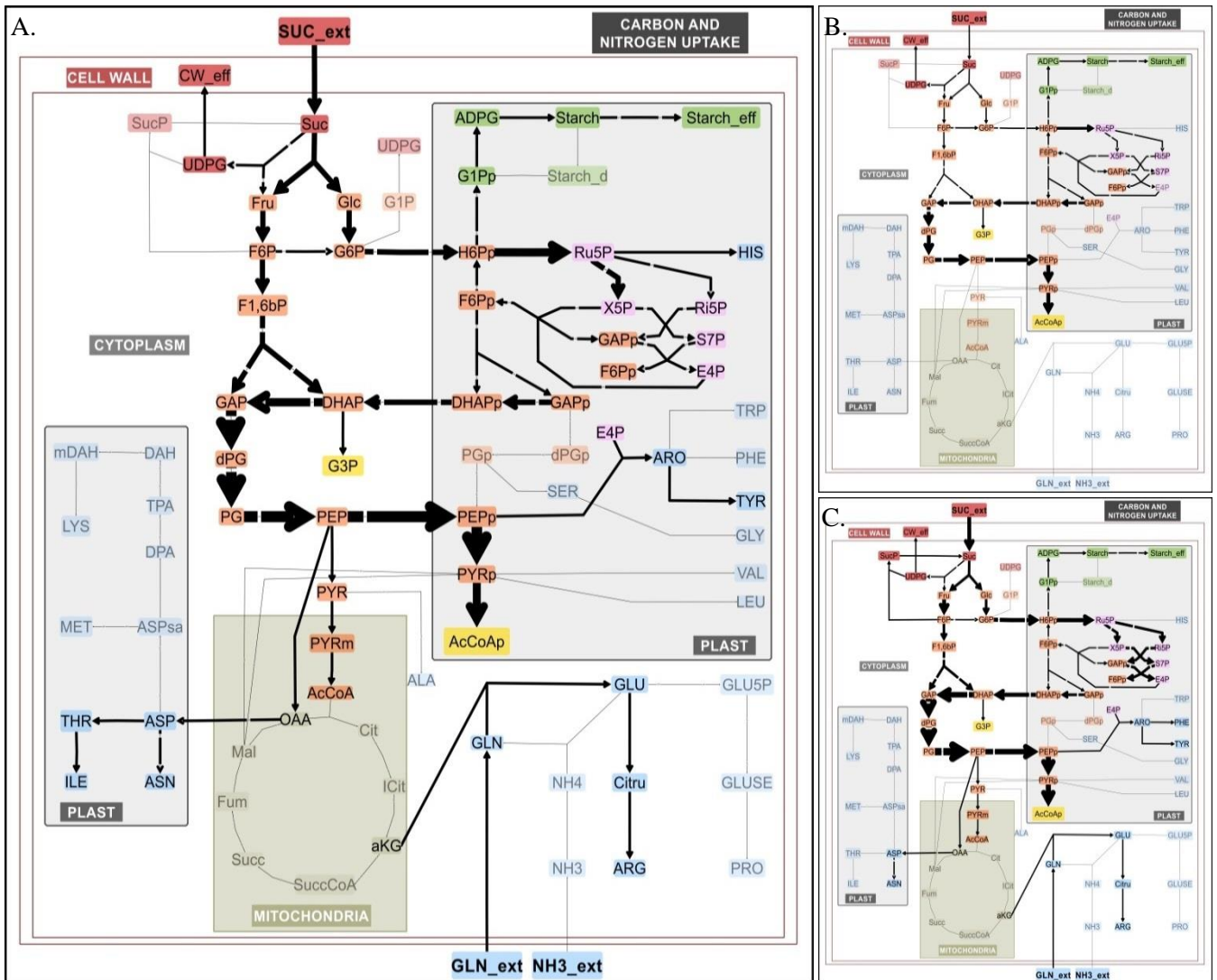


Figure 52 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 10 JAF.

A. Lignée Astral ; B. Lignée 238 ; C. Lignée Solal. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

1.2.2.2.2. Stade 16 JAF.

A 16 JAF, la synthèse des acides gras a débuté pour les trois lignées (figures 32, 33 et 34). L'apport en saccharose et en glutamine s'intensifie afin de fournir le carbone nécessaire à la synthèse d'acétyl-CoA des acides gras ainsi que des acides aminés et de la paroi cellulaire

(figure 53 ; annexe 3). Ici encore, les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates semblent très sollicitées. De plus, la majeure partie du PEP synthétisé (> 80%) est transférée dans le plaste pour la synthèse des acides gras. Ce stade de développement étant un stade crucial dans l'accumulation des acides gras, des cartes de flux différentiels entre les lignées Astral et 238, et Astral et Solal ont alors été réalisées (figure 54).

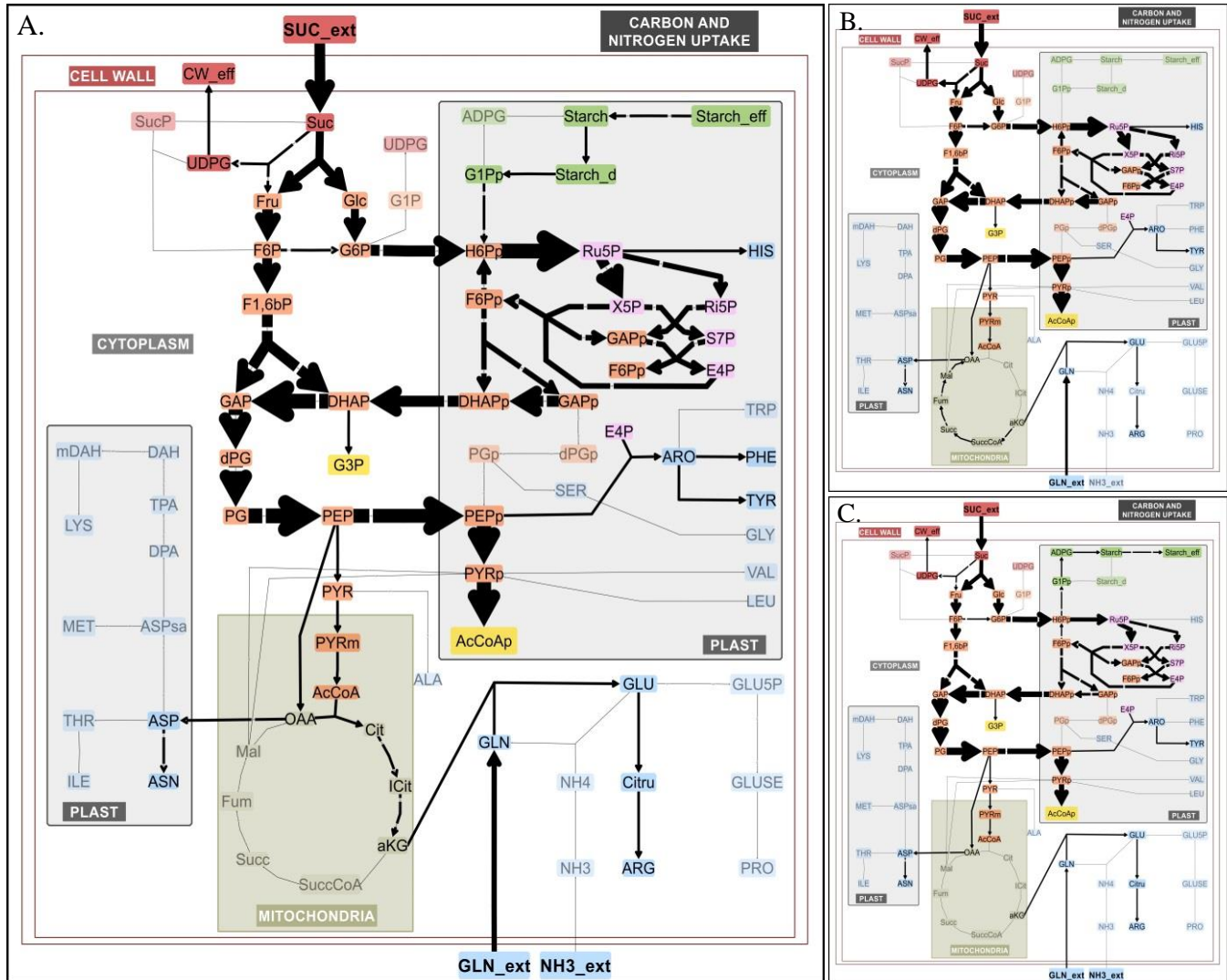


Figure 53 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 16 JAF.

A. Lignée Astral ; B. Lignée 238 ; C. Lignée Solal. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

Pour une croissance identique entre les lignées Astral et 238, on a pu remarquer une assimilation différente du carbone à 16 JAF. En effet, le flux total d'entrée serait cette fois 15,4% plus important chez la lignée 238, compensant probablement le retard observé à 10 JAF. Pour un comparatif plus intéressant, la valeur de chaque flux a été normalisée par la valeur de flux correspondant à l'apport en saccharose ($V_{\text{Saccharose}} = 100\%$; annexe 4). Cette normalisation

va permettre de s'affranchir des flux d'entrée considérés comme trop variables pour une analyse différentielle.

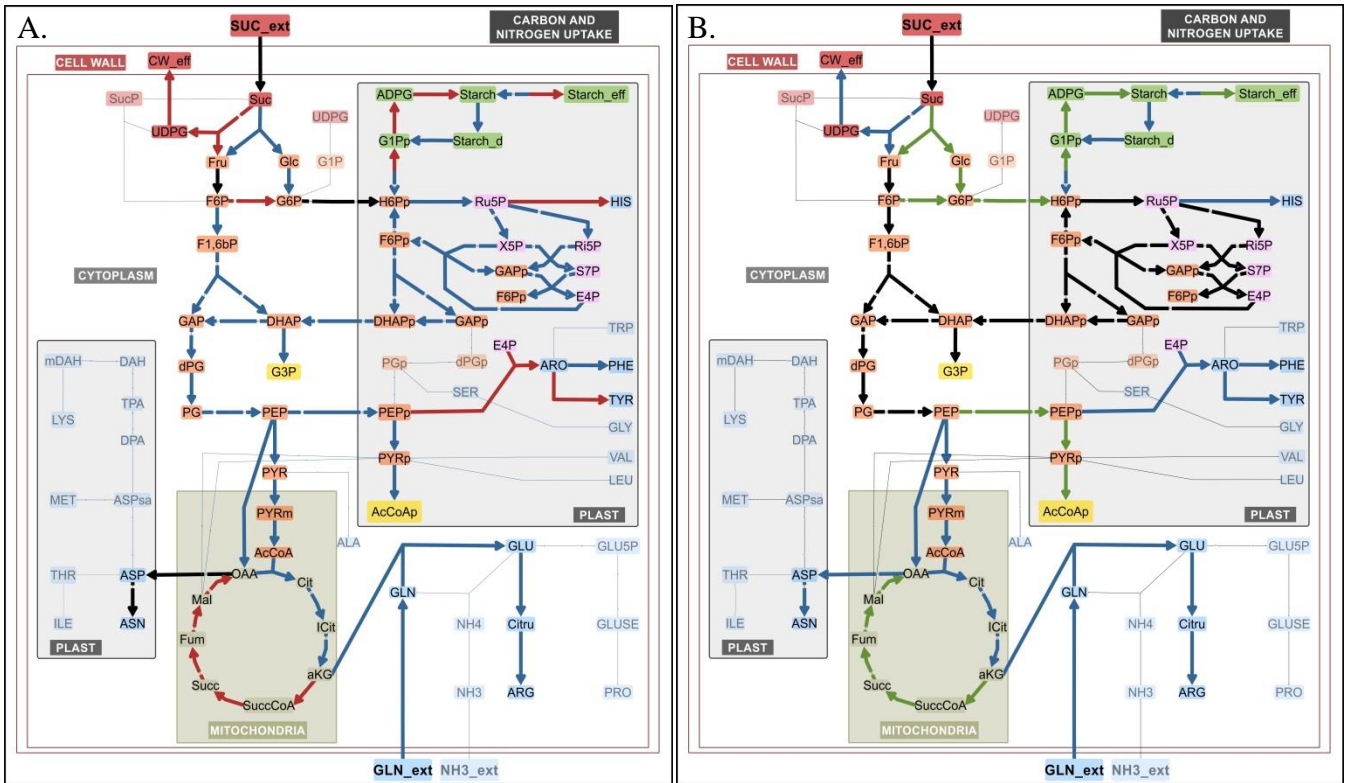


Figure 54 : Carte de flux différentiels FBA de graines de lin à 16 JAF.

A. Lignées 238/Astral ; B. Lignée Solal/Astral. Les flèches colorées correspondent à des réactions dont les flux sont significativement plus intenses chez une lignée par rapport à l'autre : Astral (bleues), 238 (rouges) et Solal (vertes). Les flèches noires correspondent à des flux dont la variation ne dépasse pas les 10% entre deux lignées. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

➤ Astral V.S. 238.

Les lignées Astral et 238 impliqueraient plutôt les invertases pour la prise en charge du saccharose (Annexe 3 ; figure 54A). Cependant, la lignée Astral semblerait les solliciter de manière plus importante, tandis que la sucrose synthase serait davantage employée par la lignée 238. En effet, la lignée 238 utiliserait deux fois plus l'apport en carbone pour la synthèse de paroi cellulaire (annexe 4 ; figure 54A). Au contraire, la lignée Astral présenterait un flux glycolytique plus intense de 22,1% de par cette divergence métabolique (annexe 4). Cela permet notamment de fournir la quantité nécessaire en acétyl-CoA et en G3P pour la synthèse des triglycérides. Avec une remobilisation de l'amidon déjà amorcée à ce stade (153 nmol. graine⁻¹.jour⁻¹ ; annexe3) et venant renforcer le pool de G6P plastidial, la lignée Astral favorise alors la génération de NADPH *via* la voie des pentoses phosphates. En effet, pour un transfert

des hexoses similaire entre le cytosol et le plaste (flèche noire), la lignée 238, en exploite une part pour la synthèse d'amidon ($24 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.100 \text{ nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$; annexe 4) ainsi que pour la synthèse d'histidine (3,3% du R5P généré comparés à 1,8% chez Astral). Cette lignée implique également la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques de manière plus importante que la lignée Astral (+74,2% ; annexe 4) et notamment celle de la Tyr malgré un apport considérablement plus faible en glutamine (figure 54A ; annexe 4). L'apport en azote ne semble pas limitant dans la synthèse et l'accumulation des protéines.

Nous avons également pu noter un flux de synthèse des triglycérides inférieur chez la lignée Astral (158 par rapport à $184 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ chez 238 ; annexe 3). Cette lignée consacre cependant une part supérieure du saccharose entrant pour la production d'huile (+14,6% après normalisation du flux ; figure 54 ; annexe 4).

➤ *Astral V.S. Solal*

Un apport en saccharose et en glutamine plus faible par rapport à la lignée Astral (respectivement -20 et -72%) est observé chez la lignée Solal (figure 54 B). Ceci semble être en accord avec un taux de croissance plus important à 16 JAF chez la lignée Astral ($\sim 0,3 \text{ mg de MS.jour}^{-1}$ contre $\sim 0,2 \text{ mg de MS.jour}^{-1}$ chez Solal). Les flux normalisés ont alors également été calculés.

L'utilisation des invertases semblent favoriser le flux de transfert des hexoses phosphates du cytosol vers le plaste (+15,2%) chez la lignée Solal, au détriment de la synthèse de paroi cellulaire plus intense chez la lignée Astral (figure 54B). Cet effet est compensé par une synthèse d'amidon encore très active chez la lignée Solal ($125 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$) permettant une exploitation similaire de la voie des pentoses phosphates (figure 54B). Les deux lignées semblent donc utiliser la glycolyse cytosolique de la même manière afin de synthétiser le G3P. Une divergence sur le devenir du PEP cytosolique et plastidial peut être soulignée. Le métabolisme mitochondrial et la biosynthèse des acides aminés aromatiques seraient plus actifs chez la lignée Astral alors que la synthèse d'acétyl-CoA semblerait être privilégiée chez la lignée Solal. Cette observation est en accord avec un apport en glutamine plus intense chez la lignée Astral. Un flux plus important de carbone vers la synthèse protéique a aussi été observé chez Astral par rapport à Solal (respectivement 54 et $19 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.100 \text{ nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$; annexe 4). Chez ces deux lignées, le G3P ou le NADPH ne semblent pas limitants à l'accumulation des TAG. Malgré une réorientation du flux métabolique vers la synthèse de paroi cellulaire, d'acides aminés et vers le cycle de Krebs chez la lignée Astral par

rapport à Solal (figure 54B), la synthèse des triglycérides est peu perturbée : respectivement 9,3 et 10,2 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹.100 nmol_{sacch}⁻¹ (annexe 4).

1.2.2.2.3. Stade 24 JAF

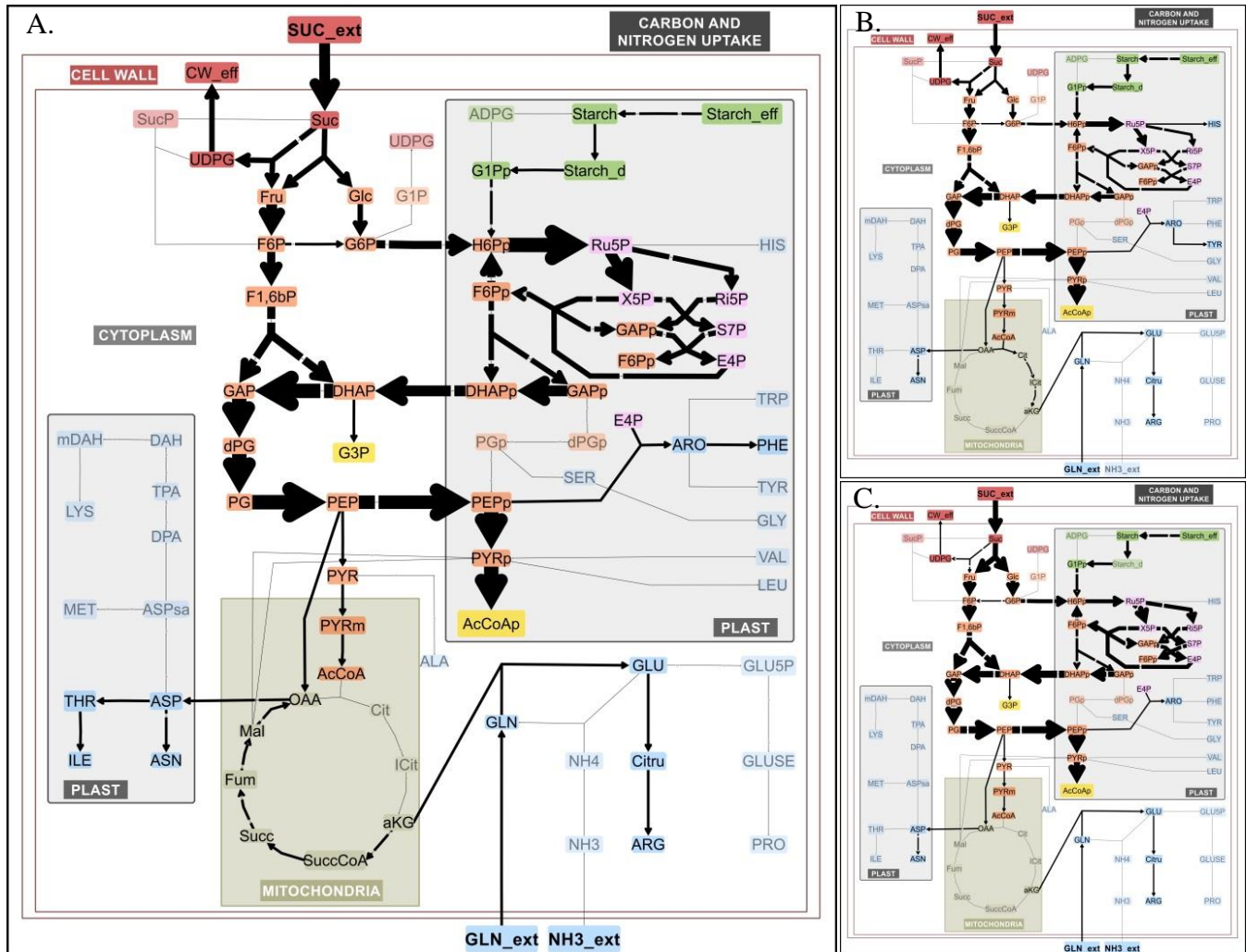


Figure 55 : Carte de flux FBA d’une graine de lin à 24 JAF.

A. Lignée Astral ; B. Lignée 238 ; C. Lignée Solal. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

La vitesse d’assimilation du saccharose est relativement stable entre 16 et 24 JAF chez les lignées Astral et Solal (annexe 3). Au contraire, chez la lignée 238, cette vitesse est divisée par deux entre 16 en 24 JAF qui a pour conséquence de réduire le flux glycolytique. Néanmoins, cette diminution d’intensité est partiellement compensée par une remobilisation de l’amidon très importante (631 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹ ; annexe 3) avec une intensité maximale à ce stade (24 JAF). L’apport en glutamine est assez faible chez les trois lignées (entre 100 et 200 nmol.graine⁻¹

¹.jour⁻¹). Pour les trois lignées, le flux majoritaire observé lors des précédents stades reste inchangé et continue d'alimenter le pool d'acétyl-CoA plastidial nécessaire à la synthèse des triglycérides. Les lignées Astral et Solal ont un taux de synthèse des triglycérides important (171,6 et 212,7 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹) par rapport à la lignée 238 (127 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹). Au contraire, malgré un flux de saccharose entrant plus faible chez la lignée 238, la synthèse en protéines est supérieure à celui observé pour les deux autres lignées (317,3, contre 269,2 et 300,0 nmol.graine⁻¹.jour⁻¹).

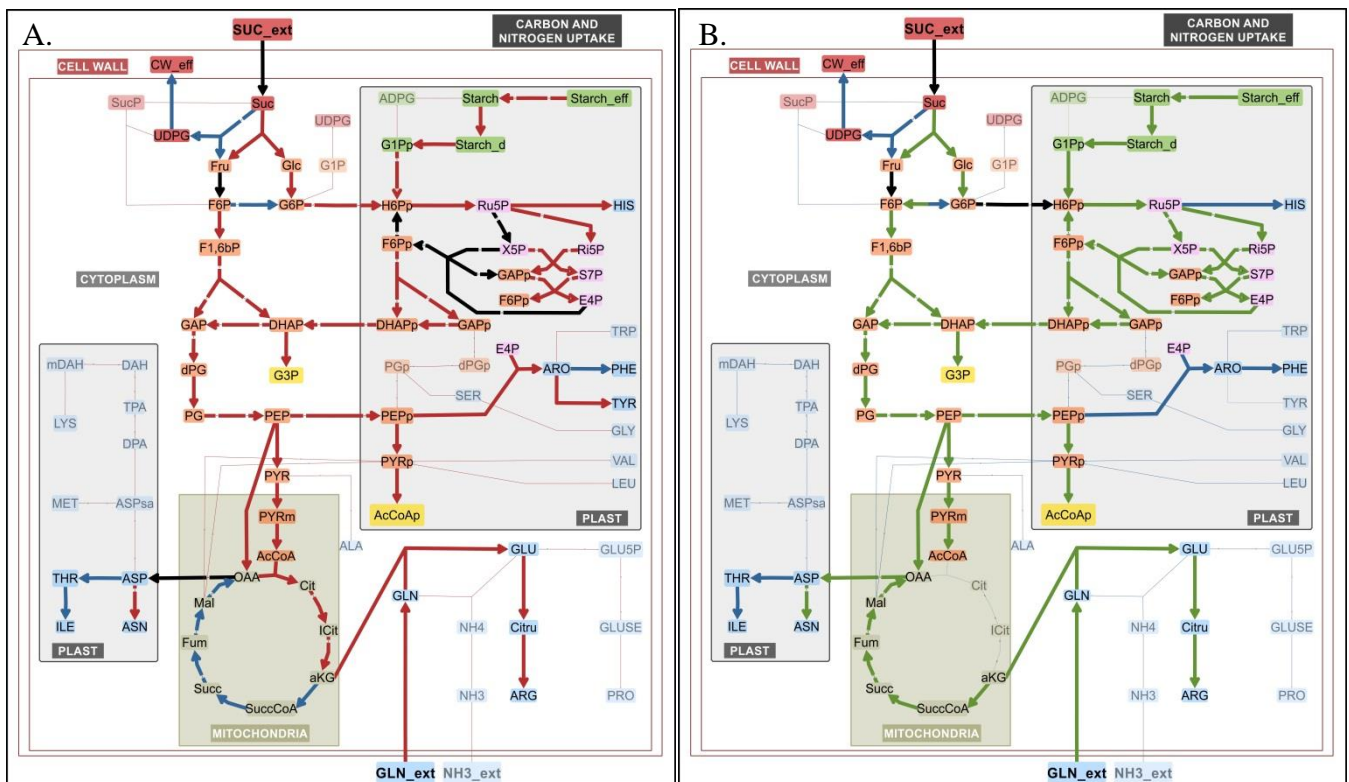


Figure 56 : Carte de flux différentiels FBA de graines de lin à 24 JAF.

A. Lignées 238/Astral ; B. Lignée Solal/Astral. Les flèches colorées correspondent à des réactions dont les flux sont significativement plus intenses chez une lignée par rapport à l'autre : Astral (bleues), 238 (rouges) et Solal (vertes). Les flèches noires correspondent à des flux dont la variation ne dépasse pas les 10% entre deux lignées. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

➤ Astral V.S. 238.

Lorsqu'on dresse la carte de flux différentiels et normalisés par l'apport en saccharose entre 238 et Astral, on remarque une première divergence en terme de prise en charge du disaccharide : sucrose synthase et invertases sembleraient agir de manière équivalente chez la lignée Astral tandis que les invertases seraient impliquées davantage chez la lignée 238 (figure 56 ; annexe 4). Ceci induit une prise en charge du carbone issu du saccharose par la glycolyse

cytosolique et plastidiale plus importante chez la lignée 238 que chez la lignée Astral. On a donc un taux de synthèse de précurseurs des triglycérides plus important chez la lignée 238. De plus, cette lignée présente une production d'huile de $11,1 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.100 \text{ nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$ comparée à 9,8 pour la lignée Astral (annexe 4). Cette différence est notamment due à la remobilisation maximale de l'amidon chez la lignée 238 à ce stade. On remarque également une part plus importante des pentoses impliqués dans la synthèse d'histidine chez 238 (2,1% du R5P contre 0,3% chez Astral) ou du PEP dans la synthèse des acides aminés aromatiques (3,0% du PEP en comparaison de 1,6% chez Astral). Ainsi, pour une assimilation de saccharose équivalente et avec un apport en glutamine également renforcé (11,1 comparés à 6,9 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.100 \text{ nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$ pour la lignée Astral), la lignée 238 mobiliserait près de deux fois plus les différentes voies de biosynthèse en lien avec l'accumulation des protéines.

➤ *Astral V.S. Solal.*

Une implication plus forte des invertases (94% du saccharose) chez la lignée Solal est observée induisant une synthèse de paroi assez faible (6 en comparaison de 50 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.\text{nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$ chez la lignée Astral) se traduisant aussi par un flux glycolytique cytosolique très important (35,9% plus important que chez Astral). Avec une remobilisation de l'amidon également plus forte, le métabolisme plastidial est lui aussi augmenté chez cette lignée par rapport à celui observé chez Astral : +29,6% pour la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) (génération de NADPH) ou encore +37,2% pour la synthèse la d'acétyl-CoA *via* la pyruvate déshydrogénase (PDH) plastidiale. Le flux de synthèse des triglycérides atteint alors 13,4 en comparaison de 9,8 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}.\text{nmol}_{\text{sacch}}^{-1}$ chez Astral. Une assimilation de la glutamine supérieure permet alors une plus grande synthèse de protéines, notamment par une génération importante d'Arg.

1.2.2.2.4. Stade 32 et 38 JAF.

Les voies sollicitées au stade 32 JAF sont sensiblement les mêmes qu'aux stades précédents pour les trois lignées (figures 57) : les flux majoritaires sont toujours en faveur de la synthèse d'acétyl-CoA plastidial *via* la glycolyse cytosolique et la voie des pentoses phosphates. La synthèse des triglycérides se révèle encore importante alors que la synthèse protéique semble s'épuiser progressivement (annexe 3).

Enfin, à 38 JAF, l'apport en substrats a drastiquement diminué pour la lignée Solal (107 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$; annexe 3 ; figure 58) en accord avec sa courbe de croissance (taux de

croissance quasi nul à ce stade ; figure 30). L'intégralité des flux en est alors affectée (annexe 3).

Chez la lignée Astral, cette valeur atteint $777 \text{ nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ pour le saccharose (annexe 3) : sa graine n'a pas encore atteint sa masse finale de 9,6 mg (figure 30). Une fois la graine arrivée à maturité, l'ensemble des flux métaboliques devrait atteindre une valeur nulle.

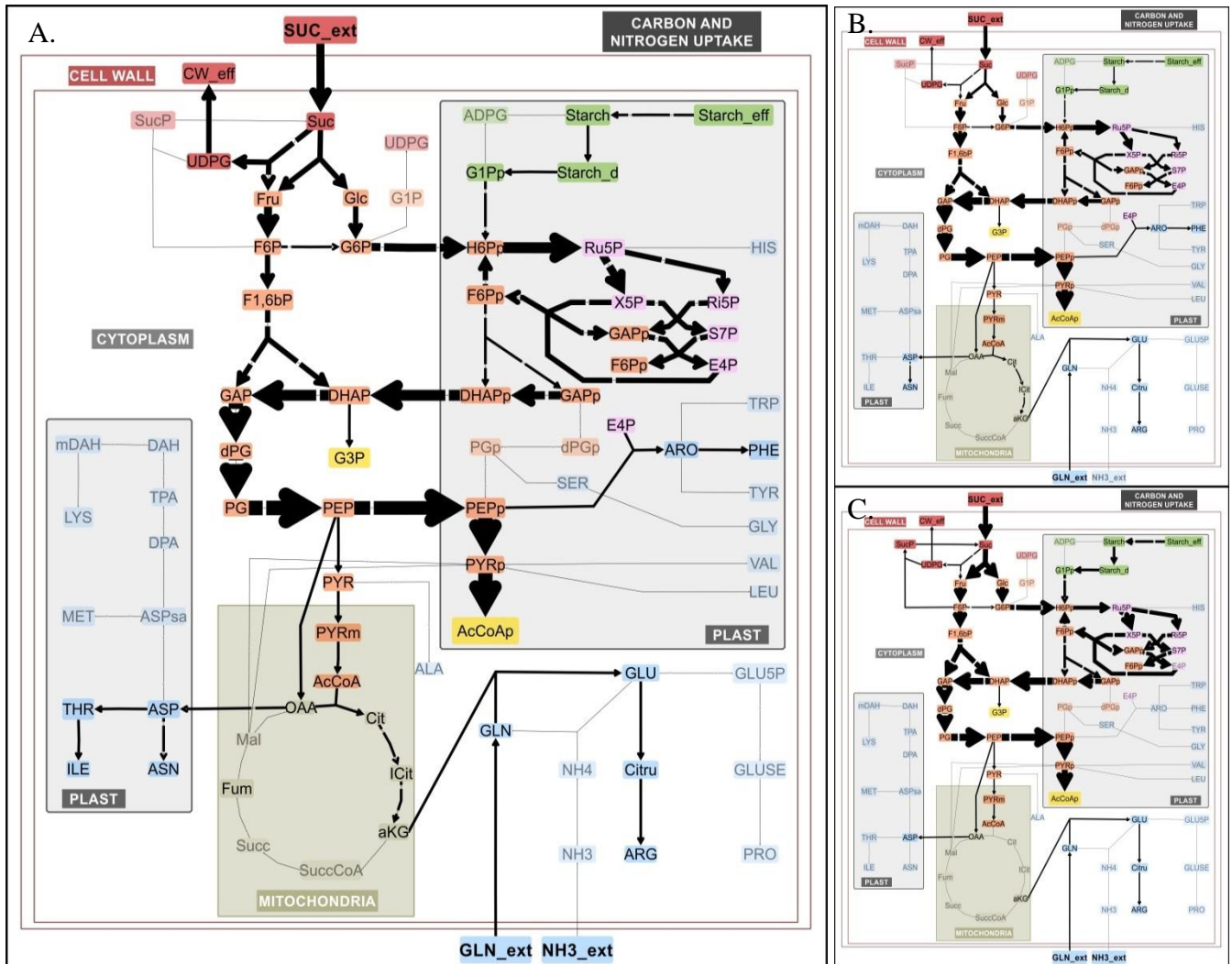


Figure 57 : Carte de flux FBA d'une graine de lin à 32 JAF.

A. Lignée Astral ; B. Lignée 238 ; C. Lignée Solal. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

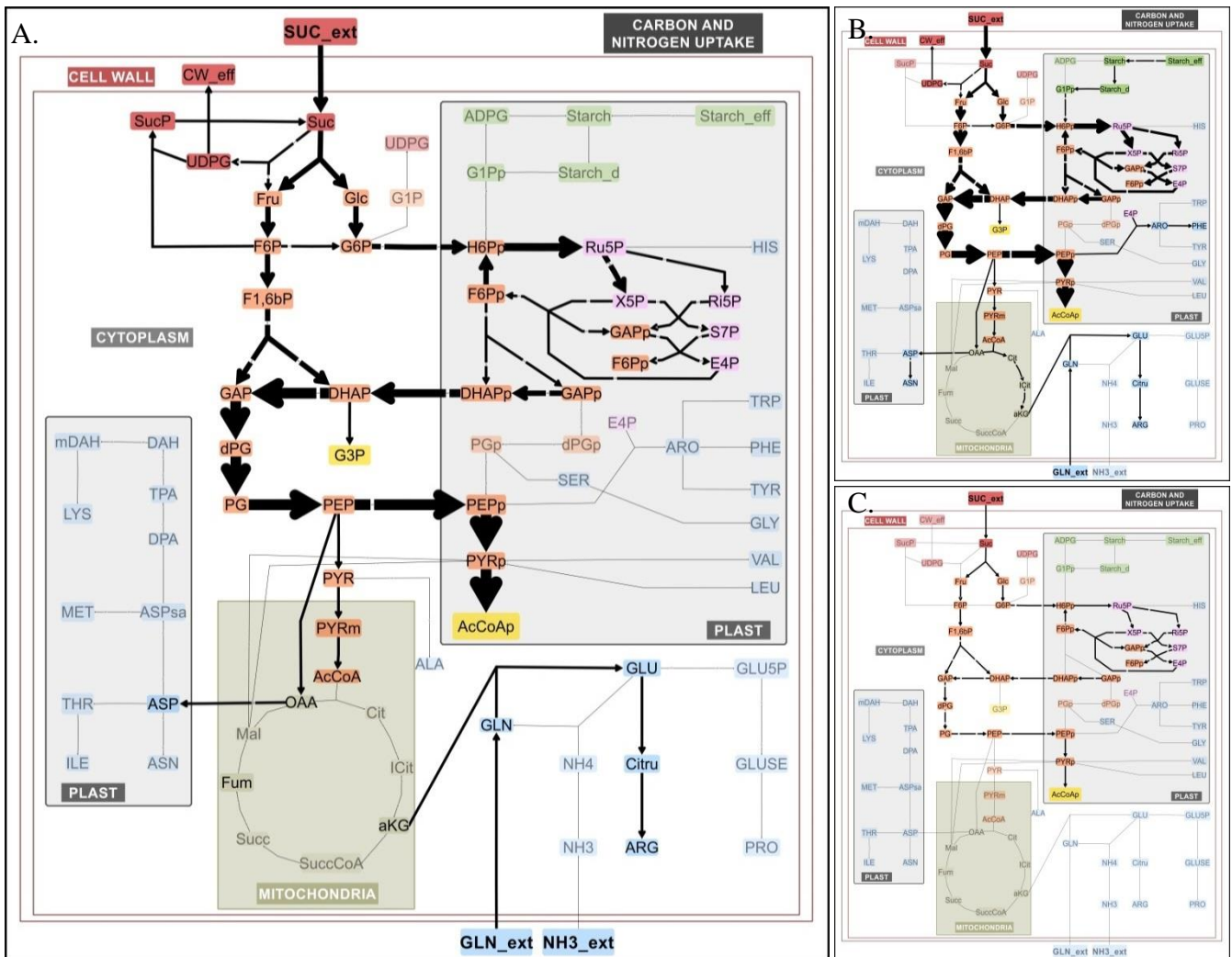


Figure 58 : Carte de flux FBA d’une graine de lin à 38 JAF.

A. Lignée Astral ; B. Lignée 238 ; C. Lignée Solal. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

1.2.2.3. Identification des étapes clés dans l’accumulation des triglycérides.

1.2.2.3.1. Assimilation des substrats.

L’apport en photoassimilats varie grandement au cours du développement de la graine afin de fournir le carbone nécessaire à la synthèse des différents composés de réserve. Malgré des courbes de croissance similaires entre les lignées Astral et 238, ces deux lignées présentent une assimilation des substrats assez différente (figures 30 et 59).

Pour Astral et 238, l’assimilation du saccharose augmente brutalement de 10 à 16 JAF pour décroître plus ou moins rapidement (figure 59A ; annexe 3). On observe le même comportement pour la courbe d’assimilation de la glutamine. Un approvisionnement plus

constant et étalé dans le temps serait probablement plus intéressant pour l'accumulation des lipides. La lignée 238 perçoit un apport probablement trop important à 16 JAF et ne peut alors consacrer tout son métabolisme à la synthèse des TAG : d'autres composés sont alors produits (protéines, paroi, autres). Au contraire, cet apport semble trop faible à 24 JAF (figures 59A). Ces deux stades étant essentiels dans la phase de synthèse des AG, cette différence pourrait alors avoir un impact direct sur la production des huiles. De plus, un apport plus important de glutamine (source d'azote et de carbone) ne serait pas directement corrélé à une synthèse protéique plus importante chez Astral par rapport à 238 (figures 45, 46 et 59B).

Une étude conduite chez des graines et siliques de *Brassica napus* a permis de révéler une quantité plus importante de glucose, fructose et saccharose chez les lignées accumulant plus de lipides (Hua *et al.*, 2014), ce qui confirme le rôle et l'impact certains de l'assimilation des sucres sur le stockage des huiles.

Chez la lignée Solal, la vitesse d'assimilation de saccharose augmente trop lentement (maximale à 32 JAF), et devient presque nulle à 38 JAF (figure 59A ; annexe 3). De plus, l'apport de glutamine serait maximal à 10 JAF et diminue ensuite (figure 59B ; annexe 3). Ces différences pourraient alors être à l'origine d'une croissance plus faible de la graine. Une photosynthèse moins efficace, un phloème moins chargé en photoassimilats, un rendement en graines plus important ou encore un transport des sucres et acides aminés altéré sont tant d'hypothèses potentielles à l'origine de cette différence phénotypique et métabolique.

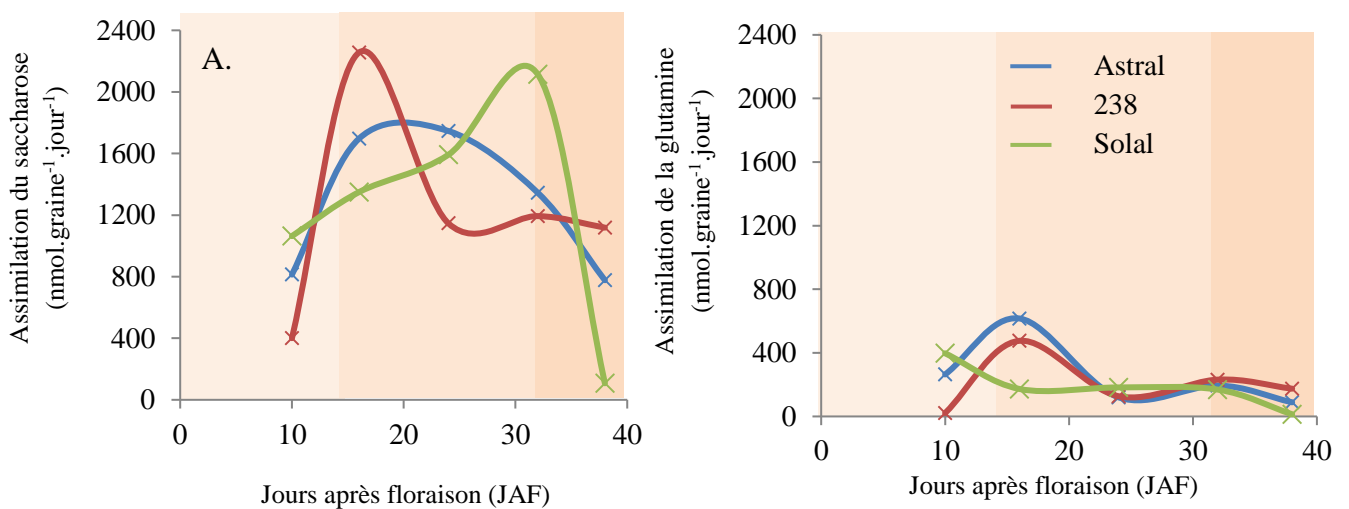


Figure 59 : Evolution de la vitesse d'assimilation des substrats au cours du temps.

A. Vitesse d'assimilation du saccharose (V_{sacch}). B. Vitesse d'assimilation de la glutamine (V_{Gln}).

1.2.2.3.2. Remobilisation des réserves.

Les résultats précédents ont montré un apport en photoassimilats plutôt variable selon la lignée étudiée et le stade de développement pour fournir le carbone nécessaire à la synthèse des différents composés de réserve.

D'après les résultats biochimiques (figures 42, 43 et 44) et les données obtenues par FBA (figures 52, 53 55, 57 et 58 ; annexes 3 et 4), la synthèse de l'amidon semble avoir un rôle très important durant l'embryogénèse avec un à deux tiers d'amidon au sein de la graine. Des mutants *phosphoglucomutase1* d'*Arabidopsis* (gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse du G1P, précurseur de l'amidon) ont non seulement présenté une absence d'amidon, mais également induit une réduction de 30-40% de la teneur en huile, démontrant le rôle majeur du stockage du carbone sous forme d'amidon avant son accumulation au niveau des TAG (Andriotis *et al.*, 2012). De plus, une diminution du niveau d'expression du facteur de transcription WRI1 conduisant alors à une sous-expression des gènes de la glycolyse et de la synthèse des acides gras a pu être notée.

Des teneurs importantes en amidon au sein des graines oléagineuses sont souvent associées à des lignées accumulant plus d'huile (Hua *et al.*, 2014). Il semblerait alors que la remobilisation de ce sucre de réserve soit alors un évènement essentiel, bien que transitoire, pour le bon développement de la graine et notamment pour la synthèse des acides gras et l'accumulation des triglycérides. Ce polymère de glucose agit comme sucre de réserve durant la première phase de développement (annexe 3). Cependant, dès 16-24 JAF, il représente une nouvelle source de carbone et est dégradé de manière intense (valeurs négatives). L'activité amylolytique décroît alors progressivement dû à l'appauvrissement en substrat.

Or, lorsqu'on s'intéresse au rapport des vitesses de réaction relatives à la dégradation de l'amidon et à la synthèse des TAG, on remarque certaines similarités entre les lignées Astral et Solal par rapport à la lignée 238.

Dès la dégradation de l'amidon amorcée, sa vitesse de consommation est plus rapide que la vitesse de synthèse des TAG, quelle que soit la lignée étudiée (figure 60). Un maximum est observé à 24 JAF. Ainsi, la quantité d'amidon remobilisé pour chaque triglycéride synthétisé évoluerait de manière plus lente et étalée dans le temps chez les deux lignées oléagineuses : 2,5 et 3,0 nmol_{amidon}.nmol_{TAG}⁻¹ lorsque ce rapport est à son maximum (24 JAF) comparé à 5,0 nmol_{amidon}.nmol_{TAG}⁻¹ chez la lignée 238. Cette différence suggèrerait un devenir différent de l'amidon consommé chez la lignée 238 (amidon alors en excès). Il pourrait notamment être

remobilisé pour la synthèse des acides aminés et des protéines dont la production est plus active de 44,3% par rapport à Astral et 31,9% par rapport à Solal (annexe 3). En effet, les ressources mobilisées pour la synthèse d'His sont dix à vingt fois supérieures et la synthèse du précurseur des acides aminés aromatiques est deux fois plus importante chez la lignée 238 (annexe 3). Or, les voies de synthèse de ces acides aminés sont les voies les plus directes à partir de la dégradation de l'amidon, ce qui confirme l'aspect limitant d'un flux de carbone trop intense sur le métabolisme lipidique.

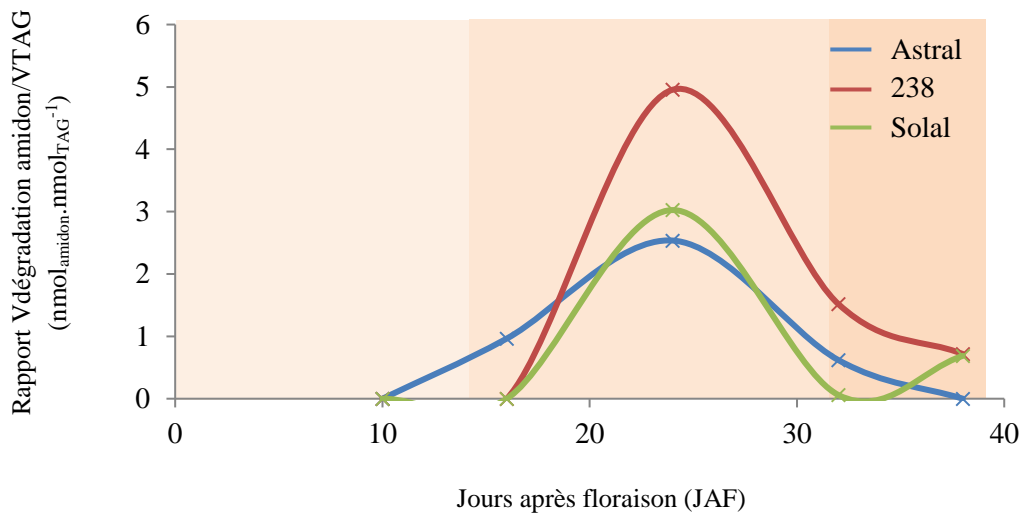


Figure 60 : Evolution du rapport de la vitesse de dégradation de l'amidon sur la vitesse de synthèse des TAG au cours du temps.

Ces résultats laissent penser qu'une activité plus constante dans le temps des enzymes amylolytiques pourrait conduire à un rapport plus favorable entre dégradation de l'amidon et synthèse des triglycérides, limitant ainsi la synthèse des protéines ou autres composés indésirables dans le cadre de l'étude des graines oléagineuses. Il serait alors intéressant d'appréhender ce phénomène en étudiant le niveau d'expression des amylases au cours du temps. Une meilleure régulation pourrait expliquer la remobilisation optimale de l'amidon chez la lignée Astral. De même, une étude fluxomique sur une lignée mutante de lin sous- et surexprimant le gène codant pour le facteur de transcription WRI1 permettrait de vérifier si un métabolisme lipidique plus actif serait susceptible de prendre en charge de manière plus efficace le carbone issu de la dégradation de l'amidon, tout en limitant la synthèse d'autres composés.

1.2.2.3.3. Synthèse des triglycérides

L'analyse des flux par FBA a également permis de déceler l'importance capitale de certaines réactions des glycolyses cytosolique et plastidiale pour la synthèse de l'acétyl-CoA et

du G3P, mais également de la voie des pentoses phosphates dans la génération de NADPH. En effet, la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), la PDH ou encore la G6PDH sont des enzymes essentielles dans l'acheminement du carbone vers les précurseurs des TAG. Une activité importante permettrait, sous réserve de disponibilité en substrat, une accumulation potentiellement plus importante des triglycérides.

Chez nos trois lignées, on remarque une augmentation plus ou moins rapide de la vitesse de synthèse des TAG (V_{TAG}) durant l'embryogénèse (figure 61A, annexe 3). Chez la lignée 238, cette augmentation est rapidement suivie par un ralentissement assez précoce durant la phase de synthèse des AG. Au contraire, chez les deux autres lignées, cette vitesse de synthèse des TAG continue d'augmenter pour décroître seulement après 24 JAF (Astral), voire 32 JAF (Solal) (figure 61A). Après normalisation, on remarque cependant que la lignée 238 consacre une part plus importante du carbone entrant pour la synthèse des TAG de 10 à 14 JAF et à partir de 20 JAF. Malgré des courbes de croissance similaires (figure 30), il semblerait que l'assimilation des substrats soit assez différente entre ces deux lignées (figure 59), expliquant certaines différences observées lors de la mobilisation du carbone pour la synthèse des composés constituant la biomasse. Cette partie serait donc à étudier davantage.

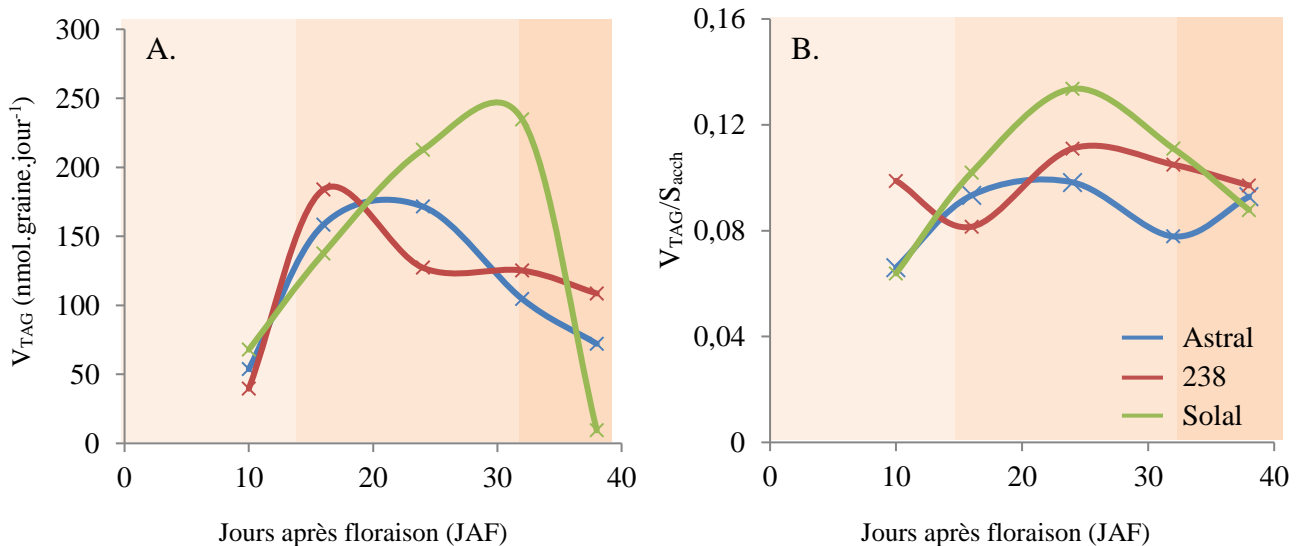


Figure 61 : Evolution de la vitesse de synthèse des triglycérides.

Evolution de la vitesse de synthèse des triglycérides (A) et du rapport V_{TAG} / V_{sacch} (B) au cours du temps.

La divergence métabolique observée précédemment quant à la synthèse des TAG peut s'expliquer par une surexpression significative (\log_2 ratio > 2) de gènes impliqués dans des réactions de la glycolyse, tels que la fructose biphosphate aldolase (genolin_c41360228), la

glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (genolin_c10324594) et la PDH (genolin_c1366869) ou encore le transport des hexoses (genolin_c41500348) (Acket, 2015). On retrouve également une surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras et leur stockage sous forme de triglycérides. C'est le cas des gènes codant pour des sous-unités de l'acétyl-CoA carboxylase carboxyltransférase (genolin_c56523320), ou encore certaines désaturases, telles la Ω 3-fatty acid desaturase plastidiale (genolin_c13821432) ainsi que de nombreuses protéines de stockages et notamment l'oléosine (genolin_c566746).

Les facteurs de transcription ne sont que très peu touchés par cette différence d'expression entre les lignées Astral et 238, sauf WRKY4, MYB et BHLH (Acket, 2015). Ces trois facteurs sont habituellement impliqués dans le développement, la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques et le métabolisme secondaire (Hossain *et al.*, 2018 ; Yao *et al.*, 2018). Ils pourraient intervenir de manière indirecte sur le métabolisme au cours du temps. En effet, il a déjà été observé que les facteurs de transcription de la famille des MYB contrôlaient directement et indirectement l'accumulation des acides gras dans la graine chez *Arabidopsis* : MYB89 réprimerait WRI1 ainsi que d'autres gènes de la voie de biosynthèse des AG (Li *et al.*, 2017), tandis que MYB76 contrôlerait négativement les gènes de la photosynthèse, de la biosynthèse des AG, de leur modification et dégradation, ainsi que les gènes impliqués dans la formation des corps lipidiques (Duan *et al.*, 2017).

1.2.2.3.4. Un cofacteur essentiel, le NADPH.

La génération de pouvoir réducteur pour la synthèse des acides gras proviendrait, selon les modèles de plantes étudiés, essentiellement de la voie des pentoses phosphates (Sriram *et al.*, 2004 ; Alonso *et al.*, 2007 ; Stincone, *et al.*, 2015), de l'enzyme malique (Alonso *et al.*, 2010), ou encore de la phase claire de la photosynthèse (Ducat et Silver, 2012 ; O'grady *et al.*, 2012). D'après ce modèle, le NADPH est exclusivement synthétisé à partir de la voie des pentoses phosphates, *via* la G6PDH et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), fournissant chacune une molécule de NADPH.

Grâce à l'analyse FBA, on remarque une correspondance entre le comportement des courbes représentant l'évolution de la vitesse de synthèse des TAG (figure 61A) et de la génération de NADPH (figure 62A) pour les trois lignées. Il semblerait que cette corrélation soit due à l'évolution de la vitesse d'assimilation du saccharose (comportement similaire : figures 59A, 61A et 62A), renforçant le rôle majeur de l'apport en photoassimilats sur l'accumulation des TAG.

Lorsqu'on s'intéresse à la quantité de NADPH générée, on remarque qu'au moins 2,5 moles de NADPH sont synthétisées pour chaque mole de saccharose importée (jusqu'à 4,1 moles pour Solal à 16 JAF ; tableau 8) d'après le calcul suivant :

$$\frac{n \text{ mole de NADPH}}{1 \text{ mole de Saccharose}} = \frac{V_{G6PDH} \times 2}{V_{\text{Saccharose}}}$$

Ce rapport est assez variable et ne semble pas corrélé avec les teneurs en huiles supérieures chez la graine mature. Seul, le stade 16 JAF pourrait être critique quant à la synthèse de NADPH : 3,2 et 3,1 moles de NADPH par mole de saccharose chez Astral et Solal, en comparaison de 2,6 chez 238 (tableau 8).

	Astral					238					Solal				
	10	16	24	32	38	10	16	24	32	38	10	16	24	32	38
Moles NADPH/ Sacch	2,5	3,2	3,2	2,8	3,2	2,9	2,6	3,6	3,6	3,6	2,6	3,1	4,1	3,5	2,9
% NADPH _{TAG}	73	87	92	84	91	97	92	93	89	82	69	94	93	93	86

Tableau 8 : Génération et devenir du NADPH.

De plus, la proportion de NADPH destinée à la synthèse des acides gras et à l'accumulation des triglycérides a pu être calculée de la manière suivante :

$$\% \text{ NADPH}_{TAG} = \frac{(7 \times V_{FA16} + 8 \times V_{FA18} + 9 \times V_{FA18_1} + 10 \times V_{FA18_2} + 11 \times V_{FA18_3})}{V_{G6PDH} \times 2}$$

Les lignées Astral et Solal ne consommeraient qu'environ 70% de leur NADPH pour la synthèse des TAG à 10 JAF, contre 97% pour la lignée 238 (figure 62B). La part restante correspond alors aux autres réactions consommatrices de NADPH (synthèse de certains acides aminés notamment). Dès 16 JAF, ce ratio s'équilibre autour 85-95%, indiquant que la majeure partie du NADPH serait destinée à la synthèse des acides gras tout au long du développement de la graine de lin (figure 62B). Néanmoins, on pourrait penser que la lignée accumulant moins de lipides pourrait présenter un taux plus faible de NADPH impliqué dans leur synthèse : ce n'est pas le cas d'après la figure 62B et le tableau 8.

Il semblerait donc que le NADPH ne soit pas un facteur limitant dans le processus de synthèse des acides gras et d'accumulation des triglycérides chez la graine de lin. Ceci a également été montré chez le maïs (Alonso *et al.*, 2011).

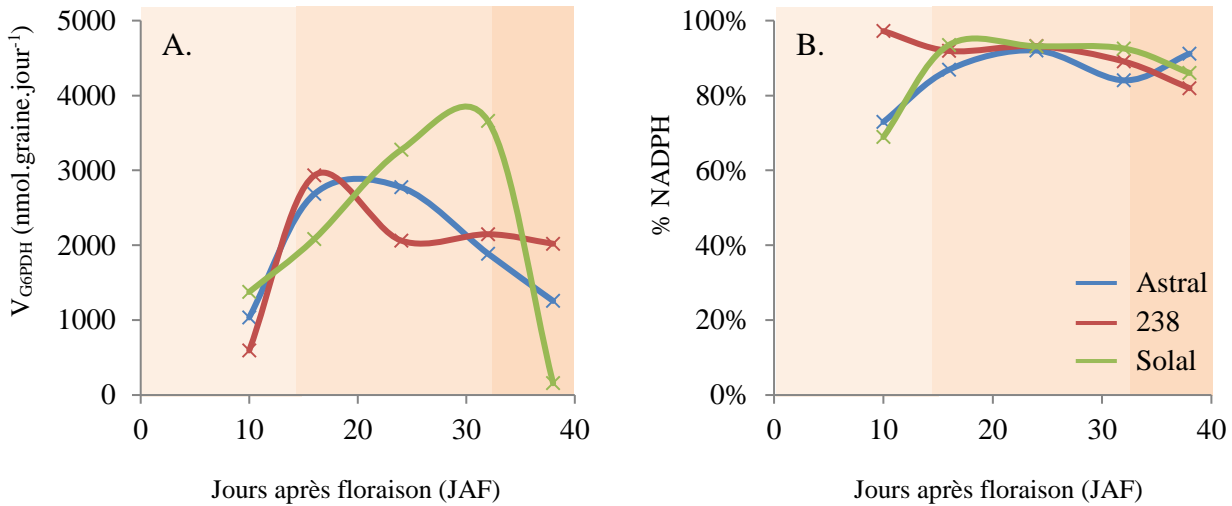


Figure 62 : Evolution de la vitesse de génération de NADPH et son devenir.

A. Evolution de la vitesse de synthèse du NADPH (V_{G6PDH}) au cours du temps.

B. Evolution de la part de NADPH allouée à la synthèse des triglycérides.

1.2.2.3.5. Différentes voies en compétition : utilisation de la MOMA.

On a pu voir dans les précédentes parties (Résultats et discussion, § 1.2.2.3.1. à § 1.2.2.3.4.) que l'apport en photoassimilats et la remobilisation des réserves pouvaient avoir un impact sur la quantité de triglycérides accumulés chez la graine de lin. En effet, selon leur nature, leur intensité ou le stade auquel ces phénomènes interviennent, la disponibilité des substrats peut induire une réponse physiologique différente qui pourrait notamment être due à la régulation temporelle des gènes. Cela se traduit alors par une divergence métabolique entre les trois lignées étudiées, impliquant une meilleure accumulation des lipides chez la lignée Astral, des protéines chez la lignée 238 ou une croissance ralentie chez la lignée Solal.

Il est alors intéressant, dans une problématique de production d'huile dans des graines oléagineuses, d'identifier les voies compétitives à la synthèse des TAG. Dans notre étude, nous avons déjà mis en évidence une synthèse plus importante de paroi cellulaire et des protéines chez la lignée produisant moins d'huile, indiquant une redirection métabolique des précurseurs des lipides. Ces voies concurrentes représentent une perte de rendement en huile par rapport au flux de photoassimilats entrant. Il serait alors intéressant de connaître l'impact de la suppression de certaines de ces voies sur le métabolisme carboné chez graine de lin.

Une des applications de la FBA a donc été exploitée : la MOMA (Minimization of Metabolic Adjustment) (Segre *et al.*, 2002). Cette méthode permet de prédire le phénotype d'une lignée mutante KnockOut (KO) en réduisant l'impact de la modification génétique sur le reste du métabolisme. Les analyses ont été réalisées sur la lignée Astral à 24 JAF (lignée et

stade contrôle dans cette étude MOMA). Le réseau ayant été préalablement construit avec une réaction unique pour la synthèse protéique (annexe 2), il a d'abord fallu dissocier chaque acide aminé pour une synthèse indépendante : la suppression d'un acide aminé dans le premier réseau entraînait une suppression totale de la synthèse protéique (annexe 5). La valeur d'une ou de plusieurs réactions peut alors être contrainte à une valeur nulle afin de simuler la délétion des gènes codant pour les enzymes correspondantes.

Dans l'interface MOMA, il est également possible de contraindre cette valeur à une valeur plus faible ou au contraire plus importante afin d'obtenir un résultat plus nuancé. On parlera ici de sous ou sur expression plutôt que de délétion. Dans chacune des conditions, la valeur des flux d'entrée sera fixée à sa valeur de référence pour une comparaison plus intéressante (respectivement 1750, 120, 0 et 0 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ pour les flux de saccharose, de glutamine, de CO_2 et de NH_3). Il en a été de même pour la vitesse de dégradation de l'amidon, celui-ci étant présent en quantité limitée et non extensible à ce stade dans la cellule (remobilisation de 435 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$). Les flux de sortie seront quant à eux libres afin de connaître l'impact sur de ces redirections métaboliques sur le phénotype de la graine.

➤ Stratégie d'amélioration de la vitesse de synthèse des triglycérides.

Une analyse MOMA a été réalisée à partir d'une valeur de flux de synthèse des triglycérides de 215 $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$, soit une augmentation de 25% de la vitesse de production des triglycérides par rapport au contrôle (annexe 6). Une carte de flux différentiels a alors été établie afin d'identifier au mieux les réactions ayant contribué à ce phénotype plus intéressant ($\text{Astral}_{\text{TAG}+25\%}$; figure 63). On remarque alors que le métabolisme du saccharose (sucrose phosphate synthase et sucrose phosphate phosphatase) est réprimé ainsi que celui de la synthèse de paroi végétale *via* la SuSy. Le flux de synthèse de la plupart des acides aminés a été réduit, voire supprimé, à l'exception de celui conduisant à l'Asp et à la Pro. En effet, la glutamine étant assimilée à la même vitesse, la cellule doit alors la consommer ou la convertir en autres acides aminés, n'étant pas impliquée dans la synthèse des AG. En contrepartie, la voie des pentoses phosphates et la glycolyse sont considérablement amplifiées. Un turn-over plus important au niveau de la synthèse et de la dégradation de l'amidon (génération d'ADP et d'AMP amplifiées) pourrait être ainsi provoqué. La stratégie serait alors de réprimer certaines réactions (stratégie récapitulée en figure 63) successivement ou conjointement, afin de vérifier l'effet positif de ces répressions sur la synthèse des triglycérides précédemment observé.

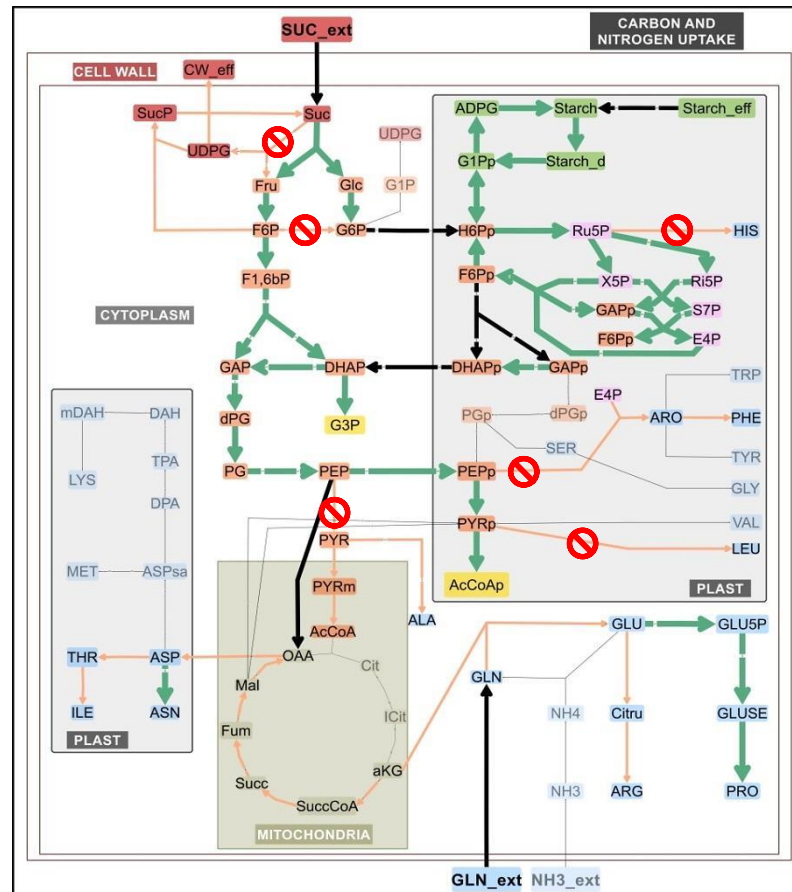


Figure 63 : Carte de flux différentiels entre la lignée Astral $_{WT}$ et Astral TAG $_{+25\%}$.

Les flèches vertes correspondent à une réaction dont les flux ont été significativement augmentés, les flèches orange à une réaction dont les flux ont été significativement réduits et les noires à une réaction dont le flux n’a pas été significativement modifié (< 10%). Les cercles rouges barrés représentent les réactions à réprimer dans les prochaines analyses MOMA. Liste des métabolites et abréviations en annexe 1.

➤ La SuSy.

Lors des analyses effectuées par FBA, on a pu remarquer de grandes divergences au niveau de la prise en charge du saccharose réduisant le flux glycolytique lorsque l’activité de la SuSy augmente (figures 52 à 58 ; annexe 3). Lorsque cette enzyme est supprimée, le flux de synthèse de paroi devient nul. L’UDP-glucose ne peut plus être synthétisé. Afin de limiter l’effet délétère de cette suppression et conserver une physiologie plus réaliste de la cellule végétale, une valeur de flux de la SuSy a été imposée au réseau ($V_{SuSy\ mutant} = V_{SuSy} / 2$) (annexe 6). La réduction par deux du flux relatif à la SuSy a alors entraîné une augmentation du flux glycolytique dans le cytosol et la voie des pentoses phosphates de 6% sans pour cela entraîner de répercussion sur la production des triglycérides. Au contraire, certains acides aminés semblent avoir été favorisés chez ce mutant (Trp, His, Tyr, Phe et Pro notamment). D’après ce

modèle, la sous-expression des gènes codant pour la SuSy ne serait pas suffisante pour obtenir un impact positif sur la vitesse de synthèse des triglycérides.

➤ Les acides aminés.

La synthèse de certains acides aminés utilise des précurseurs et cofacteurs communs à la synthèse des acides gras : PEP, pyruvate, acétyl-CoA ou encore E4P et NADPH. Seulement, la délétion de la réaction de synthèse du précurseur des acides aminés aromatiques n'entraîne qu'une redirection du flux vers les autres acides aminés (Arg, l'His ou l'Ala) (annexe 6). Néanmoins, la réduction combinée de la SuSy et de la synthèse d'acides aminés aromatiques d'un facteur deux a permis d'augmenter de 2% le flux de synthèse des triglycérides. Il semblerait donc que des actions combinées soit plus efficaces afin d'orienter le flux vers la synthèse des triglycérides.

A partir de ces résultats, la diminution du flux de synthèse d'un autre acide aminé a alors été entreprise : l'His. En effet, la réaction conduisant à celui-ci consomme une molécule de R5P, représentant à la fois une perte de carbone, mais également une perte de pouvoir réducteur par réduction de l'intensité de la voie des pentoses phosphates. L'action combinée relative à la réduction de ces trois réactions (V_{SuSy} , V_{Aro} et V_{His}) a, cette fois, permis d'augmenter de 9% le flux de synthèse des triglycérides et constituerait une piste supplémentaire afin d'améliorer la production de lipides chez la graine de lin (annexe 6).

➤ Le G3P.

Il a été émis l'hypothèse que le G3P pouvait être limitant dans la synthèse des triglycérides. Généré à partir de l'un des intermédiaires de la glycolyse cytosolique, voie très active d'après notre étude, il est probable que la G3PDH ne dispose pas d'une activité suffisante pour augmenter davantage la production des huiles. La stratégie a donc été ici de ralentir une portion de la glycolyse afin de permettre à la G3PDH une prise en charge plus importante du DHAP pour la synthèse de G3P. Lorsqu'on diminue de 10% le flux relatif à la triose phosphate isomérase cytosolique la principale réponse est une diminution du métabolisme plastidial (transport du G6P réduit de 17%) afin de limiter le transport du DHAP vers le cytosol. Aucun impact sur le flux de synthèse des triglycérides n'a été observé. Cependant, lorsque V_{tpi} est réduit de 10% et que V_{SuSy} , V_{Aro} et V_{His} sont réduits de 50%, on obtient alors une augmentation de 10% de V_{TAG} (annexe 6).

1.2.3. Conclusions et limites de la FBA.

Le modèle FBA présenté dans cette étude a été conçu à partir du modèle MFA développé par Acket (2015) et Acket (2018 ; données personnelles), ainsi que des données de protéomique publiées par Barvkar *et al.* (2012). Cette analyse a tout d'abord permis d'identifier le flux majoritaire conduisant à la synthèse des triglycérides : une glycolyse cytosolique couplée à la voie des pentoses phosphates plastidiale, ainsi que des transporteurs de G6P, DHAP et PEP. Chaque stade de développement a été analysé pour chacune des trois lignées. Des cartes de flux différentiels ont permis d'identifier les réactions plus ou moins impliquées dans la production d'huile. La MOMA a également contribué à cette identification par la simulation de suppressions et de régulations positives et négatives des réactions impliquées le métabolisme de la graine de lin. Il semblerait donc que la surexpression des gènes codant pour la G3PDH soit l'un des principaux leviers pour une meilleure accumulation des triglycérides. De plus, l'activité enzymatique des protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés et de la paroi cellulaire induirait une compétition du carbone, mais également des cofacteurs : les réprimer permettrait une augmentation du contenu en huile. Cependant, nous n'avons pas pu optimiser la synthèse des PUFA chez la graine de lin par la MOMA : leur synthèse serait plutôt dépendante de la génétique de la lignée ou des conditions environnementales.

Ce type d'expérience simulée ici *in silico* pourrait très bien être vérifiée *in vivo* afin d'en confirmer l'impact positif et valider la stratégie MOMA. En effet, des mutants pourraient être construits à l'aide de séquences génétiques placées en anti-sens dans le but de réprimer l'activité enzymatique ciblée. Placée sous le contrôle d'un promoteur inductible durant la phase de synthèse des acides gras, cette séquence pourrait bien permettre la génération de mutants physiologiquement viables, sans modification létale et irréversible. Une liste non exhaustive des promoteurs potentiellement exploitables dans le cadre de notre étude a été récapitulée dans le tableau suivant. Les promoteurs tels que 35S-CaMV ne sont pas exploitables ici du fait de leur caractère constitutif et de leur faible niveau d'activité dans la majorité des graines.

Malgré certains avantages indéniables de la FBA sur la MFA, tels que la rapidité d'exécution, le faible coût des expérimentations ou encore les potentielles applications dérivées de celle-ci, elle présente néanmoins certaines limites.

Promoteurs étudiés	Espèce végétale d'origine	Expression (localisation/stade)	Références
Napine	<i>Brassica napus</i>	Graine – 25 JAF	Fernandez <i>et al.</i> , 1991
Oléosine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Graine - En développement	Parmenter <i>et al.</i> , 1995
	<i>Linum usitatissimum</i>	Embryon – 20-30 JAF	Caillot, 2006
ω -6 désaturase	<i>Linum usitatissimum</i>	Embryon et racines – 30 JAF	Caillot, 2006
Elongase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Embryon – En développement (10 JAF)	Rossak <i>et al.</i> , 2001
	<i>Brassica napus</i>	Embryon – 25 JAF	Wilmer, 2001
	<i>Linum usitatissimum</i>	Embryon – 30 JAF	Caillot, 2006
Conliline1	<i>Linum usitatissimum</i>	Embryon – 20 JAF	Truksa <i>et al.</i> , 2003
11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase	<i>Linum usitatissimum</i>	Embryon – 30 JAF	Caillot, 2006

Tableau 9 : Liste non exhaustive de promoteurs inductibles durant la phase de synthèse des acides gras chez la graine de différentes espèces végétales.

Le résultat d'une analyse FBA dépend avant tout du réseau initial et des différentes contraintes appliquées. Chez la cellule végétale, la compartimentation rend la conception du modèle assez hypothétique. Certains transporteurs sont différenciellement sollicités et sont même potentiellement absents d'une espèce ou lignée à une autre. Certaines enzymes/réactions sont également compartiment-dépendantes (présentes dans le plaste et absentes dans le cytosol, et inversement). De solides études en transcriptomique et protéomique permettent de pallier à ce problème. Ici, Barvkar *et al.* (2012) a été notre seule référence afin de déterminer la présence ou non de chaque enzyme *via* la protéomique et ainsi concevoir notre réseau. Cependant, une étude complémentaire serait nécessaire afin de les confirmer.

La FBA ne tient ici pas compte de potentielles régulations telles que des phénomènes de rétro-inhibition/activation ou de l'expression génétique. Il semblerait, d'après notre étude, que la synthèse d'His soit, par exemple, un frein à la synthèse des triglycérides par simple compétition du carbone. Néanmoins, Ma et Wang (2016) ont montré chez *Arabidopsis thaliana* l'implication de cet acide aminé dans la régulation négative de la

β -oxydation par l'intermédiaire de la synthèse d'acide abscissique (ABA). Ainsi, la répression de l'His chez le lin ne conduirait pas nécessairement à une amélioration du contenu en huile mais elle induirait probablement une activation des gènes de la β -oxydation, une remobilisation des triglycérides, ainsi qu'une synthèse de protéines. L'étude de ce mécanisme chez la graine de lin permettrait de vérifier l'impact positif de l'His sur le contenu en huile. Sa présence ou l'expression des gènes codant pour les protéines catalysant sa synthèse, pourrait être un indicateur d'un phénotype intéressant. Cependant, la comparaison de la composition biochimique des graines de lignées Astral et 238 n'a pas permis de souligner la véracité de ce phénomène chez le lin. La β -oxydation n'étant pas une voie importante durant la maturation de la graine, sa répression *via* l'His et l'ABA n'aurait probablement aucun impact notable sur la composition de la graine.

1.3. Conclusion partielle : Production d'huile chez la graine de lin.

L'ensemble des résultats a permis d'associer un contenu intéressant en huile à des marqueurs génétiques, transcriptomiques, métaboliques ou phénotypiques précis. Un schéma bilan (figure 64) reprend les principales informations contenues dans cette conclusion.

- Quelle que soit la lignée, le flux majoritaire provient du saccharose qui est hydrolysé et métabolisé *via* la glycolyse cytosolique pour la plus grande partie (absence de certaines enzymes glycolytiques dans le plaste). Il est alors à l'origine de la synthèse des précurseurs des acides gras : l'acétyl-CoA (*via* la PDH) et le glycérol-3-phosphate (*via* G3PDH). Une partie du G6P généré dans le cytosol est transférée vers le plaste afin d'entrer dans la voie des pentoses phosphates et générer les co-facteurs nécessaires à la synthèse des AG (NADPH). Certaines réactions représentent cependant un élément limitant à leur synthèse et à l'accumulation TAG.
- L'expression d'invertases favoriserait le flux glycolytique, flux majoritaire pour la synthèse des AG, au détriment de la paroi cellulaire *via* la SuSy. Ceci a été montré chez nos trois lignées au cours des différents stades de développement. Ces enzymes seraient donc ici témoin d'une vitesse d'accumulation supérieure des TAG chez la graine de lin.
- Le flux de carbone au sein de la voie des pentoses phosphates pour la génération de cofacteurs ne semble pas être un élément limitant dans l'accumulation des AG. Il est néanmoins essentiel de conserver une synthèse de NADPH équivalente à 2,5 - 4,1 moles par mole de saccharose assimilée.
- La synthèse de G3P serait un élément limitant dans le mécanisme d'accumulation des TAG à cause d'un flux glycolytique trop important et d'une G3PDH trop peu efficace dans la

conversion du DHAP en G3P. L'amélioration de l'expression de gènes codant pour cette enzyme serait une première étape. La répression de l'interconversion des trioses phosphates afin d'augmenter la quantité de substrat disponible pour la G3PDH constituerait une autre voie d'étude.

- Une forte teneur en amidon aux stades les plus précoces de la graine (10 JAF et moins) serait gage d'un contenu en huile plus intéressant une fois la graine mature. Au contraire, une dégradation trop rapide de celui-ci serait signe d'une moins bonne synthèse en TAG : les enzymes de la voie de biosynthèse des AG ne semblent donc pas disposer d'une activité assez importante afin de prendre en charge l'afflux de carbone provenant des enzymes amylolytiques. Le niveau d'expression et/ou la concentration des glucose-1-phosphate adenylyltransférases à 10-12 JAF serait, sous réserve de vérifications (transcriptomique et protéomique), des marqueurs positifs pour l'accumulation des huiles tandis qu'une expression ou une activité excessive d'amylase à 24 JAF serait alors plutôt considérée comme marqueur négatif.
- En cas d'assimilation trop rapide des substrats durant la phase de synthèse des AG (~ 14 - 32 JAF), les enzymes impliquées dans leur accumulation ne seraient pas en mesure de prendre en charge cet excédent de carbone. Cela conduirait dans ce cas essentiellement à la synthèse d'acides aminés tels que l'Arg et l'Asn chez nos trois lignées, à la synthèse de la Phe et l'Ile chez les lignées plus oléagineuses (et en fin de développement pour la troisième), et de Tyr chez 238. La redirection du flux de carbone vers la synthèse des protéines chez la lignée 238 serait donc en partie due à une trop faible vitesse d'accumulation des réserves lipidiques. Le profil en acides aminés variant d'une lignée à une autre, on peut penser à la synthèse de protéines spécifiques à chacune (oléosines, légumine, conlinines, etc.).
- Alors que la synthèse des AG saturés et mono-insaturés seraient plutôt réalisée dans les plastides, les PUFA de type C18:2 et C18:3 seraient majoritairement issus de la désaturation du PC-C18:1 dans le réticulum endoplasmique avant d'être pris en charge par des PDAT pour leur incorporation directe sur les DAG et former des triglycérides riches en PUFA. L'implication des LPCAT et PLA2 dans la libération de ces AG dans le pool d'acyl-CoA et l'action de DGAT plus spécifiques et sélectives pour les PUFA que les LPAAT n'est cependant pas à écarter sous réserves de vérifications complémentaires.

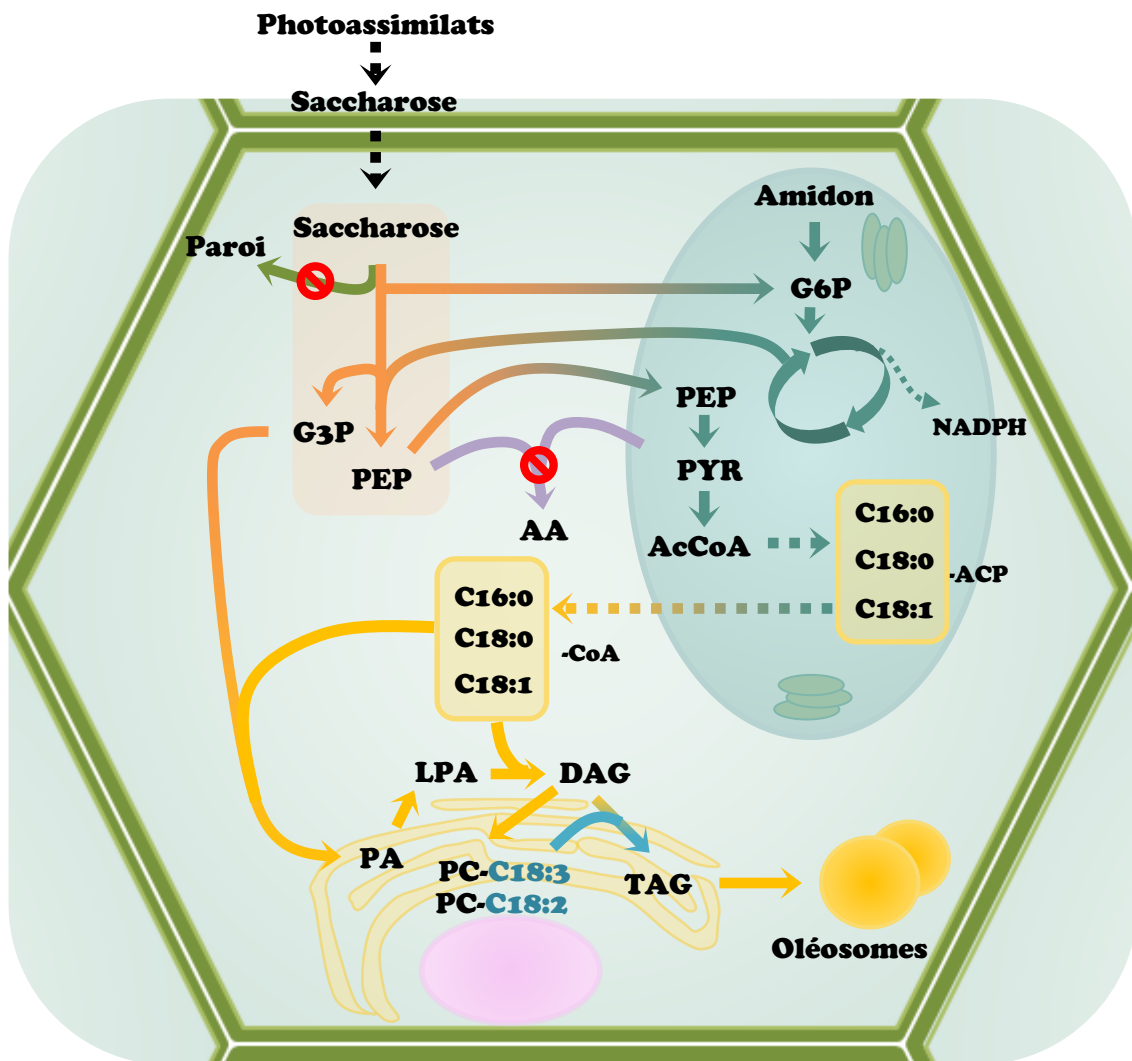


Figure 64 : Schéma bilan de la synthèse des PUFA chez la graine de lin.

Les voies présentées sont les principales conduisant à la synthèse des AG et notamment du C18:3. Les flèches représentées avec un cercle barré (rouge) correspondent aux principales voies concurrentes à la production de TAG.

La graine de lin est un organe pluricellulaire fonctionnant avec de nombreux mécanismes de régulation pour l'apport de carbone et son stockage sous forme lipidique, glucidique ou protéique. Les transporteurs sont également essentiels afin d'assurer la prise en charge de chaque composé par de multiples voies métaboliques et au sein de chaque compartiment.

Par le passé et dans cette étude, nous avons levé un certain nombre de verrous technologiques et biologiques quant à la synthèse et à l'accumulation des triglycérides chez la graine de lin. L'identification d'acides gras inhabituels d'intérêt nutritionnel ou industriel

(acides gras oméga, méthylés, hydroxylés, cyclopropanes) a permis de déceler des enzymes spécifiques et sélectives naturellement présentes chez les plantes, offrant ainsi toute une batterie de gènes au potentiel quasi infini (Lee *et al.*, 1998 ; Gontier *et al.*, 2000 ; Bao *et al.*, 2002 ; Dyer *et al.*, 2008 ; Guan *et al.*, 2014).

Arrivant aux limites du modèle végétal de par la durée des expérimentations avant d'obtenir des mutants aux phénotypes désirés, ainsi que par les différentes controverses relatives à la culture d'OGM, le potentiel applicatif de notre modèle d'étude n'en est que fortement réduit. Seul, l'aspect exploratoire lié à la compréhension paraît alors exploitables. Il a néanmoins permis de se diriger vers une adaptation à un second modèle quant à lui plus souple vis-à-vis des réglementations françaises et européennes : la conception de souches de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* ainsi que la compréhension de son métabolisme grâce au développement de modèles métaboliques dans des conditions de productions d'acides gras inhabituels.

Résultats et Discussions

Chapitre 2.

*Compréhension du métabolisme central et
lipidique chez *Yarrowia lipolytica*.*

Chapitre 2. Compréhension du métabolisme central et lipidique chez *Yarrowia lipolytica*.

Depuis des années la biodiversité, et plus particulièrement le monde végétal, a inspiré les équipes de recherche et les industriels afin de concevoir des souches de microorganismes capables de reproduire certaines voies métaboliques et synthétiser des métabolites d'intérêt à façon. Dans un contexte de bioraffinerie et de production de lipides, le choix s'est ici porté sur différentes souches modifiées de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*. En effet, des réglementations plus souples relatives à la modification génétique ainsi que l'absence de contrainte climatique fait de *Yarrowia* un concurrent sérieux, mais à optimiser, face à la production végétale.

Pour cete étude, trois souches ont été sélectionnées : JMY3501, JMY5289 et JMY5578 (tableau 5 ; figure 65). La première est considérée comme souche de référence, tandis que les deux suivantes serviront de modèle d'étude pour la synthèse des acides gras cyclopropanes (CFA).

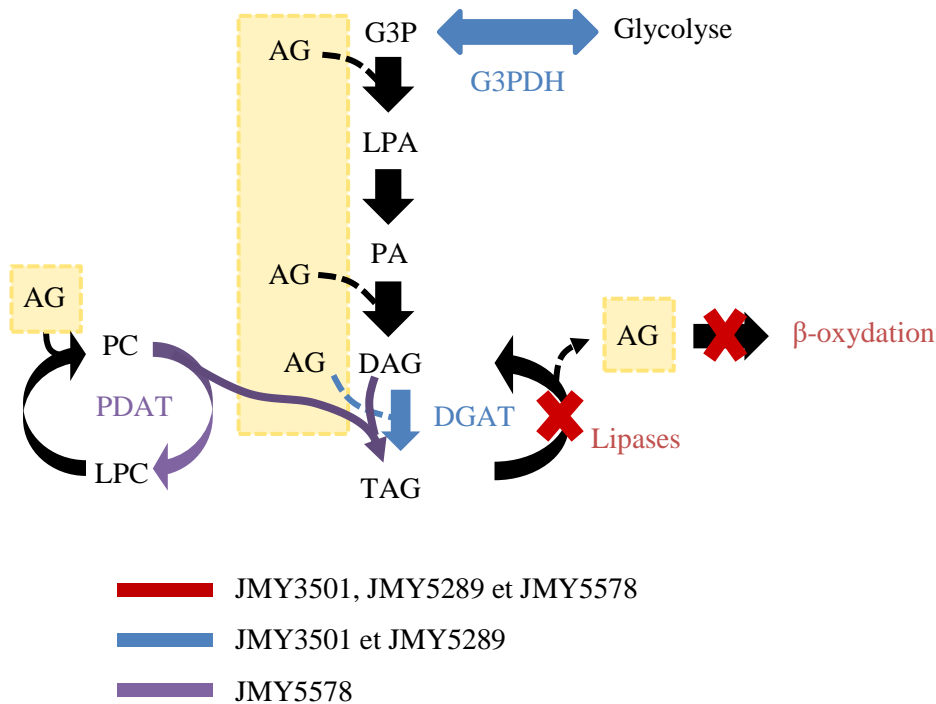


Figure 65 : Schéma récapitulatif des transformations génétiques effectuées sur les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

2.1. Caractérisation biochimique et physiologique de la levure *Yarrowia lipolytica*.

2.1.1. Impact de la source de carbone : glucose et glycérol.

Yarrowia lipolytica est connue pour sa capacité à croître sur une gamme de substrats relativement large comprenant le glucose, le saccharose (Förster *et al.* 2007), le glycérol (Papanikolaou *et al.*, 2002b), l'éthanol (Arzumanov *et al.* 2000) ou des substrats hydrophobes tels que les alcanes, les alcènes ou les lipides (Ledesma-Amaro et Nicaud. 2016), ainsi que des huiles végétales (Imatoukene *et al.*, 2017 ; Kamzololova *et al.*, 2008). Le glycérol est un co-produit de nombreux procédés de transformation (fabrication du savon et du biodiesel par exemple) et peut constituer un substrat potentiellement plus intéressant financièrement pour les industriels : il pourrait donc constituer une alternative intéressante pour la croissance de souches de *Yarrowia lipolytica* et accumulatrices de lipides d'intérêt. Les différents paramètres liés à la croissance de la souche JMY3501 et de sa composition sont abordés dans cette première partie afin de comprendre de manière plus approfondie le mode d'assimilation du glucose et du glycérol chez nos souches d'intérêt.

2.1.1.1. Croissance en milieu minimum.

Le suivi de la croissance a été effectué par analyse de la turbidimétrie et pesée de la matière sèche après lyophilisation. Cependant, la turbidité manque parfois de précision de par la morphologie de la levure et sa tendance à faire des filaments selon les conditions de culture (Morales-Vargas *et al.*, 2012 ; Martinez-Vazquez *et al.*, 2013). C'est pour ces raisons que nos observations concerneront uniquement la variation de la matière sèche au cours du temps, considérée comme plus représentative de la concentration cellulaire (figure 66).

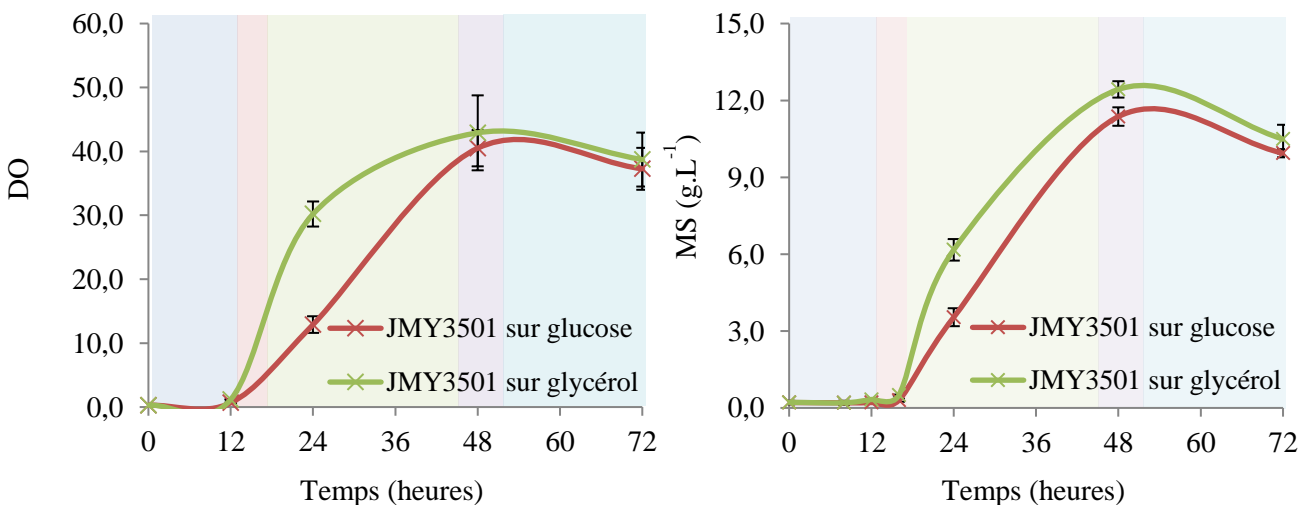


Figure 66 : Croissance de la souche JMY3501 sur glucose et glycérol.

La croissance microbienne peut se diviser en six phases plus ou moins distinctes (figure 66) : la phase de latence, durant les 12 premières heures ; la phase d'accélération jusqu'à 16h ; la phase de croissance jusqu'à 44h ; la phase de ralentissement jusqu'à environ 50h ; une phase stationnaire, ici quasi absente et confondue avec la phase de mort cellulaire.

Il semblerait que la source de carbone n'ait un impact que sur la phase de croissance cellulaire : à T₂₄, la vitesse de consommation du glucose serait de ~ 0,41 g.L⁻¹.h⁻¹ comparée à ~ 0,48 g.L⁻¹.h⁻¹ en présence de glycérol. Ce dernier semblerait permettre une croissance plus rapide.

2.1.1.2. Assimilation des substrats carboné et azoté.

Afin d'expliquer la cause d'une croissance altérée entre ces deux conditions, la consommation des substrats carboné et azoté a été caractérisée par dosage enzymatique. On remarque une consommation précoce et rapide du glycérol à partir de T₁₂ de T₁₆ (4,4 g.L⁻¹.h⁻¹) et un épuisement quasi-total dès T₂₄ (figure 67). L'assimilation du glucose débute après T₁₆-T₂₀ avec une vitesse de 1,3 g.L⁻¹.h⁻¹, soit environ 3,8 fois plus lente que celle observée en glycérol.

D'autres équipes ont pu observer ce phénomène, que ce soit dans le cadre de cultures classiques (mono-substrat glucose ou glycérol) ou des fermentations à deux substrats (glucose et glycérol) chez *Yarrowia lipolytica* (Workman *et al.*, 2013 ; Sabra *et al.*, 2017). Ils ont expliqué cette préférence par la présence dans le génome d'un seul transporteur d'hexose, alors qu'au moins trois gènes codant pour des protéines associées au transport du glycérol sont présents. Or, les protéines kinases de la famille des SNF1/AMPKs ont été identifiées comme des régulateurs majeurs dans le stockage des sucres et des lipides, à la fois chez les levures (*Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*), les mammifères et les plantes, assurant le maintien de l'homéostasie cellulaire en initiant la production d'ATP et réprimant certaines voies biosynthétiques : c'est le cas pour le glucose, contrairement au glycérol (Ghillebert *et al.*, 2011 ; Kerkhoven *et al.*, 2016). La construction d'une souche mutante pour le gène *snf1* a notamment permis de lever cette répression et d'augmenter de 2,6 fois le contenu en lipides chez *Y. lipolytica* (Seip *et al.*, 2013).

Dans nos expériences, la croissance s'achève totalement à partir de 48h (figure 66), alors qu'un épuisement quasi-total du glycérol et de l'azote est observé dès 24h (figure 67). L'absence de toute autre source de carbone au sein du milieu de culture permet de suggérer la

sécrétion d'autres composés dans le milieu extracellulaire durant les 24 premières heures, potentiellement réassimilés par la suite afin d'assurer la fin de la phase de croissance.

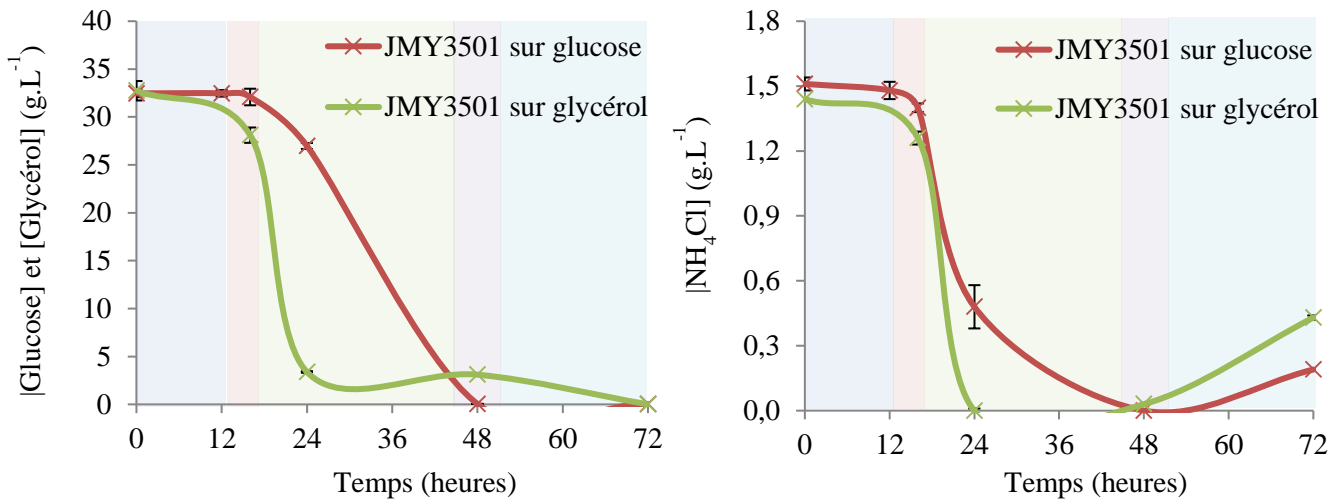


Figure 67 : Assimilation des substrats carboné et azoté chez la souche JMY3501.

2.1.1.3. Caractérisation de la biomasse.

2.1.1.3.1. Synthèse des lipides.

➤ Les lipides et acides gras totaux.

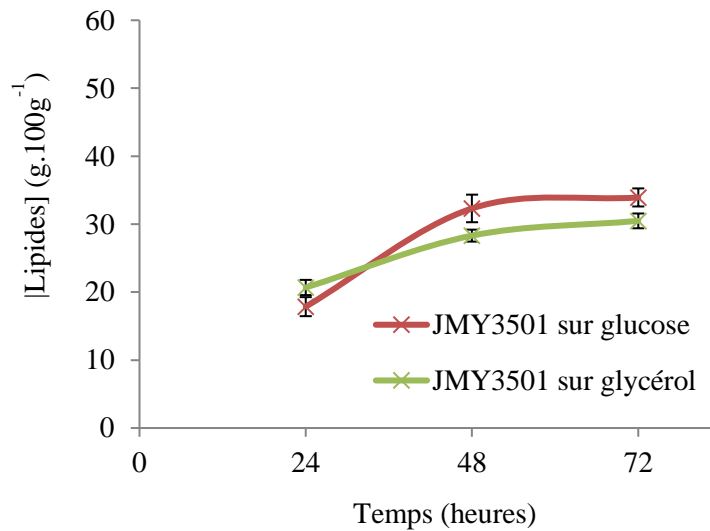


Figure 68 : Synthèse des lipides totaux au cours du temps chez la souche JMY3501.

La souche JMY3501 a été conçue pour une synthèse optimisée en triglycérides par la surexpression des gènes codant pour la G3PDH (*GPD1*) et la DGAT (*DGA2*) (figure 65 ; tableau 5). La teneur en lipides totaux a alors été quantifiée au cours du temps pour chacune

des sources de carbone (figure 68). Dans les conditions de culture présentées ici, l'assimilation du glycérol (30,5 g.100g de MS⁻¹) semble avoir un effet plutôt négatif sur la capacité à accumuler des lipides par rapport au glucose (33,9 g.100g de MS⁻¹) représentant une réduction de 10%. Ce résultat est contradictoire avec le phénomène de répression catabolique par le glucose induit par SNF1 (Seip *et al.*, 2013) et certaines études conduites en glucose et en glycérol (Sabra *et al.*, 2017). De plus, le NH₄Cl étant consommé plus rapidement (figure 67), une carence en azote plus précoce sans en affecter la croissance (figure 66) pourrait être susceptible d'induire plus tôt une meilleure accumulation des lipides (Zhang *et al.*, 2016). Cependant, le milieu nutritif semble avoir un impact majeur sur les effets positifs ou négatifs de la source de carbone. Bhutada *et al.* (2017) ont, en effet, relevé un contenu plus important en TAG pour des souches cultivées en milieu minimum avec glucose (20 g.100 g de MS⁻¹) par rapport au glycérol (14 g.100 g de MS⁻¹) en accord avec notre étude.

Afin de vérifier l'impact de la source de carbone sur le profil en acides gras, des analyses par GC-MS et GC-FID ont été effectuées (chromatogramme en annexe 7A). La proportion d'acides gras saturés semble diminuer pour tendre à se stabiliser dès T₄₈ (figure 69A). Au contraire, le phénomène inverse se produit pour les acides gras insaturés. Néanmoins, il semble moins marqué sur milieu glycérol (-26% d'AG saturés de T₂₄ à T₄₈ sur glucose, par rapport à -11% sur glycérol). En tenant compte des teneurs en AG, on peut également en déduire un index de désaturation plus élevé sur glucose (DI = 2,7) que sur glycérol (DI = 2,1) (méthode de calcul utilisée par Bhutada *et al.*, 2017).

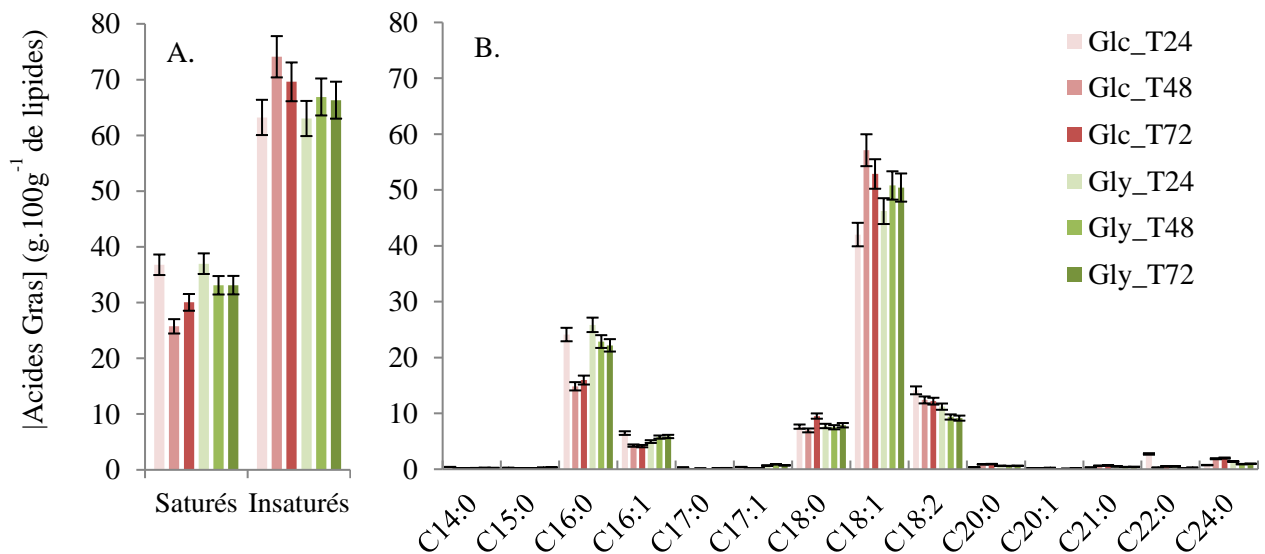


Figure 69 : Profil en acides gras saturés, insaturés (A) et totaux (B) selon la source de carbone chez la souche JMY3501.

Le profil en acides gras totaux a alors été analysé afin de caractériser les différentes modifications au cours du temps (figure 69B.). L'acide oléique (C18:1) est l'acide gras majoritaire (de 42,0 à 57,1% selon la source de carbone et le stade de la culture), ce qui est assez différent du profil obtenu par Beopoulos *et al.* (2011). On observe une nette augmentation de la teneur en C18:1 entre T₂₄ et T₄₈ (+35,9% sur glucose ; +9,9% sur glycérol), puis assez peu de changement de T₄₈ à T₇₂. Le second acide gras majoritaire est l'acide palmitique (C16:0), dont la teneur diminue sur la même période avant de se stabiliser (de 24,1 à 14,9% sur glucose ; de 25,9 à 22,9% sur glycérol).

Certaines différences observées sembleraient liées à l'assimilation du glucose ou du glycérol. C'est le cas du C16:0 dont la teneur est plus importante en présence de glycérol (+38,9% par rapport au glucose à T₇₂). Il est probablement moins bien pris en charge par les élongases de type ELO2 impliquées dans l'élongation du C16 jusqu'au C24 (Wang *et al.*, 2018). Dans nos expériences, on retrouve des teneurs réduites en C18:0 (-17%), C18:1 (-5%) et en C18:2 (-25%) sur milieu glycérol par rapport au milieu glucose à T₇₂. Au contraire, la désaturation du C16:0 en C16:1 serait sensiblement plus efficace en présence de glycérol (+42% de C16:1 à T₇₂).

De plus, il semblerait que le profil en acides gras des lipides totaux soit non seulement dépendant de la source de carbone comme le montre la figure 68 mais également du milieu nutritif utilisé. En effet, Yun *et al.* (2018) ont émis des conclusions différentes quant à l'impact de la source de carbone sur le profil acide gras selon la nature du milieu synthétique : YPD ou YPG (yeast extract-peptone glucose/glycérol), et SCD ou SCG (synthetic complete glucose/glycerol). Il est alors impossible de se référer à des éléments issus de la littérature pour comparer les résultats expérimentaux présentés ici (milieu minimum), expliquant en partie les différences observées avec Beopoulos *et al.*, 2011.

➤ Espèces lipidiques.

Afin d'appréhender au mieux l'impact de la source de carbone sur le métabolisme lipidique chez la souche JMY3501, les différentes espèces constituant les lipides totaux ont été séparées et identifiées par CCM (figures 70A et B), puis quantifiées en GC-FID (figures 70C et D).

Aucune différence significative n'a pu être relevée pour les différentes espèces lipidiques au sein des biomasses des deux conditions étudiées (figures 69A et B) : la voie Kennedy est représentée par le PA, les DAG et les TAG, tandis que le PC, LPC et les AGL

traduisent une voie d'acyl-editing potentiellement active (figure 12), et intervenant dans l'élaboration et la modification des lipides membranaires (Li-Beisson *et al.*, 2013). Les ES constituent, avec les TAG, les lipides de réserve. De manière générale, les lipides neutres représentent ici la majeure partie des lipides totaux (> 80%) (figure 70C et D). Cependant, de légères différences ont pu être notées en fonction de la nature de la source de carbone. Par exemple, les figures 69C et D semble indiquer un effet négatif du glycérol sur la teneur en triglycérides (-5,3%) par rapport à une culture en glucose, au profit d'esters de stérols (+88,9%) ou de certains phospholipides (+10,2% pour le PC). Chez *Yarrowia lipolytica*, l'altération de la teneur en TAG confirme et justifie une accumulation plus faible des lipides totaux (Beopoulos *et al.*, 2008) : ici, le glycérol comme source de carbone induit cette altération dans les conditions de culture en milieu minimum et pour la souche JMY3501.

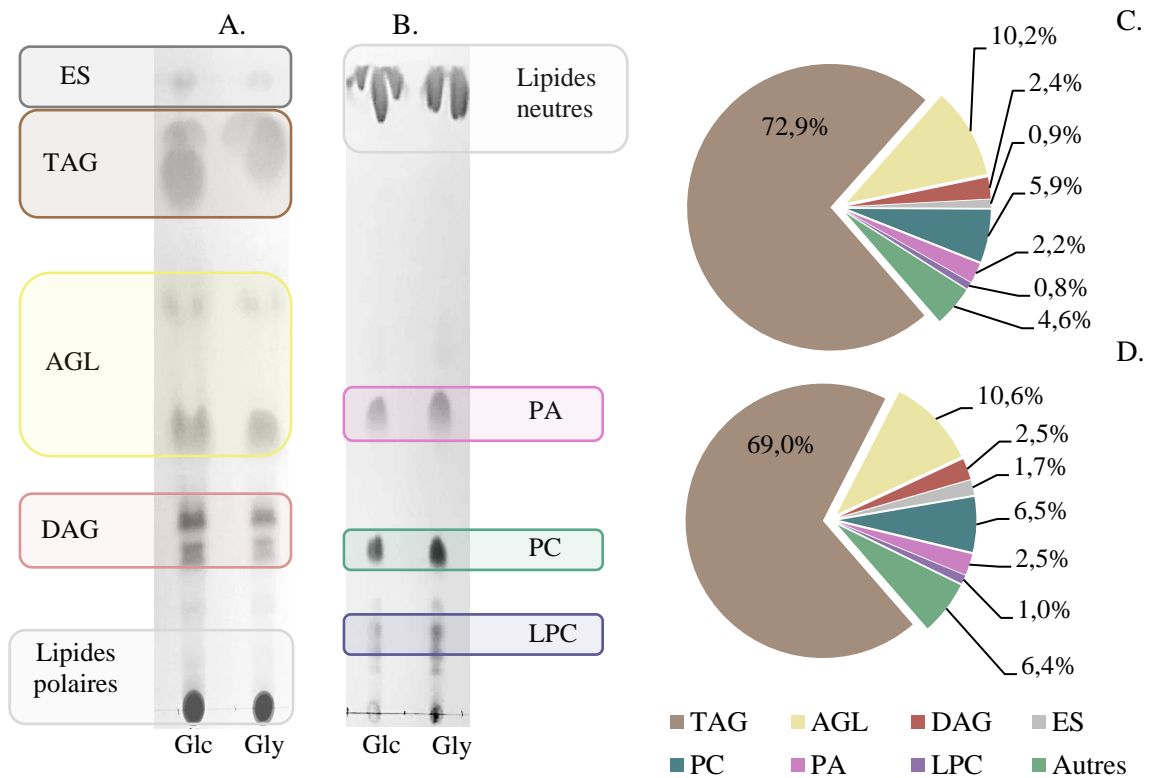


Figure 70 : Séparation, identification et quantification des espèces lipidiques par CCM chez la souche JMY3501 sur milieu minimum glucose et glycérol.

- A. Séparation des acides gras apolaires par l'usage d'un mélange hexane/diéthyl éther/acide acétique (70:30:1).
- B. Séparation des acides gras polaires par l'usage d'un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (90:15:10:3).
- C. Quantification des espèces lipidiques de la souche JMY3501 sur glucose par GC-FID (en % lipides totaux).
- D. Quantification des espèces lipidiques de la souche JMY3501 sur glycérol par GC-FID (en % lipides totaux).

En tenant compte du profil en acides gras de certaines classes lipidiques (figure 71), on peut noter une composition et un index de désaturation assez proche entre PC et TAG, à la fois en glucose ($DI_{PC} = 2,9$ et $DI_{TAG} = 2,4$) et en glycérol ($DI_{PC} = 1,7$ et $DI_{TAG} = 2,0$). Au contraire, un profil appauvri en acides gras insaturés dans les DAG ($DI_{DAG} = 1,1$ et $0,9$ respectivement sur glucose et glycérol) suggère alors une implication active de la PDAT (interconversion TAG/PC) et/ou d'une DGAT plus spécifique des acides gras insaturés que la GPAT et la LPAAT.

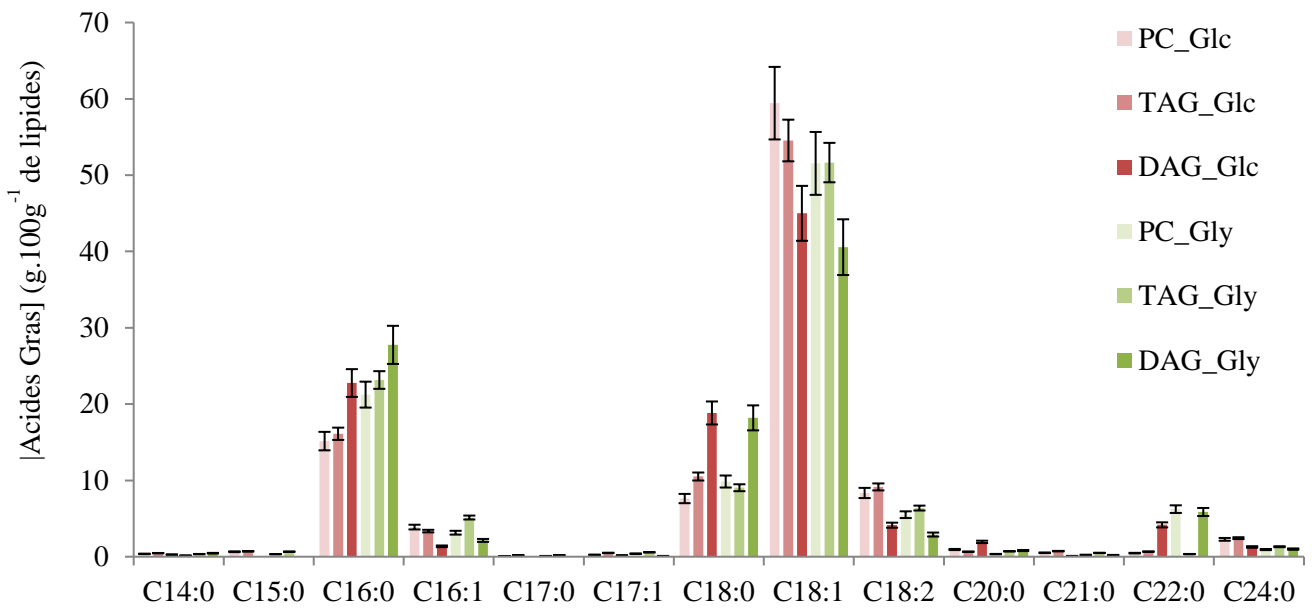


Figure 71 : Profil en acides gras observés sur le PC, TAG et DAG de la souche JMY3501 sur milieu minimum glucose et glycérol.

Le mode d'incorporation des acides gras saturés et insaturés au sein des différentes classes lipidiques semble relativement conservé chez les eucaryotes. Dans la partie précédente (Résultats et Discussions, § 1.1.3.1.3.), on a souligné l'implication de la PDAT pour l'accumulation des PUFA dans les triglycérides chez les plantes (Li-Beisson *et al.*, 2013). Les profils obtenus ici semblent montrer un fonctionnement équivalent. Le C18:1 présent dans le pool de CoA est incorporé dans la voie Kennedy sur les MAG, DAG et TAG, mais est peu désaturé en C18:2 *via* la voie d'acyl-editing. La stearyl-CoA 9-désaturase (désaturation du C18:0 en C18:1) serait alors très active contrairement à la $\Delta 12$ -désaturase (désaturation du C18:1 en C18:2). Néanmoins, et comme chez les plantes, le C18:2 serait plutôt synthétisé dans les PC, transféré sur les TAG (*via* la PDAT) et/ou dans le pool d'acyl-CoA (*via* des phospholipases et LPCAT) pour être réintégré dans les TAG par la voie Kennedy (GPAT, LPAAT et DGAT).

Pour démontrer cela, des études plus avancées doivent être conduites afin d’appréhender la sélectivité et la spécificité de chacune de ces enzymes pour chacun de ces acides gras, la bibliographie est malheureusement assez pauvre sur ce type d’expérimentation chez *Yarrowia lipolytica*.

La tendance à incorporer de plus de C16:0 sur milieu glycérol ou d’acides gras insaturés sur milieu glucose se confirme sur chacune des espèces lipidiques présentées en figure 71. En effet, ce substrat alternatif induirait une augmentation de la teneur en acide palmitique de 40% sur le PC, de 44% sur les TAG et de 22 % sur les DAG. Une diminution de la teneur en acide oléique de 13% sur le PC, de 5% sur les TAG et de 10% sur les DAG serait donc à noter en parallèle. Ce phénomène pourrait s’expliquer par une régulation du potentiel redox lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone : pour être catabolisé, le glycérol doit être phosphorylé puis oxydé afin d’être converti en DHAP et intégré la glycolyse (Tamás et Hohmann, 2004). La réduction excessive de NAD ou FAD en découlant pourrait impliquer une diminution de l’activité des désaturases et notamment au niveau des cytochromes b5, protéines spécialisées dans le transport d’électrons en lien avec les désaturases (Henry *et al.*, 2012). La figure 72 adaptée de la littérature montre l’implication de ces cofacteurs dans le catabolisme du glycérol (Tamás et Hohmann (2004)).

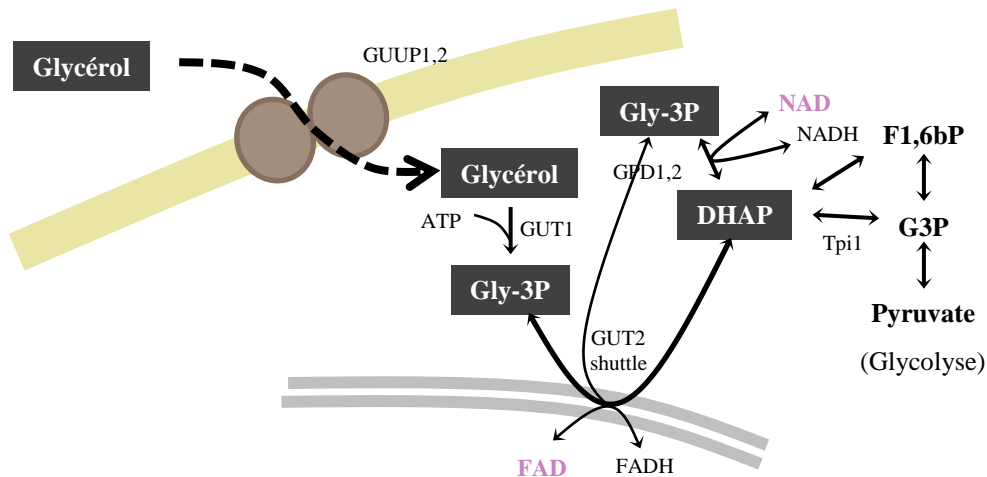


Figure 72 : Catabolisme du glycérol : implication des cofacteurs de type NAD et FAD, adapté de Tamás and Hohmann (2004).

2.1.1.3.2. Synthèse des protéines et acides aminés.

La synthèse protéique est un mécanisme primordial pour la division cellulaire et la fabrication de biomasse. Elle est dépendante de la source en azote fournie dans le milieu de culture (Ratledge et Wynn, 2002). La figure 73 représente l’évolution de la teneur en protéines

au cours du temps. En milieu conventionnel (glucose), la synthèse protéique semble se poursuivre avec une teneur en protéines croissante entre T_{24} et T_{48} (40,3 et 44,3 g.100 g de MS^{-1}) puis décroissante (25,3 g.100g de MS^{-1} à T_{72}). Ceci est en accord avec les résultats présentés en figure 67. La concentration en NH_4Cl était encore de 0,5 g.L⁻¹ à T_{24} permettant une incorporation de l'azote pour une synthèse de protéines jusqu'à T_{48} . En milieu glycérol, la teneur en protéines décroît dès T_{24} jusqu'à T_{72} et est 20% plus faible qu'en milieu glucose au stade final. Là encore, la courbe d'assimilation du NH_4Cl permet d'expliquer ce phénomène : le milieu en serait déjà dépourvu dès T_{24} . Sans source d'azote, la synthèse protéique tend à s'arrêter, tandis que la croissance et la synthèse des autres composés se poursuivent (figures 67, 68 et 73), se traduisant par la diminution de la teneur en protéines. Une consommation rapide de la source d'azote et de carbone (milieu glycérol ; figure 67) n'induirait donc pas nécessairement une plus forte accumulation de protéines ou de lipides (figures 68 et 73).

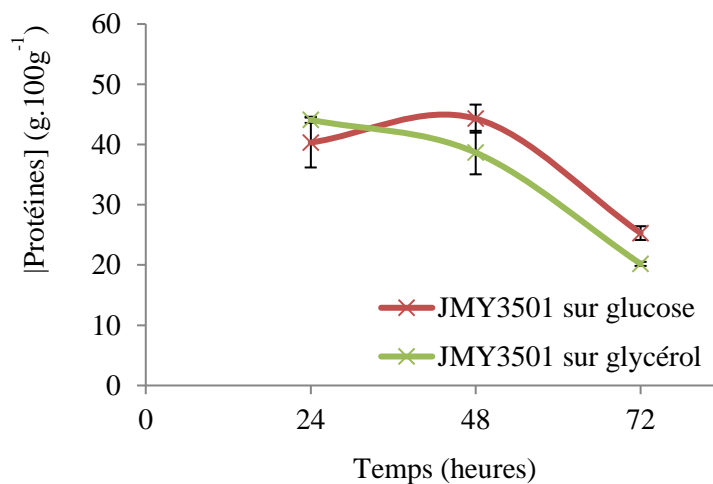


Figure 73 : Synthèse des protéines totales au cours du temps chez la souche JMY3501.

La voie d'entrée du glycérol dans la cellule est différente de celle du glucose n'impliquant alors pas les mêmes enzymes ni même la même demande en co-facteurs. On a pu voir que cela pouvait avoir un impact sur le degré d'insaturation des acides gras (Résultats et Discussions, § 2.1.1.3.1 ; figure 69). Les voies de biosynthèse des acides aminés sont énergivores (ATP) et requièrent l'intervention d'une grande quantité de cofacteurs (NAD, FAD, etc.) afin de réaliser des réactions d'oxydoréduction, de condensation, de décarboxylation et de déshydrogénation. Il est ainsi probable que le profil en acides aminés puisse être altéré en fonction de la source de carbone utilisée. La figure 74 permet de comparer ces profils en acides aminés dans ces deux conditions.

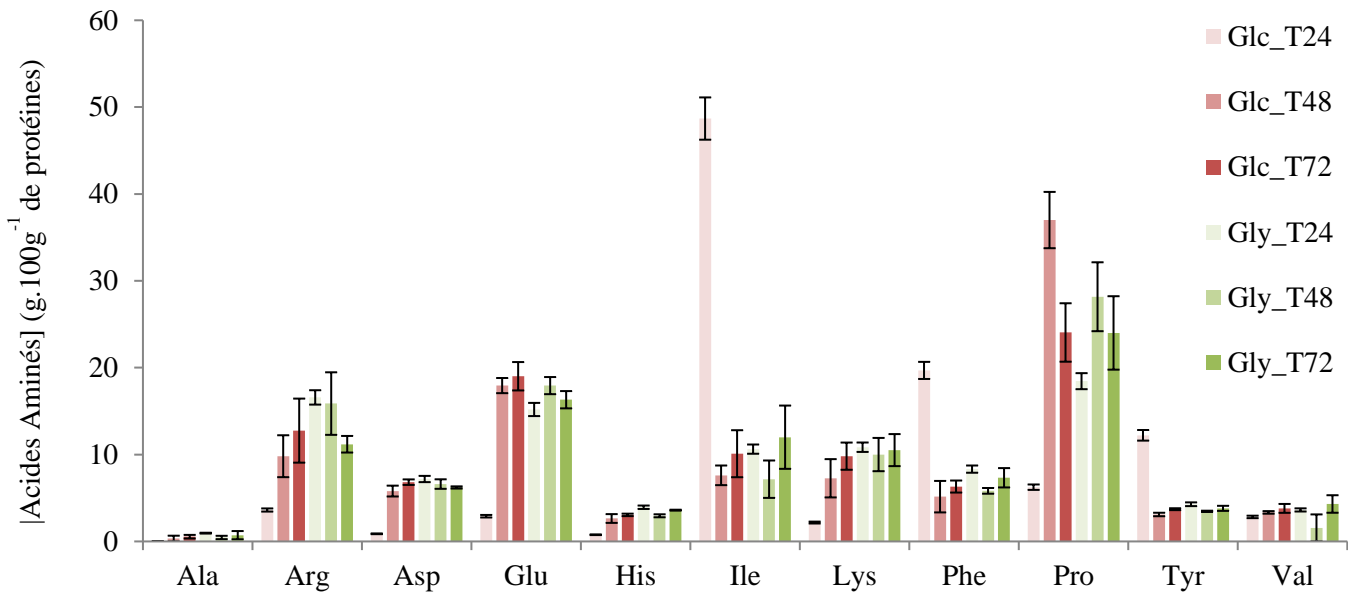


Figure 74 : Profil en acides aminés chez la souche JMY3501 au cours du temps.

Il semblerait d'après nos résultats que certains acides aminés soient très importants durant la phase exponentielle en présence de glucose ([Ile] = 48,7 g.100g_{protéines}⁻¹, [Phe] = 19,7 g.100 g_{protéines}⁻¹ et [Tyr] = 12,2 g.100 g_{protéines}⁻¹). Leur teneur est ensuite respectivement réduite de 84, 74 et 75% dès T₄₈. Au contraire, la teneur d'autres acides aminés augmente significativement durant la phase stationnaire de T₄₈ à T₇₂. C'est le cas de l'Arg (x3,5), Asp (x7,8), Glu (x6,6), Lys (x4,5) et Pro (x3,4) (valeurs calculées de T₂₄ à T₇₂). Enfin, l'Ala, l'His et la Val semblent assez peu varier au cours de la culture.

Des expérimentations complémentaires permettraient de comprendre le rôle de certains acides aminés dans la croissance et notamment lors de la transition entre la phase de production de biomasse (T₂₄-T₄₈) et la phase d'accumulation des lipides (T₄₈-T₇₂). Il serait alors intéressant d'ajouter le milieu d'Ile, de Phe ou de Tyr marquées au ¹³C afin de connaître leur devenir après 24 heures de culture (réduction de leur teneur de plus de 70%).

Contrairement à un milieu glucose, la souche JMY3501 cultivée sur milieu glycérol présente assez peu de variations au cours du temps dans le profil en acides aminés (figure 74). Au stade finale, les acides aminés majoritaires sont cependant les mêmes que sur milieu glucose ([Pro] > [Glu] > [Arg] > [Autres]).

L'utilisation du glycérol comme source de carbone aurait alors faible un impact sur le profil en acides aminés de la biomasse récoltée en fin de culture (figure 74), mais influencerait grandement la dynamique de leur synthèse. En effet, ce profil est beaucoup moins variable au cours du temps par rapport à celui obtenu en milieu glucose. La première explication serait une

consommation totale de l'azote dès T₂₄ (pas avant T₄₈ sur glucose). La biosynthèse des acides aminés serait alors assez peu active à partir de ce stade, et donc pour chaque point de cinétique étudié. De plus, on a pu voir que l'assimilation du glycérol nécessitait une grande quantité de co-facteurs afin d'être métabolisé (Tamás et Hohmann (2004). Il est alors possible que la synthèse d'Ile, Phe ou Tyr soit altérée à T₂₄ sur milieu glycérol, et qu'elle soit en fait liée à un déficit en cofacteurs lui-même causé par l'oxydation du glycérol. Cela reste néanmoins à confirmer par une étude plus approfondie (disponibilité des cofacteurs notamment). Une régulation plus complexe n'est pas à écarter (transcriptomique par exemple).

2.1.1.3.3. Synthèse des glucides.

Yarrowia lipolytica est capable de stocker le carbone assimilé sous la forme de polysaccharides de réserve. Son accumulation est en général fortement induite en condition de stress et notamment lors d'une carence en glucose (accumulation en fin de phase exponentielle) ou en azote (dès la perception de la carence) (Bhutada *et al.*, 2017). Lamers *et al.* (2016) ont montré que le glycogène pouvait représenter 10-45% de la biomasse de levure et Dulermo *et al.* (2015) et Bhutada *et al.* (2017) ont montré que *Y. lipolytica* en accumulait 9 à 16%. Ces derniers ont également observé une augmentation de 60% du contenu en TAG avec un mutant *YIGSY1* alors dépourvu de glycogène (8,5% chez le WT). Il paraît alors évident qu'une compétition entre ces deux voies de stockage du carbone ait lieu chez la levure oléagineuse. Représentant un tiers de la biomasse en condition de carence en azote et pour des raisons pratiques, seuls les glucides totaux ont été quantifiés dans cette partie.

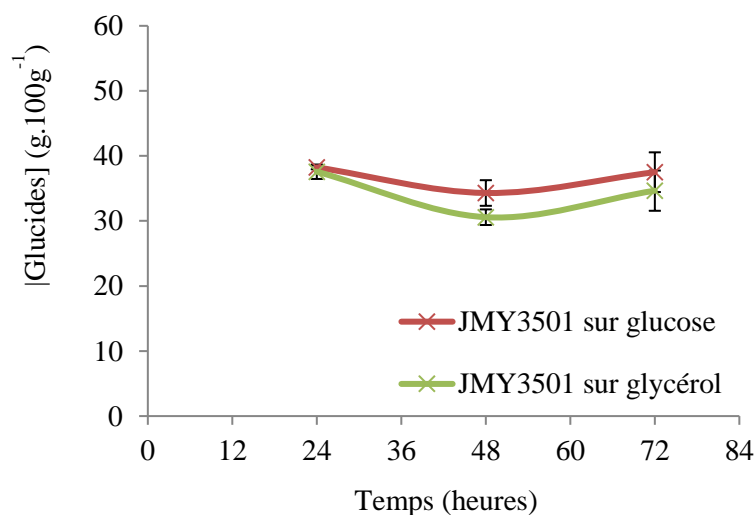


Figure 75 : Synthèse des glucides totaux au cours du temps chez la souche JMY3501.

Il semblerait que la source de carbone n'ait que peu d'effet sur la teneur en glucides totaux chez la souche JMY3501 (-7,5% à T₇₂) (figure 75). Dans nos expériences, une réduction de la teneur en lipides n'a pas conduit à une augmentation de la teneur en glucides. Une augmentation de la quantité de glycogène au sein de ce pool global n'est pas exclue. En effet, Bhutada *et al.*, (2017) ont montré une augmentation de 170% de la teneur en glycogène en présence de glycérol associée à une réduction de 24% de la teneur en triglycérides.

2.1.1.4. Acidification du milieu.

Yarrowia lipolytica est également connue pour sa faculté à sécréter des acides organiques incluant des intermédiaires et précurseurs métaboliques du cycle de Krebs (Sabra *et al.*, 2017) : succinate, acétate, citrate et isocitrate. Ce phénomène serait fortement induit au cours d'une carence en azote affectant le métabolisme de la cellule et entraînant la transition entre la phase de croissance et la phase de production de citrate ou d'accumulation des lipides (Sarris *et al.*, 2011). En effet, le citrate est un intermédiaire clé dans le métabolisme de la levure (précurseur des acides gras, régulateur du métabolisme du glucose et impliqué dans le métabolisme énergétique ; Sun *et al.*, 2010). *Yarrowia* est dorénavant exploitée en industrie (Laboratoires Pfizer par exemple) comme producteur potentiel de citrate (Arzumanov *et al.*, 2000 ; Förster *et al.*, 2007 ; Papanikolaou *et al.*, 2009) Cependant, lorsque la source de carbone est le glycérol, la production d'acide citrique peut s'accompagner d'une production de succinate (Yuzbashev *et al.*, 2010).

Dans le cadre de notre étude, la culture de la souche JMY3501 s'est accompagnée d'une acidification du milieu extracellulaire (figure 76). Ce phénomène semble plus important lorsque la souche JMY3501 est cultivée en présence de glycérol. Dès la phase exponentielle de croissance (T₁₂), le pH commence à diminuer et atteint un plateau dès T₂₄ (pH ≈ 2,5-3). Lorsque la souche est cultivée en présence de glucose, l'acidification du milieu débute seulement après T₂₀₋₂₄ et ne se stabilise qu'à partir de T₅₄ (pH = 2,5). En plus d'une acidification plus tardive par rapport à la culture en glycérol, elle semble également plus lente (-0,15 par rapport à -0,73 points de pH.h⁻¹) qu'en milieu glycérol (figure 75). Ces différences de vitesse d'acidification et de retard sont en accord avec les cinétiques d'assimilation des substrats (figure 67) : l'interruption de l'acidification et l'épuisement des substrats semblent concomitants.

Cependant, le dosage enzymatique (Kit megazyme) et l'analyse HPLC-MS effectués sur des échantillons de milieu extracellulaire à T₀, T₁₂, T₂₄, T₃₆, T₄₈, T₅₄ et T₇₂ n'ont révélé que d'infimes quantités de citrate (< 10 mg.L⁻¹). Le chromatogramme et le spectre de masse n'ont

pas permis l'identification d'autres acides organiques pouvant expliquer cette acidification du milieu de culture pourtant tamponné (annexe 8). On peut néanmoins noter la présence de mannitol (non quantifié) lorsque la source de carbone est le glycérol. La faible variation de la composition du milieu de culture entre T_0 et T_{72} laisse penser que ni le mannitol (milieu glycérol), ni le citrate (milieux glucose et glycérol), ni aucun autre métabolite serait synthétisé puis sécrété en quantité suffisante afin d'expliquer la diminution du pH de 6,8 à 2,5 observée en milieu tamponné.

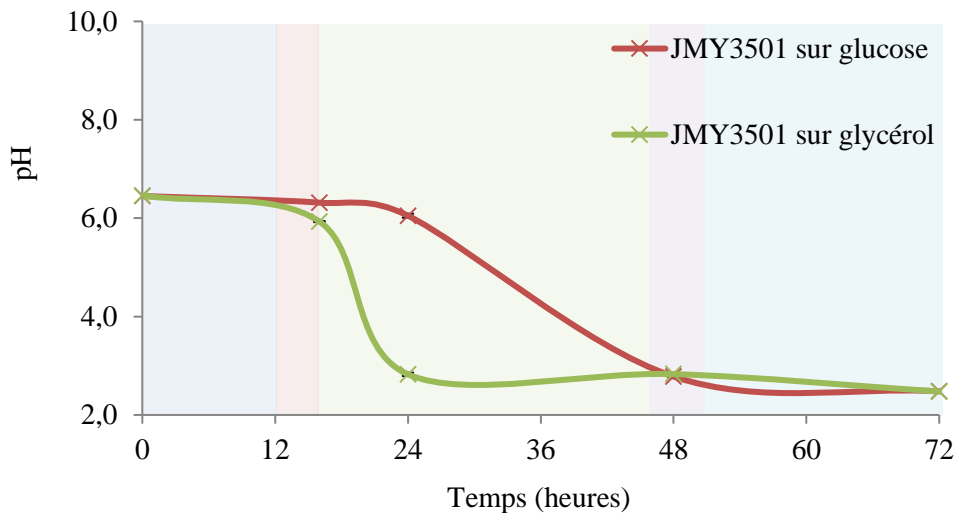
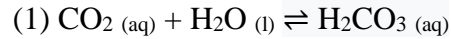


Figure 76 : Evolution du pH au cours du temps chez la souche JMY3501.

Kavšček *et al.* (2015) ont montré que 0,55 moles de citrate par mole de glucose sont sécrétées dans les conditions testées (soit 55% du carbone entrant). Ils ont également montré qu'une réduction de la vitesse d'assimilation du glucose (de 0,350 à 0,152 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) permettait de ralentir le flux glycolytique et supprimer la sécrétion de citrate. Dans ces conditions, 2,6 moles de CO_2 seraient générées par mole de glucose, avec une teneur en TAG (~ 30%) équivalente à notre étude : la « fuite » de carbone représenterait alors ~ 43% du carbone entrant. Dans le cas de notre étude, la vitesse d'assimilation de la source de glucose est plutôt faible ($1,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; figure 67) comparée à celle observée lors d'une culture en bioréacteur (4 à $5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; Antonucci *et al.*, 2001 ; Egermeier *et al.*, 2017) et où les teneurs en citrate peuvent atteindre 40-50 g.L^{-1} . Une vitesse d'assimilation du glycérol élevée ($4,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pourrait alors suggérer une libération importante d'acides et d'autres métabolites (Kavšček *et al.*, 2015).

Néanmoins, de nombreuses réactions libèrent du carbone sous forme de CO₂ non réassimilé par la cellule. Il est alors libéré dans le milieu extracellulaire et est susceptible de se dissoudre pour y former l'acide carbonique selon la réaction (1) :



L'acide carbonique serait ainsi impliqué dans l'acidification plus ou moins rapide du milieu de culture *via* la libération intensive du CO₂ (~ 166 mmol.L⁻¹ sur glucose d'après l'estimation faite précédemment). Il serait intéressant d'effectuer des expérimentations pour confirmer le rôle du CO₂ dans l'acidification de ce milieu de culture pourtant tamponné.

D'autres mécanismes pourraient participer de manière simultanée à cette acidification. En effet, l'azote est assimilé sous la forme NH₄⁺ (à partir du NH₄Cl) par le biais des transporteurs MEP1 et MEP2. Il est incorporé à l' α -ketoglutarate sous la forme NH₃ pour la synthèse du glutamate puis des autres acides aminés (Conrad *et al.*, 2014) impliquant la libération d'une mole de H⁺ par mole de NH₄⁺ assimilée et déprotonée. Afin de maintenir un pH intracellulaire stable (pH ≈ 7,2), les levures sont capables de réguler l'activité de pompes à protons (PMA1 et V-ATPase) libérant ainsi les ions H⁺ et contribuant alors partiellement à l'acidification du milieu. De plus, ces transporteurs seraient activés en présence de glucose, puis réprimés en cas de carence en substrat carboné (Martínez-Muñoz et Kane, 2018).

L'ensemble de ces points justifie alors la concomitance entre l'assimilation des substrats carboné et azoté (figure 67) et l'acidification du milieu (figure 76).

2.1.1.5. Conclusion partielle : Impact de la source de carbone sur la physiologie et la composition biochimique de la souche JMY3501.

La levure *Yarrowia lipolytica* dont la voie Kennedy a été optimisée dans le cadre des projets Prebiol et MétalipPro est capable de produire 9,9 à 10,5 g.L⁻¹ de biomasse (figure 66) selon sa source de carbone et d'accumuler jusqu'à 33,9 g de lipides.100 gMS⁻¹, en milieu minimum carencé en azote (rapport molaire C/N = 6) (figure 68). Lorsque la source de carbone est le glycérol, les vitesses de croissance et d'assimilation des substrats ont nettement été améliorées (figures 66 et 67). Néanmoins, cela a entraîné une réduction de la teneur en lipides de 10% (figure 68) et de l'index de désaturation des acides gras de 22% (figure 69). Les contenus en protéines et en glucides ont également été diminués respectivement de 20% et de 7,5% (figures 73 et 75), avec une dynamique de synthèse des acides aminés altérée. La synthèse de l'ensemble des composés constitutifs de la biomasse ayant été réduite, une proportion plus importante de composés « inconnus » (non identifiés dans le cadre de l'étude) serait induite en

présence de glycérol par rapport au glucose (figure 77). En effet, la plus faible accumulation des lipides sur milieu glycérol n'a pas conduit à une synthèse plus importante des protéines ou des glucides. Or, le glycérol est plus spécifiquement utilisé comme source de carbone pour la production de composés de type polyols comme le mannitol, l'érythritol ou l'arabitol (Egermeier *et al.*, 2017). Il serait alors intéressant d'identifier ces composés inconnus et de les quantifier afin de compléter cette étude en essayant de définir d'autres marqueurs métaboliques induits par une culture en milieu glycérol.

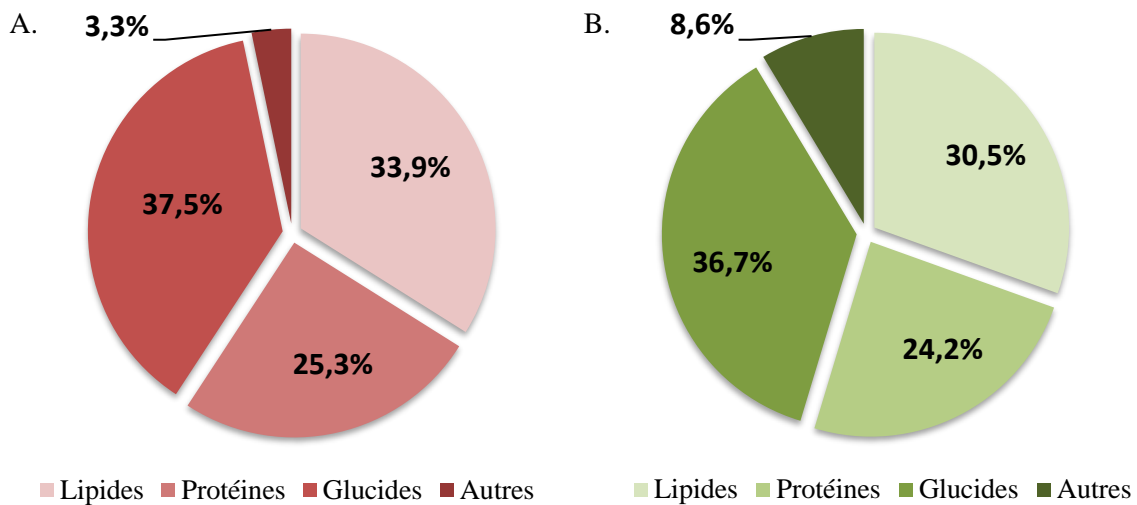


Figure 77 : Composition biochimique de la biomasse de la souche JMY3501 à T₇₂ et cultivée sur milieu minimum glucose (A) ou glycérol (B).

2.1.2. Impact de la production des acides gras cyclopropanes.

Les biotechnologies exploitant la diversité microbienne et végétale sont une alternative prometteuse pour la substitution de composés issus de la pétrochimie. Les avancées génétiques de la levure *Yarrowia lipolytica* (Celińska *et al.*, 2017) ont permis de décupler les potentialités pour l'ingénierie de nouvelles souches productrices de molécules d'intérêts. Les acides gras cyclopropanes, présents chez les phospholipides des bactéries à Gram positive (Teixeira *et al.*, 2002) et négative (Chang et Cronan, 1999) ou dans la composition de l'huile issue de graines du litchi notamment (Gaydou *et al.*, 1993 ; Gontier *et al.*, 2000) sont essentiellement connus pour leur rôle dans la tolérance à certains stress abiotiques, tels que la présence d'éthanol (Budin-Verneuil *et al.* 2005) ou en milieu acide (Teixeira *et al.*, 2002). Ces acides gras inhabituels pourraient être exploités comme précurseurs d'acides gras méthyl-branchés (ouverture du cycle et hydrogénation) constituant d'excellentes alternatives aux lubrifiants pétrosourcés (Kai et Pryde, 1982 ; Duhot *et al.*, 1998).

La souche JMY3501, précédemment étudiée pour sa capacité à croître sur glucose et glycérol (Résultats et Discussions, § 2.1.1.) est une souche dont la voie Kennedy a été améliorée (délétions $\Delta pox1-6$ et $\Delta tgl4$, et surexpressions de *GPD1* et *DGA2* ; tableau 5 ; figure 64). Afin d'étudier la synthèse des acides gras cyclopropanes (CFA) chez la levure, une souche JMY5289, issue de la souche JMY3501 a été construite. En plus des modifications précédentes, elle exprime alors le gène codant pour une CFA synthase d'*Escherichia coli*. Une seconde souche productrice de CFA a été élaborée, sans néanmoins disposer des optimisations de la voie Kennedy. Elle possède néanmoins un mécanisme de transfert des acides gras inhabituels vers les triglycérides renforcé (surexpression du gène *LROI*, codant pour une PDAT).

La comparaison de ces différentes souches a pour objectif de caractériser l'effet de la synthèse des CFA sur la composition biochimique et la physiologie des levures. Cela a pour but d'améliorer la compréhension de ces mécanismes afin de développer des souches et procédés de fermentation optimisés dans le cadre d'une production industrielle d'huiles enrichies en CFA.

2.1.2.1. Croissance en milieu minimum.

Les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 présentent une croissance relativement similaire en matière sèche lorsqu'elles sont cultivées en milieu minimum carencé en azote (rapport molaire C/N = 6) sur glucose (figure 78). Les souches dont la voie Kennedy a été optimisée (JMY3501 et JMY5289) présentent une vitesse de croissance en phase exponentielle équivalente (respectivement 0,41 et 0,39 g.L.⁻¹h⁻¹). La souche JMY5578 semble croître plus lentement (0,32 g.L.⁻¹h⁻¹). Néanmoins, une lyse cellulaire (pente de la courbe décroissante après T₄₈) plus importante chez la souche non productrice de CFA entraîne un rendement en biomasse légèrement inférieur : 9,9 g de MS.L⁻¹ à T₇₂, contre 10,9 et 11,5 g de MS.L⁻¹ pour JMY5578 et JMY5289 qui connaissent une mortalité très faible (pente nulle pour la souche JMY5578).

On peut suggérer que les CFA jouent un rôle dans la résistance de *Yarrowia lipolytica* face à un quelconque stress, limitant alors la lyse cellulaire (figure 78). Des études plus avancées seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

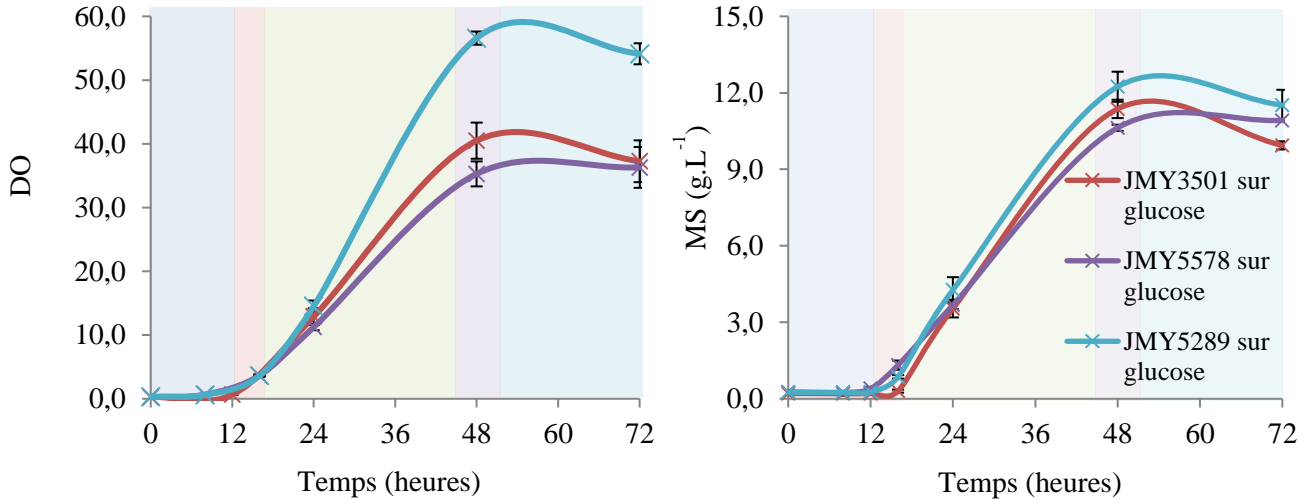


Figure 78 : Croissance des souches JMY3501, JMY5578 et JMY5289 sur glucose.

2.1.2.2. Assimilation des substrats.

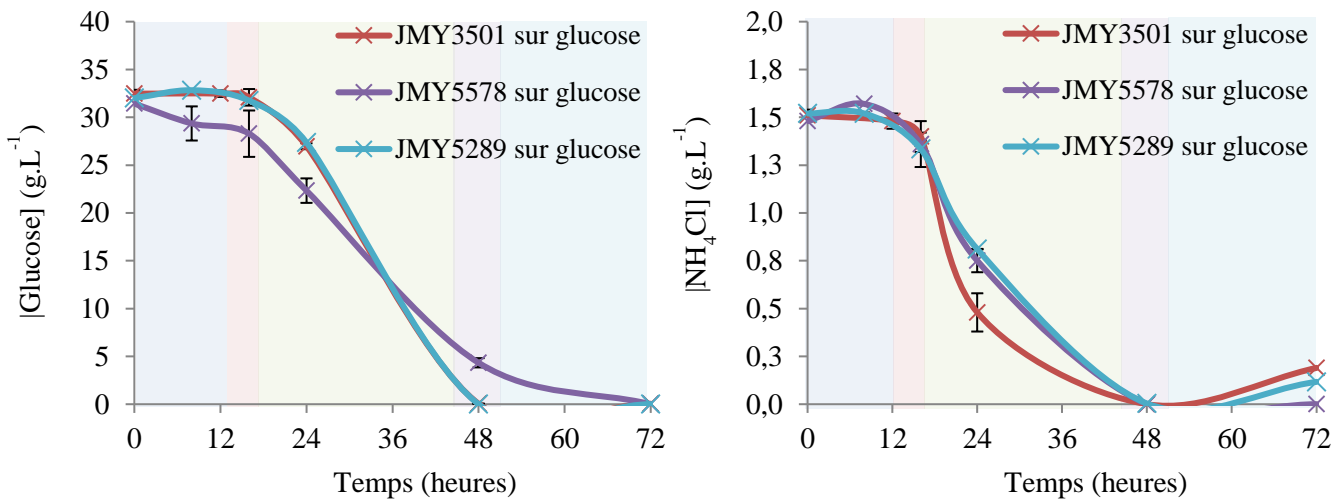


Figure 79 : Assimilation des substrats carboné et azoté chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

Afin d'appréhender l'effet des modifications génétiques sur l'assimilation du glucose et du chlorure d'ammonium, la consommation des substrats a été mesurée pour chacune des souches (figure 79). La vitesse d'assimilation du glucose semble être plus faible pour la souche JMY5578 dont la voie Kennedy n'a pas été optimisée (0,8 g.L⁻¹.h⁻¹ comparé à 1,25 g.L⁻¹.h⁻¹, pour les deux autres souches testées). Cette voie pourrait alors conditionner le flux glycolytique

ainsi que l'import de glucose. En effet, la synthèse de CFA ne semble pas avoir d'impact sur la consommation de la source de carbone (figure 79).

L'azote semble être assimilé plus rapidement chez la souche JMY3501 ($0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) par rapport aux souches productrices de CFA ($0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Cela pourrait impliquer un besoin plus important en protéines à T_{24} chez cette souche, ou au contraire, une biosynthèse des acides aminés plus faible chez les souches productrices de CFA. Une étude sur le devenir du carbone dans la cellule pourrait apporter des réponses plus précises. De plus, les CFA sont connus pour être synthétisés dans les phospholipides afin de perturber directement la fluidité membranaire et faire face à un stress physicochimique (Brown *et al.*, 1997 ; Chang et Cronan, 1999 ; Budin-Verneuil *et al.*, 2005). De cette manière, une modification de la dynamique membranaire est susceptible de provoquer une altération des protéines transmembranaires, canaux, transporteurs, récepteurs, etc. (Cournia *et al.*, 2015).

2.1.2.3. Caractérisation de la biomasse.

On a pu voir certaines divergences d'assimilation des substrats carboné et azoté. La caractérisation biochimique de la biomasse a pu être réalisée afin de comprendre les composés majeurs dont la synthèse aurait été altérée entre ces trois souches, à la fois différentes par leur génétique (figure 65 ; tableau 5), mais également par leur physiologie (croissance et consommation des substrats : figures 78 et 79).

2.1.2.3.1. Synthèse des lipides.

➤ Les lipides et acides gras totaux.

Les lipides totaux ont été quantifiés à T_{24} , T_{48} et T_{72} , ce qui a permis de montrer une cinétique d'accumulation différente entre JMY3501 et JMY5289 (figure 80). En effet, la teneur en lipides au stade le plus précoce est plus importante chez la souche non productrice de CFA (17,9 comparé à 11,3 g.100g de MS^{-1} chez la souche productrice). Cependant, on observe en fin de croissance des teneurs plutôt proches (30,9 puis 31,2 g.100g de MS^{-1} pour JMY5289 et 32,3 puis 33,9 g.100g de MS^{-1} pour JMY3501 à T_{48} puis T_{72}). On observe donc un retard d'accumulation des lipides chez la souche JMY5289 qui pourrait être dû à la synthèse de CFA (seule différence génétique entre les deux souches).

Chez la souche JMY5578, on remarque aussi un retard de synthèse des lipides. Le contenu en lipides chez les souches productrices de CFA est similaire à T_{24} (9,8 et 11,3 g.100g de MS^{-1} chez JMY5578 et JMY5289 à T_{24} , soit -45 et -37% de lipides par rapport à la souche JMY3501). La souche JMY5578 atteint un plateau à T_{48} à 17,9 g.100g de MS^{-1}

(18,1 g.100g de MS⁻¹ à T₇₂). Les différences génétiques entre JMY5289 et JMY5578 sont alors à l'origine d'un contenu en lipides inférieur chez JMY5578 (-42%), lui-même probablement dû à une assimilation du carbone et à un flux glycolytique plus lents.

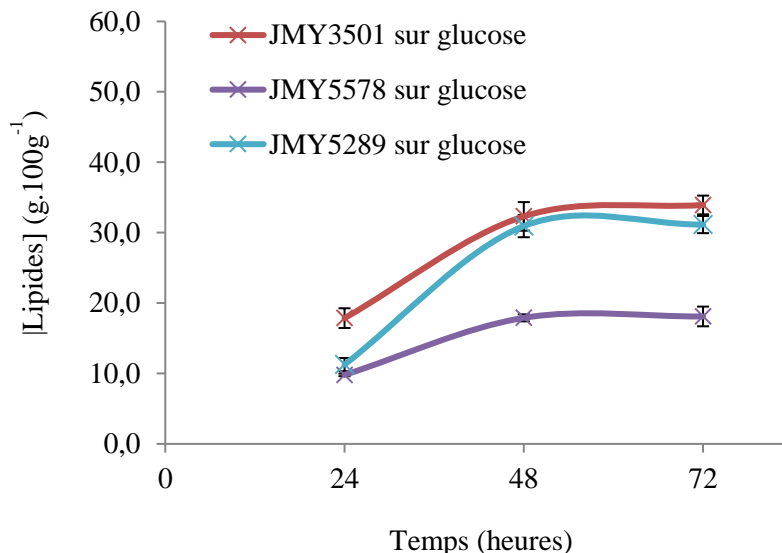


Figure 80 : Synthèse des lipides totaux au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

Afin de vérifier l'effet de l'expression d'une CFAS chez une souche dont la voie Kennedy a été optimisée (JMY5289/JMY3501), il est nécessaire de vérifier le profil en acides gras produits. De même, l'étude d'une souche où le transfert des acides gras des phospholipides vers la voie Kennedy a été amélioré doit être étudiée (JMY5578/JMY5289). L'annexe 7 présente un exemple de chromatogramme de la souche JMY3501 (A) (non productrice de CFA) et de la souche JMY5578 (B) (productrice de CFA).

La figure 81 montre de manière très explicite une réduction de 42% de la teneur en C18:1 entre JMY3501 et JMY5289. La synthèse d'un nouvel acide gras, le C19:CFA, présent à 12,5% a été formé grâce à la formation d'un cycle cyclopropane à partir de l'insaturation présente sur le C18:1. De même, la teneur en C16:1 a été diminuée de 70%, conduisant à la synthèse de C17:CFA (3,6%). Chez la souche JMY5578, une réduction de 71 et 87% des teneurs en C18:1 et C16:1 a aussi été observée. Cette souche a pu accumuler 19,3% de C19:CFA et 5,3% de C17:CFA au sein de ses lipides totaux (+55% et +47% par rapport à JMY5289). L'utilisation du C18:1 pour la synthèse des CFA n'a cependant eu aucun effet significatif sur la teneur en C18:2 à T₄₈ ou T₇₂. On peut néanmoins noter une différence à T₂₄ où la teneur en C18:2 est plus élevée chez JMY5289 et JMY5578 par rapport à JMY3501

(+73 et +77%). Il est possible qu'une sous-régulation de la désaturase à l'origine du C18:2 soit à l'origine de ce phénomène, permettant l'action de la CFA synthase sur le C18:1 : la mesure du niveau d'expression des gènes codant pour les désaturases permettrait de confirmer cette hypothèse.

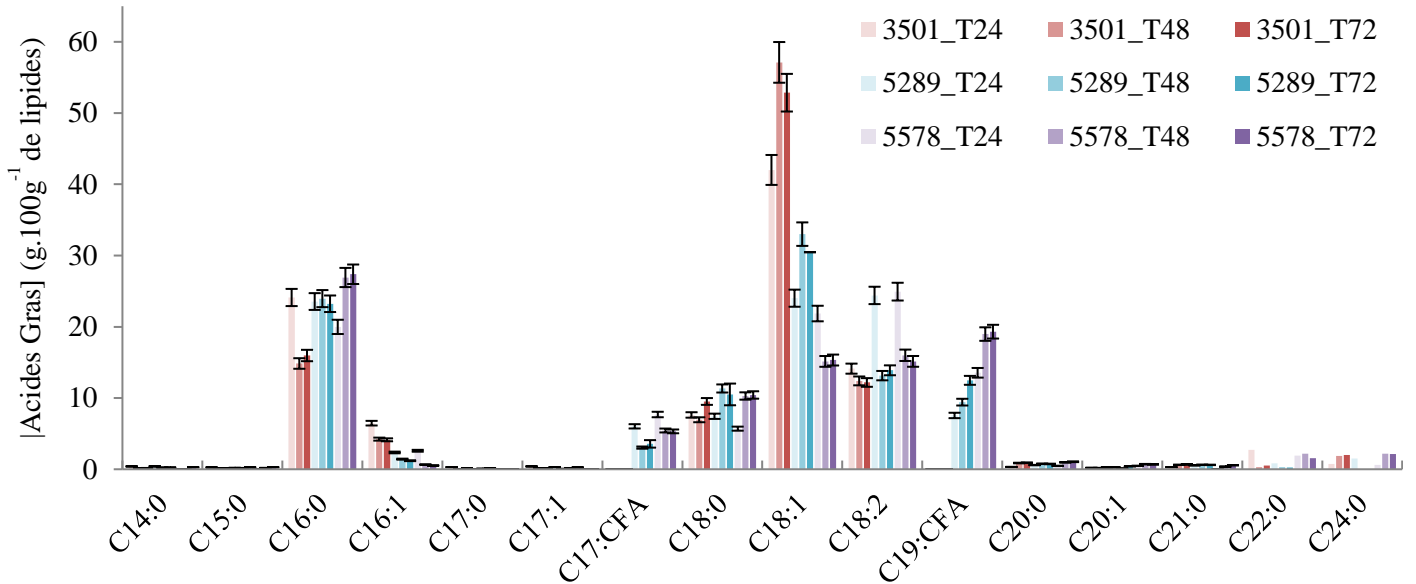


Figure 81 : Profil en acides gras totaux chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

Malgré des teneurs en CFA plus intéressantes chez la souche JMY5578 (24,6 comparées à 16,04 g CFA.100g de lipides⁻¹ chez JMY5289), elle ne dispose en réalité que de 4,5 g CFA.g de MS⁻¹ comparés à 5,0 g de CFA.g de MS⁻¹ chez JMY5289. Le gène *LROI* codant pour une phospholipide diacylglycérol acyltransférase (PDAT) permet d'augmenter le pool d'acides gras d'intérêt au sein des lipides totaux chez JMY5578, tandis que l'optimisation de la voie Kennedy *via* la surexpression de *GPD1* et *DGA2* augmenterait la teneur en lipides totaux chez JMY5289. Cumuler ces deux types de modification génétique serait un excellent moyen d'accroître le rendement en CFA dans le cadre de notre étude.

➤ Espèces lipidiques.

Les triglycérides sont les lipides préférentiellement exploités par les industriels pour leur plus grande facilité d'extraction et de transformation (transestérification notamment) par rapport aux phospholipides (deux acides gras par glycérol) (Ren *et al.*, 2017). Cependant, les acides gras cyclopropanes sont plutôt synthétisés sur les phospholipides (Wang *et al.*, 1992). Il est alors primordial d'obtenir des informations complémentaires sur la présence et la quantité de chaque classe de lipides au sein des lipides totaux, ainsi que sur profil en acides gras de

chacune de ces classes. La composition en lipides a tout d’abord été établie par séparation (CCM) et quantification (GC-FID) des lipides précédemment extraits (figure 82), puis le profil de chaque classe a pu être établi (figure 83).

La figure 82 nous montre une très légère diminution de la teneur en triglycérides chez la souche JMY5289 (-2%), au profit des autres classes. L’aspect significatif de ces résultats serait néanmoins à discuter. Au contraire, la teneur en triglycérides a été réduite de près de 22% chez la souche JMY5578, essentiellement au profit des phospholipides. Ces résultats montrent que la non surexpression des gènes codant pour la DGAT et la G3PDH a conduit à une diminution de la capacité à accumuler des lipides de réserve (TAG), et à une augmentation de la proportion des diglycérides et phospholipides. Ces résultats sont en accord avec les teneurs en lipides totaux des souches JMY5289 (31,2 g.100g⁻¹) et JMY5578 (18,1 g.100g⁻¹).

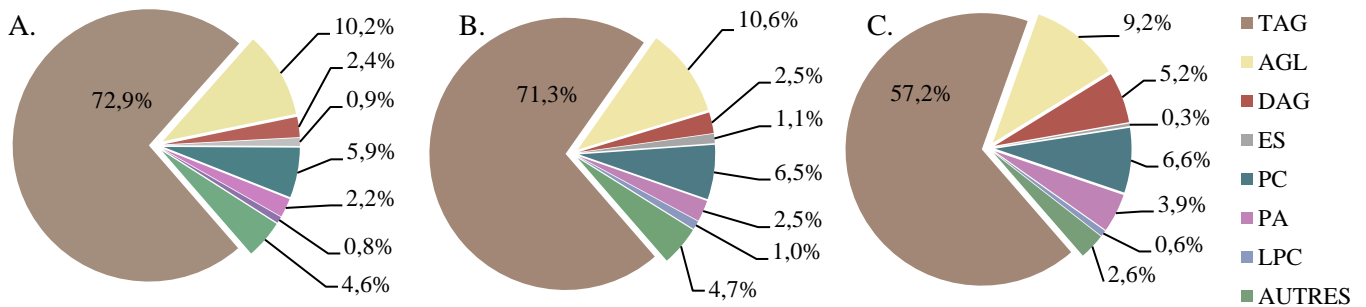


Figure 82 : Séparation, identification et quantification des espèces lipidiques par CCM et GC-FID chez les souches JMY3501 (A), JMY5289 (B) et JMY5578 (C) à T72.

Le profil en acide gras a été caractérisé pour certaines de ces fractions lipidiques : DAG, PC et TAG (figure 83). Ces résultats ont permis d’appréhender de manière plus précise la synthèse et la prise en charge des acides gras cyclopropanes lors de l’accumulation des lipides.

En effet, le C19:CFA semble être majoritairement présent sur les PC (33,9% chez JMY5578 et 21,4% chez JMY5289), par rapport aux TAG (17,5 chez JMY5578 et 10,5% chez JMY5289), ainsi qu’aux DAG (4,6 chez JMY5578 et 6,5% chez JMY5289). Ces résultats confirment l’implication des PDAT pour le transfert des CFA sur les TAG (transfert optimisé chez JMY5578 dont le gène *LROI* a été surexprimé) et la faible activité des phospholipases et/ou de la sélectivité des GPAT et LPAAT pour les acides gras inhabituels (faible incorporation des CFA dans les DAG par rapport aux TAG). Des études complémentaires de spécificité et sélectivité de ces enzymes pour les acides gras saturés, insaturés ou cyclopropanes seraient bénéfiques dans le cadre de cette étude.

De plus, malgré un transfert plus important des CFA entre PC et TAG (+67%), la teneur en C19:CFA au sein des PC reste toujours plus importante chez JMY5578 par rapport à celle de JMY5289 (+58%) : la CFAS et le donneur de méthyle (SAM) ne seraient alors pas limitant pour l'accumulation des CFA.

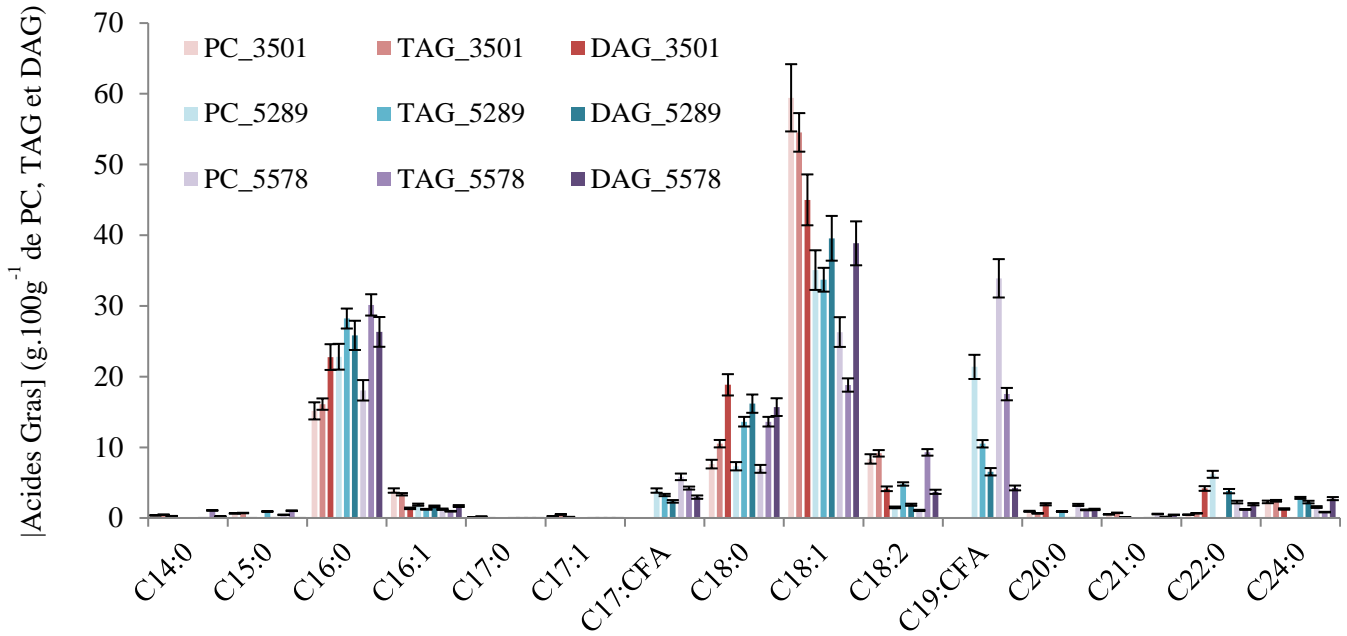


Figure 83 : Profil en acides gras des DAG, PC et TAG chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

➤ Production de lipides et aspect morphologique.

La production différentielle de lipides, quantitative (-42% entre JMY5289 et JMY5578) et qualitative (présence de CFA ou non chez JMY5289 et JMY3501) n'a provoqué aucune variation de la croissance entre les trois souches testées. On peut alors se demander l'impact de ces acides gras inhabituels, généralement synthétisés sur les lipides membranaires, sur la morphologie des souches. Une analyse par microscopie à fluorescence a été réalisée en utilisant la coloration des lipides au rouge de Nil (principalement les corps lipidiques) au sein des cellules de levure (Kimura *et al.*, 2004).

La figure 84 illustre l'observation en microscopie à fluorescence (x400) des cellules des souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 à T₂₄. La souche JMY3501 présente des cellules soit légèrement bombées et pleines de lipides, soit très allongées (filament) et contenant également plusieurs corps lipidiques. En effet, la levure *Yarrowia lipolytica* est capable de montrer différentes morphologies cellulaires lorsque son environnement est modifié, allant d'une forme

ronde typique des levures à une forme mycélienne, d'hyphes ou de filaments (Morales-Vargas *et al.*, 2012 ; Martinez-Vazquez *et al.*, 2013). Cette transition morphologique est déclenchée suite à un stress tel qu'une pression osmotique élevée, un pH acide, une limitation en nutriments ou autres conditions limitantes pour la croissance (carence en azote et acidification ; Xie, 2017). Ces modifications permettent par exemple d'augmenter la surface d'échange entre le milieu de culture et la cellule afin d'assimiler plus de nutriments. Cette transition dimorphique est notamment permise grâce à l'expression de facteurs de transcription tels que HOY1 et MHY1, ou les gènes impliqués dans la transduction du signal comme *ZNC1*, *CLA4*, *TPK1*, *RAC1* et *STE1* (Martinez-Vazquez *et al.*, 2013).

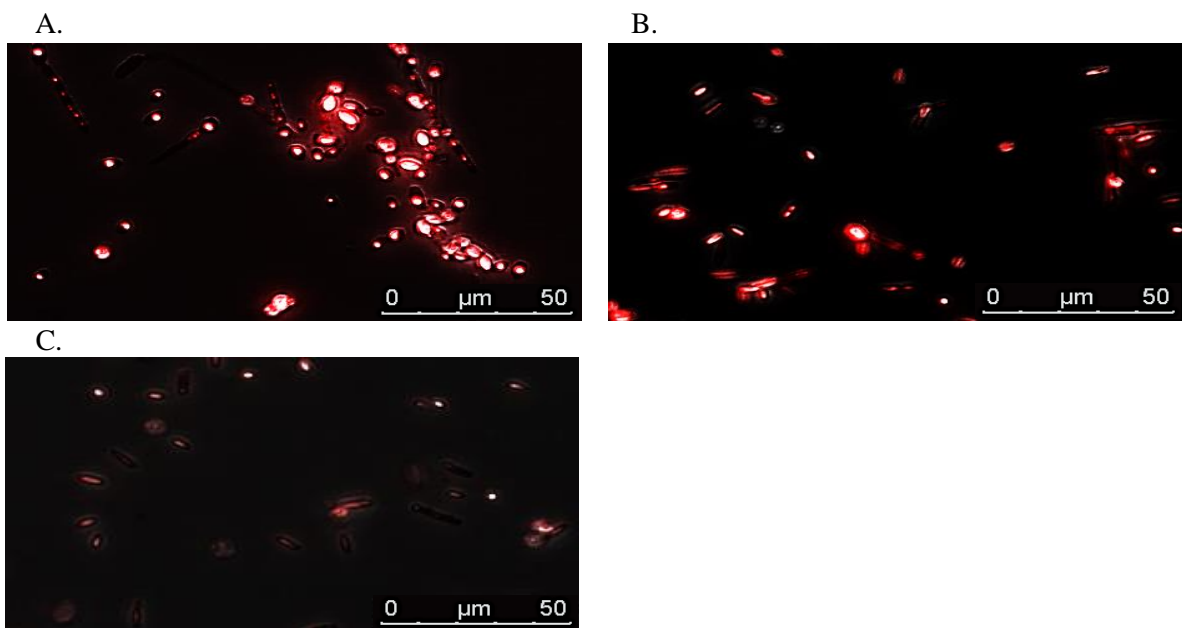


Figure 84 : Observation par microscopie à fluorescence des souches JMY3501 (A), JMY5289 (B) et JMY5578 (C) colorées au rouge de Nil à T24 (x400).

La souche JMY5289 (figure 84B) semble contenir une quantité de lipides équivalente à la souche JMY3501, mais présente des cellules en moyenne moins grosses et plus allongées. De même, les corps lipidiques sont très peu marqués chez la souche JMY5578 (figure 84C), peu accumulatrice de lipides (-42% par rapport à JMY5289). Elle présente le même allongement de ses cellules que JMY5289 avec cependant très peu de cellules rondes.

L'incorporation des CFA au sein des membranes de la levure semble donc avoir un effet (direct ou non) sur la morphologie de la cellule. Ces changements pourraient avoir un lien avec la carence en azote du milieu minimum utilisé et avec l'altération des transporteurs d'ammonium (vitesse d'assimilation du NH_4Cl plus faible que pour la souche non productrice ;

figure 79). Une adaptation de la morphologie de la cellule a probablement ainsi permis de rétablir une consommation de l'azote proche de la normale. Des analyses supplémentaires concernant le niveau d'expression de gènes impliqués dans la transition dimorphique permettraient de confirmer la potentielle corrélation entre ces différents facteurs.

2.1.1.3.2. Synthèse des protéines et acides aminés.

Les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 présentent une croissance similaire avec une accumulation des lipides différente. Un mode d'assimilation du carbone différent a pu être noté. Les variations observées pourraient également avoir un effet sur la synthèse des protéines et leur composition en acides aminés.

La figure 85A suggère une synthèse identique des protéines entre les souches productrices de CFA JMY5289 et JMY5578 : respectivement 37,6 et 41,6 g.100g de MS⁻¹ à T₂₄, 26,3 et 25,5 à T₄₈ et 26,0 et 24,6 à T₇₂. Ceci rend compte d'une diminution de la teneur en protéines au cours de la croissance jusqu'à atteindre un plateau à T₄₈. Chez la souche JMY3501, la teneur en protéines ne diminue qu'après T₄₈ pour atteindre une valeur similaire aux deux autres souches. La teneur en protéines semble alors plutôt conservée, quelle que soit la génétique de la souche à T₂₄ et T₇₂. Cependant, la production de CFA semble avoir induit une redirection métabolique plus tôt (T₄₈) entraînant une réduction de la quantité de protéines au sein de la cellule.

Afin de comparer ces résultats avec les courbes d'assimilation en azote (figure 79), ces résultats ont été convertis en g.L⁻¹ par l'intermédiaire des données relatives à la croissance des souches (figure 78B). La souche JMY3501 présente alors une assimilation du NH₄Cl deux fois plus rapide par rapport aux souches JMY5289 et JMY5578 se traduisant par une synthèse deux fois plus intense en protéines (0,18 g.L⁻¹.h⁻¹) par rapport à celle observée pour les souches JMY5289 (0,08 g.L⁻¹.h⁻¹) et JMY5578 (0,06 g.L⁻¹.h⁻¹). Malgré cette différence de vitesse de synthèse en début de croissance, la concentration diminue après T₄₈ (source d'azote épuisée), rendant alors compte d'une re-consommation des protéines afin d'atteindre une teneur similaire aux autres souches à T₇₂. Au contraire, les souches productrices de CFA ne semblent pas remobiliser leurs protéines après T₄₈. Un plateau est observé malgré des teneurs décroissantes dues à l'accumulation des lipides dans la biomasse.

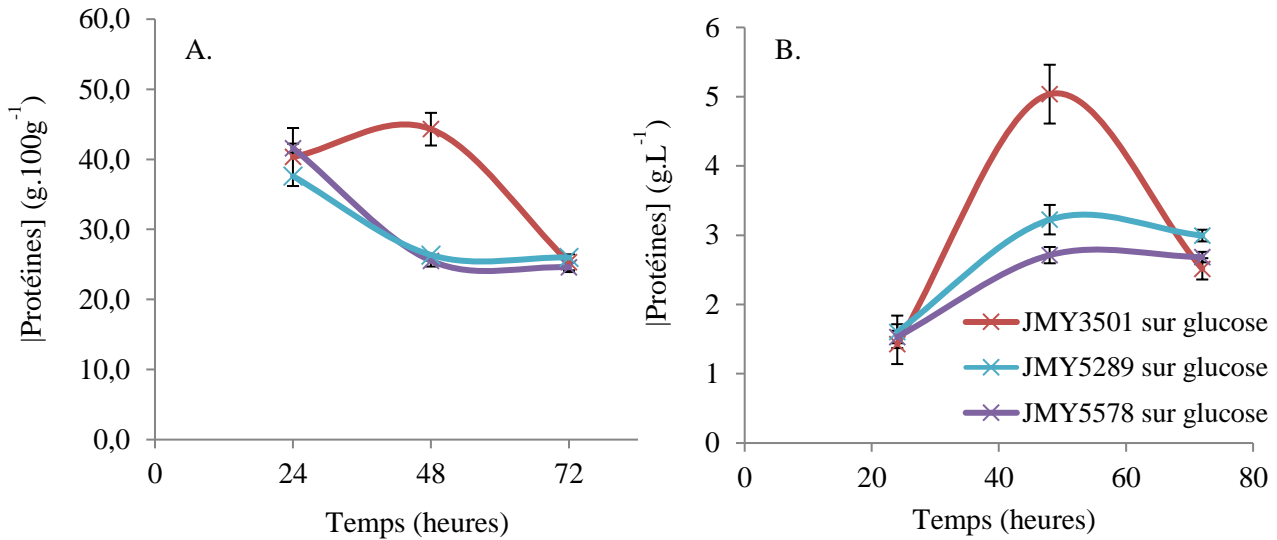


Figure 85 : Synthèse des protéines totales chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

Ces remarques sont plutôt en accord avec une altération de l'intégrité membranaire (présence des CFA) ayant pour conséquence une perturbation des transporteurs de NH_4Cl , ce qui entrainerait une réduction de la vitesse de synthèse des protéines (pentes plus faibles ; figure 85B). On a alors une corrélation négative entre synthèse des protéines et teneur en CFA. Ceci serait à vérifier par l'analyse des teneurs en protéines d'autres souches productrices de CFA, ou dans des conditions induisant une altération de la synthèse de CFA.

Une analyse du profil en acides aminés a été réalisée (figure 86) afin de vérifier d'une part si la production de CFA a également entraîné une altération de certaines voies de biosynthèse des acides aminés (JMY3501/JMY5289) et d'autre part si la modification génétique des voies de synthèse et transfert des lipides a provoqué certains changements dans le profil en acides aminés (JMY5289/JMY5578).

La figure 86 montre tout d'abord certaines similarités entre les différentes souches. En effet, la teneur en Arg et en Lys augmente au cours du développement quelle que soit la souche, tandis que l'Ala, Val (tous deux issus du pyruvate mitochondrial) et l'His sont assez peu représentés. Néanmoins, certains acides aminés présentent un profil très différent. La teneur en Asp, Glu et Pro (dérivées du Glu) augmente chez la souche JMY3501, tandis qu'elle diminue ou se stabilise chez les souches productrices de CFA. Au contraire, la proportion de la Phe, Tyr (issus de l'E4P et du PEP) et l'Ile augmente chez les souches JMY5289 et JMY5578 tandis qu'elle diminue fortement chez notre témoin.

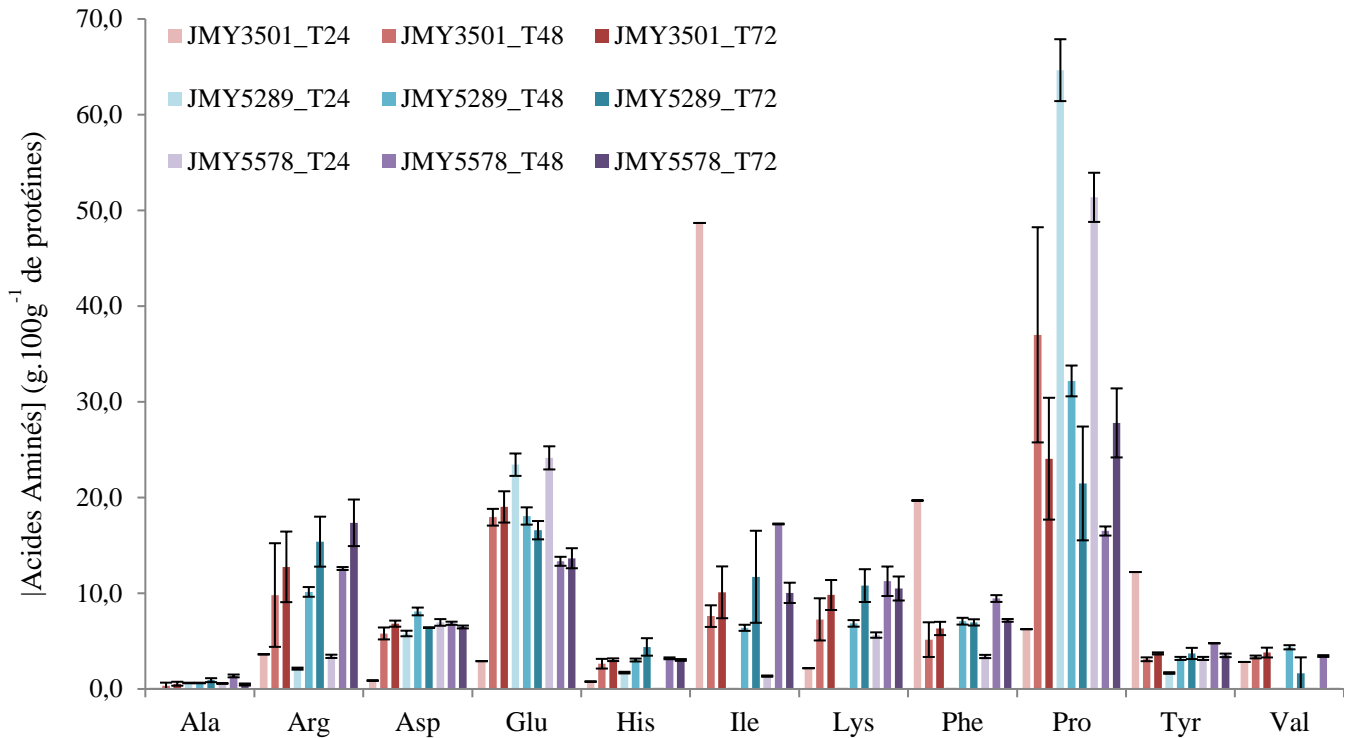


Figure 86 : Profil en acides aminés chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 au cours du temps.

Il est assez difficile d'établir une corrélation entre la teneur en acides aminés et les autres paramètres définis jusqu'à présent. Cependant, certaines voies métaboliques semblent spécifiquement affectées par la présence de CFA. La biosynthèse d'acides aminés issus à la fois du PEP et de l'E4P semblerait sous-réglée en début de croissance chez les souches JMY5289 et JMY5578. Des analyses plus poussées sur les flux métaboliques pourraient permettre d'établir des hypothèses quant aux redirections orchestrées par la cellule suite à une production d'acides gras inhabituels.

2.1.1.3.3. Synthèse des glucides.

Il a été noté précédemment que la synthèse de glycogène et plus généralement des glucides était induite lors de conditions de stress et que leur accumulation était susceptible de concurrencer la production des triglycérides par compétition du carbone (Bhutada *et al.*, 2017).

Les teneurs en glucides totaux présents au sein de la cellule chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 ont alors été déterminées et représentées au cours du temps (figure 87). La souche optimisée pour la voie Kennedy et non productrice de CFA (33,9 g de lipides.100g de MS⁻¹) contient 37,5 g de glucides.100g de MS⁻¹ au stade final de la culture. Des résultats similaires sont observés chez la souche JMY5289 avec 31,2 g de lipides et

40,3 g de glucides.100g de MS⁻¹. Cependant, la souche non optimisée pour la voie Kennedy, JMY5578, montre une accumulation rapide pour atteindre un plateau dès T₄₈ à 55,8 g de glucides.100g de MS⁻¹, soit une augmentation de 39% par rapport ce qui a été enregistré chez JMY5289.

La production d'acides gras inhabituels ne semble pas avoir d'impact sur la teneur en glucides totaux. Des analyses biochimiques complémentaires permettraient de vérifier la nature de chacun de ces sucres (monosaccharides, disaccharides ou polysaccharides, et notamment le glycogène) afin de confirmer ou non les résultats obtenus chez JMY3501 et JMY5289.

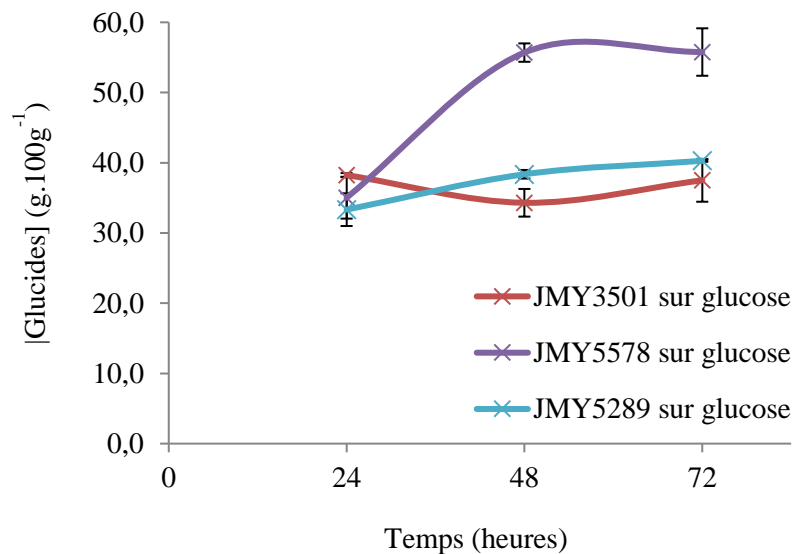


Figure 87 : Synthèse des glucides totaux au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

La surexpression de gènes impliqués dans l'accumulation des lipides (voie Kennedy) permet une augmentation de la teneur en lipides au détriment de la synthèse en glucides (souches JMY3501 et JMY5289 ; figure 87). De plus, Bhutada *et al.* (2017) ont observé une augmentation de 60% du contenu en TAG chez un mutant de *Yarrowia lipolytica* dont la glycogène synthase a été supprimée ($\Delta gsy1$). La biomasse était alors dépourvue de glycogène (8,5% chez le WT). Une compétition du carbone pour les deux voies métaboliques impliquées dans le stockage (TAG et glycogène) est donc une certitude. Dans le cadre d'une optimisation de la production des CFA *via* une amélioration du contenu en lipides totaux, la délétion du gène *GSY1* serait une approche intéressante.

2.1.2.4. Acidification du milieu.

Dans le cadre de notre étude, la culture de *Yarrowia lipolytica* en erlenmeyer et sur milieu minimum (glucose) n'a pas entraîné de libération de citrate malgré une acidification importante du milieu (figure 88). Les deux souches productrices de CFA n'ont produit aucun métabolite de manière significative pouvant expliquer la diminution du pH variant entre 2,6 et 2,8 à T₇₂. Un taux d'assimilation du carbone plutôt faible (de 0,8 à 1,3 g.L⁻¹.h⁻¹ ; figure 79) serait donc susceptible d'expliquer l'absence de sécrétion d'acide organique. Le CO₂ et les ions H⁺ générés par les pompes à protons suite à la consommation du NH₄⁺ seraient alors les causes principales de l'acidification du milieu de culture malgré la présence d'un tampon.

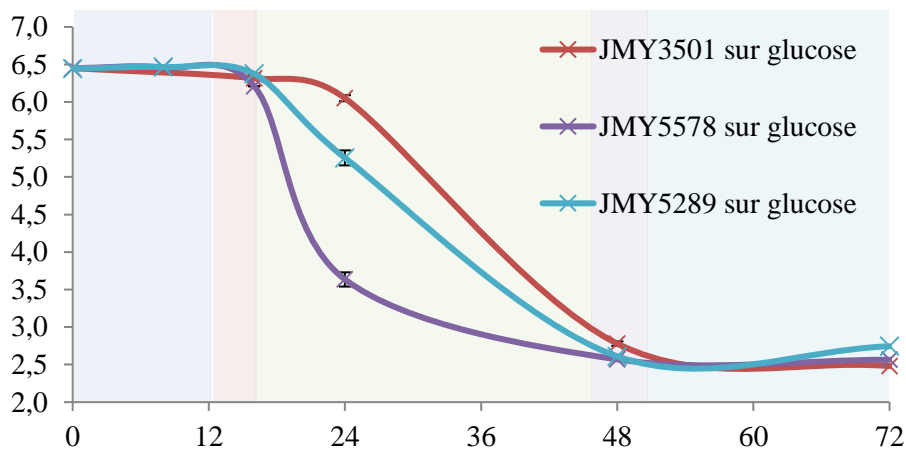


Figure 88 : Evolution du pH au cours du temps chez les souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

La figure 88 nous montre une acidification plus rapide chez la souche JMY5578 (vitesse maximale d'acidification de $\sim 0,4$ par rapport à $\sim 0,1$ points de pH.h⁻¹ pour les souches JMY3501 et JMY5289). Cette acidification est également plus précoce (T₁₆) chez les souches productrices de CFA en comparaison de la souche JMY3501 ($\sim T_{22}$ -T₂₄). L'assimilation de la source d'azote (plus rapide chez la souche JMY3501 ; figure 78) ne contribue donc pas seule à la libération de protons et à l'acidification du milieu. En effet, la perturbation des transporteurs d'ammonium par les CFA membranaires devrait réduire la libération d'ions H⁺ chez ces deux souches, ce qui ne semble pas être le cas ici. On peut alors suggérer une libération plus importante de CO₂ chez les souches productrices de CFA qui pourrait être en partie vérifiée par un bilan carbone ou l'analyse des flux métaboliques.

De plus, la croissance de la souche JMY5578 ne semble pas ou peu affectée (figure 78) par cette chute du pH du milieu extracellulaire (figure 88). Cette observation pourrait

vraisemblablement être expliquée par une résistance au stress acide conférée par les CFA et répertoriée chez les bactéries extremophiles et les *archaea* (Brown *et al.*, 1997 ; Siliakus *et al.*, 2017). Ces acides gras présentent des structures cycliques (acides gras cyclopropanes, cyclopentanes, cyclohexanes, etc) et permettent ainsi le maintien de l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane (propriétés dynamiques et structurales) afin de faire face à des conditions d'acidité extrême (Brown *et al.*, 1997 ; Siliakus *et al.*, 2017).

2.1.2.5. Conclusion partielle : Impact de la production des CFA sur la physiologie et la composition biochimique de la souche JMY3501.

La levure *Yarrowia lipolytica* dont la voie Kennedy a été optimisée est capable d'accumuler jusqu'à 33,9 g de lipides.gMS⁻¹ en milieu minimum (glucose) carencé en azote (rapport molaire C/N = 6) (figure 80). Lorsque cette souche exprime le gène de la CFA synthase d'*E. coli* (JMY5289), sa croissance, l'assimilation du carbone et l'acidification du milieu de culture sont peu affectées (figures 78, 79 et 88). La teneur en lipides est réduite de 8% (figure 80), et sont alors constitués de 16,0 % de CFA (5,0 g de CFA.100g de MS⁻¹, soit 0,58 g de CFA.L⁻¹) (figure 81). En contrepartie, cette souche présente des teneurs en glucides et protéines respectivement de 7 et 3 % plus importantes (figures 85 et 87). Elle produit également 16% de biomasse en plus par rapport à JMY3501 (figure 78).

La souche JMY5578, n'a pas été optimisée pour la voie Kennedy, mais exprime la CFAS et le gène *LROI*. Malgré une croissance conservée (figure 78), elle produit 8% de biomasse en moins par rapport à la souche JMY5289. De plus, l'assimilation du carbone est plus lente et l'acidification plus rapide (figures 79 et 88). Sa biomasse présente des teneurs en lipides et en protéines réduites respectivement de 42 et 5% (figures 80 et 85), et au contraire une augmentation de 38% de la teneur en glucides a été enregistrée (figure 87). Ce résultat confirme donc une compétition du carbone pour la synthèse des lipides et des glucides et principalement du glycogène (figure 85 ; Bhutada *et al.*, 2017). Cette souche produit cependant jusqu'à 24,6% de CFA dans ses lipides (4,5 g de CFA.100g de MS⁻¹, soit 0,49 g de CFA.L⁻¹). Cette souche ne permet donc pas d'obtenir une quantité supérieure en CFA par quantité de biomasse.

La synthèse des acides gras cyclopropanes semblent induire certaines perturbations des transporteurs membranaires d'ammonium entraînant alors des différences quant au comportement des souches : allongement des cellules (figure 84), assimilation du NH₄Cl ralentie (figure 79), diminution plus rapide de la teneur en protéines au cours du temps (figure

85) et acidification plus rapide du milieu de culture par l'action des pompes à protons et la libération de CO₂ (figure 88). Un lien encore assez méconnu existerait entre ces différents paramètres et leur implication dans les mécanismes d'homéostasie relatifs au pH.

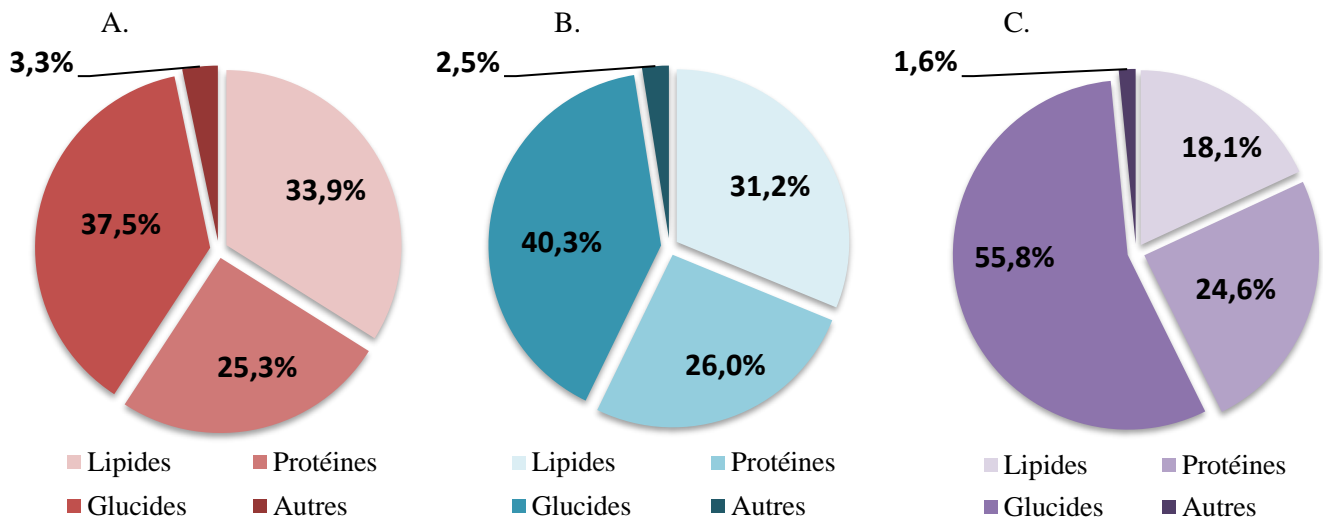


Figure 89 : Composition biochimique de la biomasse des souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578 à T72.

2.2. Caractérisation des flux métaboliques chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la synthèse des lipides chez la levure *Yarrowia lipolytica* (métabolisation de deux sources de carbone et accumulation d'acides gras inhabituels) et dans le but de les appréhender d'un point de vue plus dynamique, des analyses fluxomiques ont été entreprises.

L'analyse des flux métaboliques par MFA (marquage au ¹³C) permet ici de développer un modèle robuste basé à la fois sur des données bibliographiques, physiologiques et biochimiques. Zhang *et al.* (2016) ont développé un modèle permettant d'appréhender la carence en azote afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu durant ce phénomène. Liu *et al.* (2016) ont entrepris l'étude de l'assimilation d'une source alternative de carbone (¹³C-acétate) pour l'accumulation des lipides. D'autres équipes se sont également intéressés à la production de citrate par MFA (Sabra *et al.*, 2017) ainsi que par FBA (Kavšček *et al.*, 2015), afin d'optimiser leur production en réalisant des simulations *in silico*. Récemment, Bhutada *et al.* (2017) ont également exploité cette technique afin d'étudier la compétition du carbone pour la synthèse de glycogène et des lipides. L'ensemble de ces travaux permettra de développer un modèle intégrant les différentes réactions du métabolisme central et lipidique chez *Yarrowia lipolytica*.

L'analyse du fluxome requiert alors une culture des cellules avec un substrat marqué, notamment au ^{13}C . Les enrichissements isotopiques des différents métabolites cellulaires peuvent être déterminés par MS (isotopomères de masse) ou par RMN (isotopomères de position) (O'Grady *et al.*, 2012). Ils sont alors intégrés dans le modèle préalablement établi, de même pour les vitesses de réaction des flux externes (assimilation du carbone, production de lipides, glucides et protéines). Les flux métaboliques sont alors calculés grâce au logiciel INCA (Young, 2014). Ces données MFA servent ensuite à développer un modèle FBA fiable en impliquant des contraintes à certaines réactions et prenant en compte une fonction objective. Le modèle FBA permettra alors de démultiplier les expériences à moindre coût et avec un temps d'analyse réduit : variation des conditions de culture et des souches étudiées, simulation *in silico* de modifications génétiques par MOMA (Segre *et al.*, 2002), etc.

2.2.1. Analyses des flux métaboliques par MFA.

2.2.1.1. Construction du modèle et estimation des flux métaboliques.

L'ensemble des études de fluxomique réalisées sur *Yarrowia lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015 ; Liu *et al.* 2016 ; Sabra *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Bhutada *et al.* 2017) a permis de développer un modèle prenant en compte les différentes réactions du métabolisme central et lipidique chez *Yarrowia lipolytica*. Le réseau contient alors 101 réactions faisant intervenir plus de 60 métabolites dans deux compartiments (cytosol et mitochondrie ; figure 90 ; annexes 9, 10 et 11). Les réactions de la glycolyse (rouge foncé), la voie des pentoses phosphates (rose), le cycle de Krebs et voie du glyoxylate (beige), la synthèse d'acétate (orange) et sécrétion de citrate (gris) ainsi que la voie de biosynthèse des lipides (jaune), des glucides de réserve (rouge) et des acides aminés (bleu) ont été intégrés et le réseau est présenté sur la figure 90. Seul, le glucose ou le glycérol, est considéré comme métabolite entrant, tandis que les flux sortants sont représentés par les principaux composés de la biomasse (TAG, protéines, glucides de réserve), le citrate et le CO_2 .

Le seul cofacteur ajouté au réseau est le NADPH. L'enzyme malique est connue pour participer à l'approvisionnement en co-facteurs pour la synthèse des triglycérides chez les levures oléagineuses. En effet, la surexpression du gène codant pour cette enzyme a conduit à une augmentation de la teneur en lipides chez les espèces *Rhodotorula glutinis* et *Mucor circinelloides*. (Wynn *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2007). Il a également été rapporté que l'activité de l'enzyme malique augmentait de manière significative après l'initiation de l'accumulation des lipides chez *Yarrowia lipolytica* (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014).

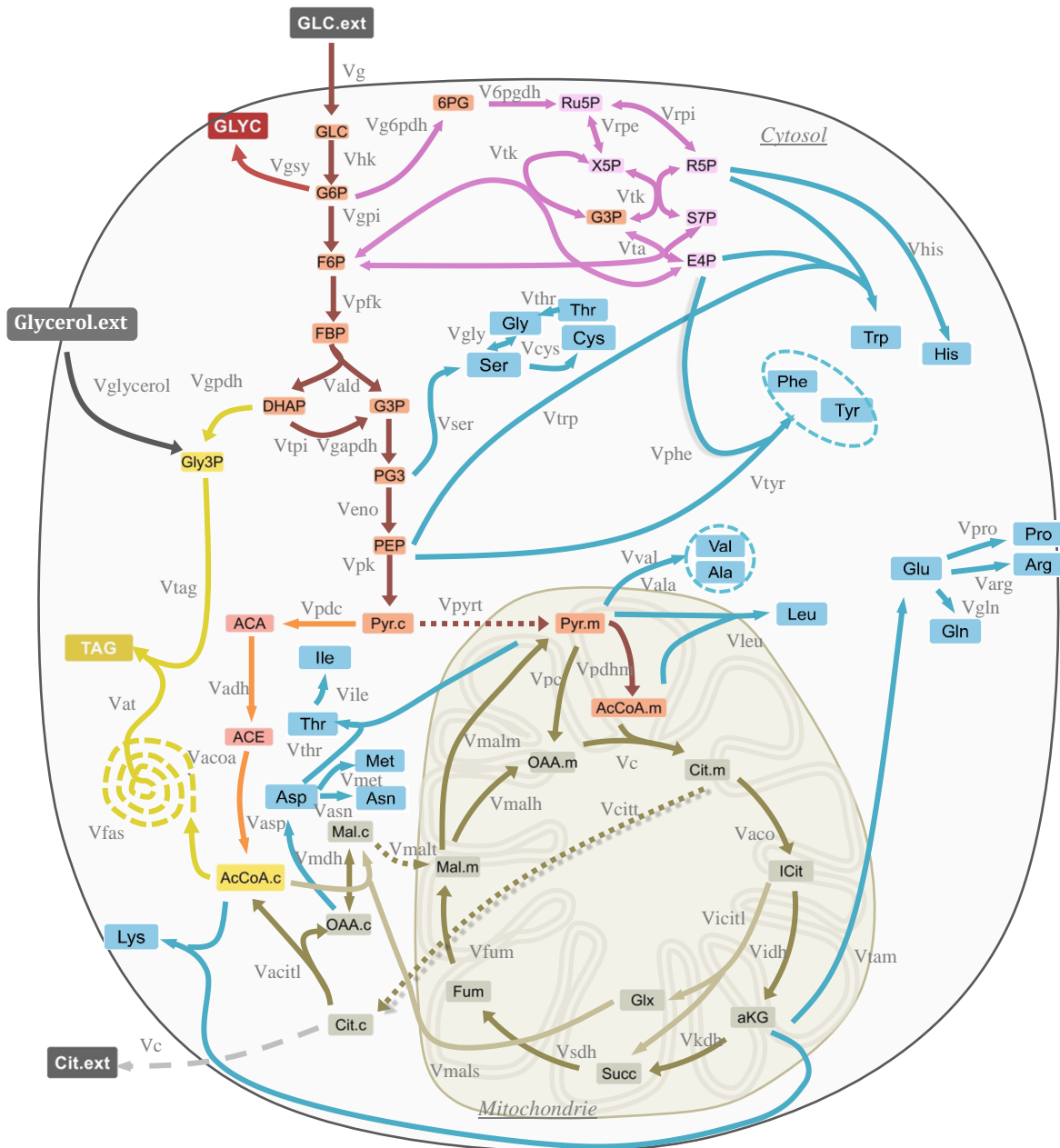


Figure 90 : Réseau métabolique d’une cellule de levure *Yarrowia lipolytica*.

La liste des abréviations, des métabolites et des réactions est présente en annexes 9, 10 et 11.

D’autres résultats sont plutôt en désaccord avec ces données, suggérant même la non-implication de l’enzyme malique dans la génération de NADPH pour la synthèse lipidique : identification de l’enzyme uniquement dans la mitochondrie (Beopoulos *et al.*, 2011) et préférence pour le NAD⁺ par rapport au NADP⁺ (Zhang *et al.*, 2013 ; Ratledge, 2014). Des analyses de ¹³C-MFA ont d’ailleurs montré que le NADPH était principalement généré par la

voie des pentoses phosphates (PPP) (Wasylenko *et al.*, 2015). Dans le modèle présenté ici, seules les réactions de la PPP permettront la synthèse de NADPH (annexe 10 et 11).

D'autres contraintes ont également été appliquées au réseau et notamment la notion de « pools d'acides aminés » issus d'un même précurseur comme c'est le cas de la Phe et la Tyr, le Glu et la Gln, l'Ala et la Val et la Ser, la Gly et la Cys. Ainsi, il sera possible de pallier à certaines difficultés relatives à la correspondance entre les valeurs expérimentales de flux et celles mesurées par le logiciel INCA ou encore à l'enrichissement isotopique mesuré ou simulé par le logiciel.

Afin d'étudier l'effet de différentes sources de carbone sur le métabolisme, les cellules ont été cultivées sur milieu minimum en présence de glucose ou de glycérol à 30 g.L⁻¹ et durant 24h. Le substrat carboné apporté pour ce type d'analyse est souvent un mélange de substrat marqué et non marqué (Liu *et al.*, 2016 ; Sabra *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016). Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi les ratios suivants :

- [U¹³C₆]-D-glucose (20%) / [U¹²C₆]-D-glucose (80%) pour le glucose.
- [U¹³C₃]-glycérol (5%)/[¹³C]-glycérol (5%)/[U¹²C₃]-glycérol (90%) pour le glycérol.

Les données biochimiques relatives à la croissance, l'assimilation des substrats et la composition de la biomasse ont permis de quantifier les flux extracellulaires au métabolisme : flux d'entrée de glucose, de sortie du citrate, synthèse des protéines constitutives et accumulation des réserves lipidiques et glucidiques (tableau 10). La teneur en acides nucléiques ayant été estimée à <1%, les flux extracellulaires n'ont alors pas été calculés. De plus, suite à l'extraction des protéines et acides aminés, des lipides et acides gras, ainsi que des acides organiques, les enrichissements isotopiques ont été analysés par spectrométrie de masse et indexés en annexes 12 et 13.

L'ensemble de ces paramètres a permis d'estimer les flux métaboliques nets (réactions s'effectuant dans un seul sens) et les flux d'échange (réactions s'effectuant dans les deux sens) pour chacune des deux conditions, avec un fit dont la SSR est comprise dans l'intervalle de confiance. La comparaison des fit mesurés et simulés sont répertoriés en annexe 12 (glucose) et 13 (glycérol). Le calcul des valeurs de flux par la méthode de « Monte-Carlo » (plus efficace que la méthode « parameter continuation » : Antoniewicz *et al.*, 2006) a été réalisée (annexes 13) et sera celle utilisée pour le reste de la discussion.

Métabolites	JMY3501_Glc	JMY3501_Gly	Métabolites	JMY3501_Glc	JMY3501_Gly
glucose/glycérol	1354,7	1539,9	Cys	0,0	0,0
C16:0	12,8	10,9	Glu	7,6	31,4
C16:1	3,4	2,1	Gly	0,0	0,0
C18:0	4,0	3,3	His	2,0	7,7
C18:1	22,2	19,5	Ile	149,7	24,6
C18:2	7,5	4,7	Leu	0,0	0,0
C20:0	0,2	0,3	Lys	6,0	22,5
C22:0	1,4	0,2	Met	0,0	0,0
C24:0	0,4	0,6	Phe	48,1	15,3
G3P	17,3	13,9	Pro	21,9	48,7
Glucides	212,0	143,8	Ser	0,0	0,0
Citrate	0,0	0,0	Thr	0,0	0,0
Ala	0,0	3,3	Trp	0,0	0,0
Arg	8,4	28,9	Tyr	27,2	7,2
Asn	0,0	0,0	Val	9,7	9,4
Asp	6,7	16,4	Ac. Nucl.	-	-

Tableau 10 : Calcul des flux métaboliques externes de la souche JMY3501 sur glucose et glycérol à T24.

Les flux présentés (en $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ont été calculés à partir des données biochimiques obtenues au paragraphe 2.1.1. et du taux de croissance spécifique μ (calculé par lecture graphique à partir de la figure 65 : $\mu_{\text{JMY3501 glc}} = 0,100 \text{ h}^{-1}$ et $\mu_{\text{JMY3501 gly}} = 0,069 \text{ h}^{-1}$).

2.2.1.2. Impact de la source de carbone sur les flux métaboliques.

Le glucose et le glycérol étant des substrats au nombre de carbones différent (respectivement six et trois), aux masses molaires différentes ($180,16$ et $92,09 \text{ g.mol}^{-1}$) et aux vitesses d'assimilation distinctes (figure 67), les analyses et discussions des flux métaboliques seront effectuées de manière indépendante dans un premier temps avant d'être réalisés de manière différentielle. Néanmoins, pour un milieu glucose concentré à 30 g.L^{-1} ($= 0,17 \text{ mol.L}^{-1}$), il aurait fallu ajouter $31,3 \text{ g.L}^{-1}$ ($0,34 \text{ mol.L}^{-1}$) en glycérol dans le milieu de culture afin d'obtenir un nombre de carbone équivalent en glucose et en glycérol : des concentrations massiques identiques entraînent donc un léger écart entre les deux conditions présentées ici.

2.2.1.2.1. Les flux métaboliques en milieu glucose.

Suite au calcul des flux effectué par ^{13}C -MFA (annexe 14), une carte représentant les flux métaboliques a été réalisée pour la souche JMY3501 à T₂₄ sur milieu minimum glucose

(figure 91). La largeur des traits est proportionnelle à l'intensité du flux (les valeurs ont été normalisées par le flux d'entrée du carbone et sont disponibles en annexe 14). Les flèches colorées en rouge correspondent à la voie préférentiellement utilisée et conduisant à la synthèse des triglycérides à partir de glucose.

Chez la souche JMY3501, le glucose emprunte majoritairement la voie glycolytique (figure 91). En effet, 1 mole de glucose pénétrant dans la cellule permet la formation de 1,1 mole de pyruvate cytosolique qui est alors transporté dans la mitochondrie pour générer de l'acétyl-CoA (figure 91 ; annexe 14). La citrate synthase prend en charge cet intermédiaire et le condense à une molécule d'acide oxaloacétique (OAA) pour former le citrate, qui est alors transporté en dehors de la mitochondrie dans le cytosol : 62% du citrate est exporté de cette manière (annexe 14). En effet, il a été largement démontré qu'une carence en azote pouvait induire une diminution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale, un ralentissement global du cycle de Krebs et un transport important de citrate afin d'être clivé en acétyl-CoA et OAA avec hydrolyse d'une molécule d'ATP (Zhang *et al.*, 2016). La conversion directe du pyruvate en acétyl-CoA cytosolique ne semble pas exploitée chez *Yarrowia lipolytica* dans ces conditions (figure 91 ; annexe 14). En effet, cette voie est initiée par la pyruvate décarboxylase, permettant la conversion du pyruvate en acétaldéhyde et CO₂, et serait plutôt impliquée lors du catabolisme des acides aminés (Mansour *et al.*, 2009). Chaque mole de glucose assimilée permet alors une disponibilité de ~ 0,34 moles d'acétyl-CoA, directement utilisée pour la synthèse des acides gras : carboxylation en malonyl-CoA, puis condensations successives.

De plus, ces résultats montrent que la cellule nécessite environ 77 moles de glucose pour la formation d'une seule mole de G3P. Le flux correspondant à la G3PDH semble être plutôt faible (17,3 μmoles de G3P.g de MS⁻¹.h⁻¹).

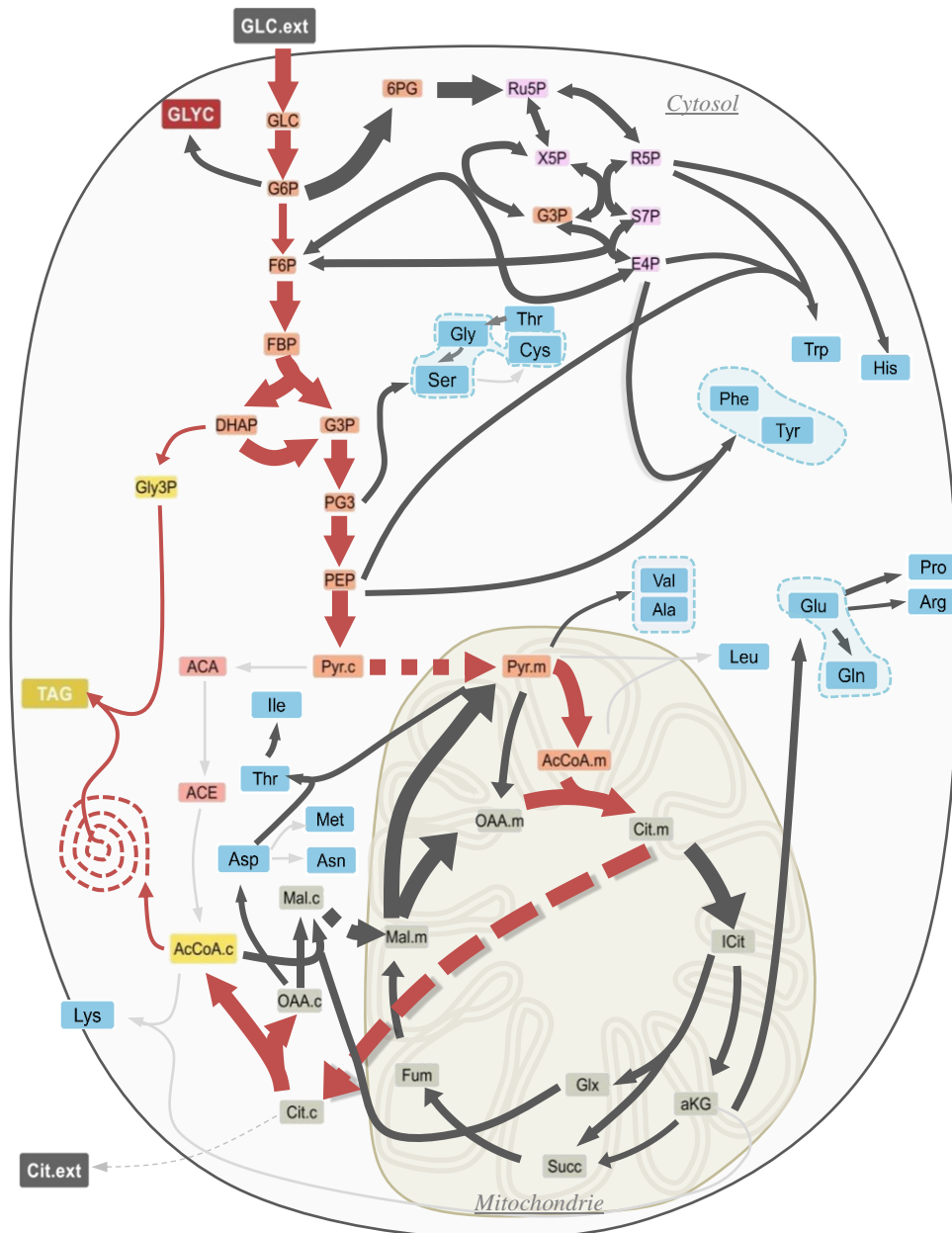


Figure 91 : Carte de flux métaboliques de la levure *Yarrowia lipolytica* JMY3501 cultivée en milieu minimum (glucose) à T₂₄.

La liste des abréviations et des réactions pour ce modèle se trouvent en annexes 9 et 10. Les flèches rouges correspondent à la voie métabolique empruntée pour la synthèse des triglycérides sur milieu glucose. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

La voie des pentoses phosphates constitue ici la seule voie de synthèse du NADPH d'après nos données (annexe 14) : 1,05 mole de NADPH produite par mole de glucose consommée. L'enzyme malique n'est donc pas impliquée dans l'approvisionnement en cofacteurs pour la synthèse des lipides : ce résultat est en accord avec les données de la littérature (Beopoulos *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Wasylenko *et al.*, 2015). Néanmoins,

des simulations effectuées en FBA (Kavšček *et al.*, 2015) ont montré qu'une augmentation de la teneur en lipides n'était pas directement corrélée à une demande croissante en NADPH (et acétyl-CoA). En effet, la synthèse des acides aminés consomme également beaucoup de précurseurs et cofacteurs. A vitesse d'assimilation de glucose constante, l'augmentation de la teneur en lipides entraîne une diminution de la teneur en acides aminés mais également une diminution modérée de la croissance (Kavšček *et al.*, 2015). Entreprendre la modulation de l'expression des gènes de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés dont les précurseurs sont communs avec la synthèse des acides gras pourrait être une piste envisageable pour l'augmentation de la synthèse de lipides mais loin d'être évidente pour obtenir un rendement maximum en lipides. Enfin, on a 2,4 moles de CO₂ libérées pour chaque mole de glucose consommée (2,6 déterminés par Kavšček *et al.*, 2015).

2.2.1.2.2. Les redirections métaboliques en milieu glycérol.

En milieu glycérol, la voie conduisant à la synthèse des acides gras est sensiblement la même qu'en présence de glucose, exceptées pour les deux premières phases de la glycolyse (l'activation des hexoses par phosphorylation et le clivage du fructose-1,6-bisphosphate en deux trioses) (figures 91 et 92). En effet, lorsqu'il pénètre dans la cellule à l'aide de transporteurs, le glycérol est d'abord phosphorylé en G3P par une glycérol kinase. D'après nos résultats, 65% du glycérol est pris en charge (annexe 14) dans les dernières phases de la glycolyse pour la synthèse de pyruvate (> 90% d'après les résultats obtenus par Sabra *et al.*, 2017). Après transfert et conversion du pyruvate en acétyl-CoA puis en citrate dans la mitochondrie, la majeure partie en est exportée afin d'être clivée (67%) en acétyl-CoA et OAA. Le flux de synthèse d'acétyl-CoA directement utilisable pour la synthèse des acides gras est alors 20% plus faible qu'en milieu glucose (363,8 par rapport à 455,1 $\mu\text{mol d'acétyl-CoA.g de MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$). La vitesse de synthèse des lipides est alors réduite de 20% en milieu glycérol à ce stade de la culture (annexe 14).

On peut suggérer une mise en cause du flux d'assimilation de la source de carbone ayant un effet négatif direct sur la synthèse des triglycérides. En effet, la vitesse d'assimilation du glycérol est 14% plus forte que celle du glucose (1540, par rapport à 1355 $\mu\text{moles.g de MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$; annexe 14). En revanche, ce résultat ne suffit pas à compenser un nombre d'atomes de carbone réduit de moitié chez le glycérol par rapport au glucose : en une heure et sur glycérol, 1 g de matière sèche de JMY3501 a assimilé 43% d'atomes de carbone en moins par rapport à une souche identique cultivée sur glucose.

Ainsi, les résultats avancés quant à une meilleure assimilation du glycérol due à l'absence de répression catabolique des hexoses (§ 2.1.1.) sont à nuancer (Ghillebert *et al.*, 2011 ; Kerkhoven *et al.*, 2016) : il est important de prendre en compte le nombre d'atomes de carbone réellement assimilés afin de comparer glucose (six carbones) et glycérol (trois carbones) de manière efficace.

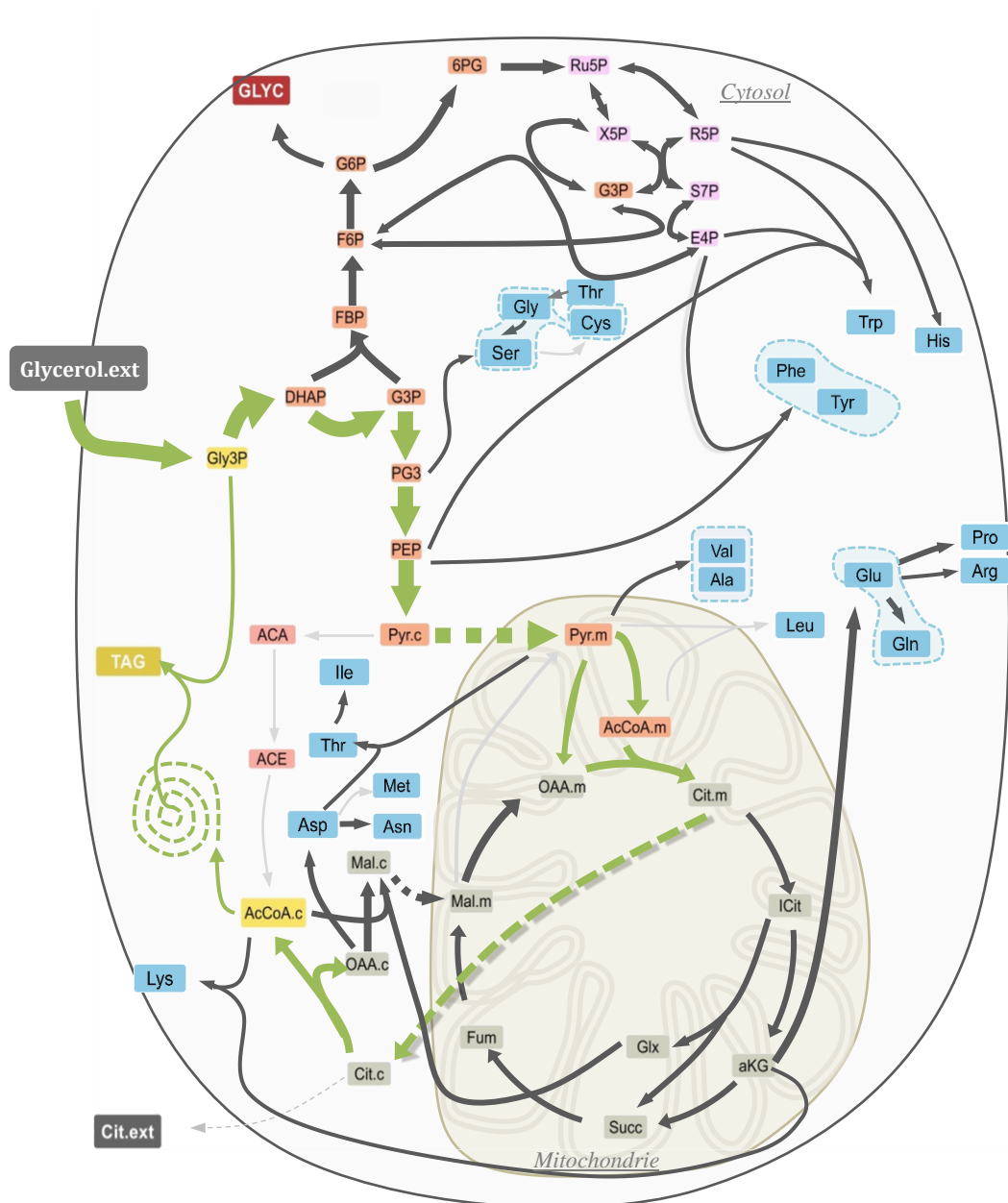


Figure 92 : Carte de flux métaboliques de la levure *Yarrowia lipolytica* JMY3501 cultivée en milieu minimum (glycérol) à T₂₄.

La liste des abréviations et des réactions pour ce modèle se trouvent en annexes 9 et 11. Les flèches vertes correspondent à la voie métabolique empruntée pour la synthèse des triglycérides sur milieu glycérol. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

La synthèse de G3P ne peut être mise en cause pour la réduction de la vitesse d'accumulation des triglycérides dans ce milieu. En effet, sa position dans l'enchaînement des réactions métaboliques (figure 92) en fait même un précurseur pour les autres voies (notamment la glycolyse ; Sabra *et al.*, 2017). De même, la néoglucogénèse et la voie des pentoses phosphates sont ici impliquées dans la génération de NADPH. Ce co-facteur essentiel à la synthèse des acides gras est produit de manière moins importante par rapport au milieu glucose (-41%) : 0,84 par rapport à 1,22 mmol de NADPH.g de MS⁻¹.h⁻¹ sur glucose (annexe 14). Ces données laissent sous-entendre une possible corrélation entre quantité de NADPH synthétisée et assimilation du carbone. Il est alors possible que la génération de cofacteurs soit un élément limitant dans le cadre de production de lipides sur milieu glycérol.

Ces résultats suggèrent donc que, malgré des concentrations massiques égales dans le milieu de culture initial (quantité d'atomes de carbone équivalente), la vitesse d'assimilation des carbones du glycérol semble ici bien trop lente par rapport à celle obtenue dans un milieu constitué de glucose et pourrait expliquer la plupart de ces différences.

2.2.2. Analyse des flux métaboliques par FBA.

2.2.2.1. Construction du modèle FBA et simulation des flux métaboliques.

Le modèle élaboré pour l'analyse des flux métaboliques par utilisation de glucose marqué au ¹³C (souche JMY3501 ; annexe 10) a été utilisé quasi à l'identique pour analyser les deux autres souches, JMY5289 et JMY5578. Seules, les réactions relatives à la synthèse des acides gras cyclopropanes ont été ajoutées dans ce second réseau (modèle en annexe 15). L'implication de l'enzyme malique et de la pyruvate décarboxylase a été minimisée dans ce modèle en accord avec les résultats obtenus en MFA chez la souche JMY3501 (annexe 14). Les flux extracellulaires ont alors été calculés (tableau 11) à partir des données biochimiques précédemment déterminés (figures 78, 79, 80, 81, 85, 86 et 87). Les flux métaboliques ont alors été simulés grâce à l'interface INCA (Young, 2014) et sont récapitulés en annexe 16.

Métabolites	5289	5578	Métabolites	5289	5578
Glucose	1110,4	1200,2	Asp	0,0	0,0
C16:0	7,8	4,6	Cys	0,0	0,0
C16:1	0,8	0,6	Glu	59,5	55,4
C17:CFA	2,0	1,8	Gly	0,0	0,0
C18:0	2,4	1,3	His	4,1	0,0
C18:1	8,1	5,0	Ile	3,5	3,5
C18:2	8,2	0,1	Leu	0,0	0,0
C19:CFA	2,6	5,7	Lys	0,0	13,0
C20:0	0,2	3,1	Met	0,0	0,0
C22:0	0,3	0,4	Phe	0,0	6,9
C24:0	0,5	0,1	Pro	209,9	150,5
G3P	10,9	7,6	Ser	0,0	0,0
Glucides	183,8	157,6	Thr	0,0	0,0
Citrate	0,0	0,0	Trp	0,0	0,0
Ala	2,6	2,2	Tyr	3,4	5,9
Arg	4,6	6,6	Val	0,0	0,0
Asn	16,3	17,6			

Tableau 11 : Calcul des flux métaboliques externes des souches JMY5289 et JMY5578 sur glucose à T₂₄.

Les flux présentés ici (en $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ont été calculés à partir des données biochimiques retrouvées en partie 2.1.2. et du taux de croissance spécifique μ calculé par lecture graphique à partir de la figure 78 : $\mu_{\text{JMY5289}} = 0,099 \text{ h}^{-1}$ et $\mu_{\text{JMY3501 gly}} = 0,081 \text{ h}^{-1}$. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

2.2.2.2. Impact de la production des CFA sur une souche oléagineuse.

Dans un premier temps, seuls les flux métaboliques des souches JMY3501 et JMY5289 ont été comparés. En effet, ces deux souches dont la synthèse des triglycérides a été optimisée ($\Delta\text{pox1-6}$, Δtgl4 , pTEF-GPD1-URA3ex, pTEF-DGA2-LEUex) ne diffèrent que par la capacité de JMY5289 à synthétiser des CFA par l'intervention de la CFA synthase (pTEF-EcCFAS-LEU2ex). Ainsi, une carte de flux a pu être réalisée à partir du réseau métabolique élaboré pour la souche JMY3501 cultivée sur glucose (figure 90). Cette carte représente les flux métaboliques différenciellement impliqués dans le métabolisme central et lipidique entre ces deux souches (figure 93).

Le substrat carboné étant le même dans ces deux conditions, on peut néanmoins noter une réduction de la vitesse d'assimilation du glucose chez la souche JMY5289 (-18% ; annexe 16). Dans la partie Résultats et Discussion, § 2.1.2., on avait noté une cinétique de croissance

similaire mais la vitesse calculée ici correspond à une vitesse spécifique. Celle-ci est reportée à la quantité de biomasse qui diffère légèrement à T₂₄ (-17% chez JMY3501 ; figure 78) expliquant un flux d'assimilation du glucose différent. L'ensemble des flux métaboliques a été normalisé par la valeur du flux entrant dans la cellule ($V_{\text{Glc}} = 100\%$ pour chaque souche étudiée) et une carte de flux différentiels a été établie (figure 93).

La figure 93 montre des variations importantes quant à l'implication des nombreuses voies de biosynthèse dans le métabolisme de la levure. Pour une vitesse équivalente d'assimilation du glucose, la souche JMY5289 présente, à ce stade, un flux glycolytique et un métabolisme mitochondrial plus important (en moyenne 20-30% supérieurs ; annexe 16). L'exportation du citrate vers le cytosol est au contraire 24% plus faible de même que son clivage en OAA et acétyl-CoA. Une réduction d'environ 23% de la vitesse de synthèse des triglycérides chez la souche productrice de CFA a pu ainsi être observée. Cette accumulation est également due à une production plus faible de G3P (-23%) et une génération également diminuée de NADPH de 37% : en 1h, 1 g de biomasse de la souche JMY5289 synthétise 0,74 mmoles de NADPH, tandis que la souche JMY3501 en produit environ deux fois plus (2,44 mmoles).

Ce résultat est en accord avec la demande supérieure en NADPH chez la souche non productrice de CFA (JMY3501) et pour la synthèse d'acides aminés. En effet, la Thr (-97% chez JMY5289), la Val (-70%), la Lys (-100%), la Phe (-100%), la Tyr (-69%) ou encore l'Ile (-97%) nécessitent la consommation d'une mole de NADPH par mole d'acide aminé synthétisé. Au contraire, la Pro, le Glu et l'Asp sont synthétisés de manière significativement plus importante chez la souche JMY5289 (valeurs multipliées par 5 à 10). Or, seule, la production de Pro requiert l'utilisation d'une mole de NADPH.

La Pro est l'unique acide aminé différentiellement synthétisé chez ces deux souches et dont la synthèse nécessite la consommation de NADPH. Cela suggère une potentielle compétition du cofacteur pour la synthèse des acides aminés, et éventuellement, pour la synthèse des acides gras. Le profil en acides aminés des trois souches étudiées à T₂₄ (figure 86) conforte cette hypothèse : la teneur en Pro est supérieure 50 g.100g de protéines⁻¹ chez les souches productrices de CFA, tandis que la souche JMY3501 présente une teneur de 6,3 g.100g de protéines⁻¹ à T₂₄. La proline pourrait alors jouer un rôle dans la production des CFA, ou en être au contraire l'une des conséquences.

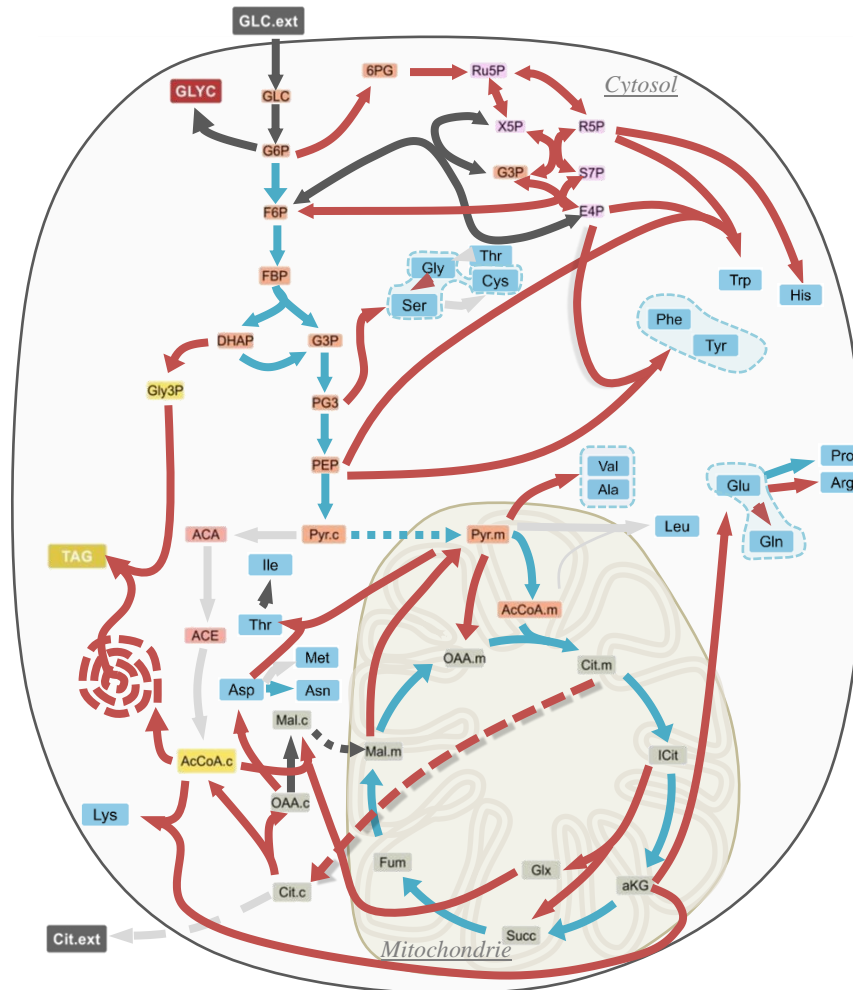


Figure 93 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures *Yarrowia lipolytica* JMY3501 et JMY5289 cultivées en milieu minimum (glucose) à T₂₄.

Les flèches colorées correspondent à des réactions dont les flux sont significativement plus intenses chez une souche par rapport à l'autre : JMY3501 (rouge) et JMY5289 (turquoise). Les flèches noires correspondent à des flux dont la variation ne dépasse pas les 10% entre les deux lignées, tandis que les grises sont des flux impliqués chez aucune des deux souches. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

La plupart des bactéries lactiques produisent des CFA afin de lutter contre le stress acide qu'elles génèrent (Budin-Verneuil *et al.*, 2005). De plus, l'accumulation ou l'assimilation de Pro serait souvent en lien avec leur capacité à résister à certaines conditions stressantes (froid, acidité, etc.). Cet acide aminé agit comme osmolyte sur l'organisation et la fluidité des membranes, interagissant alors avec les protéines membranaires et périphériques pour les protéger d'éventuelles dénaturations (par exclusion préférentielle ou vitrification des sucres par exemple ; Papadimitriou *et al.*, 2016). Cet effet a également pour conséquence la libération d'une grande quantité de protons (Murínová et Dercová, 2014) qui induit alors une acidification

supplémentaire de leur environnement. De plus, Oyola *et al.*, (2012) ont montré que la délétion de la CFAS chez *Leishmania infantum* réduisait fortement l'assimilation de la Pro démontrant d'une part que les CFA modifient les capacités de prise en charge des différents substrats ou encore que la cellule diminue sa demande en Pro pour une raison encore inconnue. Lors d'un stress osmotique, il est également fréquent d'observer une régulation positive de la concentration intracellulaire en Glu et Asp chez *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* et *Tetragenococcus halophilus* (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus relatifs à la production des CFA et les teneurs en acides aminés à T₂₄ sont en parfaite adéquation avec la bibliographie, suggérant une corrélation, voire une régulation, de la synthèse des CFA et de la Pro (ainsi que du Glu et Asp). Il est ainsi possible que le changement de conformation des membranes induit par la présence des CFA ait un impact à la fois sur l'assimilation de l'azote, la morphologie de la cellule, l'acidification du milieu de culture ainsi que sur la teneur en acides aminés (la Pro majoritairement). Des analyses supplémentaires seraient à envisager afin de confirmer l'implication exacte de la proline dans ce type de mécanisme et les potentiels liens de cause à effet.

2.2.2.3. Optimisation de l'accumulation des CFA.

Dans un second temps, les flux métaboliques obtenus pour les souches JMY5289 et JMY5578 ont été comparés. Ces deux souches ont été modifiées pour la production de CFA *via* l'intervention de la CFAS (pTEF-*EcCFAS-LEU2ex*). Cependant, la souche JMY5289 a été optimisée pour la synthèse des triglycérides (Δ *pox1-6*, Δ *tgl4*, pTEF-*GPD1-URA3ex*, pTEF-*DGA2-LEUex*) tandis que la souche JMY5578 a été améliorée afin d'augmenter sa teneur en CFA (Δ *pox1-6*, Δ *tgl4*, pTEF-*LRO1-URA3ex*, 4UAS-pTEF-*EcCFAS-LEU2ex*) (tableau 5, figure 65). Ainsi, une carte de flux a pu être établie à partir du réseau métabolique élaboré pour la souche JMY3501 sur glucose. Cette carte représente les flux métaboliques différentiellement impliqués dans le métabolisme central et lipidique entre ces deux souches (figure 94).

Le substrat carboné est, dans les deux cas, assimilé à une vitesse spécifique relativement proche (+8% chez JMY5578 ; annexe 16). L'ensemble des flux métaboliques a également été normalisé par la valeur de ce flux entrant dans la cellule ($V_{\text{Glc}} = 100\%$ pour chaque souche étudiée). Le flux glycolytique est plutôt conservé entre les deux souches jusqu'à la synthèse de citrate dans la mitochondrie (figure 94). L'exportation de cet acide et son clivage en acétyl-CoA et OAA est néanmoins favorisée chez la souche oléagineuse (-14% chez JMY5578). De

même, une réduction de 36 et 29% de la vitesse de synthèse respective de G3P et du NADPH a alors pour conséquence la diminution de 36% de la vitesse d'accumulation des triglycérides.

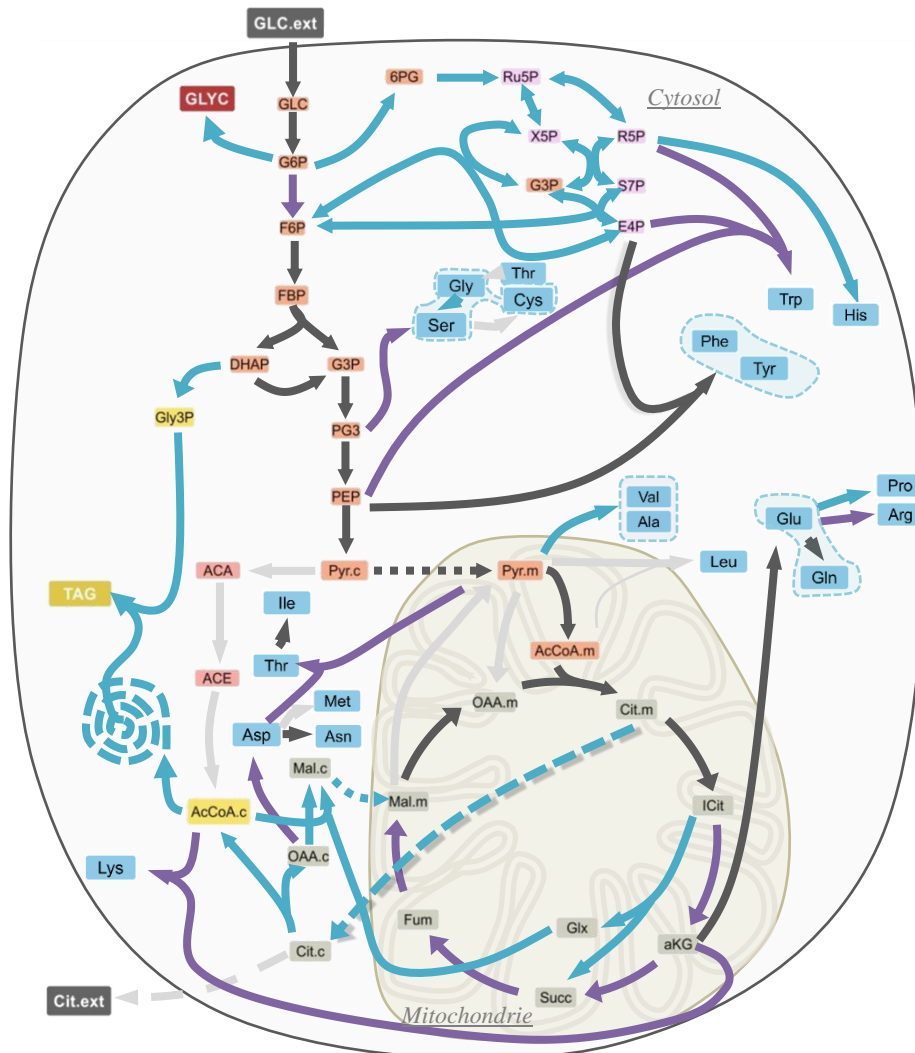


Figure 94 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures *Yarrowia lipolytica* JMY5289 et JMY5578 cultivées en milieu minimum (glucose) à T₂₄.

Les flèches colorées correspondent à des réactions dont les flux sont significativement plus intenses chez une souche par rapport à l'autre : JMY5289 (turquoise) et JMY5578 (violet). Les flèches noires correspondent à des flux dont la variation ne dépasse pas les 10% entre deux lignées, tandis que les grises sont des flux impliqués chez aucune des deux souches. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

Cependant, contrairement à l'hypothèse émise précédemment (Résultats et Discussions, § 2.1.1.3.3.), la synthèse de glucides de réserve semble également ralentie de 21% chez JMY5578 (figure 94 ; annexe 16). En effet, peu de différences sont à noter au niveau des teneurs à T₂₄ : les différences de flux observées semblent uniquement dues à une assimilation du carbone et de la quantité de biomasse différente entre les deux souches. La réelle redirection

métabolique à l'origine de la compétition du carbone lipides/glucides interviendrait plutôt entre T₂₄ et T₄₈, au moment où la teneur en glucides augmente de 59% chez JMY5578 et de seulement 15% chez la souche JMY5289 (figure 87). En contrepartie, la teneur en lipides n'augmente que de 83% chez JMY5578, alors qu'elle augmente de 172% chez JMY5289 entre ces deux stades. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de *GSY* ainsi que des gènes du métabolisme des lipides au cours du temps chez ces deux souches, afin de confirmer cette hypothèse.

Avec une synthèse plus faible en lipides et sucres à T₂₄ chez la lignée JMY5578, le bilan carbone est rétabli par la synthèse améliorée de certains acides aminés (Phe et Lys) non synthétisés chez JMY5289 ainsi que par la libération de CO₂ plus importante de 24% (2,7 moles de CO₂ par mole de glucose assimilée chez JMY5289 par rapport à 3,3 moles de CO₂ par mole de glucose assimilé chez JMY5578). Cette perte de carbone réduit la quantité de carbone ré-assimilable en cours de culture pour la synthèse d'autres composés et notamment des triglycérides. Ce résultat peut également expliquer l'acidification plus rapide observée chez cette souche et confirmant l'implication de l'acide carbonique dans la baisse du pH mesurée (figure 88) : libération de CO₂ plus intense que chez JMY3501 (2,4 moles de CO₂ par mole de glucose).

D'après les résultats obtenus (annexe 16), la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate puis de l' α -cétoglutarate en succinyl-CoA sont les deux réactions majoritairement mises en cause (respectivement +33 et +80% chez JMY5578) pour la libération excessive en CO₂. On a, en effet, pu noter une exportation du citrate mitochondrial plus faible chez JMY5578 (-14% ; annexe 16), contraignant le flux de carbone à emprunter un cycle de Krebs complet, ce qui augmente alors les émissions de CO₂ dans le milieu de culture (figure 88).

2.2.2.4. Optimisation de la production de triglycérides et d'acides gras cyclopropanes : utilisation de la MOMA.

Les données biochimiques et les modèles développés par MFA puis FBA ont permis d'identifier certains points clés relatifs à l'accumulation des triglycérides et à la synthèse des acides gras cyclopropanes. Dans le cadre d'une optimisation des souches industrielles pour ces productions ciblées, il serait intéressant d'entreprendre davantage de modifications génétiques. L'utilisation de la MOMA serait alors un moyen de déterminer l'effet d'une délétion/surexpression de certains gènes cibles sur le métabolisme afin de poursuivre le procédé d'ingénierie génétique déjà amorcé.

La synthèse des CFA étant sujette à de nombreuses régulations (pH, acides aminés, morphologie, assimilation des substrats, etc.), il serait plus intéressant d'effectuer une optimisation MOMA à partir de la souche JMY5578 (24,6% de CFA) afin d'en augmenter la teneur en triglycérides initialement assez faible (18,1 g.100g de MS⁻¹ à T₇₂).

➤ Optimisation de la voie Kennedy.

On a pu voir précédemment que la souche JMY5289, dont la voie Kennedy a été améliorée par surexpression des gènes codant une G3PDH et une DGAT, permet un flux de synthèse des TAG 40% plus important par rapport à celui de la souche JMY5578. Le premier axe d'amélioration de la souche JMY5578 *via* la MOMA a donc été d'optimiser le flux de synthèse des triglycérides de 40% chez cette souche, atteignant donc une vitesse de 10,6 μmol_{TAG}.g de MS⁻¹.h⁻¹. Cette souche dont la vitesse de synthèse des triglycérides a été optimisée *in silico* en mimant la surexpression des gènes *GPD1* et *DGA2* est nommée JMY5578a afin de faciliter la discussion. On a alors V_{TAG} chez JMY5578a équivalent au V_{TAG} chez JMY5289.

Avec un flux d'assimilation du glucose constant, les conséquences directes sur le reste du métabolisme ont été : (1) une plus grande implication de la voie des pentoses phosphates (+12%), (2) une production et une exportation du citrate également plus intense (+30%) ce qui a permis de conduire à la synthèse d'acétyl-CoA pour une meilleure production de lipides (annexe 17). La plupart des acides aminés ont vu leur synthèse ralentir ou s'interrompre totalement (par exemple : Pro, -18% ; Lys, -100% ; Ile, -100%) (annexe 17).

Il est ainsi possible d'améliorer la synthèse des lipides chez une souche de levure dont la production d'acides gras inhabituels a déjà été optimisée en surexprimant uniquement les gènes impliqués dans la biosynthèse des triglycérides : l'augmentation de 40% du flux de synthèse des TAG à de ce fait permis l'augmentation de la production de CFA de 40% également. Cependant, on remarque que d'autres voies seraient à améliorer et/ou à réprimer afin d'obtenir une production plus intéressante d'un point de vue industriel.

➤ Synthèse du glycogène.

Bhutada *et al.* (2017) ont montré que la délétion de la glycogène synthase, enzyme responsable de 16% de glycogène dans la biomasse, pouvait conduire à une augmentation de 50 à 60% de la teneur en TAG chez *Yarrowia lipolytica*. Malgré une synthèse de glycogène supérieure chez JMY5289 par rapport à JMY5578 à T₂₄, l'accumulation de glycogène est un mécanisme limitant la synthèse des triglycérides (Bhutada *et al.*, 2017 ; figure 87). Un second axe d'amélioration exploité par la MOMA s'est alors profilé : à partir de la souche JMY5578a

développée *in silico* précédemment, on a entrepris la réduction du flux d'accumulation des glucides totaux de 30% (le glycogène n'ayant pas été quantifié, la proportion approximative de ce sucre a été fixée à 30% par rapport aux glucides totaux ; Zhang *et al.*, 2016 ; Bhutada *et al.*, 2017).

La simulation de la délétion de la glycogène synthase (souche JMY5578b) a alors conduit à des vitesses de synthèse de NADPH et de synthèse des triglycérides doublée (annexe 17). La plupart des acides aminés ont subi cette redirection par une diminution de leur synthèse (jusqu'à -100%). L'impact sur la glycolyse est quant à lui négligeable (<5%).

➤ *Isocitrate déshydrogénase et libération de CO₂*

Une carence en azote entraîne une limitation en AMP, réduisant l'activité de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) ayant pour conséquence une plus forte exportation du citrate dans le cytosol afin d'être pris en charge par les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras (Zhang *et al.*, 2016). Il semblerait que l'IDH soit un élément limitant dans la synthèse des triglycérides. En effet, chaque mole de citrate non exportée et effectuant un tour de cycle de Krebs génère deux moles de CO₂ de par l'activité des deux déshydrogénases successives (perte d'un tiers du carbone sous forme de CO₂). La réduction par deux du flux représenté par l'IDH permettrait alors de limiter la fuite de carbone hors de la cellule sous forme gazeuse, de réduire la disponibilité des précurseurs aux acides aminés (α -cétoglutarate) de manière à avoir le même effet qu'une carence en azote (transport du citrate pour son clivage).

Le flux de conversion de l'isocitrate a donc été réduit par deux sur la souche JMY5578b précédemment optimisée *via* la simulation MOMA : création de la souche JMY5578c (annexe 17). Une carte de flux différentiels a été établie afin de visualiser plus facilement les différences engendrées sur le métabolisme (figure 95). Avec un flux d'assimilation du carbone et un flux glycolytique égaux à notre souche témoin JMY5578, cette simulation a néanmoins conduit à une réduction supplémentaire de la synthèse des glucides (71,5 $\mu\text{mol.g de MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ chez JMY5578c, par rapport à 157,6 et 100,0 $\mu\text{mol.g de MS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ chez les souches JMY5578 et JMY5578b ; annexe 17). En contrepartie, la synthèse des triglycérides a augmenté de 13% par rapport à celle obtenue chez JMY5578b et de 137% par rapport à celle chez JMY5578.

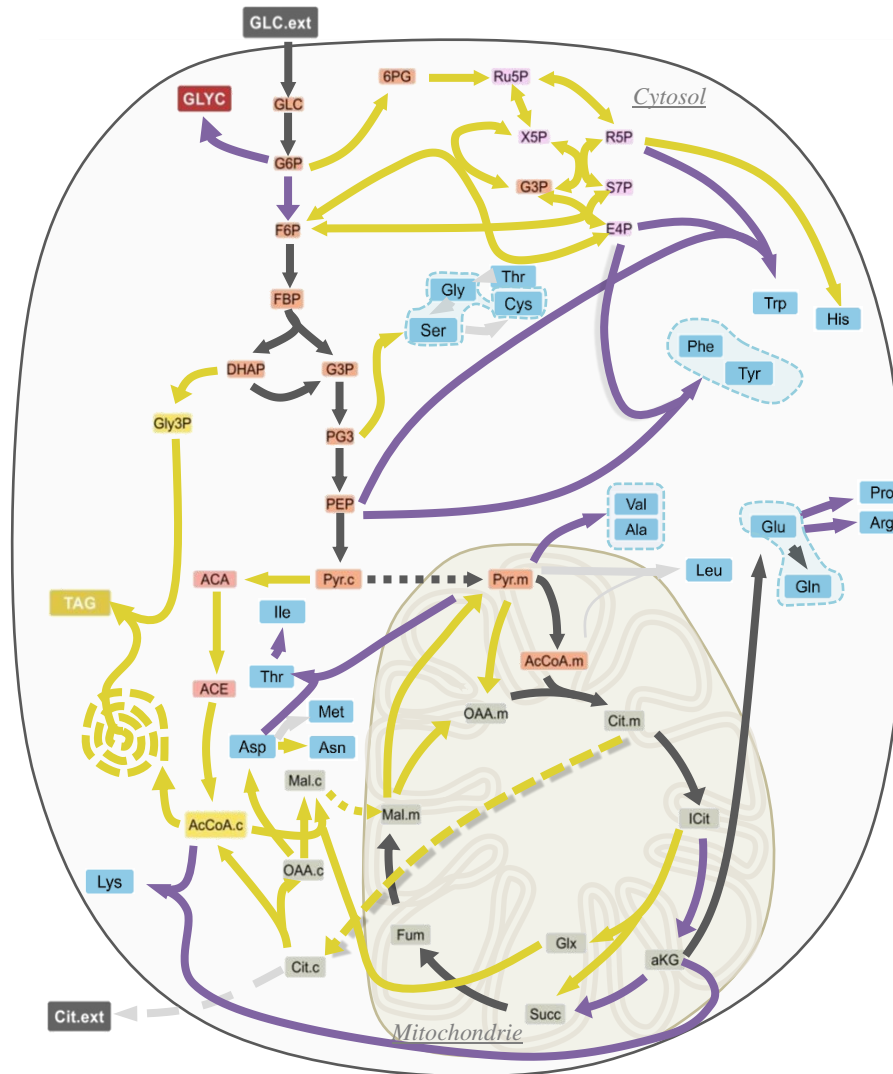


Figure 95 : Carte de flux métaboliques différentiels des levures *Yarrowia lipolytica* JMY5578 et JMY5578c générée par simulation MOMA à T₂₄.

Les flèches colorées correspondent à des réactions dont les flux sont significativement plus intenses chez une souche par rapport à l'autre : JMY5578 (violet) et JMY5578c (jaune). Les flèches noires correspondent à des flux dont la variation ne dépasse pas les 10% entre deux lignées, tandis que les grises sont des flux impliqués chez aucune des deux souches. La liste des abréviations relative à ce tableau est présente en annexe 9.

La répression de l'IDH pourrait conduire à une optimisation de la souche JMY5578 en réduisant les pertes de carbone sous la forme de CO₂. Néanmoins, ces pertes n'ont été réduites que de 0,4% (annexe 17). Cette modification génétique et métabolique *in silico* semble avoir été compensée par une augmentation du flux généré au sein de la voie des pentoses phosphates (+58% chez JMY5578c par rapport à JMY5578). En effet, avec une synthèse en acides gras

optimisée découle nécessairement une demande en NADPH grandissante (libérant une mole de CO₂ pour deux moles de NADPH produites).

➤ Bilan des optimisations par MOMA.

Nous avons pu identifier trois facteurs métaboliques différents capables d'influencer la synthèse des triglycérides chez *Yarrowia lipolytica*. L'optimisation de la voie Kennedy par la surexpression des gènes codant pour la G3PDH et la DGAT (JMY5578a) ainsi que la suppression de la synthèse du glycogène (JMY5578b) ont permis de montrer une redirection des flux métaboliques vers l'accumulation des lipides (annexe 17). De plus, la répression partielle de l'IDH conduit à un mécanisme proche de la carence en azote entraînant un meilleur transport et clivage du citrate en acétyl-CoA, également à l'origine d'une production de triglycérides optimisée. Ces résultats ont suggéré que la perte de carbone par les déshydrogénases est inéluctable dans ce type de métabolisme car elles sont souvent associées à la génération de pouvoir réducteur essentiel pour la synthèse des acides gras. Ces altérations du métabolisme ont malgré tout permis une amélioration de près de 140% la vitesse d'accumulation des TAG à ce stade chez une souche produisant près de 25% de CFA dans ses lipides.

2.2.3. Avantages et limites de la MFA et la FBA.

Le modèle développé dans cette étude s'est inspiré de études précédentes réalisées en fluxomique (Kavšček *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016 ; Sabra *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Bhutada *et al.* 2017). En milieu carencé en azote, on a pu identifier un flux majoritaire cytosolique, avec une entrée dans le cycle de Krebs puis une exportation du citrate dans le cytosol afin qu'il soit clivé. L'acétyl-CoA en découlant peut être pris en charge par les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras. La source de carbone (glucose et glycérol) influence assez peu la composition de la biomasse mais induit l'utilisation de voies spécifiques à chacune des sources. Au contraire, la génétique de la souche conduit à des compositions en biomasse très différentes et le modèle FBA a permis d'identifier des réactions favorisant ou au contraire limitant la synthèse des triglycérides ainsi que des marqueurs métaboliques relatifs à la présence de CFA au sein des membranes des levures oléagineuses. La MOMA effectuée ensuite a alors permis de simuler *in silico* des modifications génétiques de souches : ce type d'altération serait à confirmer *in vivo* afin de vérifier l'impact positif observé en MOMA.

Le modèle développé dans cette étude est un modèle relativement simple prenant en compte les réactions principales du métabolisme central et lipidique. Il pourra donc être exploité

pour l'analyse de nombreuses souches, modifiées ou non, démultipliant alors le nombre de conditions à analyser (modifications génétiques, modifications des conditions de cultures, substrats, etc.) avec, comme bénéfiques, de faibles coûts et la faible durée des expérimentations. Cette méthode permettra, à terme, d'optimiser davantage la synthèse des triglycérides ou d'entreprendre la production d'autres composés lipidiques ou non lipidiques.

2.3. Conclusion partielle : production d'acides gras cyclopropanes chez *Yarrowia lipolytica*.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis d'établir certaines corrélations entre la physiologie de la levure *Yarrowia lipolytica*, le métabolisme central et la production des triglycérides et des acides gras cyclopropanes. Le schéma bilan suivant (figure 96) reprend l'ensemble de ces données.

Le glucose est métabolisé via la glycolyse cytosolique, et le pyruvate en résultant est transporté dans la mitochondrie pour la synthèse et l'exportation du citrate dans le cytosol. La carence en azote conduit à une plus grande implication de l'ATP citrate lyase pour la conversion du citrate en acétyl-CoA, puis en lipides (Zhang *et al.*, 2016). Une assimilation de glucose contrôlée permet également de supprimer la sécrétion de citrate en dehors de la cellule (Kavšček *et al.*, 2015). De plus, la répression d'une partie du cycle de Krebs permettrait, à la fois, de réduire les pertes de carbone sous la forme de CO₂ et d'augmenter le transfert du citrate vers le cytosol (figure 96). Cette modification métabolique impliquerait alors une redirection du flux métabolique vers la voie des pentoses phosphates pour la synthèse de NADPH (déshydrogénases ; annexe 16) : la libération de CO₂ représente donc une perte de carbone alors impossible à supprimer. En présence de glycérol, les dernières phases de la néoglucogénèse permettent de transiter vers la voie des pentoses phosphates, tandis que les dernières phases de la glycolyse conduisent à la synthèse de pyruvate pour rejoindre le cycle de Krebs.

Des condensations successives de malonyl-CoA sur l'acétyl-CoA par l'acide gras synthase (FAS) mènent à la production des acides gras. Ils sont alors estérifiés sur le glycérol-3-phosphate afin d'être stockés sous la forme de triglycérides. La synthèse de G3P peut être optimisée par surexpression du gène *GPD1* ce qui entraînerait une redirection du flux métabolique et permettrait d'accumuler des teneurs en lipides plus importantes (figures 80 et 94). La suppression de voies compétitives telles que celle de la synthèse de glycogène sont

également des pistes prometteuses d'ingénierie génétique (annexes 16 et 17 ; figures 87 et 95 ; Bhutada *et al.*, 2017).

Les acides gras cyclopropanes sont synthétisés à partir d'acides gras insaturés présents sur les phospholipides (majoritairement le PC-C16:1 et PC-C18:1 ; Wang *et al.*, 1992). La PDAT permet alors l'incorporation de ces acides gras directement dans les TAG (gène *LROI* ; figure 96). Les organismes présentant cette particularité sont capables de résister de manière plus efficace à un stress acide grâce à une modification de la composition de ses lipides membranaires (Budin-Verneuil *et al.*, 2005). Ces organismes ont également développé un mécanisme de protection des protéines périphériques et transmembranaires basé sur l'action de la proline (Papadimitriou *et al.*, 2016). Dans notre étude, l'expression de la CFA synthase n'est pas induite par une acidification mais par une modification génétique. Une acidification plus importante a été observée dans ces conditions sans sécrétion de citrate, suggérant alors que la présence de CFA au sein des membranes induirait une libération d'ions H⁺ et de CO₂ plus importante. La synthèse de proline peut alors être régulée directement par la synthèse de CFA (co-régulation, facteur de transcription commun, etc.) ou indirectement après acidification.

Ces observations sont souvent liées à la capacité de cette levure à filammenter : l'allongement des cellules *via* la modification des membranes permet à la fois une meilleure assimilation des substrats lors d'une carence, mais également de développer une résistance à un stress de type acide notamment (Martinez-Vazquez *et al.*, 2013). Cependant, malgré l'effet des CFA sur la morphologie des cellules mis en évidence dans ces travaux, aucune étude ne permet à ce jour d'établir une corrélation directe entre l'expression de la CFAS et l'induction de la transition entre deux états morphologiques de la cellule de levure *Yarrowia lipolytica*.

Une meilleure compréhension des systèmes de régulation liés à ces différents facteurs pourrait alors permettre certaines actions plus ciblées afin d'induire et d'augmenter encore davantage la teneur en acides gras cyclopropanes et en triglycérides dans nos souches de *Yarrowia lipolytica*.

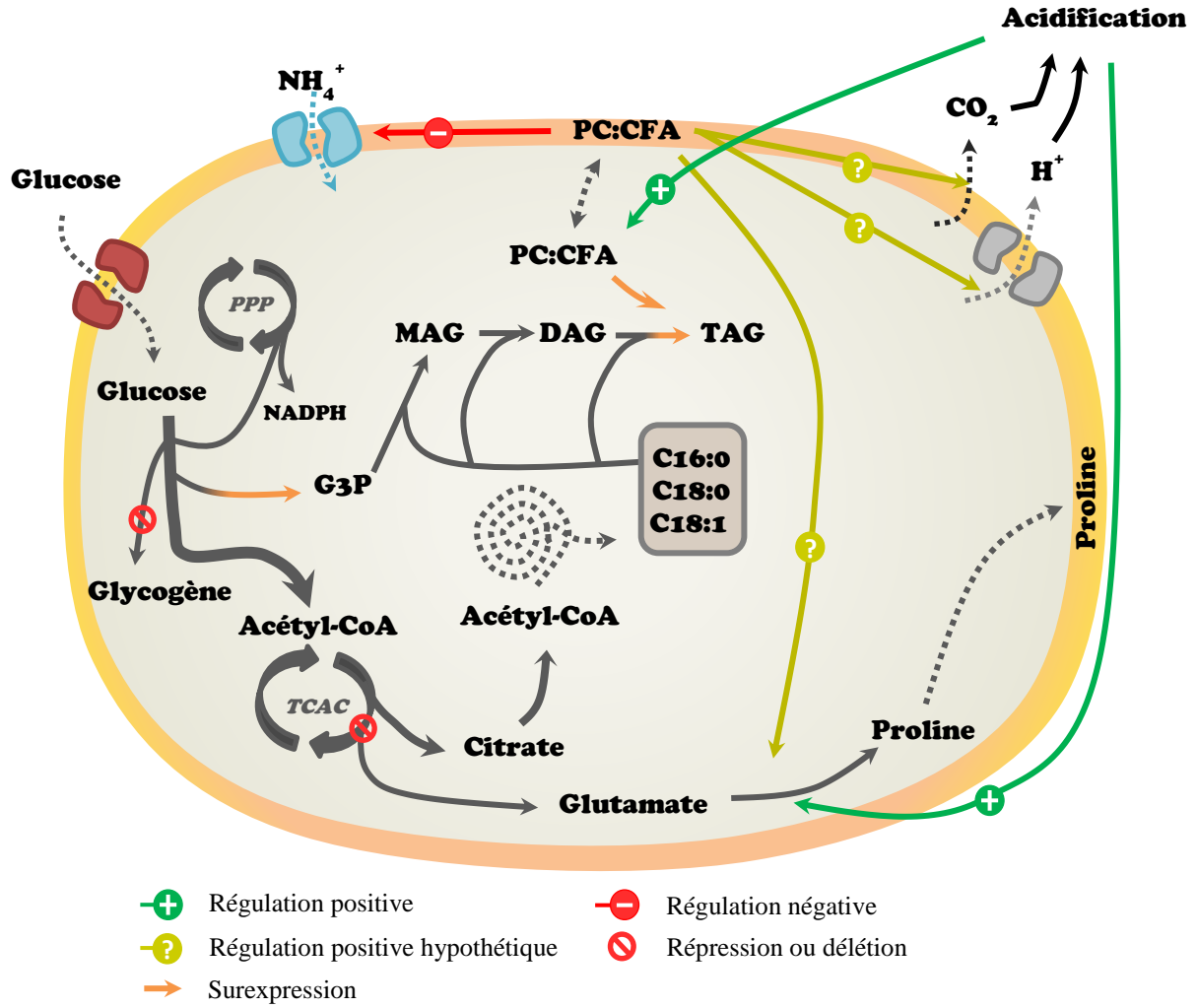


Figure 96 : Optimisation de l'accumulation des triglycérides et régulations relatives aux acides gras cyclopropanes chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

Abréviations : DAG, diglycérides ; G3P, glycérol-3-phosphate ; MAG, monoglycérides ; PC:CFA, acide gras cyclopropane estérifié à une phosphatidyl-choline ; PPP, voie des pentoses phosphates ; TAG, triglycérides ; TCAC, cycle des acides tricarboxyliques.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

➤ Résultats majeurs

L'objectif de ce travail était, par des approches biochimiques et fluxomiques, d'identifier les mécanismes majeurs intervenant dans l'accumulation d'huiles enrichies en oméga-3 chez la graine de lin et de comprendre les modes de production des acides gras inhabituels chez la levure *Yarrowia lipolytica* afin d'optimiser leur synthèse.

Chez la graine de lin, les précurseurs des acides gras (acétyl-CoA et G3P) sont générés *via* l'hydrolyse du saccharose, suivie par une glycolyse essentiellement cytosolique. Le NADPH est synthétisé uniquement par la voie des pentoses phosphates dans le plaste. Dans ce même compartiment, les acides gras sont synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, puis exportés, modifiés et estérifiés sur le G3P, afin d'être stockés sous la forme de TAG. La compétition du carbone pour les composés de réserve réduit cependant le flux de synthèse des TAG. Dès la prise en charge du saccharose par les invertases, celui-ci peut être clivé par la SuSy, et forme un précurseur pour la synthèse de la paroi cellulaire. Le stockage du carbone durant l'embryogénèse s'effectue en amidon. Sa remobilisation doit être lente et progressive durant le développement de la graine : la fluxomique a montré qu'une assimilation ou une remobilisation trop rapide induisait une redirection vers la synthèse de protéines. Enfin, une huile enrichie en oméga-3 est possible grâce à l'intervention des désaturases, puis des PDAT, impliquées dans le transfert des PUFA des phospholipides aux TAG.

Chez *Yarrowia lipolytica*, l'assimilation du glucose conduit à la fois à la synthèse de glycérol-3-phosphate (oxydation des trioses phosphate) et d'acétyl-CoA (glycolyse cytosolique). Le pyruvate est ensuite transporté dans la mitochondrie. Le citrate, intermédiaire du cycle de Krebs, est exporté dans le cytosol où il est clivé pour générer l'acétyl-CoA disponible pour la production des acides gras. Un apport contrôlé de carbone permet de limiter la libération extracellulaire du citrate non pris en charge par l'AG synthase. Un transport optimal du citrate permet aussi de restreindre la perte de CO₂ généré par le cycle de Krebs. Une perte de carbone est cependant inévitable : la génération de NADPH (PPP) s'effectue avec la libération de CO₂. Dans cette étude, lorsqu'une source de carbone alternative est utilisée, la néoglucogénèse permet de reformer un glucose-6-phosphate à partir de deux glycérols, pour la production des cofacteurs (NADPH). L'optimisation de la voie Kennedy (*GPD1* et *DGA2*) permet d'améliorer l'assimilation du carbone et d'augmenter l'intensité du flux glycolytique et

la synthèse des TAG. La synthèse de glycogène est un des facteurs limitant leur accumulation, contrairement aux protéines dont la teneur est similaire malgré des contenus en lipides différents. L'accumulation des CFA est largement améliorée lorsque des PDAT sont employées pour leur transfert dans les TAG. Leur présence dans les membranes induit cependant certains phénomènes indésirables ou inattendus, tels qu'une modification de la morphologie, une diminution de l'assimilation de l'azote, ainsi qu'une potentielle activation de la synthèse de proline et libération de CO_2 et H^+ .

➤ **Comparaison du modèle plante et levure**

Dans cette étude, le modèle végétal peut paraître plus simple à appréhender car il peut se rapporter directement à un organe entier (la graine). Néanmoins, une analyse MFA chez la graine ne permet qu'une étude *in vitro* de l'organe, avec des conditions expérimentales probablement tronquées : organe hors de son enveloppe, susceptible de capter l'énergie lumineuse et réaliser la photosynthèse, une composition du milieu de culture et des vitesses d'assimilation mimant de manière approximative le phloème en plante entière, etc. En analyse FBA, on s'affranchit de l'aspect *in vitro* afin de conserver le modèle *in vivo* : les métabolites entrant/sortant du modèle sont alors plus difficilement quantifiables. Enfin, la fluxomique chez un modèle végétal est, de manière générale, assez longue : croissance de la plante puis récolte des graines. Au contraire, le modèle microbien se rapporte en général à une concentration massique et non à une cellule (ou organe) unique. Une confusion entre un phénomène de consommation ou de diminution de la teneur d'un composé (due à l'augmentation de celle d'un autre) est donc possible. Que la technique utilisée soit la MFA ou la FBA, les conditions expérimentales sont similaires : seul le milieu de culture est adapté (incorporation de $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ -D-glucose à 20% par exemple). Les expérimentations sont également plus rapides et chaque paramètre est plus facilement contrôlé.

Malgré une organisation totalement différente, la graine de lin (organisme pluricellulaire) et la levure *Yarrowia lipolytica* (microorganisme unicellulaire) sont ici considérées comme des eucaryotes hétérotrophes, tous deux dépendant d'une source de carbone fournie par un « milieu de culture » : le saccharose et la glutamine apportés *via* le phloème chez la graine et le glucose pris en charge directement par le transporteur adéquat chez la levure. Avec un compartiment supplémentaire, le plaste, la cellule végétale de graine de lin requiert un plus grand nombre de transporteurs : transporteurs d'hexoses, de trioses et de PEP durant la glycolyse, d'acétyl-CoA pour la synthèse des AG, etc. Cette compartimentation peut alors rapidement complexifier le modèle et le calcul mathématique des flux métaboliques.

Les analyses MFA, FBA ou MOMA ont également permis d'identifier des étapes limitantes dans l'accumulation des TAG chez deux oléagineux. Chez la graine, une assimilation importante de carbone conduit à des redirections métaboliques, les enzymes du métabolisme des lipides n'étant pas assez efficaces pour prendre en charge un flux glycolytique en excès. Elle conduit à une accumulation de protéines *via* la conversion des intermédiaires de la glycolyse, et à la synthèse de parois (SuSy). De plus, durant l'embryogénèse, le carbone est stocké en amidon, sucre de réserve rapidement remobilisé pour la synthèse des TAG. Si une consommation de glucose non contrôlée chez la levure conduit également à des redirections métaboliques, c'est plutôt sous la forme de citrate (sécrété dans le milieu extracellulaire) et de glycogène. Contrairement au modèle végétal, ce sucre de réserve n'est visiblement pas remobilisé chez *Yarrowia*. Sa synthèse est alors un réel frein à la production d'huile. Dans les deux modèles, le CO₂ représente une perte de carbone non négligeable et inévitable (libéré *via* la voie des pentoses phosphates pour la synthèse de NADPH). La MOMA, outil prédictif exploité pour l'ingénierie génétique et métabolique, s'avère plus intéressant chez la levure, les techniques de transformation étant plus simples et rapides, et l'organisme résultant de ces modifications génétiques étant plus facilement valorisable et moins soumis à controverses (par rapport aux plantes OGM).

➤ **Perspectives de recherche**

L'analyse biochimique et fluxomique de graines de lin oléagineux à différents stades de développement ont permis d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'accumulation des huiles riches en PUFA. Néanmoins, certaines pistes et hypothèses restent à confirmer et approfondir. Certaines vérifications pourraient d'abord être effectuées en protéomique afin de vérifier les résultats avancés par Barvkar *et al.* (2012) : présence ou absence de transporteurs et d'enzymes dans chaque compartiment. L'accumulation et la remobilisation d'amidon se sont révélées être des événements majeurs pour le stockage des triglycérides : des analyses en qRT-PCR pourraient permettre de constater davantage l'implication des amylases durant la phase de synthèse des acides gras. Une collection de mutants développée grâce à des séquences en antisens sous le contrôle de promoteurs inductibles à différents stades (et non constitutifs) renforcerait grandement cette étude en s'intéressant directement à l'effet d'une répression sur les flux métaboliques et au cours de la croissance de la graine. Les lignées analysées dans cette étude représentent en effet une diversité génétique trop importante pour confirmer avec certitude certaines de nos hypothèses. Ces répressions pourraient alors concerner la capacité de la graine à synthétiser l'amidon ou au

contraire à le remobiliser (amylases), mais également celles réalisées *in silico* par la MOMA : implication de la Susy, la synthèse des acides aminés aromatiques, etc. Des études complémentaires permettraient de vérifier le rôle de l'His dans l'activation de la synthèse d'ABA et la répression de la β -oxydation (Ma et Wang, 2016) chez la graine de lin : répression génétique de l'His, ajout d'His et/ou d'ABA dans un milieu de culture, mesure de l'expression des gènes de la β -oxydation, teneur en TAG, etc. Enfin, on a conclu à une action déterminante de la PDAT pour le transfert et l'accumulation des PUFA : des expérimentations de radiomarquage seraient nécessaires pour confirmer la sélectivité/spécificité de cette enzyme pour le C18:2 et C18:3.

On a pu voir que la fluxomique pouvait conduire à une meilleure compréhension des systèmes plantes et notamment en étudiant l'impact d'une condition sur les flux métaboliques. A plus long terme, la FBA pourrait alors être exploitée afin de comparer de nombreuses autres conditions (pédoclimatiques, etc) et de comprendre la manière dont elles ont altérée la composition de la graine et de son huile (actions et impacts de la température, de l'ensoleillement, des précipitations, de la qualité du sol, etc). De plus, il pourrait être très intéressant de développer un modèle « plante entière », exploitant chaque organe, de l'assimilation du CO₂ par les feuilles et la nutrition par les racines, jusqu'au stockage dans les graines en passant par le transport des photoassimilats *via* le phloème. Certains dispositifs existent et sont déjà exploités en recherche (Dersch *et al.*, 2016), mais sont relativement coûteux.

Chez *Yarrowia lipolytica*, il serait tout d'abord primordial d'aller plus loin concernant l'identification et la quantification des composés inconnus dans la biomasse (3,3 et 8,6% respectivement sur glucose et glycérol). L'analyse des différents glucides accumulés serait également prévue. De plus, l'étude des milieux extracellulaires est restée assez superficielle et mériterait d'être améliorée par des analyses plus précises des composés libérés (sucres alcool, acides organiques). De plus, il est possible que certains composés sécrétés (potentiellement le citrate) aient été réassimilés (non visibles sur les chromatogrammes). Un ajout de citrate marqué au ¹³C dans le milieu pourrait répondre à cette question. De plus, nous avons proposé une libération de CO₂ et d'ions H⁺ afin d'expliquer une acidification du milieu pourtant tamponné : nous pourrions vérifier, entre autres, si le bullage de CO₂ dans du milieu non inoculé conduirait à cette baisse de pH. L'analyse MOMA a permis d'identifier des réactions limitantes pour l'accumulation des lipides (synthèse de glycogène notamment). D'un point de vue génétique, il serait judicieux de modifier la souche JMY5578 (forte production de CFA) avec

les mêmes transformations que les souches JMY3501 et JMY5289 (forte teneur en lipides) : cette souche a d'ores et déjà été réalisée dans le cadre du projet PREBIOL. Une modification génétique inspirée de l'analyse MOMA et de Bhutada *et al.* (2017) pourrait augmenter considérablement le contenu en lipides par délétion de la glycogène synthase (souche également réalisée dans le cadre de PREBIOL). Nous nous sommes intéressés dans cette étude à une source alternative de carbone, le glycérol, et remarqué que peu de variations ont été notées d'un point de vue phénotypique. Nous pourrions donc tester d'autres sucres et hydrocarbures (en MFA) et également vérifier la possibilité d'utiliser des extraits bruts et purifiés (en FBA) afin de limiter les étapes de transformation des substrats dans le cadre de la chimie verte. Nous avons également pu voir que le comportement en erlenmeyer était parfois différent de celui en fermenteur dû à l'ensemble des paramètres facilement ajustables dans ce dernier (pO_2 , pCO_2 , pH, alimentation en substrats, utilisation d'antimousse, etc). Une meilleure compréhension de ces conditions serait possible en fluxomique afin d'optimiser chacun d'entre eux, comme l'ont montré Kavšček *et al.* (2015) avec l'influence de la vitesse d'apport en glucose sur la synthèse du citrate et l'accumulation des TAG.

Enfin, d'un point de vue plutôt technique, la MFA et FBA se sont révélées être des outils très intéressants dans le cadre de la compréhension et l'optimisation des systèmes oléagineux. L'une des perspectives serait de la coupler à d'autres techniques « omics » (telles que la transcriptomique ; Kim *et al.*, 2016 ; Pomraning *et al.*, 2016 ; Sabra *et al.*, 2017), afin renforcer nos études et prendre en compte les différents niveaux de régulation (expression des gènes, activité des protéines, régulations métaboliques, physiologiques) pour la production de composés d'intérêt industriel variés.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdullah B. M., Zubairi S. I., Huri H.Z., Hairunisa N., Yousif E., Basu R. C. (2016). Polyesters Based on Linoleic Acid for Biolubricant Basestocks: Low-Temperature, Tribological and Rheological Properties. *PLoS One*. 11 (3). doi:10.1371/ journal.pone.0151603.
- Acket S. (2015). Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses – Lin : modélisation des systèmes. Thèse de doctorat : Biotechnologie. Compiègne : Université de Technologie de Compiègne, 242 p.
- Acket *et al.*, 2018 : En cours de rédaction.
- Adrio J. L. (2017). Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* 9999. 1–6.
- Afriyanti D., Kroeze C., Saad A. (2016). Indonesia palm oil production without deforestation and peat conversion by 2050. *Sci Total Environ.* 557-558. 562-570.
- AFSSA (2010). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Saisine n° 2010-SA-0109.
- Alix S., Marais S., Morvan C., Lebrun L. (2008). Biocomposite materials from flax plants: Preparation and properties. *Composites Part A Applied Science and Manufacturing.* 39. 1793-1801.
- Alonso A. P., Goffman F. D., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y. (2007). Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus L.*) embryos. *Plant J.* 52. 296–308.
- Alonso A. P., Dale V. L., Shachar-Hill Y. (2010). Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 12 (5). 488-97.
- Alonso A. P., Val D. L., Shachar-Hill Y. (2011). Central metabolic fluxes in the endosperm of developing maize seeds and their implications for metabolic engineering. *Metabolic Engineering.* 13 (1). 96-107.
- Alu'datt M. H., Rababah T., Ereifej K., Alli I. (2013). A distribution, antioxidant and characterization of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chemistry.* 13. 93-99.
- Andrade F. H., Ferreiro M.A. (1996). Reproductive growth of maize, sunflower and soybean at different source levels during grain filling. *Field Crops Research.* 48. 155-165.
- Andriotis V. M. E., Pike M.K., Schwarz S. L., Rawsthorne S., Wang T.L., Smith A.M. (2012). Altered starch turnover in the maternal plant has major effects on Arabidopsis fruit growth and seed composition. *Plant Physiology.* 160. 1175-1186.
- Anonymous (1996). Growing flax: production, management and diagnostic guide, fourth edition.. *Flax council of Canada ; SaskFlax.* 1-59.
- ANSES (2011). Rapport d'expertise collective: actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail. 327 p.

- Antonucci S., Bravi M., Bubbico R., Di Michele A., Verdone N. (2001). Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*. 28 (2-3). 189-195.
- Antoniewicz M. R., Kelleher J. K., Stephanopoulos G. (2006). Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng.* 8. 324-337.
- AOAC, Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists Inc., Gaithersburg (2000).
- Aro E. M. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*. 45 (1). 24-31.
- Arzumanov T. E., Shishkanova T. N., Finogenova T. V., (2000). Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 (5). 525-529.
- Attoumbré J., Bienaimé C., Dubois F., Fliniaux M. A. Chabbert B., Baltora-Rosset S. (2010). Development of antibodies against secoisolariciresinol – application to the immunolocalization of lignans in *Linum usitatissimum* seeds. *Phytochemistry*. 71. 1979-1987.
- Bagheri Z. S., El Sawi I., Schemitsch E. H., Zdero R., Bougherara H. (2013). Biomechanical properties of an advanced new carbon/flax/epoxy composite material for bone plate applications. *J. Mech.Behav. Biomed. Mater.* 20. 398-406.
- Basch E., Bent S., Collins J., Dacey C., Hammerness P., Harrison M., Smith M., Szapary P., Ulbricht C., Vora M., Weissner W. (2007). Flax and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*): A review by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of the Society for Integrative Oncology*. 5 (3). 92-105.
- Bao X., Katz S., Pollard M. R., Ohlrogge J. B. (2002). Carbocyclic fatty acids in plants: biochemical and genetic characterization of cyclopropane fatty acid synthesis of *Sterculia foetida*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99. 7172-7177.
- Barvkar V. T., Pardeshi V. C., Kale S. M., Kadoo N. Y., Giri A. P., Gupta V. S. (2012). Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: characterization of functional metabolic pathways operating during seed development. *J. Proteome Res.* 11. 6264-7626.
- Bates P. D., Browse J. (2011). The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds. *Plant J.* 68. 387-399.
- Baud S., Mendoza M. S., To A., Harscoët E., Lepiniec L., Dubreucq B. (2007). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50. 825-838.
- Baud S., Lepiniec L. (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog Lipid Res.* 49. 235-249.
- Bauer N., Hilaire J., Brecha R.J., Edmonds J., Jiang K., Kriegler E., Rogner H.H., Sferra F. (2016). Data on fossil fuel availability for Shared Socioeconomic Pathways. *Data Brief.* 18. 44-46.

- Beard B. H., Comstock V. E. (1980). Flax. Hybridization of Crop plants. *American Society of Agronomy-Crop Science Society of America*. 357-366.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74. 7779–7789.
- Beopoulos A., Nicaud J. M., Gaillardin C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90. 1193–1206.
- Bergmeyer H. U., Beutler H. O. (1990). Ammonia. Methods of Enzymatic Analysis. *New York: Academic Press*. 8 (3). 454-461.
- Bhutada G., Kavšček M., Ledesma-Amaro R., Thomas S., Rechberger G. N., Nicaud J. M., Natter K. (2017). Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*. 17 (3). doi: 10.1093/femsyr/fox020.
- Bilato C. (2013). N-3 fatty acids and cardiovascular disease: the story is not over yet. *Aging Clin Exp Res*. 25. 357-63.
- Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J. Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277 (5331). 1453-62.
- Bligh E. G. and Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37. 911–917.
- Bodennec J., Brichon G., Koul O., El Babili M., Zwingelstein G. (1997). A two-dimensional thin-layer chromatography procedure for simultaneous separation of ceramide and diacylglycerol species. *Journal of Lipid Research*. 38. 1702-1706.
- Borodziej S., Rudnicka L., Mirowska-Guzel D., Cudnoch-Jedrzejewska A. (2016). *Lipids in Health and Disease*. 15. 13.
- Bredeweg E. L., Pomraning K. R., Dai Z., Nielsen J, Kerkhoven E. J., Baker S. E. (2017). A molecular genetic toolbox for *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels*. 10. 2.
- Brown J. L., Ross T., McMeekin T. A., Nichols P. D. (1997). Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 37 (2-3). 163-173.
- Browse J. and Slack C. R. (1985). Fatty-acid synthesis in plastids from maturing safflower and linseed cotyledons. *Planta*. 166. 74-80.
- Budin-Verneuil A., Pichereau V., Auffray Y., Ehrlich D.S., Maguin E. (2005). Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics*. 5. 4794-807.
- Caillot S. (2006). Isolement de séquences spécifiques d'une expression dans la graine de lin et validation de leur fonctionnalité. Thèse de doctorat : Stratégies d'Exploitations des Fonctions Biologiques. Compiègne : Université de Technologie de Compiègne, 135 p.

- Calder P. C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans.* 45. 1105-1115.
- Canonne J., Froidure-Nicolas S., Rivas S. (2011). Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant Signal. Behav.* 6. 13-18.
- Carter J. F. Potential of flaxseeds and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition (1993). *Cereal Foods World.* 38. 754–759.
- Casa R., Russel G., Lo Cascio B., Rossini F. (1999). Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities. *European Journal of Agronomy.* 11. 267-278
- Caygill C. P. J., Charlett A., Hill M.J. (1996). Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer.* 74. 159-164.
- Celińska E., Iedema-Amaro R., Larroude M., Rossignol T., Pauthenier C., Nicaud J. M. (2017). Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*. *Microb Biotechnol.* 10 (2). 450-455.
- Chang Y. Y., Cronan Jr J. E. (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 33(2). 249-59.
- Colombié S., Nazaret C., Bénard C., Biais B., Mengin V., Solé M., Fouillen L., Dieuaide-Noubhani M., Mazat J.P., Beauvoit B., Gibon Y. (2015). Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicum* (tomato) fruit. *The Plant Journal.* 81. 24-39.
- Conrad M., Schothorst J., Kankipati H. N., Van Zeebroeck G., Rubio-Teixeira M., Thevelein J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 38(2). 254-299.
- Cournia Z., Allen T. W., Andricioaei I., Antonny B., Baum D., Brannigan G., Buchete N. V., Deckman J. T., Delemotte L., Del Val C., Friedman R., Gkeka P., Hege H. C., Hénin J., Kasimova M.A., Kolocouris A., Klein M. L., Khalid S., Lemieux M. J., Lindow N., Roy M., Selent J., Tarek M., Tofoleanu F., Vanni S., Urban S., Wales D. J., Smith J. C., Bondar A. N. (2015). Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: a Perspective from Experiments and Theory. *J Membr Biol.* 248 (4). 611-640.
- Czemplik M., Boba A., Kostyn K., Kulma A., Mituła A., Sztajnert M., Wróbel- Kwiatkowska M., Żuk M., Szopa J., Skórkowska-Telichowska K. (2011). Flax engineering for biomedical application. Biomedical Engineering, *Trends, Research and Technologies.* Chap 17. 407-434.
- Daun J., Barthelet V., Chornick T., Duguid S. (2003). Structure, composition, and variety development of flaxseed. *Flaxseed in Human Nutrition.* Eds Thompson L.U. and Cunnane S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois USA. 1-40.
- Deamer D. (2017). The Role of Lipid Membranes in Life's Origin. *Life.* 7 (1). 5. Review.
- Denich T. J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods.* 52. 149-82.

- Dersch L. M., Beckers V., Rasch D., Melzer G., Bolten C., Kiep K., Becker H., Blasing O. E., Fuchs R., Ehrhardt T., Wittman C. (2016). Novel Approach for High-Throughput Metabolic Screening of Whole Plants by Stable Isotopes. *Plant Physiol.* 171 (1). 25–41.
- Destailats F, Angers P (2002) One-step methodology for the synthesis of FA picolinyl esters from intact lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 79. 253–256. doi: 10.1007/s11746-002-0469-7
- Dieuaide-Noubhani M. and Alonso A. P. (2014). Plant Metabolic Flux Analysis to plants: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology.* 1090.
- Dixit S., Kanakraj S., Rehman A. (2012). Linseed oil as a potential resource for biodiesel: A review. *Renwable and Sustainable Energy Reviews.* 16. 4415-4421.
- Droste P., Miebach S., Niedenführ S., Wiechert W., Nöh K. (2011). Visualizing multi-omics data in metabolic networks with the software Omix: a case study. *Biosystems.* 105 (2). 154-161.
- Duan S., Jin C., Li D., Gao C., Qi S., Liu K., Hai J., Ma H., Chen M. (2017). MYB76 Inhibits seed fatty acid accumulation in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8:226.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem.* 28, 350-356.
- Ducat D.C. and Silver P.A. (2012). Improving carbon fixation pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16 (3-4). 337-344.
- Ducheix S., Montagner A, Polizzi A., Lasserre F., Régnier M., Marmugi A., Benhamed F., Bertrand-Michel J., Mselli-Lakhal L., Loiseau N., Martin P.G., Lobaccaro J.M., Ferrier L., Postic C., Guillou H. (2017). Dietary oleic acid regulates hepatic lipogenesis through a liver X receptor-dependent signaling. *PLoS One.* 12 (7).
- Duhot P., Gontier E., Thomas D., Thomasset B., Menard M. (1998). Procédé de production d'acides gras ramifiés au moyen de plantes génétiquement modifiées. Numéro de brevet PCT/FR 98 02116. Europe, Canada, Etats Unis, Japon, WOFR9802116.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., de Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J. M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., De Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J. M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G. F., Straub M. L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wésolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature.* 430 (6995). 35-44.
- Dulermo R., Gamboa-Meléndez H., Dulermo T., Thevenieau F., Nicaud J.M. (2014). The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 14. 883–96.

- Dulermo T., Lazar Z., Dulermo R., Rakicka M., Haddouche R., Nicaud J.M. (2015). Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1851. 1107–17.
- Durrett T., Benning C., Ohlrogge J. (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J*. 54. 593-607.
- Duskova M., Borovikova D., Herynkova P., Rapoport A., Sychrova H., (2015). The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 362 (3). 1-8.
- Dyer J. M., Stymne S., Green A. G., Carlsson A.S. (2008). High-value oils from plants. *Plant J*. 54. 640-655.
- Eastmond P., Koláčná, L., Rawsthorne S. (1996). Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). 47 (304). 1763-1769.
- Eastmond P. J. and Rawsthorne S. (2000). Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos. *Plant physiol*. 122 (33). 767-74.
- EDF – L'épuisement des ressources. www.edf.fr. Consulté le 21/08/2018.
- Egermeier M., Russmayer H., Sauer M., Marx H. (2017). Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Front Microbiol*. 8 (49). 1-9.
- Facchinelli F. and Weber A. P. M. (2011). The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front. Plant Sci*. 2 (50). doi: 10.3389/fpls.2011.00050.
- FAO, How to Feed the World in 2050. in: Expert Meeting on How to feed the World in 2050. FAO Headquarters, Rome, 24–26 June. 2009, 35pp.
- Fehr W. R., Hadley H. H. (1980). Hybridization of Crop Plants. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Publishers Madison, Wisconsin, USA. Chap. 24. 357-366.
- Fernandez D. E., Turner F. R., Crouch M. L. (1991). In situ localization of storage protein mRNAs in developing meristems of *Brassica napus* embryos. *Development*. 111. 299-313.
- Fickers P., Benetti P. H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M. S. & Nicaud J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*. 5. 527-543.
- FitzPatrick M., Cunningham M. P., Whitney R. A. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*. 101. 8915-8922.
- Flock M. R., Kris-Etherton P. M. (2013). Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16. 133-140.
- Flügge U. I., Häusler R. E., Ludewig F., Gierth M. (2011). The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *Journal of Experimental Botany*. 62 (7). 2381-2392.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957). A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226 (1). 497-509.

- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G. (2007). Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75 (6). 1409-1417.
- Gao S., Tong Y., Wen Z., Zhu L., Ge M., Chen D., Jiang Y., Yang S. (2016). Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43. 1085–1093.
- Gaydou E. M., Ralaimanarivo A., Bianchini J. P. (1993). Cyclopropanoic fatty-acids of Litchi (*Litchi chinensis*) seed oil - a reinvestigation. *J Agr Food Chem*. 41. 886-890.
- Geigenberger P. and Fernier A. R. (2014). Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid Redox Signal*. 21(9). 1389–1421.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J, Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274. 563-567.
- Gontier E., Boussouel N., Terrasse C., Jannoyer M., Ménard M., Thomasset B., Bourgaud F. (2000). *Litchi chinensis* fatty acid diversity: occurrence of the unusual cyclopropanic fatty acids. *Biochemical Society Transaction*. 28 (6). 578-580.
- Guan R., Lager I., Li X., Stymne S., Zhu L. H. (2014). Bottlenecks in erucic acid accumulation in genetically engineered ultrahigh erucic acid *Crambe abyssinica*. *Plant biotechnol. J*. 12. 193-203.
- Ghillebert R., Swinnen E., Wen J., Vandesteene L., Ramon M., Norga K., Rolland F., Winderickx J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J*. 278(21). 3978-90.
- Harzevili F. D., Farshad (2014). Biotechnological applications of the yeast. Springer Briefs in Microbiology. Paperback – 1709.
- Hauschild P., Röttig A., Madkour M.H., Al-Ansari A.M., Almakishah N.H., Steinbüchel A. (2017). Lipid accumulation in prokaryotic microorganisms from arid habitats. *Appl Microbiol Biotechnol*. 101 (6). 2203-2216.
- Hay J. and Schwender J. (2011). Metabolic network reconstruction and flux variability analysis of storage synthesis in developing oilseed rape (*Brassica napus* L.) embryos. *The plant Journal*. 67. 526-541.
- Henry S. A., Kohlwein S. D., Carman G. M. (2012). Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 192 (2). 317-349.
- Hill L. M. and Smith A. M. (1991). Evidence that glucose-6-phosphate is imported as substrate for starch synthesis by plastids of developing pea embryos. *Planta*. 185. 91-96.
- Holdsworth J. E., Veenhuis M., Ratledge C. (1988). Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. *J Gen Microbiol*. 134. 2907–2915.
- Hossain Z., Pillai B. V. S., Gruber M. Y., Yu M., Amyot L., Hannoufa A. (2018). Transcriptome profiling of *Brassica napus* stem sections in relation to differences in lignin content. *BMC Genomics*. 19. 255.

- Hua S., Chen Z. H., Zhang Y., Yu H., Lin B., Zhang D. (2014). Chlorophyll and carbohydrate metabolism in developing silique and seed are prerequisite to seed oil content of *Brassica napus* L. *Botanical Studies*. 55. 34.
- Huang A. H. (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.*, 110. 1055–1061.
- Huang C. Y., Huang A. H. C. (2017). Unique motifs and length of hairpin in oleosin target the cytosolic side of endoplasmic reticulum and budding lipid droplet. *Plant physiol.* 174 (4). 2248–2260.
- Imatoukene N., Verbeke J., Beopoulos A., Taghki A.I., Thomasset B., Sarde C.O., Nonus M, Nicaud J.M. (2017). A metabolic engineering strategy for producing conjugated linoleic acids using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101 (11). 4605–4616.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). <https://iupac.org/>.
- Jang H. D., Lin Y. Y., Yang S. S. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*. 94 (15). 1633-1644
- Jhala J.A., Hall. M.L. (2010). Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current Uses and Future Applications. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 4, 4304-4312.
- Jenkins D. J., Chiavaroli L., Wong J. M., Kendall C., Lewis G. F., Vidgen E., Connelly P. W., Leiter L. A., Josse R. G., Lamarche B. (2010). Adding monounsaturated fatty acids to a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia. *CMAJ*. 182 (18). 1961-7.
- Jensen C. L. (2006). Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr.* 83. 1452-1457.
- Juretzek T., Le Dall M., Mauersberger S., Gaillardin G., Barth G., Nicaud J.M. (2001). Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 18 (2). 97-113.
- Kai Y., Pryde E.H. (1982). Production of branched-chain fatty acids from Sterculia oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 59 (7). 300-305.
- Kajla J., Sharma A., Sood D.R. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *J Food Sci Technol.* 52 (4). 1857–1871.
- Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schubert S., Gutensohn M., Weber A., Flügge U.I. (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose-6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell*. 10 (1). 105-17.
- Kamzololova S. V., Finogenova T. V., Morgunov I. G. (2008). Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technol Biotechnol.* 46. 51–59.
- Kavšček M., Bhutada G., Madl T., Natter K. (2015). Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Syst Biol.* 9. 72.
- Kerkhoven E. J., Pomraning K. R., Baker S. E., Nielsen J. (2016). Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *NPJ Syst Biol Appl.* 2. 16005.

- Khadake R. M., Ranjekar P. K., Harsulkar A. M. (2009). Cloning of a novel omega-6 desaturase from flax (*Linum usitatissimum* L.) and its functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* 42 (2). 168-74.
- Khandelwal S., Kelly L., Malik R., Prabhakaran D., Reddy S. (2013). Impact of omega-6 fatty acids on cardiovascular outcomes: a review. *J Prev Cardiol.* 2. 325–336.
- Kim M. K., Lane A., Kelley J.J., Lun D. S. (2016). E-Flux2 and SPOT: Validated Methods for Inferring Intracellular Metabolic Flux Distributions from Transcriptomic Data. *PLoS One.* 11 (6). e0157101.
- Kim, T.-H., Young-Sook O., Sang-Jin K. (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.
- Kimura K., Yamaoka M., Kamisaka Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods.* 56. 331–338.
- King S. P., Lunn J. E., Furbank R.T. (1997). Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing Canola siliques. *Plant physiol.* 114 (1). 153-160.
- Ko J. K., Lee S. M. (2018). Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. *Current Opinion in Biotechnology.* 50. 72–80.
- Kolouchová I., Mařátková O., Sigler K., Masák J., Řezanka T. (2016). Production of palmitoleic and linoleic acid in oleaginous and nonoleaginous yeast biomass. *International Journal of Analytical Chemistry.* 2016, Article ID 7583684.
- Koubaa M., Cocuron J. C., Thomasset B., Alonso A. P. (2013). Highlighting the tricarboxylic acid cycle: liquid and gas chromatography-mass spectrometry analyses of (13)C-labeled organic acids. *Anal Biochem.* 436 (2). 151-159.
- Kozak B. U., Rossum H. M., Benjamin K. R., Wu L., Daran J. M. G., Pronk J. T., Maris A. J. A., (2014). Replacement of the *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-CoA synthetases by alternative pathways for cytosolic acetyl-CoA synthesis. *Metabolic Engineering.* 21. 46–59.
- Kreger van Rij N. J. W. (1984). *The Yeasts: A Taxonomic Study.* (3rd revised and enlarged edition) XVI + 1082 S., 404 Abb., 42 Tab. Amsterdam 1984. Elsevier Science Publishers B V.
- Kris-Etherton P. M., Harris W.S., Appel L.J. (2003). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:20-30.
- Küllenberg D., Taylor L. A., Schneider M., Massing U. (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease.* 11. 3.
- Kumar A., Singh J. (2016). Microalgae and Cyanobacteria Biofuels: A Sustainable Alternate to Crop-based Fuels. *Microbes and Environmental Management.* Chapitre 1. 1-21.
- Kuriki K., Hirose K., Wakai K., Ito H., Suzuki T., Hiraki A., Saito T., Iwata H., Tatematsu M., Tajima K. (2007). Breast cancer risk and erythro-cyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese. *Int J Cancer.* 121. 377-385.

- Lamers D., Van Biezen N., Martens D., Peters L., Van de Zilver E., Jacobs-van Dreumel N., Wijffels R.H., Lokman C. (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnol.* 16 (1). 45.
- Landys M. M., Piersma T., Guglielmo C. G., Jukema J., Ramenofsky M., and Wingfield J.C. (2005). Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. *Proc Biol Sci.* 272 (1560). 295–302.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J. M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants (Basel).* 4 (1). 112-66.
- Ledesma-Amaro R., Nicaud J.M. (2016). *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research.* 61. 40-50.
- Lee H., Park W. J. (2014). Unsaturated fatty acids, desaturases, and human health. *J Med Food.* 17. 189-197.
- Lee M., Lenman M., Banas A., Bafor M, Singh S., Schweizer M., Nilsson R., Liljenberg C., Dahlgvist A., Gummesson P. O., Sjudahl S., Green A., Stymne S. (1998). Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science.* 280. 915-918.
- Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J. L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* Review. doi: 10.3389/fpls.2013.00272.
- Li D., Jin C., Duan S., Zhu Y., Qi S., Liu K., Gao C., Ma H., Zhang M., Liao Y., Chen M. (2017). MYB89 transcription factor represses seed oil accumulation. *Plant Physiology.* 173 (2). 1211-1225.
- Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Adersson M. X., Arondel V., Bates P. D., Baud S., Bird D., DeBono A., Durrett T. P., Franke R. B., Graham I. A., Katayama K., Kelly A. A., Larson T., Markham J. E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K. M., Wada H., Welti R., Xu C., Zallot R., Ohlrogge J. (2013). Acyl-Lipid Metabolism. The Arabidopsis Book. *American Society of Plant Biologists.*
- Liu Z., Erhan S.Z., Akin D.E., Barton F.E. (2006). "Green" composites from renewable resources: preparation of epoxidized soybean oil and flax fiber composites. *J. Agric. Food Chem.* 54. 2134-2137.
- Liu N., Qiao K., Stephanopoulos G. (2016). ¹³C Metabolic Flux Analysis of acetate conversion to lipids by *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering.* 38. 86-97.
- Lombard J. (2014). Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol direct.* 9. 32.
- Long C. P., Antoniewicz M. R., (2014). Quantifying biomass composition by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal.Chem.* 86. 9423–9427.
- Lonien J., Schwender J. (2009). Analysis of metabolic flux phenotypes for two *Arabidopsis* mutants with severe impairment in seed storage lipid synthesis. *Plant Physiol.* 151. 1617-1634.

- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 193. 265-275.
- Luo X., Su P., Zhang W. (2015). Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs.* 13 (7). 4231–4254.
- Ma H. and Wang S. (2016). Histidine regulates seed oil deposition through abscisic acid biosynthesis and β -oxidation. *American Society of Plant Biologists.* 172. 848-857.
- MacLean C.H., Newberry S.J., Mojica W.A., Khanna P., Issa A. M., Suttorp M.J., Lim Y.W., Traina S B., Hilton L., Garland R., Morton S.C. (2006). Effects of Omega-3 fatty acids on cancer risk. A systematic review. *JAMA.* 295 (4). 403-415.
- Mansour S., Bailly J., Delettre J., Bonnarne P. (2009). A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics.* 20. 4714-25.
- Markham K. A. et Alper H. S. (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* for the production of cyclopropanated fatty acids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2067-8>
- Martínez-Muñoz G. A., Kane P. (2018). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem.* 283 (29). 20309-20319.
- Martinez-Vazquez A. Gonzalez-Hernandez A., Domínguez A., Rachubinski R., Riquelme M., Cuellar-Mata P., Guzman J. C. T. (2013). Identification of the Transcription Factor Znc1p, which Regulates the Yeast-to-Hypha Transition in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS One.* 8(6).
- McCleary B. V., Gibson T. S., Mugford D. C. (1997). Measurement of Total Starch in Cereal Products by Amyloglucosidase- α -Amylase Method: Collaborative Study. *J. AOAC International.* 80. 571-579.
- Metcalf D., Wang, C. N. (1981). Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base catalyzed transesterification. *Journal of Chromatography Science.* 19 (10). 530-535.
- Millan-Oropeza A., Henry C., Blein-Nicolas M., Aubert-Frambourg A., Moussa F., Bleton J., Virolle M. J. (2017). Quantitative proteomics analysis confirmed oxydative metabolism predominates in *Streptomyces coelicolor* versus glycolytic metabolism in *Streptomyces lividans*. *J. Proteome Res.* 16 (7). 2597–2613.
- Millard P., Letisse F., Sokol S., Portais J. C. (2012). IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics.* 28. 1294-1296.
- Mitchell D.C., Niu S.L., Litman B.J. (2003). DHA-rich phospholipids optimize G-protein-coupled signaling. *J Pediatr.* 143. 80-86.
- Mondal M., Goswami S., Ghosh A., Oinam G., Tiwari O. N., Das P., Gayen K., Mandal M.K., Halder G.N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *3 Biotech.* 7 (2). 99.
- Monford P.A., Patel J., Anand Prem (2014). Rajan Algae Oil: A Sustainable Renewable Fuel of Future. *Biotechnol Res Int.*

- Montastier C., Griat J. (1992). Utilisation de sphingolipides, dans la préparation d'une composition cosmétique ou dermapharmaceutique protégeant la peau et les cheveux contre les effets nocifs de la pollution atmosphérique. Brevet WO1992017160 A1 (PCT/FR1992/000302).
- Morales-Vargas A. T., Dominguez A., Ruiz-Herrera J. (2012). Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Research in Microbiology*. 163 (5). 378-387.
- Moriguchi K., Yamamoto S., Ohmine Y., Suzuki K. (2016). A fast and practical yeast transformation method mediated by *Escherichia coli* based on a trans-kingdom conjugal transfer system: just mix two cultures and wait one hour. *PLoS One*. 11 (2). doi: 10.1371/journal.pone.0148989
- Morin N., Cescut J., Beopoulos A., Lelandais G., Le Berre V., Uribe Larrea J. L., Molina-Jouve C., Nicaud J. M. (2011). Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS One*. 6 (11). doi:10.1371/journal.pone.0027966.
- Mumtaz M. W., Mukhtar H., Anwar F., Saari N. (2014). RSM based optimization of chemical and enzymatic transesterification of palm oil: biodiesel production and assessment of exhaust emission levels. *Scientific World Journal*. 2014. Article ID 526105.
- NATUR'LIN.LEO : Les écomatériaux du lin : http://www.leo-ecomateriaux.fr/15_natur-lin
- Murínová S. and Dercová K. (2014). Response Mechanisms of Bacterial Degraders to Environmental Contaminants on the Level of Cell Walls and Cytoplasmic Membrane. *Int J Microbiol*. 2014. ID873081.
- Nanchen A., Fuhrer T., Sauer U. (2007). Determination of metabolic flux ratios from ¹³C experiments and gas chromatography–mass spectrometry data: protocol and principles. *Metabolomics: methods and protocols*. 177–197.
- Nicaud J. M., Fabre E., Gaillardin C. (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Current Genetics*. 16. 253–260.
- Niewiadomski P., Knappe S., Geimer S., Fischer K., Schulz B., Unte U. S., Rosso M. G., Ache P., Flügge U. F., Schneider A. (2005). The Arabidopsis Plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 Is Essential for Pollen Maturation and Embryo Sac Development. *Plant Cell*. 17 (3). 760-775.
- Nlandu-Mputu M. (2009). Identification des enzymes intervenant dans le transfert des acides gras dans les végétaux : spécificité de ces enzymes vis-à-vis de la prise en charge d'acides gras inhabituels. Thèse de doctorat : Biotechnologie. Compiègne : Université de Technologie de Compiègne.
- O'Grady J., Schwender J., Shachar-Hill Y., Morgan J. A. (2012). Metabolic cartography: experimental quantification of fluxes from isotopic labelling studies. *Journal of Experimental Botany*. 63 (6). 2293-2308.
- Oomah B.D., Kenaschuk E.O., Cui W., Mazza G. (1995). Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed. *J. Agric. Food Chem.* 43. 1484-1488.

- Oomah B.D., Kenaschuk E.O., Mazza G. (1997). Tocopherols in flaxseeds. *J. Agric. Food Chem.* 45 (6). 2076-2080.
- Orth J. D., Thiele I., Palsson B. (2010). What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 28 (3). 245-248.
- Overeem A., Buisman G.J.H., Derksen J.T.P., Cuperus F.P., Molhoek L., Grisnich W. & Goemans G. (1999) Seed oils rich in linolenic acid as renewable feedstock for environment-friendly crosslinkers in powder coatings. *Ind. Crops Prod.* 10. 157-165.
- Oyola S. O., Evans K. J., Smith T. K., Smith B. A., Hilley J. D., Mottram J. C., Kaye P. M., Smith D. F. (2012). Functional Analysis of Leishmania Cyclopropane Fatty Acid Synthetase. *PLoS One.* 7 (12). e51300.
- Papadimitriou K., Alegria A., Bron P. A., de Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J. A., Linares D. M., Ross P., Stanton C., Turrone F., Van Sinderen D., Varmanen P., Ventura M., Zúñiga M., Tsakalidou E., Kok J. (2016). Stress physiology of lactic acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol.* 80 (3). 837-890. Review.
- Pan X., Siloto R. M. P., Wickramaratna A. D., Mietkiewska E., Weselake R. J. (2013). Identification of a Pair of Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferases from Developing Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Catalyzing the Selective Production of Trilinolenin. *J. Biol. Chem.* 288 (33). 24173-24188.
- Pan X., Chen G., Kazachkov M., Greer M. S., Caldo K. M. P., Zou J., Weselake R. J. (2015). In vivo and in vitro evidence for biochemical coupling of reactions catalyzed by lysophosphatidylcholine acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 290 (29). 18068-18078.
- Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. (2002a). Single cell oil production by Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58. 308–312.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I. (2002b). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology.* 92. 737-744.
- Parikh M., Netticadan T., Pierce G.N. (2017). Flaxseed: Its Bioactive Components and their Cardiovascular Benefits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 314 (2). 146-159.
- Parmenter D. L., Boothe J. G., Van Rooijen G. J., Yeung E. C., Moloney M.M. (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.* 29 (6). 1167-1180.
- Peet M, Stokes C. (2005). Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs.* 65. 1051-1059.
- Petrovič U. (2015). Next-generation biofuels: a new challenge for yeast. *Yeast.* 32. 583-593.
- Pierre M., Traverso J. A., Boisson B., Domenichini S., Bouchez D., Giglione C., Meinel T. (2007). N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 19. 2804–2821.

- Pomraning K. R., Kim Y. M., Nicora C. D., Chu R. K., Bredeweg E. L., Purvine S. O., Hu D., Metz T. O., Baker S. E. (2016). Multi-omics analysis reveals regulators of the response to nitrogen limitation in *Yarrowia lipolytica*. *BMC Genomics*. 17. 138.
- Prasad, K. (2009) Flaxseed and cardiovascular health. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 54. 369-377.
- Press W. H., Teukolsky S. A., Vetterling W. T., Flannery B. P. (1992). Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ochoa-Estopier A. and Guillouet S. E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*. 170. 35-41.
- Queiroz-Claret C., Jolivet P., Chardot T., Bergeron E., Meunier J. C. (2000). Time-co-ordinated control of glycogen synthase, protein phosphatase 2A and protein kinase CK2 during culture growth in *Yarrowia lipolytica* in relation to glycogen metabolism. *C R Acad Sci III*. 323. 257–66.
- Quek L. E., Wittman C., Nielsen L. K., Krömer J. O. (2009). OpenFLUX; efficient modeling software for ¹³C-based metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact*. 8. 25. doi: 10.1186/1475-2859-8-25.
- Ratledge C. (1992). Tailor made oils and fats - Possibilities for microbial oils. *Revue Française des Corps Gras*. 39. 325-332.
- Ratledge C and Wynn J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 51. 1-51.
- Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. 86. 807–815.
- Ratledge C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnol Lett*. 36. 1557–1568.
- Ren X. Zhao X., Turcotte F., Deschênes J. S., Tremblay R., Jolicoeur M. (2017). Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microb Cell Fact*. 16. 26.
- Rizos E. C., Ntazani E. E., Bika E., Kostapanos M. S., Elisaf M. S. (2012). Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events a systematic. Review and meta-analysis. *JAMA*. 308 (10). 1024-1033.
- Rolland F., Winderickx J., Thevelein J. M., (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 26 (5). 310-317.
- Romero-Guido C., Belo I., Ta T. M., 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 utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*. 89. 535–47.
- Ros E. (2003). Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 78. 617-625. Review.

- Rossak M., Smith M., Kunst L. (2001). Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 46. 717-725.
- Röttig A., Hauschild P., Madkour M. H., Al-Ansari A. M., Almakishah N. H., Steinbüchel A. (2016). Analysis and optimization of triacylglycerol synthesis in novel oleaginous *Rhodococcus* and *Streptomyces* strains isolated from desert soil. *Journal of Biotechnology.* 225. 48-56.
- Ryu S., Hipp J., Trinh C. T. (2016). Activating and Elucidating Metabolism of Complex Sugars in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 82 (4). 1334–1345.
- Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. (2013). Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy.* 48. 148–166.
- Sánchez-Vidaña D. I., Rajwani R., Wong M. S. (2017). The use of omic technologies applied to traditional chinese medicine research. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017. Article ID 6359730.
- Sabra W., Bommareddy R.R., Maheshwari G., Papanikolaou S., Zeng A.P. (2017). Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microb Cell Fact.* 16. 78.
- Santos D. K. F., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of Molecular Sciences.* 17. 401.
- Santos-Mendoza M., Dubreucq B., Baud S., Parcy F., Caboche M., Lepiniec L. (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 54, 608-620.
- Sarris D., Galiotou-Panayotou M., Koutinas A. A., Komaitis M., Papanikolaou S. (2011). Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol.* 86:1439–1448.
- Savoire R., Lazouk M.A., Van Hecke E., Roulard R., Tavernier R., Guillot X., Rhazi L., Petit E., Mesnard F., Thomasset B. (2015). Environmental and varietal impact on linseed composition and on oil unidirectional expression process. *OCL.* 22 (6). doi: 10.1051/ocl/2015016
- Schwender J., Ohlrogge J. B. (2002). Probing in vivo metabolism by stable isotope labelling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant physiol.* 130 (1). 347-61.
- Schwender J., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y. (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J. Biol. Chem.* 278. 29442-29453.
- Segre D., Vitkup D., Church G.M. (2002). Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99. 15112-15117.
- Seip J., Jackson E., He H., Zhu Q., Hong S. P. (2013). Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7360–7370.

- Service de la statistique et de la prospective (SSP). <http://agreste.agriculture.gouv.fr/> Consulté en Septembre 2017.
- Sharma R. V., Somidi A. K., Dalai A. K. (2015). Preparation and properties evaluation of biolubricants derived from canola oil and canola biodiesel. *J Agric Food Chem.* 63 (12). 3235-42.
- Shuba E. S., Kifle D. (2018). Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Vol 81. 743-755.
- Show P. L., Tang M. S. Y., Nagarajan D., Ling T. C., Ooi C. W., Chang J. S. (2017). A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International Journal of Molecular Sciences.* 18 (1). 215.
- Shysha E. N., Korhovyv V. I., Bayer G. Y., Guzenko E. V., Lemesh V. A., Kartel N. A., Yemets A. I., Blume Y. B., (2012). Genetic Transformation of Flax (*Linum usitatissimum* L.) with the Chimeric GFPTUA6 Gene for the Visualization of Microtubules. *Cytology and genetics.* 47 (2). 63-69.
- Siliakus M. F., Van der Oost J., Kengen S. W. M. (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles.* 21 (4).651-670.
- Smith R. G., Gauthier D. A., Dennis D. T., Turpin D. H. (1992). Malate- and Pyruvate-Dependent Fatty Acid Synthesis in Leucoplasts from Developing Castor Endosperm. *Plant Physiol.* 98. 1233-1238.
- Sriram G., Fulton D. B., Iyer V.V., Peterson J. M., Zhou R., Westgate M. E., Spalding M. H., Shanks J. V. (2004). Quantification of compartmented metabolic fluxes in developing soybean embryos by employing biosynthetically directed fractional ¹³C labeling, two-dimensional [¹³C, ¹H] nuclear magnetic resonance, and comprehensive isotopomer balancing. *Plant Physiol.* 136 (2). 3043–3057.
- Stadler R., Lauterbach C., Sauer N. (2005). Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos. *Plant Physiol.* 139. 701-712.
- Stincone A., Prigione A., Cramer T., Wamelink M.M.C., Campbell K., Cheug E., Olin-Sandoval V., Grüning N.M., Krüger A., Tauqeer Alam M., Keller M.A., Breitenbach M, Brindle K.M., Rabinowitz J.D., Ralser M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 90 (3). 927–963.
- Sturm A. (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant physiol.* 121. 1-8.
- Sun J., Aluvila S., Kotaria R., Mayor J. A., Walters D. E., Kaplan R. S. (2010). Mitochondrial and plasma membrane citrate transporters: discovery of selective inhibitors and application to structure/function analysis. *Mol Cell Pharmacol.* 2(3).101-110.
- Tamás M. J. and Hohmann S. (2004). The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Stress Responses. *Topins in Currents Genetics.* 1. 121-177.

- Teixeira H., Goncalves M.G., Rozes N., Ramos A., San Romao M.V. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microb Ecol.* 43. 146-53.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408. 796-815.
- Thesing C. S., Bot M., Milaneschi Y., Giltay E. J., Penninx B. W. J. H. (2017). Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 87. 53-62.
- Trémolières A. (1998). Les lipides : des agents de plus en plus actifs de la vie cellulaire. *Analysis Magazine.* 26. 25-26.
- Trinder P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. clin.Path.* 22. 158-161.
- Trivedi J., Aila M., Sharma C. D., Gupta P., Kaul S. (2015). Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipase enzyme in solvent free medium. *Springerplus.* 4. 165.
- Troncoso-Ponce M.A., Kilaru A., Cao X., Durrett T.P., Fan J., Jensen J.K., Thrower N.A. Pauly M., Wilkerson C., Ohlrogge J.B. (2011). Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds. *The Plant Journal.* 68. 1014-1027.
- Troufflard S. (2004). Etude du métabolisme carbone dans l'embryon de lin oléagineux lors de l'accumulation des réserves lipidiques. Thèse de doctorat : Biochimie métabolique. Amiens : Université de Picardie Jules Verne, 148 p.
- Truksa M., MacKenzie S. L., Qiu X. (2003). Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiol. Biol.* 41 (2). 141-147.
- USDA - United States Department of Agriculture, Janvier 2018. "Oilseeds World Marker and Trade. Foreign Agricultural Service.
- USDA - United States Department of Agriculture, Août 2018. "Oilseeds World Marker and Trade. Foreign Agricultural Service.
- Van De Mark, M., Sandefur, K. (2005) Vegetable Oils in Paint and Coatings. Industrial Uses of Vegetable Oil, S. Erhan, AOCS Publishing, Champaign, Illinois, USA. 143-162.
- Venglat P., Xiang D., Qiu S., Stone S. L., Tibiche C., Cram D., Alting-Mees M., Nowak J., Cloutier S., Deyholos M., Bekkaoui F., Sharpe A., Wanf E., Rowland G., Selvaraj G., Datla R. (2011). Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biology.* 11 (74).
- Verwoerd T. C., Dekker B. M., Hoekema A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17 (6). 2362.
- Vesper H., Schmelz E. M., Nikolova-Karakashian M. N., Dillehay D. L., Lynch D. V. and Merrill A. H. (1999). Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *J. Nutr.* 129 (7). 1239-50.
- Vijay V., Pimm S.L., Jenkins C.N., Smith S.J. (2016). The Impacts of Oil Palm on Recent Deforestation and Biodiversity Loss. *PLoS One.* 11 (7).

- Wang D. D., Hu F. B. (2017). Dietary Fat and Risk of Cardiovascular Disease: Recent Controversies and Advances. *Annu Rev Nutr.* 37. 423-446.
- Wang A. Y., Grogan D., Cronan Jr.J. E. (1992). Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site. *Biochemistry.* 31. 11020-11028.
- Wang Q., Cui Y., Sen B., Ma W., Zheng R. L., Liu X., Wang G. (2017). Characterization and robust nature of newly isolated oleaginous marine yeast *Rhodospiridium spp.* from coastal water of Northern China. *AMB Expr.* 7. 30.
- Wang Q., Du X., Ma K., Shi P., Liu W., Sun J., Peng M. Huang Z. (2018). A critical role for very long-chain fatty acid elongases in oleic acid-mediated *Saccharomyces cerevisiae* cytotoxicity. *Microbiological Research.* 207. 1-7.
- Wang Z. and Benning C. (2011). Arabidopsis thaliana Polar Glycerolipid Profiling by Thin Layer Chromatography (TLC) Coupled with Gas-Liquid Chromatography (GLC). *Journal of Visualized Experiments.* (49). e2518.
- Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S., Shi D., McDill J., Yang L., Hawkins S., Neutelings G., Datla R., Lambert G., Galbraith D. W., Grassa C.J., Gerald A., Cronk Q.C., Cullis C., Dash P. K., Kumar P. A., Cloutier S., Sharpe A. G., Wong G. K. S., Wang J., Deyholos M. K. (2012). The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads. *The Plant journal.* 72. 461-473.
- Wasylenko T. M., Ahn W. S., Stephanopoulos G. (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering.* 30. 27-39.
- Wickerham L. J., Kurtzman C. P., Herman A. I. (1970). Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science.* 167. 1141.
- Wickramarathna A. D., Siloto R. M. P., Mietkiewska E., Singer S. D., Pan X., Weselake R. J. (2015). Heterologous expression of flax Phospholipid:Diacylglycerol Cholinephosphotransferase (PDCT) increases polyunsaturated fatty acid content in yeast and Arabidopsis seeds. *BMC Biotechnol.* 15. 63.
- Wiechert W., Möllney M., Petersen S., de Graff A. A. (2001). A universal framework for 13C metabolic flux analysis. *Metab Eng.* 3. 265-283.
- Wieland O. H. (1988). Glycerol. *Methods of enzymatic analysis.* 6. 504-510.
- Wijffels R. H., Barbosa M. J., Eppink M. H. M. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuel Bioproduct Biorefin.* 4 (3). 287-95.
- Wilkinson P., Leach C., Ah-Sing E. E., Hussain N., Miller G. J., Millward D. J., Griffin B. A. (2005). Influence of alpha-linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis.* 181. 115-124.

- Williams T. C. R., Miguet L., Masakapalli S. K., Kruger N. J., Sweetlove L. J., Ratcliffe R. G. (2008). Metabolic network fluxes in heterotrophic *Arabidopsis* cells: stability of the flux distribution under different oxygenation conditions. *Plant physiol.* 148 (2). 704-18.
- Wilmer J.A. and Wallington E.J. (2001). Elongase promoters. Brevet N°WO 02/05024 A2.
- Workman M., Holt P., Thykaer J. (2013). Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express.* 3 (58).
- World Population Prospects - Population Division - United Nations. www.esa.un.org. Visité le 20/08/2018.
- Wynn J. P., Hamid A. A., Ratledge C. (1999). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology.* 145. 1911–1917
- Xie D. (2017). Integrating Cellular and Bioprocess Engineering in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* for Biodiesel Production: A Review. *Front Bioeng Biotechnol.* 5 (65).
- Yadav U. P., Ayre B. G., Bush D. R. (2015). Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality. *Front. Plant Sci.* 6. 275. Review.
- Yao N., Jing L., Zheng H., Chen M., Shen Y. (2018). Research progress of jasmonate-responsive transcription factors in regulating plant secondary metabolism. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 43(5). 897-903.
- Yarrow D. (1972). Four new combinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 3. 357–360.
- Young J.D. (2014). INCA: a computational platform for isotopically non-stationary metabolic flux analysis. 30(9):1333-5
- Yu W.H., Rawat R., Shanklin J. (2011). Characterization and analysis of the cotton cyclopropane fatty acid synthase family and their contribution to cyclopropane fatty acid synthesis. *BMC Plant Biology.* 11. 97.
- Yun E. J., Lee J., Kim D. H., Kim, J., Kim S., Jin Y. S., Kim, K. H. (2018). Metabolomic elucidation of the effects of media and carbon sources on fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology.* 272-273. 7-13.
- Yuzbashev T. V., Yuzbasheva E. Y., Sobolevskaya T. I., Laptev I. A., Vybornaya T. V., Larina A. S., Matsui K., Fukui K., Sineoky S. P. (2010). Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering.* 107. 673–682.
- Zhang Y., Adams P., Ratledge C. (2007). Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology.* 153:2013–2025.
- Zhang Y. M., Rock C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 6. 222-233.

- Zhang H., Zhang L., Chen H., Chen Y. Q., Ratledge C., Song Y., Chen W. (2013). Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation. *Biotechnol Lett.* 35. 2091–2098.
- Zhang H., Wu C., Wu Q., Dai J., Song Y. (2016). Metabolic flux analysis of lipid biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *PLoS One.* 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159187>.
- Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A. R. (2014). *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances.* 32. 920–933.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Liste des métabolites et abréviations (modèle FBA-lin).

Type	Abréviation	Nom
Flux externes	ext	Source
	eff	Sink
Compartment	.c	cytosolique
	.m	mitochondrial
	.p	plastidial
Métabolites/ cofacteurs	ADPG	Adénosine Diphosphate-Glucose
	aKG	2-oxoglutarate
	Ala	Alanine
	AcCoA	Acetyl-coenzyme A
	ADP	Adenosine diphosphate
	AMP	Adenosine monophosphate
	Arg	Arginine
	Aro	Aromatic amino acid precursor
	Asn	Asparagine
	Asp	Aspartate
	ASPsa	L-Aspartate 4-semialdehyde
	ATP	Adenosine triphosphate
	Cit	Citrate
	Citru	Citruline
	CO ₂	Carbon dioxyde
	CW	Cell wall
	DAH	L-2-Amino-6-oxoheptanedioate
	DPA	(2S,4S)-4-Hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate
	E4P	Erythrose 4-phosphate
	FBP	Fructose-1,6-biphosphate
	F6P	Fructose-6-phosphate
	FA4	Fatty acids with a 4-carbon chain
	FA6	Fatty acids with a 6-carbon chain
	FA8	Fatty acids with a 8-carbon chain
	FA10	Fatty acids with a 10-carbon chain
	FA12	Fatty acids with a 12-carbon chain
	FA14	Fatty acids with a 14-carbon chain
	FA16	Fatty acids with a 16-carbon chain
	FA16_1	Fatty acids with a 16-carbon chain and 1 double bond
	FA18	Fatty acids with a 18-carbon chain
	FA18_1	Fatty acids with a 18-carbon chain and 1 double bond
	FA18_2	Fatty acids with a 18-carbon chain and 2 double bond
	FA18_3	Fatty acids with a 18-carbon chain and 3 double bond
	FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide
	Fru	Fructose
	Fum	Fumarate
	G1P	Glucose-1-phosphate
	G6P	Glucose-6-phosphate
	GLC	Glucose
	GLN	Glutamine
	GLU	Glutamate
	GLU5P	L-Glutamyl 5-phosphate
	GLUSE	L-Glutamate 5-semialdehyde
	Gly	Glycine
	G3P	Glycerol 3-phosphate

His	Histidine
ICit	Isocitrate
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Mal	Malate
mDAH	meso-2,6-Diaminoheptanedioate
Met	Methionine
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OAA	Oxaloacetate
PEP	Phosphoenolpyruvate
Phe	Phenylalanine
Pro	Proline
Pyr	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sedoheptulose-7-phosphate
SER	Serine
Starch	Starch
Starch_d	Starch degradation
Suc	Saccharose
Succ	Succinate
SuccCoA	Succinyl-coenzyme A
SucP	Sucrose-phosphate
Thr	Threonin
TP	Trioses phosphate
TPA	2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinate
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UDPG	Uridine diphosphate-glucose
UTP	Uridine triphosphate
Val	Valine
X5P	Xylulose-5-Phosphate

Annexe 2 : Liste des réactions et abréviations (modèle FBA-lin).

R	Réactions	V _{réaction}	Enzymes/réactions
R1	Suc_ext -> Suc	Vsuc	Import de saccharose
R2	NH3_ext -> NH3	Vnh3	Import de NH ₃
R3	GLN_ext -> GLN	Va	Import de glutamine
R4	CO2_in -> CO2	Vco2in	Import de CO ₂
R5	Suc + UDP <-> Fru + UDPG	Vsusy	Sucrose synthase
R6	Suc -> Fru + GLC	Vinv	Invertase
R7	Fru + ATP -> F6P + ADP	Vhvk2	Hexokinase 2
R8	F6P + UDPG -> SucP + UDP	Vsps	Sucrose phosphate synthase
R9	SucP -> Suc	Vspp	Sucrose phosphate phosphatase
R10	GLC + ATP -> G6P + ADP	Vhvk1	Hexokinase 1
R11	G6P <-> F6P	Vgpi	Glucose-6-phosphate isomérase
R12	ATP + F6P -> ADP + F16bP	Vpfkc1	Cytosolic phosphofructokinase 1
R13	F16bP -> F6P	Vpfkc2	Cytosolic phosphofructokinase 2
R14	F6P -> F16bP	Vpfkc3	Cytosolic phosphofructokinase 3
R15	F16bP <-> DHAP + GAP	Vald	Aldolase
R16	DHAP <-> GAP	Vtpi	Triose phosphate isomérase
R17	DHAP + NADH + ATP -> G3P + NAD + ADP	Vgpdh	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
R18	GAP + NAD <-> dPG + NADH	Vg3pdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate désydrégénase
R19	dPG + ADP <-> PG + ATP	Vpgk/Vpgem	Phosphoglycérate kinase/phosphoglycérate mutase
R20	PG <-> PEP	Veno	Enolase
R21	PGp <-> PEPp	Venop	Enolase plastidiale
R22	PEP + ADP -> PYR + ATP	Vpyrk	Pyruvate kinase
R23	CO2 + PEP -> OAA	Vpepck1	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1
R24	OAA -> CO2 + PEP	Vpepck2	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2
R25	PYR -> PYRm	Vpyrm	Transporteur de pyruvate
R26	PYRm + NAD -> CO2 + AcCoA + NADH	Vpdhm	Pyruvate deshydrogénase mitochondriale
R27	OAA + AcCoA -> CIT	Vcits	Citrate synthase
R28	CIT <-> ICIT	Vaco	Aconitase
R29	ICIT + NAD <-> aKG + CO2 + NADH	Vidh	Isocitrate déshydrogénase
R30	aKG + NAD <-> CO2 + NADH + SuccCoA	Vogdc	A-ketglutarate dehydrogenase
R31	SuccCoA + ADP -> Succ + ATP	Vscs	Succinyl-coa synthetase
R32	Succ + FAD <-> FADH2 + Fum	Vsdh	Succinate dehydrogenase
R33	Fum <-> Mal	Vfum	Fumarase
R34	Mal + NAD <-> NADH + OAA	Vmaldh	Malate dehydrogenase
R35	G6P <-> G1P	Vpgm	Phosphoglucomutase
R36	G1P + UTP -> UDPG	Vgput	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase
R37	UDPG -> CW + UDP	Vcw1	Synthèse de paroi cellulaire
R38	G6P <-> H6Pp	Vgpt	Transporteur d'hexoses
R39	H6Pp <-> G1Pp	Vpgmp	Phosphoglucomutase plastidiale
R40	G1Pp + ATP -> ADPG	Vgpa	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase
R41	ADPG -> Starch + ADP	Vsts	Synthèse d'amidon
R42	Starch -> Starch_d	Vamy1	Dégradation d'amidon
R43	Starch_d + ATP -> G1Pp + AMP	Vamy2	Amylase
R44	H6Pp + NADP + NADP -> CO2 + Ru5P + NADPH + NADPH	Vppp	Glucose-6-phosphate deshydrogenase et 6-phosphogluconate déshydrogénase
R45	Ru5P <-> X5P	Vripe	Ribulose-phosphate-3-épimérase
R46	Ru5P <-> Ri5P	Vripi	Ribose-5-phosphate isomérase
R47	S7P + GAPp <-> Ri5P + X5P	Vtk1	Transkétolase 1
R48	F6Pp + GAPp <-> E4P + X5P	Vtk2	Transkétolase 2
R49	S7P + GAPp <-> E4P + F6Pp	Vta	Transaldolase
R50	H6Pp <-> F6Pp	Vgpip	Glucose-6-phosphate isomérase plastidiale
R51	F6Pp <-> DHAPp + GAPp	Valdp	Aldolase plastidiale
R52	DHAPp <-> GAPp	Vtpip	Triose phosphate isomérase plastidiale
R53	GAPp + NAD <-> dPGp + NADH	Vg3pdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate désydrégénase plastidiales

R54	dPGp + ADP <-> PGp + ATP	Vpgkp/Vpgemp	Phosphoglycérate kinase/phosphoglycérate mutase plastidiales
R55	DHAPp <-> DHAP	Vdhap	Transporteur de DHAP
R56	PEP <-> PEPp	Vpep	Transporteur de PEP
R57	PEPp + ADP -> ATP + PYRp	Vpyrkp	Pyruvate kinase plastidiale
R58	PYRp + NAD -> AcCoAp + CO2 + NADH	Vpdhp	Pyruvate déshydrogénase plastidiale
R59	8*AcCoAp + 8*ATP + 7*NADPH + 7*NADH -> FA16 + 7*NAD + 7*NADP + 8*ADP	Vfa16	3-cétoacyl-ACP synthase, 3-cétoacyl-ACP réductase, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase et énoyl-ACP réductase : synthèse de C16
R60	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 8*NADPH -> FA18 + 8*NAD + 8*NADP + 9*ADP	Vfa18	3-cétoacyl-ACP synthase, 3-cétoacyl-ACP réductase, 3-hydroxyacyl-ACP déshydratase et énoyl-ACP réductase : Synthèse de C18
R61	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 9*NADPH -> FA18_1 + 8*NAD + 9*NADP + 9*ADP	Vfa18_1	Fatty acid desaturase : desaturation du C18
R62	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 10*NADPH -> FA18_2 + 8*NAD + 10*NADP + 9*ADP	Vfa18_2	Fatty acid desaturase : desaturation du C18:1
R63	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 11*NADPH -> FA18_3 + 8*NAD + 11*NADP + 9*ADP	Vfa18_3	Fatty acid desaturase : desaturation du C18:2
R64	NH3 + NADH -> NH4 + NAD	Vnh4	Redox
R65	GLU + ATP + NH4 -> GLN + ADP	Vgls	Glutamine synthetase
R66	GLN + aKG + NADPH -> GLU + GLU + NADP	Vglus	Glutamate synthase
R67	NH4 + aKG + NADH <-> GLU + NAD	Vgludh	Glutamate deshydrogenase
R68	GLU + ATP <-> GLU5P + ADP	Vgluk	Γ-glutamyl kinase
R69	GLU5P + NADH <-> GLUSE + NAD	Vglupr	Γ-glutamyl phosphate reductase
R70	GLUSE + NADPH -> PRO + NADP	Vpcr	Pyroline-5-carboxylate reductase
R71	GLU + AcCoA + ATP + NADPH -> Citru + ADP + NADP	Vcitr	Glutamate N-acetyltransferase, acetylglutamate kinase, N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, acetylornithine aminotransferase, aminoacylase et ornithine carbamoyltransferase
R72	Citru + ATP -> ARG + AMP	Varg	Argininosuccinate synthase et argininosuccinate lyase
R73	OAA + GLU <-> ASP + aKG	Vasp	Aspartate oxydase
R74	ASP + ATP + NADPH <-> ASPsa + NADP + ADP	Vaspsa	Aspartate kinase et aspartate semialdehyde dehydrogenase
R75	ASPsa <-> MET	Vmet	Homoserine dehydrogenase, homoserine O-acetyltransferase et homocysteine S-methyltransferase
R76	PYRp + ASPsa -> DPA	Vdpa	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase
R77	DPA + NADPH <-> TPA + NADP	Vtpa	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
R78	TPA + GLU <-> DAH + aKG	Vdah	LL-diaminopimelate aminotransferase
R79	DAH <-> mDAH	Vmdah	Diaminopimelate epimerase
R80	mDAH -> LYS + CO2	Vlys	Diaminopimelate decarboxylase
R81	PGp + NAD + GLU -> SER + aKG + NADH	Vser	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase et phosphoserine phosphatase
R82	SER <-> GLY	Vgly	Glycine hydroxymethyltransferase
R83	PYR + GLU <-> ALA + aKG	Vala	Alanine aminotransferase
R84	PYRp + PYRp + NADPH + NADPH -> VAL + NADP + NADP + CO2	Vval	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid déshydratase et valine-pyruvate aminotransferase
R85	PYRp + PYRp + AcCoAp + NADPH + NADPH + NAD -> LEU + NADP + NADP + NADH + CO2	Vleu	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid déshydratase et valine-pyruvate aminotransferase, 2-isopropylmalate synthase, 3-isopropylmalate déshydratase, 3-isopropylmalate déshydratase, 3-isopropylmalate dehydrogenase et leucine transaminase
R86	Ru5P + CO2 + NAD + NAD + NAD + 6*ATP -> HIS + 3*NADH + 6*ADP	Vhis	Ribose 5-phosphate isomerase A, ribose-phosphate pyrophosphokinase, ATP phosphoribosyltransferase, phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolyase, phosphoribosyl-AMP cyclohydrolyase, phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase,

			cyclase, imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, histidinol-phosphate aminotransferase, imidazoleglycerol-phosphate dehydratase et histidinol dehydrogenase
R87	E4P + PEP + NADPH + ATP -> ARO + ADP + NADP	Varo	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, 3-dehydroquininate synthase, 3-dehydroquininate dehydratase I, quinate dehydrogenase et shikimate kinase
R88	ARO + PEP + NADPH -> PHE + NADP + CO2	Vphe	5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate aminotransferase, pretyrosine deshydratase.
R89	ARO + PEP -> TYR + CO2	Vtyr	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate amino transferase et pretyrosine deshydrogenase
R90	ARO + Ru5P + NADPH + 2*NAD + 4*ATP + GLN -> TRP + CO2 + DHAPp + GLU + PYRp + NADP + 2*NADH + 4*ADP	Vtrp	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, chorismate synthase, anthranilate synthase, anthranilate phosphoribosyltransferase et tryptophan synthase alpha chain
R91	ASP + 2*NADPH + 2*ATP -> THR + 2*NADP + 2*ADP	Vthr	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine kinase, threonine synthase
R92	THR + PYRp + 2*NADPH -> ILE + CO2 + 2*NADP	Vile	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase, branched-chain amino acid aminotransferase
R93	ASP + ATP + GLN <-> ASN + AMP	Vasn	Asparagine synthetase
R94	AMP + ATP <-> 2*ADP	Vnrj1	Adenylate kinase
R95	NADH + 2*ADP <-> NAD + 2*ATP	Vnrj2	Oxydative phosphorylation / ATP synthase (NADH dependant)
R96	FADH2 + 1.5*ADP <-> FAD + 1.5*ATP	Vnrj3	Oxydative phosphorylation / ATP synthase (FADH2 dependant)
R97	ATP + UDP <-> UTP + ADP	Vnrj4	Uridine diphosphate kinase
R98	ATP <-> ADP	Vnrj5	Non-growth associated ATP maintenance
R99	Mal + NADP -> CO2 + NADPH + PYRp	Vmal1	Malic enzyme 1 (NADP-dependant)
R100	Mal + NAD -> PYRp + NADH + CO2	Vmal2	Malic enzyme 2 (NAD-dependant)
R101	CO2 -> CO2_ext	Vco2ext	Respiration
R102*	a*ALA + b*GLY + c*VAL + d*LEU + e*ILE + f*PRO + g*MET + h*SER + i*THR + j*PHE + k*ASP + l*GLU + m*ASN + n*LYS + o*HIS + p*TYR + q*TRP + r*ARG -> PROT	Vprot	Synthèse des protéines
R103	CW -> CW_eff	Vcw2	Synthèse de paroi cellulaire
R104	Starch -> Starch_eff	Vstarch	Synthèse d'amidon
R105*	G3P + s*FA16 + t*FA18 + u*FA18_1 + v*FA18_2 + w*FA18_3 -> TAG	Vtag	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, lysophosphatidic acid acyltransferase, phosphatidic acid phosphatase et diglyceride acyltransferase

* Les coefficients utilisés pour les réactions R102 et R105 varient selon le stade et la lignée étudiés.

Annexe 3 : Calcul des flux métaboliques chez les lignées Astral, 238 et Solal par FBA.

JAF	Astral					238					Solal				
	10	16	24	32	38	10	16	24	32	38	10	16	24	32	38
R1	813	1696	1746	1345	777	496	2256	1146	1193	1118	1063	1349	1592	2114	107
R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3	264	616	120	195	89	106	476	127	232	175	397	173	182	169	14
R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	255	323	871	685	212	35	839	497	221	134	228	108	97	141	43
R6	566	1374	875	659	593	461	1417	649	972	1059	934	1242	1495	2029	64
R7	821	1696	1746	1345	805	496	2256	1146	1193	1193	1162	1349	1592	2169	107
R8	7	0	0	0	28	0	0	0	0	75	99	0	0	56	0
R9	7	0	0	0	28	0	0	0	0	75	99	0	0	56	0
R10	566	1374	875	659	593	461	1417	649	972	1059	934	1242	1495	2029	64
R11	-280	-191	-346	-398	-170	-96	-576	-32	-113	-161	-370	-193	154	-229	-24
R12	277	752	700	473	336	200	840	557	540	567	464	578	873	1008	42
R13	20	0	0	0	66	0	0	0	0	176	234	0	0	132	0
R14	277	752	700	473	336	200	840	557	540	567	464	578	873	1008	42
R15	534	1505	1400	946	607	400	1680	1115	1080	957	694	1157	1746	1885	83
R16	1326	3654	3499	2388	1616	947	3946	2700	2717	2622	1929	2818	4332	4859	207
R17	54	158	172	105	72	42	184	127	125	109	68	138	213	235	9
R18	1860	5159	4899	3334	2223	1348	5626	3814	3797	3580	2623	3974	6078	6744	290
R19	1860	5159	4899	3334	2223	1348	5626	3814	3797	3580	2623	3974	6078	6744	290
R20	1860	5159	4899	3334	2223	1348	5626	3814	3797	3580	2623	3974	6078	6744	290
R21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R22	109	327	47	218	82	63	36	101	149	302	215	54	90	147	14
R23	144	380	64	143	59	57	176	80	147	163	216	80	102	122	10
R24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R25	109	327	29	215	81	63	36	101	149	302	215	54	90	147	14
R26	109	327	29	215	81	63	36	101	149	302	215	54	90	147	14
R27	0	144	0	45	14	7	0	29	36	89	0	0	0	20	3
R28	0	144	0	45	14	7	0	29	36	89	0	0	0	20	3
R29	0	144	0	45	14	7	0	29	36	89	0	0	0	20	3
R30	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R31	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R32	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R33	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R34	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	28	0
R36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	28	0
R37	247	323	871	685	184	35	839	497	221	97	129	108	97	113	43
R38	846	1565	1221	1057	762	557	1993	681	1085	1183	1304	1434	1341	2229	89
R39	181	-153	-435	-65	0	89	24	-631	-190	-78	333	125	-643	-14	-6
R40	181	0	0	0	0	89	24	0	0	0	333	125	0	0	0
R41	181	0	0	0	0	89	24	0	0	0	333	125	0	0	0
R42	0	153	435	65	0	0	0	631	190	78	0	0	643	14	6
R43	0	153	435	65	0	0	0	631	190	78	0	0	643	14	6

R44	1036	2684	2775	1888	1257	699	2932	2063	2148	2020	1376	2083	3274	3660	157
R45	648	1718	1819	1239	830	431	1802	1308	1413	1326	869	1351	2162	2425	104
R46	355	916	949	639	422	242	1033	711	731	686	494	709	1109	1233	53
R47	-355	-916	-949	-639	-422	-242	-1033	-711	-731	-686	-494	-709	-1109	-1233	-53
R48	-292	-802	-870	-600	-409	-189	-770	-598	-681	-640	-376	-642	-1053	-1192	-50
R49	355	916	949	639	422	242	1033	711	731	686	494	709	1109	1233	53
R50	-371	-966	-1119	-766	-494	-231	-962	-751	-872	-760	-405	-773	-1289	-1417	-62
R51	277	752	700	473	336	200	840	557	540	567	464	578	873	1008	42
R52	-569	-1555	-1570	-1073	-745	-389	-1610	-1155	-1221	-1207	-839	-1221	-1926	-2201	-92
R53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R55	846	2307	2270	1546	1081	589	2450	1712	1762	1774	1303	1799	2799	3209	133
R56	1480	4225	4630	2895	2056	1121	4888	3407	3401	3022	1955	3707	5774	6394	260
R57	1480	4225	4630	2895	2056	1121	4888	3407	3401	3022	1955	3707	5774	6394	260
R58	1421	4225	4562	2815	2031	1121	4888	3403	3360	2921	1820	3680	5705	6309	253
R59	30	51	40	20	13	17	75	32	25	21	28	39	44	41	2
R60	8	16	13	9	5	6	20	13	14	11	7	15	18	18	1
R61	36	124	120	70	57	25	105	63	55	56	53	99	124	121	5
R62	44	61	57	29	22	24	106	61	53	45	107	248	441	516	20
R63	43	223	279	184	130	54	245	213	229	193	10	11	10	9	0
R64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R66	144	380	82	146	61	57	176	80	147	163	216	80	102	122	10
R67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R68	0	0	11	2	3	0	0	0	3	6	0	0	0	3	0
R69	0	0	11	2	3	0	0	0	3	6	0	0	0	3	0
R70	0	0	11	2	3	0	0	0	3	6	0	0	0	3	0
R71	109	183	29	171	67	56	36	71	113	213	215	54	90	126	11
R72	109	183	29	171	67	56	36	71	113	213	215	54	90	126	11
R73	179	236	75	99	45	50	300	51	111	74	218	105	115	101	7
R74	0	0	5	7	3	0	0	0	4	10	4	2	9	12	1
R75	0	0	5	7	3	0	0	0	4	10	4	2	9	12	1
R76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R83	0	0	18	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R84	0	0	3	10	4	0	0	0	5	16	37	6	14	11	1
R85	0	0	16	10	2	0	0	0	4	9	14	3	8	11	1
R86	33	49	7	10	5	25	97	44	4	7	14	22	3	2	0
R87	63	114	79	39	13	54	263	113	50	46	118	67	56	41	3
R88	7	28	74	31	10	0	0	0	41	35	68	11	46	32	2
R89	56	86	5	8	3	54	263	113	9	12	50	56	10	9	1
R90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R91	59	0	32	43	14	0	0	4	23	52	33	10	26	42	3
R92	59	0	31	41	13	0	0	4	23	52	33	10	26	42	3
R93	120	236	38	49	28	50	300	47	85	12	181	93	80	47	3
R94	229	572	502	285	95	105	336	749	388	303	396	147	813	187	20
R95	2245	6095	5328	3852	2488	1578	6567	4330	4248	4223	3045	4426	6641	7404	327
R96	35	0	11	0	0	0	124	0	0	0	1	26	13	0	0
R97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	28	0
R98	3761	11958	10988	7830	5173	2804	12835	8147	8641	8444	4843	8972	13535	15676	679
R99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R101	2546	7064	7434	4909	3351	1861	7970	5589	5623	5285	3385	5826	9079	10117	425
R102	385	923	269	359	144	192	712	317	357	404	615	256	300	308	26
R103	247	323	871	685	184	35	839	497	221	97	129	108	97	113	43
R104	181	-153	-435	-65	0	89	24	-631	-190	-78	333	125	-643	-14	-6
R105	54	158	172	105	72	42	184	127	125	109	68	138	213	235	9

Les valeurs présentées ici sont exprimées en $\text{nmol.graine}^{-1}.\text{jour}^{-1}$.

Annexe 4 : Normalisation des flux métaboliques chez les lignées Astral, 238 et Solal.

	Astral		238		Solal	
	16	24	16	24	16	24
R1	100	100	100	100	100	100
R2	0	0	0	0	0	0
R3	36	6,9	21	11	13	11
R4	0	0	0	0	0	0
R5	19	50	37	43	8	6
R6	81	50	63	57	92	94
R7	100	100	100	100	100	100
R8	0	0	0	0	0	0
R9	0	0	0	0	0	0
R10	81	50	63	57	92	94
R11	-11	-20	-26	-3	-14	10
R12	44	40	37	49	43	55
R13	0	0	0	0	0	0
R14	44	40	37	49	43	55
R15	89	80	74	97	86	110
R16	215	200	175	236	209	272
R17	9	10	8	11	10	13
R18	304	281	249	333	295	382
R19	304	281	249	333	295	382
R20	304	281	249	333	295	382
R21	0	0	0	0	0	0
R22	19	3	2	9	4	6
R23	22	4	8	7	6	6
R24	0	0	0	0	0	0
R25	19	2	2	9	4	6
R26	19	2	2	9	4	6
R27	8	0	0	3	0	0
R28	8	0	0	3	0	0
R29	8	0	0	3	0	0
R30	0	0,6	5	0	2	1
R31	0	0,6	5	0	2	1
R32	0	0,6	5	0	2	1
R33	0	0,6	5	0	2	1
R34	0	0,6	5	0	2	1
R35	0	0,0	0	0	0	0
R36	0	0	0	0	0	0
R37	19	50	37	43	8	6
R38	92	70	88	59	106	84
R39	-9	-25	1	-55	9	-40
R40	0	0	1	0	9	0
R41	0	0	1	0	9	0
R42	9	25	0	55	0	40
R43	9	25	0	55	0	40

R44	158	159	130	180	154	206
R45	101	104	80	114	100	136
R46	54	54	46	62	53	70
R47	-54	-54	-46	-62	-53	-70
R48	-47	-50	-34	-52	-48	-66
R49	54	54	46	62	53	70
R50	-57	-64	-43	-66	-57	-81
R51	44	40	37	49	43	55
R52	-92	-90	-71	-101	-90	-121
R53	0	0	0	0	0	0
R54	0	0	0	0	0	0
R55	136	130	109	149	133	176
R56	249	265	217	297	275	363
R57	249	265	217	297	275	363
R58	249	261	217	297	273	358
R59	3	2	3	3	3	3
R60	1	1	1	1	1	1
R61	7	7	5	5	7	8
R62	4	3	5	5	18	28
R63	13	16	11	19	1	1
R64	0	0	0	0	0	0
R65	0	0	0	0	0	0
R66	22	5	8	7	6	6
R67	0	0	0	0	0	0
R68	0	1	0	0	0	0
R69	0	1	0	0	0	0
R70	0	1	0	0	0	0
R71	11	2	2	6	4	6
R72	11	2	2	6	4	6
R73	14	4	13	4	8	7
R74	0	0	0	0	0	1
R75	0	0	0	0	0	1
R76	0	0	0	0	0	0
R77	0	0	0	0	0	0
R78	0	0	0	0	0	0
R79	0	0	0	0	0	0
R80	0	0	0	0	0	0
R81	0	0	0	0	0	0
R82	0	0	0	0	0	0
R83	0	1	0	0	0	0
R84	0	0	0	0	0	1
R85	0	1	0	0	0	0
R86	3	0	4	4	2	0
R87	7	5	12	10	5	4
R88	2	4	0	0	1	3
R89	5	0	12	10	4	1
R90	0	0	0	0	0	0

R91	0	2	0	0	1	2
R92	0	2	0	0	1	2
R93	14	2	13	4	7	5
R94	34	29	15	65	11	51
R95	359	305	291	378	328	417
R96	0	1	5	0	2	1
R97	0	0	0	0	0	0
R98	705	629	569	711	665	850
R99	0	0	0	0	0	0
R100	0	0	0	0	0	0
R101	416	426	353	488	432	570
R102	54	15,4	32	28	19	19
R103	19	50	37	43	8	6
R104	-9	-25	1	-55	9	-40
R105	9	9,8	8	11	10	13

Les valeurs présentées ici sont exprimées en $\text{nmol} \cdot 100 \text{ nmol}_{\text{saccharose}}^{-1} \cdot \text{graine}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$.

Annexe 5 : Liste des réactions (modèle MOMA-lin).

R	Réactions
R1	Suc_ext -> Suc
R2	NH3_ext -> NH3
R3	GLN_ext -> GLN
R4	CO2_in -> CO2
R5	Suc + UDP <-> Fru + UDPG
R6	Suc -> Fru + GLC
R7	Fru + ATP -> F6P + ADP
R8	F6P + UDPG -> SucP + UDP
R9	SucP -> Suc
R10	GLC + ATP -> G6P + ADP
R11	G6P <-> F6P
R12	ATP + F6P -> ADP + F16bP
R13	F16bP -> F6P
R14	F6P -> F16bP
R15	F16bP <-> DHAP + GAP
R16	DHAP <-> GAP
R17	DHAP + NADH + ATP -> G3P + NAD + ADP
R18	GAP + NAD <-> dPG + NADH
R19	dPG + ADP <-> PG + ATP
R20	PG <-> PEP
R21	PGp <-> PEPp
R22	PEP + ADP -> PYR + ATP
R23	CO2 + PEP -> OAA
R24	OAA -> CO2 + PEP
R25	PYR -> PYRm
R26	PYRm + NAD -> CO2 + AcCoA + NADH
R27	OAA + AcCoA -> CIT
R28	CIT <-> ICIT
R29	ICIT + NAD <-> aKG + CO2 + NADH
R30	aKG + NAD <-> CO2 + NADH + SuccCoA
R31	SuccCoA + ADP -> Succ + ATP
R32	Succ + FAD <-> FADH2 + Fum
R33	Fum <-> Mal
R34	Mal + NAD <-> NADH + OAA
R35	G1P + UTP -> UDPG
R36	UDPG -> CW + UDP
R37	G6P <-> H6Pp
R38	H6Pp <-> G1Pp
R39	G1Pp + ATP -> ADPG
R40	ADPG -> Starch + ADP
R41	Starch -> Starch_d
R42	Starch_d + ATP -> G1Pp + AMP
R43	H6Pp + NADP + NADP -> CO2 + Ru5P + NADPH + NADPH
R44	Ru5P <-> X5P

R45	Ru5P <-> Ri5P
R46	S7P + GAPp <-> Ri5P + X5P
R47	F6Pp + GAPp <-> E4P + X5P
R48	S7P + GAPp <-> E4P + F6Pp
R49	H6Pp <-> F6Pp
R50	F6Pp <-> DHAPp + GAPp
R51	DHAPp <-> GAPp
R52	DHAPp <-> DHAP
R53	PEP <-> PEPp
R54	PEPp + ADP -> ATP + PYRp
R55	PYRp + NAD -> AcCoAp + CO2 + NADH
R56	8*AcCoAp + 8*ATP + 7*NADPH + 7*NADH -> FA16 + 7*NAD + 7*NADP + 8*ADP
R57	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 8*NADPH -> FA18 + 8*NAD + 8*NADP + 9*ADP
R58	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 9*NADPH -> FA18_1 + 8*NAD + 9*NADP + 9*ADP
R59	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 10*NADPH -> FA18_2 + 8*NAD + 10*NADP + 9*ADP
R60	9*AcCoAp + 8*NADH + 9*ATP + 11*NADPH -> FA18_3 + 8*NAD + 11*NADP + 9*ADP
R61	NH3 + NADH -> NH4 + NAD
R62	GLU + ATP + NH4 -> GLN + ADP
R63	GLN + aKG + NADPH -> GLU + GLU + NADP
R64	NH4 + aKG + NADH <-> GLU + NAD
R65	GLU + ATP <-> GLU5P + ADP
R66	GLU5P + NADH <-> GLUSE + NAD
R67	GLUSE + NADPH -> PRO + NADP
R68	GLU + AcCoA + ATP + NADPH -> Citru + ADP + NADP
R69	Citru + ATP -> ARG + AMP
R70	OAA + GLU <-> ASP + aKG
R71	ASP + ATP + NADPH <-> ASPsa + NADP + ADP
R72	ASPsa <-> MET
R73	PYRp + ASPsa -> DPA
R74	DPA + NADPH <-> TPA + NADP
R75	TPA + GLU <-> DAH + aKG
R76	DAH <-> mDAH
R77	mDAH -> LYS + CO2
R78	PGp + NAD + GLU -> SER + aKG + NADH
R79	SER <-> GLY
R80	PYR + GLU <-> ALA + aKG
R81	PYRp + PYRp + NADPH + NADPH -> VAL + NADP + NADP + CO2
R82	PYRp + PYRp + AcCoAp + NADPH + NADPH + NAD -> LEU + NADP + NADP + NADH + CO2
R83	Ru5P + CO2 + NAD + NAD + NAD + 6*ATP -> HIS + 3*NADH + 6*ADP
R84	E4P + PEP + NADPH + ATP -> ARO + ADP + NADP
R85	ARO + PEP + NADPH -> PHE + NADP + CO2
R86	ARO + PEP -> TYR + CO2
R87	ARO + Ru5P + NADPH + 2*NAD + 4*ATP + GLN -> TRP + CO2 + DHAPp + GLU + PYRp + NADP + 2*NADH + 4*ADP
R88	ASP + 2*NADPH + 2*ATP -> THR + 2*NADP + 2*ADP
R89	THR + PYRp + 2*NADPH -> ILE + CO2 + 2*NADP

R90	ASP + ATP + GLN <-> ASN + AMP
R91	AMP + ATP <-> 2*ADP
R92	NADH + 2*ADP <-> NAD + 2*ATP
R93	FADH2 + 1.5*ADP <-> FAD + 1.5*ATP
R94	ATP + UDP <-> UTP + ADP
R95	ATP <-> ADP
R96	Mal + NADP -> CO2 + NADPH + PYRp
R97	Mal + NAD -> PYRp + NADH + CO2
R98	GAPp + NAD <-> dPGp + NADH
R99	dPGp + ADP <-> PGp + ATP
R100	G6P <-> G1P
R101	CO2 -> CO2_ext
R102	CW -> CW_eff
R103	Starch -> Starch_eff
R104	G3P + 0.2355*FA16 + 0.078*FA18 + 0.6969*FA18_1 + 0.3327*FA18_2 + 1.627*FA18_3 -> TAG
R105	ALA -> ALA_prot
R106	GLY -> GLY_prot
R107	VAL -> VAL_prot
R108	LEU -> LEU_prot
R109	ILE -> ILE_prot
R110	PRO -> PRO_prot
R111	MET -> MET_prot
R112	SER -> SER_prot
R113	THR -> THR_prot
R114	PHE -> PHE_prot
R115	ASP -> ASP_prot
R116	GLU -> GLU_prot
R117	ASN -> ASN_prot
R118	LYS -> LYS_prot
R119	HIS -> HIS_prot
R120	TYR -> TYR_prot
R121	TRP -> TRP_prot
R122	ARG -> ARG_prot

Annexe 6 : Analyse MOMA d'une graine de lin de la lignée Astral à 24 JAF.

R	FBA (WT)	R104 +25%	R5-50%	R84 - 100%	R5 -50% et R84 -50%	R5 -50%, R84 -50% et R83 -50%	R5 - 50%, R84 -50%, R83 -50% et R16 -10%
R1	1750	1750	1750	1730	1750	1750	1750
R2	0	0	0	22	0	0	0
R3	120	120	120	136	120	120	120
R4	0	0	0	20	0	0	0
R5	906	669	453 ^b	910	453 ^b	453 ^b	453 ^b
R6	879	1344	1297	862	1297	1297	1297
R7	1785	2014	1750	1771	1750	1750	1750
R8	35	264	0	41	0	0	0
R9	35	264	0	41	0	0	0
R10	879	1344	1297	862	1297	1297	1297
R11	-374	-11	-220	-374	-247	-79	674
R12	730	1151	727	724	754	1115	1363
R13	83	112	5	91	32	129	0
R14	730	700	808	722	781	684	1061
R15	1376	1739	1530	1356	1503	1671	2424
R16	3535	4018	3667	3525	3637	3948	3182 ^d
R17	172	215	169	173	175	187	189
R18	4911	5757	5197	4881	5140	5619	5606
R19	4911	5757	5197	4881	5140	5619	5606
R20	4911	5757	5197	4881	5140	5619	5606
R21	0	0	0	0	0	0	0
R22	47	0	9	88	0	0	0
R23	64	62	67	94	120	120	120
R24	0	2	0	0	0	0	0
R25	29	0	0	58	0	0	0
R26	29	0	0	58	0	0	0
R27	0	0	0	13	0	0	0
R28	0	0	0	13	0	0	0
R29	0	0	0	13	0	0	0
R30	11	0	0	9	0	0	0
R31	11	0	0	9	0	0	0
R32	11	0	0	9	0	0	0
R33	11	0	0	9	0	0	0
R34	11	0	0	9	0	0	0
R35	0	0	0	0	0	0	0
R36	871	406	453	869	453	453	453
R37	1253	1355	1517	1236	1544	1376	623
R38	-435	-435	-435	-417	-435	-435	-435
R39	0	272	0	10	0	272	195
R40	0	272	0	10	0	272	195
R41	435	707	435	427	435	707	630

R42	435	707	435	427	435	707	630
R43	2782	3260	2950	2779	3094	3295	3324
R44	1824	2173	1771	1837	1824	2181	2200
R45	951	1087	1036	919	932	1110	1120
R46	-951	-1087	-1036	-919	-932	-1110	-1120
R47	-872	-1087	-734	-919	-892	-1070	-1080
R48	951	1087	1036	919	932	1110	1120
R49	-1094	-1470	-998	-1126	-1115	-1484	-2267
R50	730	704	773	712	709	697	-66
R51	-1602	-1790	-1507	-1630	-1601	-1767	-1014
R52	2332	2494	2305	2342	2309	2464	947
R53	4642	5697	4542	4700	4940	5419	5406
R54	4642	5697	4542	4699	4940	5419	5406
R55	4573	5697	4466	4597	4634	4946	5018
R56	41	51	40	41	41	44	45
R57	13	17	13	13	14	15	15
R58	120	150	117	121	122	130	132
R59	57	72	56	58	58	62	63
R60	280	350	274	281	285	304	308
R61	0	0	0	22	0	0	0
R62	0	0	0	0	0	0	0
R63	82	60	84	103	120	120	120
R64	0	0	0	22	0	0	0
R65	11	60	88	18	120	120	120
R66	11	60	88	18	120	120	120
R67	11	60	88	18	120	120	120
R68	29	0	0	44	0	0	0
R69	29	0	0	44	0	0	0
R70	75	60	67	90	120	120	120
R71	5	0	9	8	0	0	0
R72	5	0	1	8	0	0	0
R73	0	0	8	0	0	0	0
R74	0	0	8	0	0	0	0
R75	0	0	8	0	0	0	0
R76	0	0	8	0	0	0	0
R77	0	0	8	0	0	0	0
R78	0	0	0	0	0	0	0
R79	0	0	0	0	0	0	0
R80	18	0	9	31	0	0	0
R81	3	0	33	14	93	236	163
R82	16	0	0	15	0	0	0
R83	7	0	117	23	338	4 ^b	4 ^b
R84	79	0	302	0 ^c	40 ^b	40 ^b	40 ^b
R85	74	0	188	0	35	40	40
R86	5	0	89	0	5	0	0
R87	0	0	25	0	0	0	0
R88	32	0	28	45	120	120	120

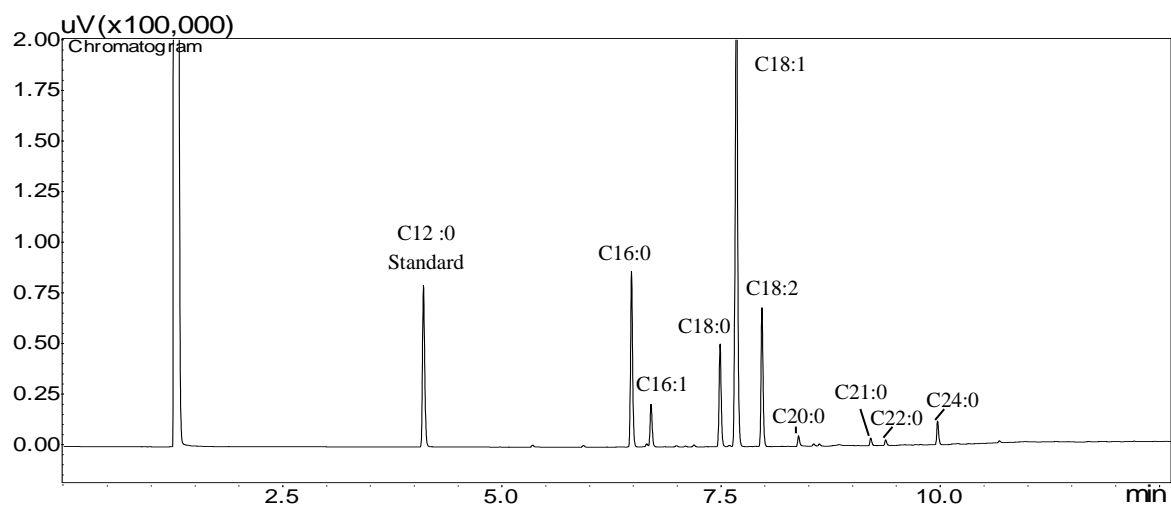
R89	31	0	28	44	120	0	62
R90	38	60	11	33	0	0	0
R91	502	767	446	504	435	707	630
R92	5343	6120	5844	5349	6380	5878	5871
R93	11	0	0	9	0	0	0
R94	0	0	0	0	0	0	0
R95	10958	11408	10876	10960	10930	11389	11260
R96	0	0	0	0	0	0	0
R97	0	0	0	0	0	0	0
R98	0	0	0	0	0	0	0
R99	0	0	0	0	0	0	0
R100	0	0	0	0	0	0	0
R101	7453	8897	7602	7433	7523	8393	8484
R102	871	406	453	869	453	453	453
R103	-435	-435	-435	-417	-435	-435	-435
R104	172	215^a	169	173	175	187	189
R105	18	0	9	31	0	0	0
R106	0	0	0	0	0	0	0
R107	3	0	33	14	93	236	163
R108	16	0	0	15	0	0	0
R109	31	0	28	44	120	0	62
R110	11	60	88	18	120	120	120
R111	5	0	1	8	0	0	0
R112	0	0	0	0	0	0	0
R113	1	0	0	2	0	120	58
R114	74	0	188	0	35	40	40
R115	0	0	19	3	0	0	0
R116	31	0	22	44	0	0	0
R117	38	60	11	33	0	0	0
R118	0	0	8	0	0	0	0
R119	7	0	117	23	338	4	4
R120	5	0	89	0	5	0	0
R121	0	0	25	0	0	0	0
R122	29	0	0	44	0	0	0

^a: V = +25% ; ^b: V = -50% ; ^c: V = -100% ; ^d: V = -10%.

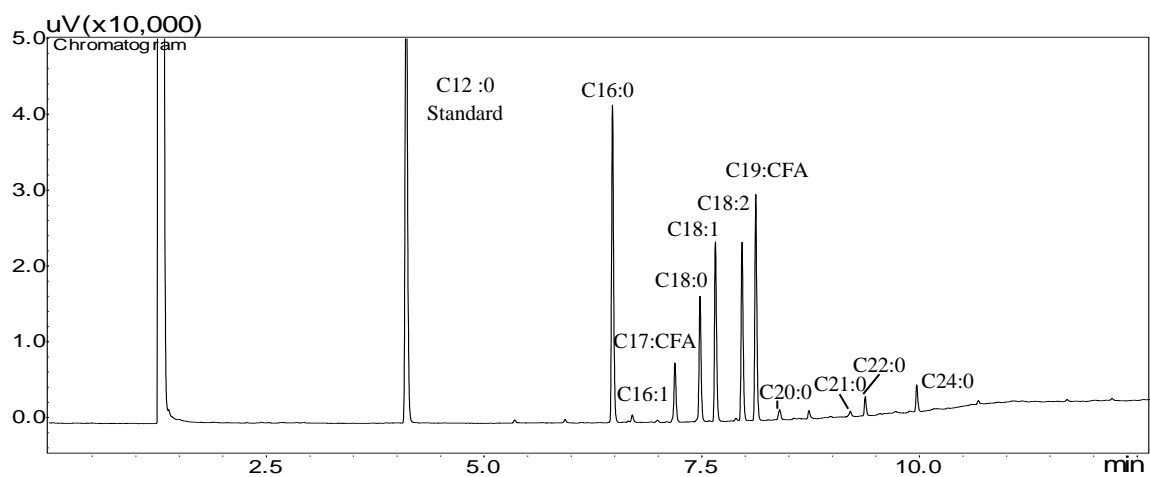
Les flux sont exprimés en nmol.graine⁻¹.jour⁻¹. R104 en surlignage orange correspond à la réaction de synthèse des TAG.

Annexe 7 : Exemple de chromatogramme pour la séparation des AG de la souche JMY3501 (A) et JMY5578 (B) sur glucose (T₇₂).

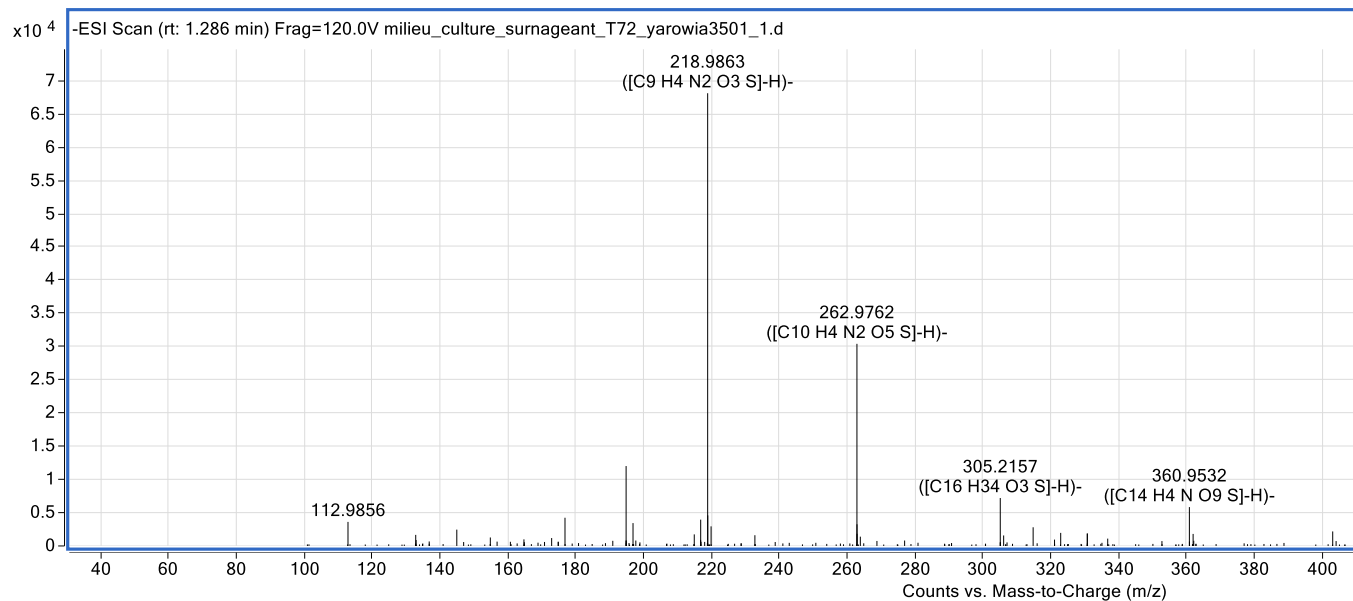
A.



B.



Annexe 8 : Spectre de masse d'un échantillon de milieu extracellulaire (T₇₂) : souche JMY3501 sur glucose.



Annexe 9 : Liste des métabolites et abréviations (modèle MFA/FBA-Levure).

Type	Abréviation	Nom
Flux externes	ext	Source
	out	Extracellulaire
Compartiment	.c	cytosolique
	.m	mitochondrial
Métabolites	6PG	6-phosphogluconolactone
	ACA	Acétaldéhyde
	ACE	Acétate
	AKG	2-oxoglutarate
	AcCoA	Acétyl-CoA
	Ala	Alanine
	Arg	Arginine
	Asn	Asparagine
	Asp	Aspartate
	CO2	Diocycle de carbone
	Cit	Citrate
	Cys	Cystéine
	DHAP	Dihydroxyacétone Phosphate
	E4P	Erythrose-4-phosphate
	F6P	Fructose-6-phosphate
	FA16	C16:0
	FA16_1	C16:1
	FA18	C18:0
	FA18_1	C18:1
	FA18_2	C18:2
	FA20	C20:0
	FA22	C22:0
	FA24	C24:0
	FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
	Fum	Fumarate
	G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
	G6P	Glucose-6-phosphate
	GLC	Glucose
	Gln	Glutamine
	Glu	Glutamate
	Glx	Glyoxylate
	Gly	Glycine
	Glyc3P	Glycerol-3-phosphate
	Glycogen	Glycogène
	His	Histidine
	ICit	Isocitrate
	Ile	Isoleucine
	Leu	Leucine
	Lys	Lysine
	Mal	Malate

Met	Methionine
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit
OAA	Oxaloacétate
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG3	3-Phosphoglycérate
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Pyr	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sédoheptulose-7-phosphate
Ser	Sérine
Suc	Succinate
TAG	Triacylglycérol
Thr	Théronine
Trp	Triptophane
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
X5P	Xylulose-5-phosphate

Annexe 10 : Liste des réactions et abréviations (modèle MFA/FBA-levure sur glucose).

R	Réactions	V _{réactions}	Enzymes/réactions
R1	GLC.ext (abcdef) -> GLC (abcdef)	Vg	Rate of glucose uptake
R2	Cit.c (abcdef) -> Cit.ext (abcdef)	Vc	Rate of citrate release
R3	CO2 (a) -> CO2.out (a)	Vco2	Rate of CO ₂ release
R4	GLC (abcdef) <-> G6P (abcdef)	Vhk	Hexokinase 1
R5	G6P (abcdef) -> F6P (abcdef)	Vgpi	Glucose-6-phosphate isomérase
R6	F6P (abcdef) -> FBP (abcdef)	Vpfr	Phosphofruktokinase
R7	DHAP (cba) + G3P (def) <-> FBP (abcdef)	Vald	Aldolase
R8	G3P (abc) <-> DHAP (abc)	Vtpi	Triose phosphate isomérase
R9	DHAP (abc) -> Glyc3P (abc)	Vgpdh	Glycerol-3-phosphate deshydrogenase
R10	PG3 (abc) <-> G3P (abc)	Vgapdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
R11	PEP (abc) <-> PG3 (abc)	Veno	Enolase
R12	PEP (abc) -> Pyr.c (abc)	Vpk	Pyruvate kinase
R13	G6P (abcdef) -> Glycogen (abcdef)	Vgsy	Glycogene synthase
R14	G6P (abcdef) + NADP (z) -> 6PG (abcdef) + NADPH (z)	Vg6pdh	Glucose-6-phosphate deshydrogenase
R15	6PG (abcdef) + NADP (z) -> Ru5P (bcdef) + CO2 (a) + NADPH (z)	V6pgdh	6-phosphogluconate deshydrogénase
R16	Ru5P (abcde) <-> X5P (abcde)	Vrpe	Ribulose-phosphate-3-épipimérase
R17	Ru5P (abcde) <-> R5P (abcde)	Vrpi	Ribose-5-phosphate isomérase
R18	X5P (abcde) <-> G3P (cde) + TKC2 (ab)	Vtk	Transketolase
R19	E4P (cdef) + TKC2 (ab) <-> F6P (abcdef)	Vtk	Transketolase
R20	R5P (cdefg) + TKC2 (ab) <-> S7P (abcdefg)	Vtk	Transketolase
R21	G3P (def) + TAC3 (abc) <-> F6P (abcdef)	Vta	Transaldolase
R22	S7P (abcdefg) <-> E4P (defg) + TAC3 (abc)	Vta	Transaldolase
R23	Pyr.c (abc) -> Pyr.m (abc)	Vpyrt	Pyruvate transporter (Cytosol/mitochondria)
R24	Mal.c (abcd) -> Mal.m (abcd)	Vmalt	Malate transporter (Cytosol/mitochondria)
R25	Cit.m (abcdef) -> Cit.c (abcdef)	Vcitt	Citrate transporter (Mitochondria/Cytosol)
R26	Pyr.m (abc) -> AcCoA.m (bc) + CO2 (a)	Vpdhm	Mitochondrial Pyruvate deshydrogenase
R27	OAA.m (abcd) + AcCoA.m (ef) -> Cit.m (dcbfea)	Vcs	Citrate synthase
R28	Cit.m (abcdef) <-> ICit (abcdef)	Vaco	Aconitase
R29	ICit (abcdef) -> AKG (abcde) + CO2 (f)	Vidh	Isocitrate deshydrogenase
R30	AKG (abcde) -> suc (bcde) + CO2 (a)	Vkdh	α -ketoglutarate deshydrogenase and succinyl-CoA synthetase
R31	suc (abcd) <-> Fum (abcd)	Vsdh	Succinate deshydrogenase
R32	Fum (abcd) <-> Mal.m (abcd)	Vfum	Fumarase
R33	Mal.m (abcd) <-> OAA.m (abcd)	Vmaldh	Malate deshydrogenase

R34	ICit (abcdef) -> Glx (ab) + suc (edcf)	Vicitl	Isocitrate lyase
R35	Glx (ab) + AcCoA.c (cd) -> Mal.c (abcd)	Vmals	Malate synthase
R36	Mal.m (abcd) -> Pyr.m (abc) + CO2 (d)	Vmalm	Mitochondrial malic enzyme
R37	Mal.c (abcd) + NADP (z) -> Pyr.c (abc) + CO2 (d) + NADPH (z)	Vmalc	Cytosolic malic enzyme
R38	Pyr.m (abc) + CO2 (d) -> OAA.m (abcd)	Vpc	Pyruvate carboxylase
R39	Cit.c (dcbfea) -> OAA.c (abcd) + AcCoA.c (ef)	Vacitl	ATP-Citrate lyase
R40	OAA.c (abcd) <-> Mal.c (abcd)	Vmdhc	Cytosolic malate deshydrogenase
R41	Pyr.c (abc) -> ACA (bc) + CO2 (a)	Vpdc	Pyruvate decarboxylase
R42	ACA (ab) -> ACE (ab)	Vadh	Aldehyde deshydrogenase
R43	ACE (ab) -> AcCoA.c (ab)	Vacoal	Acetate CoA ligase
R44	AcCoA.c (ab) + AcCoA.c (cd) + AcCoA.c (ef) + AcCoA.c (gh) + AcCoA.c (ij) + AcCoA.c (kl) + AcCoA.c (mn) + AcCoA.c (op) + 14*NADPH (z) -> FA16 (abcdefghijklmnop) + 14*NADP (z)	Vfas16	Fatty acid synthase (C16 Fatty acid synthesis)
R45	FA16 (abcdefghijklmnop) -> FA16_1 (abcdefghijklmnop)	Vfad16	Fatty acid desaturase (C16 Fatty acid dasaturation)
R46	FA16 (abcdefghijklmnop) + AcCoA.c (qr) + 2*NADPH (z) -> FA18 (abcdefghijklmnopqr) + 2*NADP (z)	Vfas18	Fatty acid synthase (C18 Fatty acid synthesis)
R47	FA18 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_1 (abcdefghijklmnopqr)	Vfad18	Fatty acid desaturase (C18 Fatty acid dasaturation)
R48	FA18_1 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_2 (abcdefghijklmnopqr)	Vfad181	Fatty acid desaturase (18_1 Fatty acid dasaturation)
R49	FA18 (abcdefghijklmnopqr) + AcCoA.c (st) + 2*NADPH (z) -> FA20 (abcdefghijklmnopqrst) + 2*NADP (z)	Vfas20	Fatty acid synthase (C20 Fatty acid synthesis)
R50	FA20 (abcdefghijklmnopqrst) + AcCoA.c (uv) + 2*NADPH (z) -> FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) + 2*NADP (z)	Vfas22	Fatty acid synthase (C22 Fatty acid synthesis)
R51	FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) + AcCoA.c (wx) + 2*NADPH (z) -> FA24 (abcdefghijklmnopqrstuvw) + 2*NADP (z)	Vfas24	Fatty acid synthase (C24 Fatty acid synthesis)
R52	FA16 (abcdefghijklmnop) -> FA16_TAG (abcdefghijklmnop)	Vat16	Acyl-transférase
R53	FA16_1 (abcdefghijklmnop) -> FA16_1_TAG (abcdefghijklmnop)	Vat161	Acyl-transférase
R54	FA18 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat18	Acyl-transférase
R55	FA18_1 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_1_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat181	Acyl-transférase
R56	FA18_2 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_2_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat182	Acyl-transférase
R57	FA20 (abcdefghijklmnopqrst) -> FA20_TAG (abcdefghijklmnopqrst)	Vat20	Acyl-transférase
R58	FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) -> FA22_TAG (abcdefghijklmnopqrstuv)	Vat22	Acyl-transférase

R59	FA24 (abcdefghijklmnopqrstuvw) -> FA24_TAG (abcdefghijklmnopqrstuvw)	Vat24	Acyl-transférase
R60	Glyc3P (abc) -> TAG (abc)	Vtag	TAG synthesis
R61	AKG (abcde) -> Glu (abcde)	Vtam	Transaminase
R62	PG3 (abc) + Glu (defgh) -> Ser (abc) + AKG (defgh)	Vser	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase and phosphoserine phosphatase
R63	Ser (abc) <-> Gly (ab) + C1 (c)	Vgly	Glycine hydroxymethyltransferase
R64	Gly (ab) <-> CO2 (a) + C1 (b)	Vglydh	Glycine dehydrogenase
R65	OAA.c (abcd) + Glu (efghi) -> Asp (abcd) + AKG (efghi)	Vasp	Aspartate transaminase
R66	Asp (abcd) -> Asn (abcd)	Vasn	Asparagine synthase
R67	Glu (abcde) <-> Gln (abcde)	Vgln	Glutamine synthase
R68	Glu (abcde) + NADPH (z) -> Pro (abcde) + NADP (z)	Vpro	γ -glutamyl kinase, γ -glutamyl phosphate reductase and Pyrroline-5-carboxylate reductase
R69	Asp (abcd) + 2*NADPH (z) -> Thr (abcd) + 2*NADP (z)	Vthr	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine kinase, threonine synthase
R70	Thr (abcd) -> Gly (ab) + AcCoA.c (cd)	Vthraldo	L-threonine aldolase
R71	Pyr.m (abc) + Glu (defgh) -> Ala (abc) + AKG (defgh)	Vala	Alanine transaminase
R72	Glu (abcde) + Glu (fghij) + CO2 (k) + Gln (lmnop) + Asp (qrst) -> AKG (abcde) + Arg (fghijk) + Glu (lmnop) + Fum (qrst)	Varg	Glutaminase, carbamoyl-phosphate synthase, amino-acid N-acetyltransferase, acetylornithine aminotransferase, N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, acetylglutamate kinase, amino-acid N-acetyltransferase, ornithine carbamoyltransferase, argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase
R73	Pyr.m (abc) + Pyr.m (def) + Glu (ghijk) + 2*NADPH (z) -> Val (abecf) + CO2 (d) + AKG (ghijk) + 2*NADP (z)	Vval	Acetolactate synthase, 2-acetolactate mutase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase and branched-chain-amino-acid transaminase
R74	Ser (abc) + AcCoA.c (de) + Asp (fghi) + CO2 (j) -> Cys (abc) + ACE (de) + suc (gihj) + CO2 (f)	Vcys	Cystathionine beta-synthase, cystathionine gamma-lyase
R75	Asp (abcd) + C1 (e) + AcCoA.c (fg) + NADPH (z) -> Met (abcde) + ACE (fg) + NADP (z)	Vmet	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine O-acetyltransferase, cystathionine gamma-synthase and homocysteine S-methyltransferase
R76	AKG (abcde) + AcCoA.c (fg) + Glu (hijkl) + Glu (mnopq) -> Lys (fgbcde) + CO2 (a) + AKG (hijkl) + AKG (mnopq)	Vlys	Homocitrate synthase, homoaconitase, homoaconitate hydratase, homoisocitrate dehydrogenase, aromatic amino acid aminotransferase, L-2-aminoadipate reductase, saccharopine dehydrogenase and saccharopine dehydrogenase

R77	AcCoA.m (ab) + Pyr.m (cde) + Pyr.m (fgh) + Glu (ijklm) -> Leu (abdghe) + CO2 (e) + CO2 (f) + AKG (ijklm)	Vleu	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid hydratase, 2-isopropylmalate synthase, 3-isopropylmalate hydratase, 3-isopropylmalate dehydrogenase and branched-chain amino acid aminotransferase
R78	PEP (abc) + PEP (def) + E4P (ghij) + Glu (klmno) + NADPH (z) -> Phe (abcefg hij) + CO2 (d) + AKG (klmno) + NADP (z)	Vphe	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate hydratase and aromatic amino acid aminotransferase
R79	PEP (abc) + PEP (def) + E4P (ghij) + Glu (klmno) + NADPH (z) -> Tyr (abcefg hij) + CO2 (d) + AKG (klmno) + NADP (z)	Vtyr	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate dehydrogenase and aromatic amino acid aminotransferase
R80	Ser (abc) + R5P (defgh) + PEP (ijk) + E4P (lmno) + PEP (pqr) + Gln (stuvw) + NADPH (z) -> Trp (abcdklmnoj) + CO2 (i) + G3P (fgh) + Pyr.c (pqr) + Glu (stuvw) + NADP (z)	Vtrp	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, anthranilate synthase, anthranilate phosphoribosyltransferase and tryptophan synthase
R81	R5P (abcde) + C1 (f) + Gln (ghijk) + Asp (lmno) -> His (edcbaf) + AKG (ghijk) + Fum (lmno)	Vhis	Ribose 5-phosphate isomerase A, ribose-phosphate pyrophosphokinase, ATP phosphoribosyltransferase, phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase, phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase, glutamine amidotransferase, imidazoleglycerol-phosphate hydratase, histidinol-phosphate aminotransferase, histidinol-phosphatase and phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase
R82	Thr (abcd) + Pyr.m (efg) + Glu (hijkl) + NADPH (z) -> Ile (abfcgd) + CO2 (e) + AKG (hijkl) + NADP (z)	Vile	Threonine hydratase, acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid hydratase and branched-chain amino acid aminotransferase
R83	0*Cit.c (abcdef) -> Cit.s (abcdef)	Vcit0	Flux nul de cit
R84	0*Cit.m (abcdef) -> Cit.s (abcdef)	Vcit0	Flux nul de cit
R85	Cit.s -> Sink_Cit	Vcit0	Flux nul de cit
R86	0*Mal.c (abcd) -> Mal.s (abcd)	Vmal0	Flux nul de mal
R87	0*Mal.m (abcd) -> Mal.s (abcd)	Vmal0	Flux nul de mal
R88	Mal.s -> Sink_Mal	Vmal0	Flux nul de mal
R89	Cys (abc) + Ser (def) + Gly (gh) -> CysSerGly_prot (abcdefgh)	Vcsgprot	synthèse protéines : pool cys ser et gly
R90	Asp (abcd) + Asn (efgh) -> AspAsn_prot (abcdefgh)	Vaaprot	synthèse protéines : pool asp asn
R91	Phe (abcdefhij) + Trp (klmnopqrstu) -> PheTrp_Prot (abcdefhijklmnopqrstu)	Vptprot	synthèse protéines : pool phe trp
R92	Tyr (abcdefhij) + His (klmnop) -> TyrHis_Prot (abcdefhijklmnop)	Vthprot	synthèse protéines : pool tyr his

R93	Glu (abcde) + Gln (fghij) -> GluGln_Prot (abcdefghijkl)	Vggprot	synthèse protéines : pool glu gln
R94	Ala (abc) + Val (defgh) -> AlaVal_Prot (abcdefgh)	Vavprot	synthèse protéines : pool ala val
R95	Arg (fghijk) -> Arg_prot (fghijk)	Vaprot	synthèse protéines : pool arg
R96	Ile (abfcdg) -> Ile_prot (abfcdg)	Viprot	synthèse protéines : pool ile
R97	Lys (fgbcde) -> Lys_prot (fgbcde)	Vlprot	synthèse protéines : pool lys
R98	Pro (abcde) -> Pro_prot (abcde)	Vpprot	synthèse protéines : pool pro
R99	Thr (abcd) -> Thr_prot (abcd)	Vtprot	synthèse protéines : pool thr
R100	Met (abcde) -> Met_prot (abcde)	Vmprot	synthèse protéines : pool met
R101	Leu (abdghe) -> Leu_prot (abdghe)	Vleuprot	synthèse protéines : pool leu

Annexe 11 : Liste des réactions et abréviations (modèle MFA/FBA-levure sur glycérol).

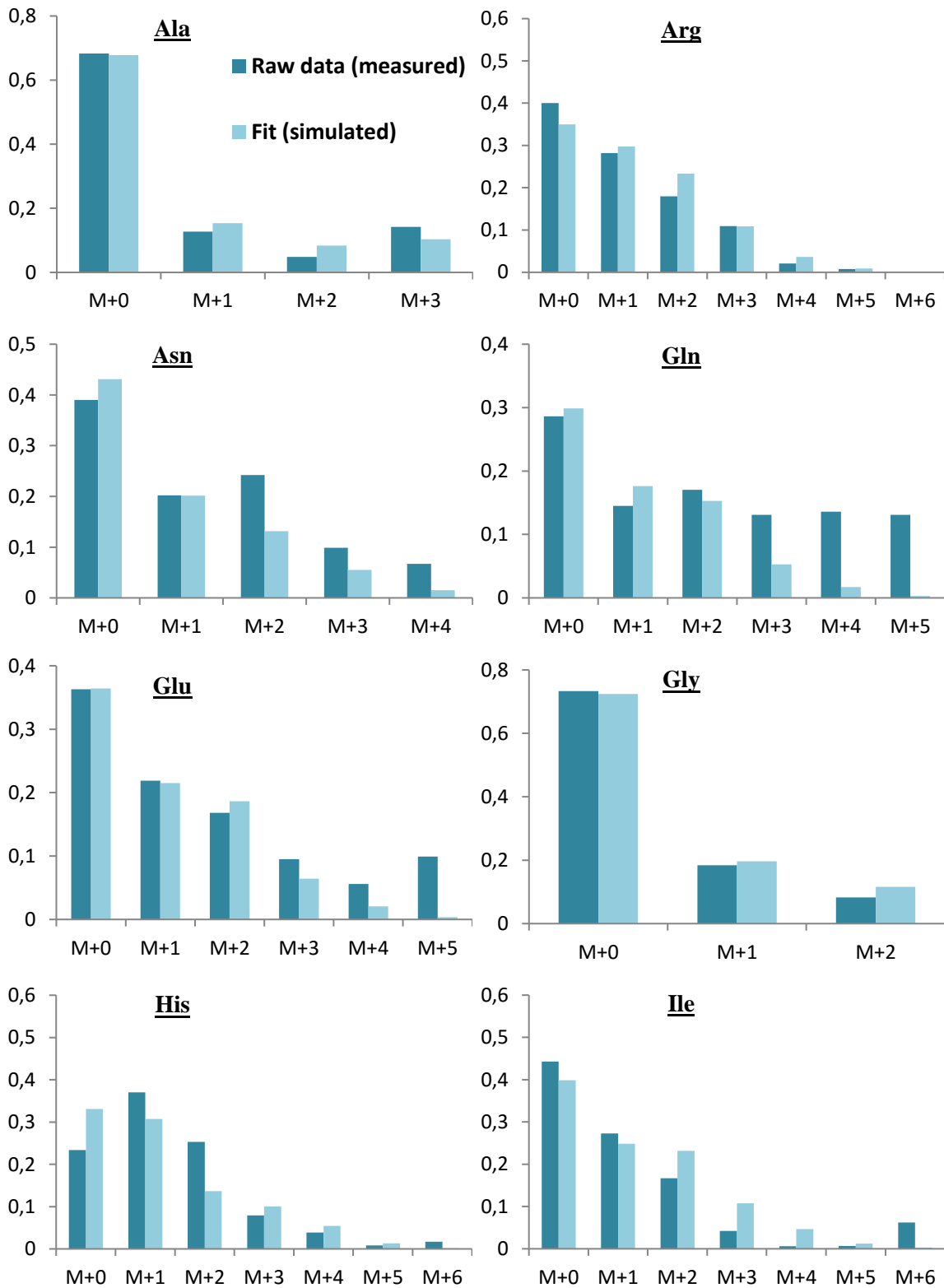
R	Réactions	V _{réactions}	Enzymes/réactions
R1	GLYCEROL.ext (abc) -> GLYCEROL (abc)	Vgyol	Rate of glycérol uptake
R2	Cit.c (abcdef) -> Cit.ext (abcdef)	Vc	Rate of citrate release
R3	CO2 (a) -> CO2.out (a)	Vco2	Rate of CO ₂ release
R4	GLYCEROL (abc) <-> Glyc3P (abc)	Vglycerol	Glycérol
R5	G6P (abcdef) <-> F6P (abcdef)	Vgpi	Glucose-6-phosphate isomérase
R6	F6P (abcdef) <-> FBP (abcdef)	Vpfb	Phosphofruktokinase
R7	DHAP (cba) + G3P (def) <-> FBP (abcdef)	Vald	Aldolase
R8	G3P (abc) <-> DHAP (abc)	Vtpi	Triose phosphate isomérase
R9	DHAP (abc) <-> Glyc3P (abc)	Vgpdh	Glycerol-3-phosphate deshydrogénase
R10	PG3 (abc) <-> G3P (abc)	Vgapdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
R11	PEP (abc) <-> PG3 (abc)	Veno	Enolase
R12	PEP (abc) -> Pyr.c (abc)	Vpk	Pyruvate kinase
R13	G6P (abcdef) -> Glycogen (abcdef)	Vgsy	Glycogene synthase
R14	G6P (abcdef) + NADP (z) -> 6PG (abcdef) + NADPH (z)	Vg6pdh	Glucose-6-phosphate deshydrogénase
R15	6PG (abcdef) + NADP (z) -> Ru5P (bcdef) + CO2 (a) + NADPH (z)	V6pgdh	6-phosphogluconate deshydrogénase
R16	Ru5P (abcde) <-> X5P (abcde)	Vrpe	Ribulose-phosphate-3-épipérase
R17	Ru5P (abcde) <-> R5P (abcde)	Vrpi	Ribose-5-phosphate isomérase
R18	X5P (abcde) <-> G3P (cde) + TKC2 (ab)	Vtk	Transketolase
R19	E4P (cdef) + TKC2 (ab) <-> F6P (abcdef)	Vtk	Transketolase
R20	R5P (cdefg) + TKC2 (ab) <-> S7P (abcdefg)	Vtk	Transketolase
R21	G3P (def) + TAC3 (abc) <-> F6P (abcdef)	Vta	Transaldolase
R22	S7P (abcdefg) <-> E4P (defg) + TAC3 (abc)	Vta	Transaldolase
R23	Pyr.c (abc) -> Pyr.m (abc)	Vpyrt	Pyruvate transporter (Cytosol/mitochondria)
R24	Mal.c (abcd) -> Mal.m (abcd)	Vmalt	Malate transporter (Cytosol/mitochondria)
R25	Cit.m (abcdef) -> Cit.c (abcdef)	Vcitt	Citrate transporter (Mitochondria/Cytosol)
R26	Pyr.m (abc) -> AcCoA.m (bc) + CO2 (a)	Vpdhm	Mitochondrial Pyruvate deshydrogénase
R27	OAA.m (abcd) + AcCoA.m (ef) -> Cit.m (dcbfea)	Vcs	Citrate synthase
R28	Cit.m (abcdef) <-> ICit (abcdef)	Vaco	Aconitase
R29	ICit (abcdef) -> AKG (abcde) + CO2 (f)	Vidh	Isocitrate deshydrogénase
R30	AKG (abcde) -> suc (bcde) + CO2 (a)	Vkdh	α -ketoglutarate deshydrogénase and succinyl-CoA synthetase
R31	suc (abcd) <-> Fum (abcd)	Vsdh	Succinate deshydrogénase
R32	Fum (abcd) <-> Mal.m (abcd)	Vfum	Fumarase
R33	Mal.m (abcd) <-> OAA.m (abcd)	Vmaldh	Malate deshydrogénase
R34	ICit (abcdef) -> Glx (ab) + suc (edcf)	Vicitl	Isocitrate lyase
R35	Glx (ab) + AcCoA.c (cd) -> Mal.c (abc)	Vmals	Malate synthase
R36	Mal.m (abcd) -> Pyr.m (abc) + CO2 (d)	Vmalm	Mitochondrial malic enzyme
R37	Mal.c (abcd) + NADP (z) -> Pyr.c (abc) + CO2 (d) + NADPH (z)	Vmalc	Cytosolic malic enzyme
R38	Pyr.m (abc) + CO2 (d) -> OAA.m (abcd)	Vpc	Pyruvate carboxylase
R39	Cit.c (dcbfea) -> OAA.c (abcd) + AcCoA.c (ef)	Vacitl	ATP-Citrate lyase
R40	OAA.c (abcd) <-> Mal.c (abcd)	Vmaldhc	Cytosolic malate deshydrogénase
R41	Pyr.c (abc) -> ACA (bc) + CO2 (a)	Vpdc	Pyruvate decarboxylase

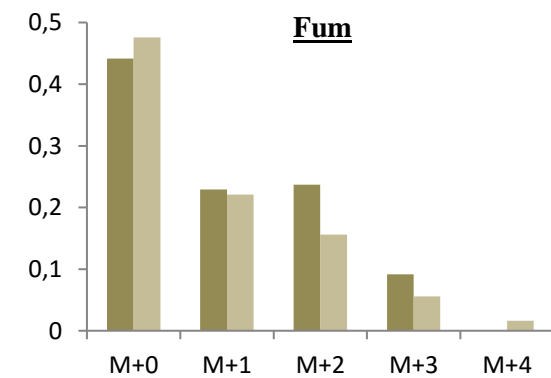
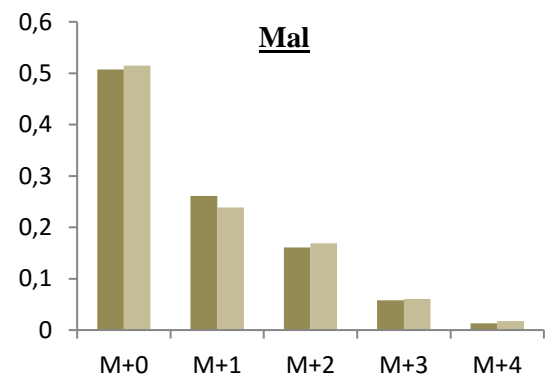
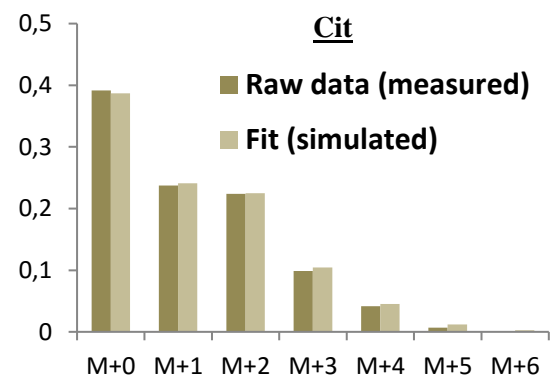
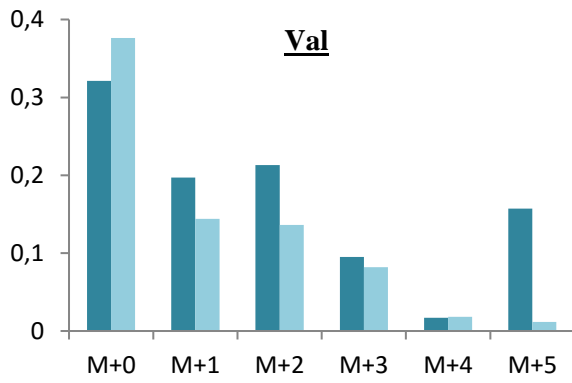
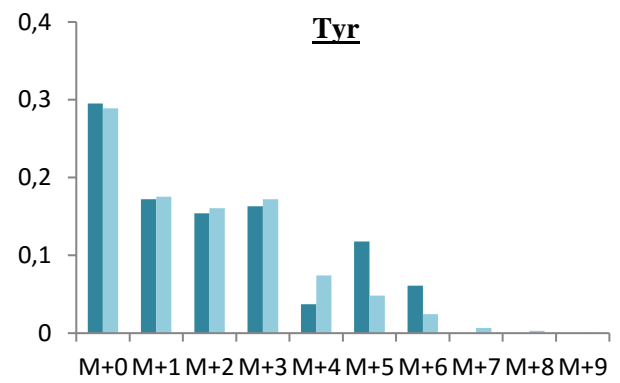
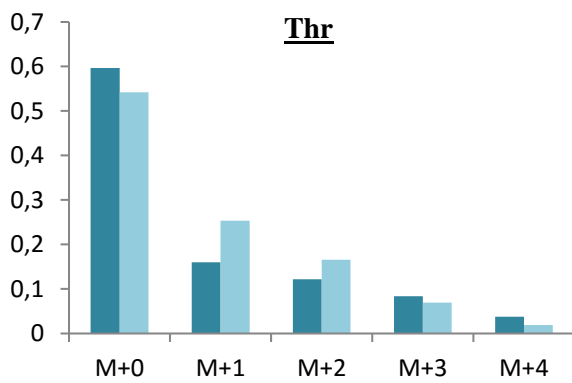
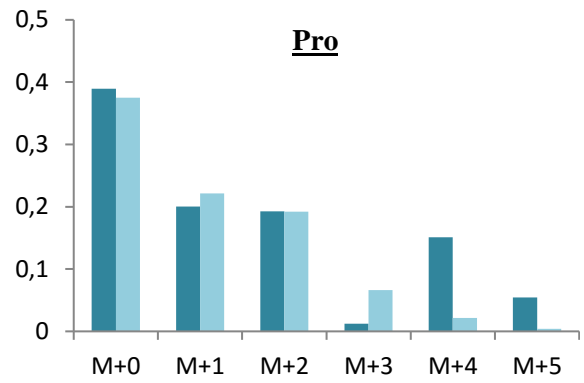
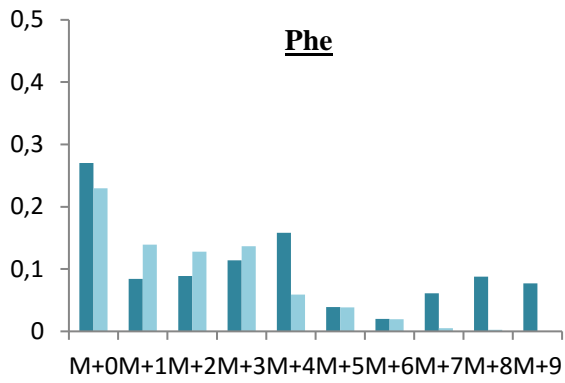
R42	ACA (ab) -> ACE (ab)	Vadh	Aldehyde deshydrogenase
R43	ACE (ab) -> AcCoA.c (ab)	Vacoal	Acetate CoA ligase
R44	AcCoA.c (ab) + AcCoA.c (cd) + AcCoA.c (ef) + AcCoA.c (gh) + AcCoA.c (ij) + AcCoA.c (kl) + AcCoA.c (mn) + AcCoA.c (op) + 14*NADPH (z) - > FA16 (abcdefghijklmnop) + 14*NADP (z)	Vfas16	Fatty acid synthase (C16 Fatty acid synthesis)
R45	FA16 (abcdefghijklmnop) -> FA16_1 (abcdefghijklmnop)	Vfad16	Fatty acid desaturase (C16 Fatty acid dasaturation)
R46	FA16 (abcdefghijklmnop) + AcCoA.c (qr) + 2*NADPH (z) -> FA18 (abcdefghijklmnopqr) + 2*NADP (z)	Vfas18	Fatty acid synthase (C18 Fatty acid synthesis)
R47	FA18 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_1 (abcdefghijklmnopqr)	Vfad18	Fatty acid desaturase (C18 Fatty acid dasaturation)
R48	FA18_1 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_2 (abcdefghijklmnopqr)	Vfad181	Fatty acid desaturase (18_1 Fatty acid dasaturation)
R49	FA18 (abcdefghijklmnopqr) + AcCoA.c (st) + 2*NADPH (z) -> FA20 (abcdefghijklmnopqrst) + 2*NADP (z)	Vfas20	Fatty acid synthase (C20 Fatty acid synthesis)
R50	FA20 (abcdefghijklmnopqrst) + AcCoA.c (uv) + 2*NADPH (z) -> FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) + 2*NADP (z)	Vfas22	Fatty acid synthase (C22 Fatty acid synthesis)
R51	FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) + AcCoA.c (wx) + 2*NADPH (z) -> FA24 (abcdefghijklmnopqrstuvw) + 2*NADP (z)	Vfas24	Fatty acid synthase (C24 Fatty acid synthesis)
R52	FA16 (abcdefghijklmnop) -> FA16_TAG (abcdefghijklmnop)	Vat16	Acyl-transférase
R53	FA16_1 (abcdefghijklmnop) -> FA16_1_TAG (abcdefghijklmnop)	Vat161	Acyl-transférase
R54	FA18 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat18	Acyl-transférase
R55	FA18_1 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_1_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat181	Acyl-transférase
R56	FA18_2 (abcdefghijklmnopqr) -> FA18_2_TAG (abcdefghijklmnopqr)	Vat182	Acyl-transférase
R57	FA20 (abcdefghijklmnopqrst) -> FA20_TAG (abcdefghijklmnopqrst)	Vat20	Acyl-transférase
R58	FA22 (abcdefghijklmnopqrstuv) -> FA22_TAG (abcdefghijklmnopqrstuv)	Vat22	Acyl-transférase
R59	FA24 (abcdefghijklmnopqrstuvw) -> FA24_TAG (abcdefghijklmnopqrstuvw)	Vat24	Acyl-transférase
R60	Glyc3P (abc) -> TAG (abc)	Vtag	TAG synthesis
R61	AKG (abcde) -> Glu (abcde)	Vtam	Transaminase
R62	PG3 (abc) + Glu (defgh) -> Ser (abc) + AKG (defgh)	Vser	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase and phosphoserine phosphatase
R63	Ser (abc) <-> Gly (ab) + C1 (c)	Vgly	Glycine hydroxymethyltransferase
R64	Gly (ab) <-> CO2 (a) + C1 (b)	Vglydh	Glycine dehydrogenase
R65	OAA.c (abcd) + Glu (efghi) -> Asp (abcd) + AKG (efghi)	Vasp	Aspartate transaminase
R66	Asp (abcd) -> Asn (abcd)	Vasn	Asparagine synthase
R67	Glu (abcde) <-> Gln (abcde)	Vgln	Glutamine synthase
R68	Glu (abcde) + NADPH (z) -> Pro (abcde) + NADP (z)	Vpro	γ -glutamyl kinase, γ -glutamyl phosphate reductase and Pyrroline-5-carboxylate reductase
R69	Asp (abcd) + 2*NADPH (z) -> Thr (abcd) + 2*NADP (z)	Vthr	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine kinase, threonine synthase
R70	Thr (abcd) -> Gly (ab) + AcCoA.c (cd)	Vthraldo	L-threonine aldolase
R71	Pyr.m (abc) + Glu (defgh) -> Ala (abc) + AKG (defgh)	Vala	Alanine transaminase
R72	Glu (abcde) + Glu (fghij) + CO2 (k) + Gln (lmnop) + Asp (qrst) -> AKG (abcde) + Arg (fghijk) + Glu (lmnop) + Fum (qrst)	Varg	Glutaminase, carbamoyl-phosphate synthase, amino-acid N-acetyltransferase, acetylmithine aminotransferase, N-acetyl-gamma-glutamyl- phosphate reductase, acetylglutamate kinase, amino-acid N-acetyltransferase, ornithine carbamoyltransferase,

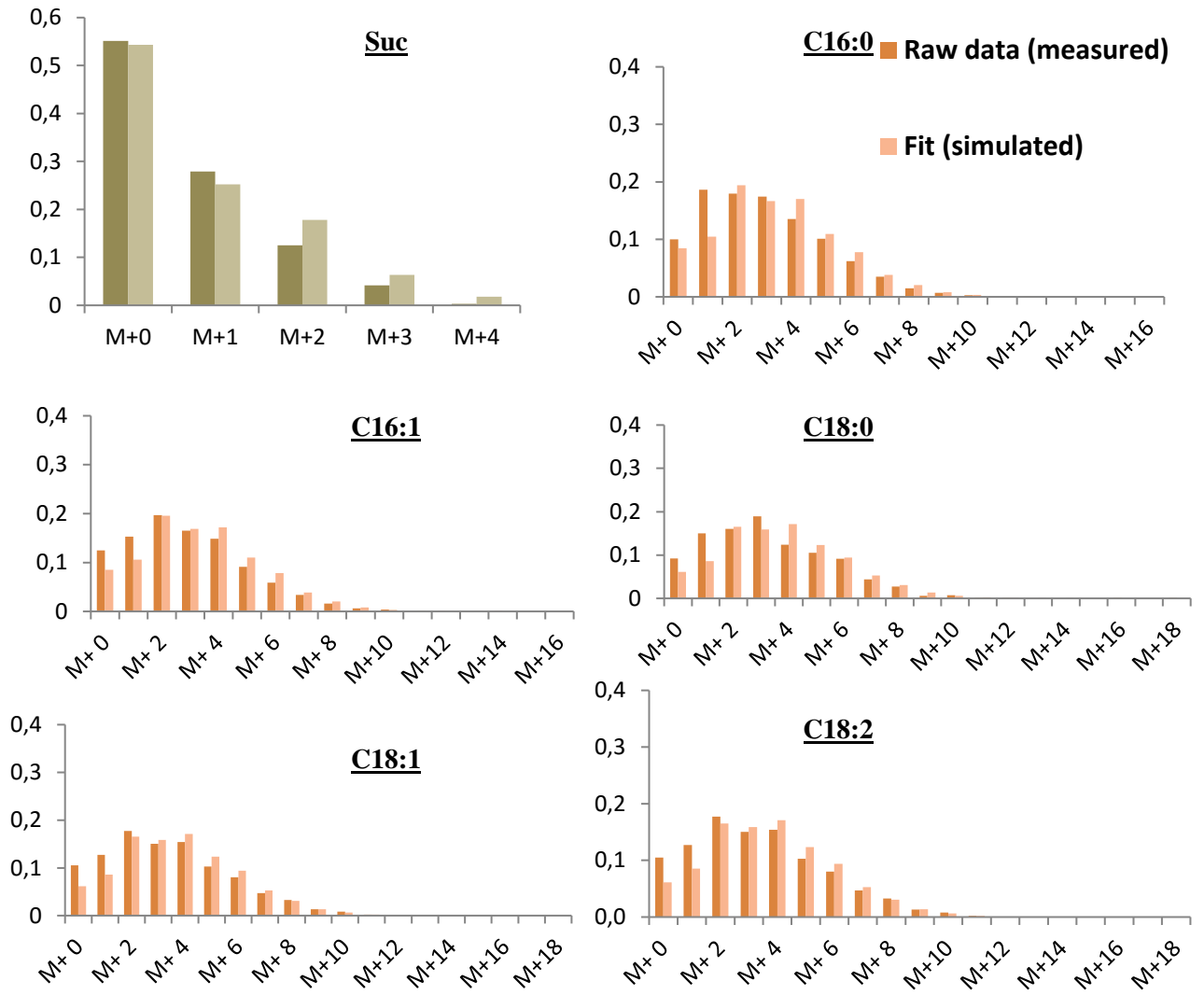
			argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase
R73	Pyr.m (abc) + Pyr.m (def) + Glu (ghijk) + 2*NADPH (z) -> Val (abecf) + CO2 (d) + AKG (ghijk) + 2*NADP (z)	Vval	Acetolactate synthase, 2-acetolactate mutase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase and branched-chain-amino-acid transaminase
R74	Ser (abc) + AcCoA.c (de) + Asp (fghi) + CO2 (j) -> Cys (abc) + ACE (de) + suc (jihj) + CO2 (f)	Vcys	Cystathionine beta-synthase, cystathionine gamma-lyase
R75	Asp (abcd) + C1 (e) + AcCoA.c (fg) + NADPH (z) -> Met (abcde) + ACE (fg) + NADP (z)	Vmet	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine O-acetyltransferase, cystathionine gamma-synthase and homocysteine S-methyltransferase
R76	AKG (abcde) + AcCoA.c (fg) + Glu (hijkl) + Glu (mnopq) -> Lys (fgbcde) + CO2 (a) + AKG (hijkl) + AKG (mnopq)	Vlys	Homocitrate synthase, homoaconitase, homoaconitase hydratase, homoisocitrate dehydrogenase, aromatic amino acid aminotransferase, L-2-aminoadipate reductase, saccharopine dehydrogenase and saccharopine dehydrogenase
R77	AcCoA.m (ab) + Pyr.m (cde) + Pyr.m (fgh) + Glu (ijklm) -> Leu (abdghe) + CO2 (c) + CO2 (f) + AKG (ijklm)	Vleu	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase, 2-isopropylmalate synthase, 3-isopropylmalate dehydratase, 3-isopropylmalate dehydrogenase and branched-chain amino acid aminotransferase
R78	PEP (abc) + PEP (def) + E4P (ghij) + Glu (klmno) + NADPH (z) -> Phe (abcefg hij) + CO2 (d) + AKG (klmno) + NADP (z)	Vphe	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate dehydratase and aromatic amino acid aminotransferase
R79	PEP (abc) + PEP (def) + E4P (ghij) + Glu (klmno) + NADPH (z) -> Tyr (abcefg hij) + CO2 (d) + AKG (klmno) + NADP (z)	Vtyr	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate dehydrogenase and aromatic amino acid aminotransferase
R80	Ser (abc) + R5P (defgh) + PEP (ijk) + E4P (lmno) + PEP (pqr) + Gln (stuvw) + NADPH (z) -> Trp (abcdklmno j) + CO2 (i) + G3P (fgh) + Pyr.c (pqr) + Glu (stuvw) + NADP (z)	Vtrp	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, anthranilate synthase, anthranilate phosphoribosyltransferase and tryptophan synthase
R81	R5P (abcde) + C1 (f) + Gln (ghijk) + Asp (lmno) -> His (edcbaf) + AKG (ghijk) + Fum (lmno)	Vhis	Ribose 5-phosphate isomerase A, ribose-phosphate pyrophosphokinase, ATP phosphoribosyltransferase, phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase, phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase, glutamine amidotransferase, imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, histidinol-phosphate aminotransferase, histidinol-phosphatase and phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase
R82	Thr (abcd) + Pyr.m (efg) + Glu (hijkl) + NADPH (z) -> Ile (abfcgd) + CO2 (e) + AKG (hijkl) + NADP (z)	Vile	Threonine dehydratase, acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase and branched-chain amino acid aminotransferase
R83	0*Cit.c (abcdef) -> Cit.s (abcdef)	Vcit0	Flux nul de cit
R84	0*Cit.m (abcdef) -> Cit.s (abcdef)	Vcit0	Flux nul de cit
R85	Cit.s -> Sink_Cit	Vcit0	Flux nul de cit
R86	0*Mal.c (abcd) -> Mal.s (abcd)	Vmal0	Flux nul de mal
R87	0*Mal.m (abcd) -> Mal.s (abcd)	Vmal0	Flux nul de mal
R88	Mal.s -> Sink_Mal	Vmal0	Flux nul de mal
R89	Cys (abc) + Ser (def) + Gly (gh) -> CysSerGly_prot (abcde fgh)	Vcsgprot	synthèse protéines : pool cys ser et gly
R90	Asp (abcd) + Asn (efgh) -> AspAsn_prot (abcde fgh)	Vaaprot	synthèse protéines : pool asp asn
R91	Phe (abcdefhij) + Trp (klmnopqrstu) -> PheTrp_Prot (abcdefhijklmnopqrstu)	Vptprot	synthèse protéines : pool phe trp
R92	Tyr (abcdefhij) + His (klmnop) -> TyrHis_Prot (abcdefhijklmnop)	Vthprot	synthèse protéines : pool tyr his
R93	Glu (abcde) + Gln (fghij) -> GluGln_Prot (abcde fghij)	Vggprot	synthèse protéines : pool glu gln

R94	Ala (abc) + Val (defgh) -> AlaVal_Prot (abcdefgh)	Vavprot	synthèse protéines : pool ala val
R95	Arg (fghijk) -> Arg_prot (fghijk)	Vaprot	synthèse protéines : pool arg
R96	Ile (abfcgd) -> Ile_prot (abfcgd)	Viprot	synthèse protéines : pool ile
R97	Lys (fgbcde) -> Lys_prot (fgbcde)	Vlprot	synthèse protéines : pool lys
R98	Pro (abcde) -> Pro_prot (abcde)	Vpprot	synthèse protéines : pool pro
R99	Thr (abcd) -> Thr_prot (abcd)	Vtprot	synthèse protéines : pool thr
R100	Met (abcde) -> Met_prot (abcde)	Vmprot	synthèse protéines : pool met
R101	Leu (abdghe) -> Leu_prot (abdghe)	Vleuprot	synthèse protéines : pool leu

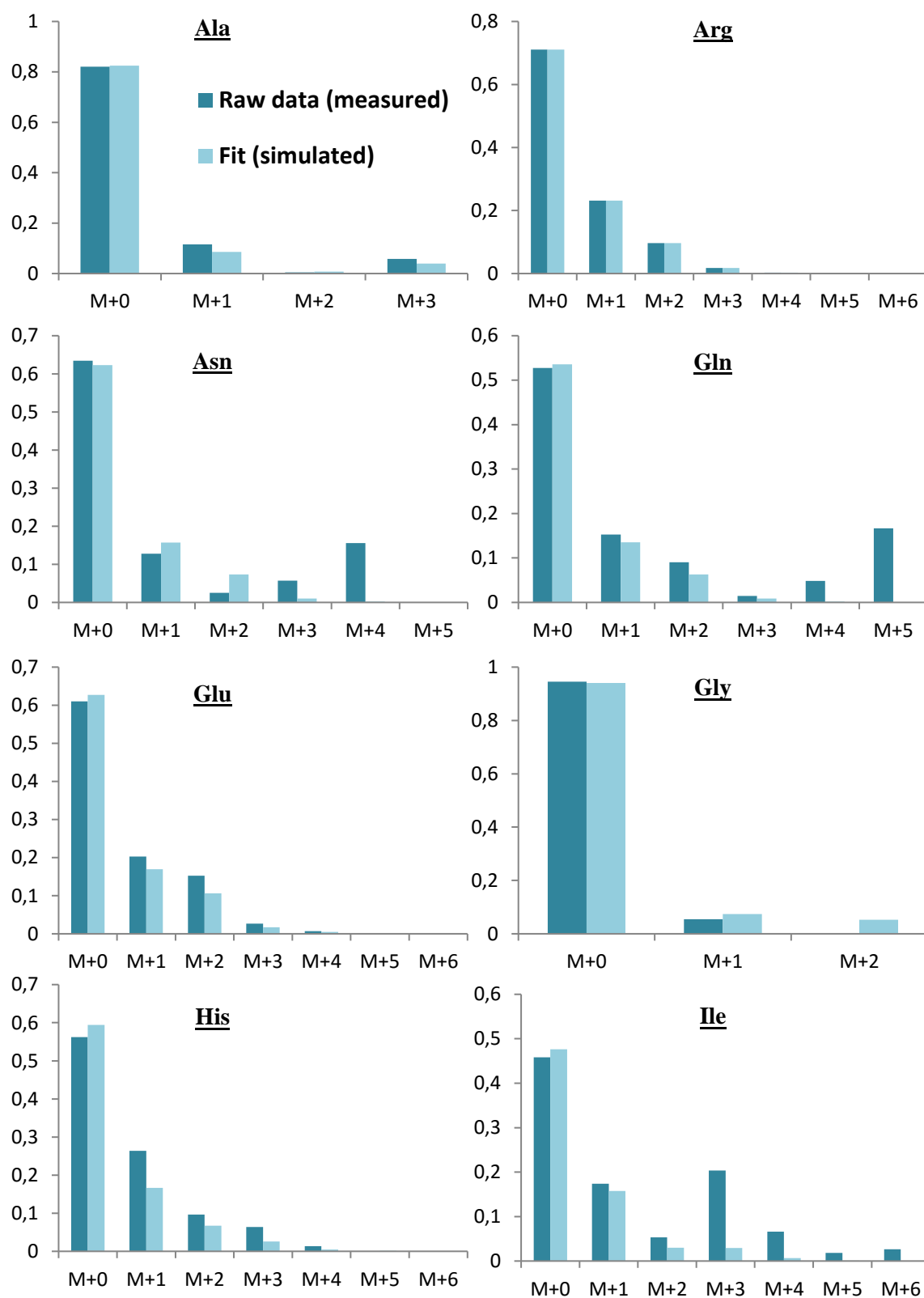
Annexe 12 : Comparaison des « fit » mesurés et simulés (MFA levure sur glucose).

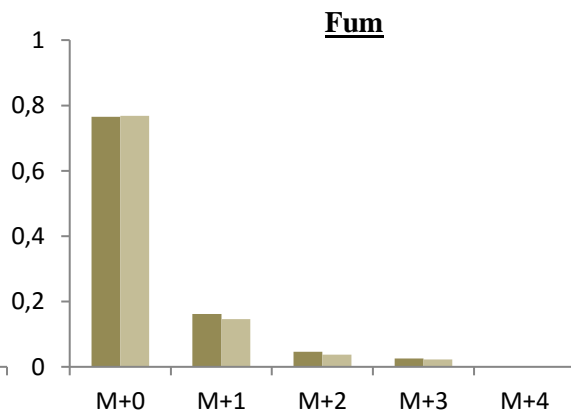
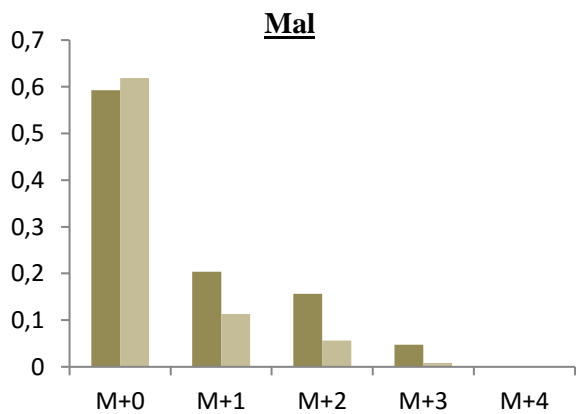
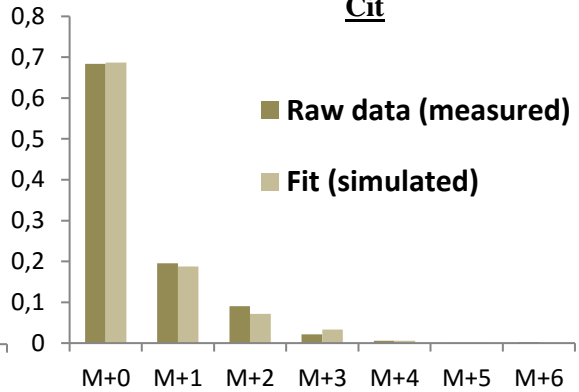
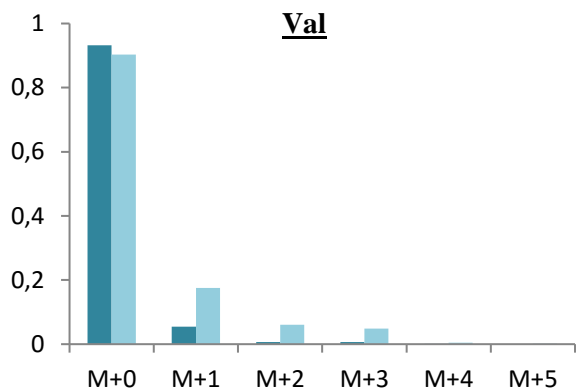
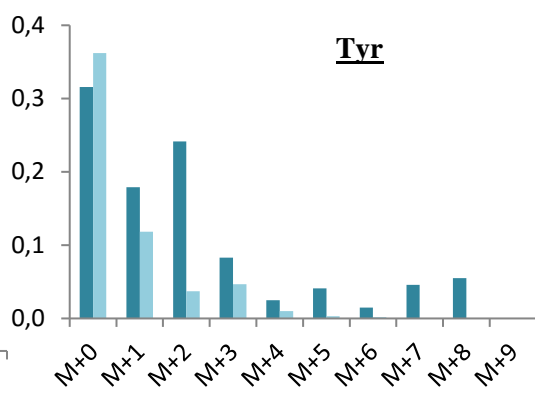
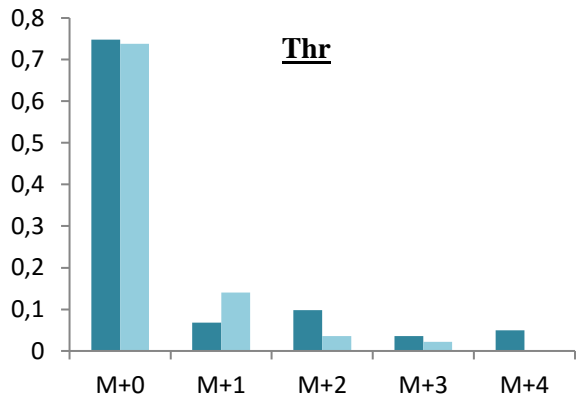
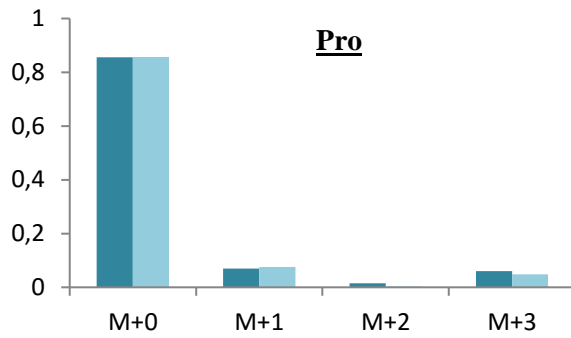
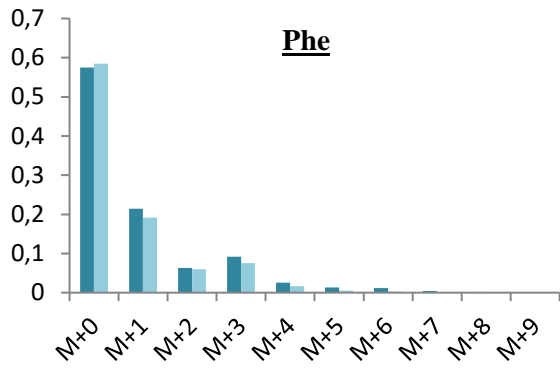


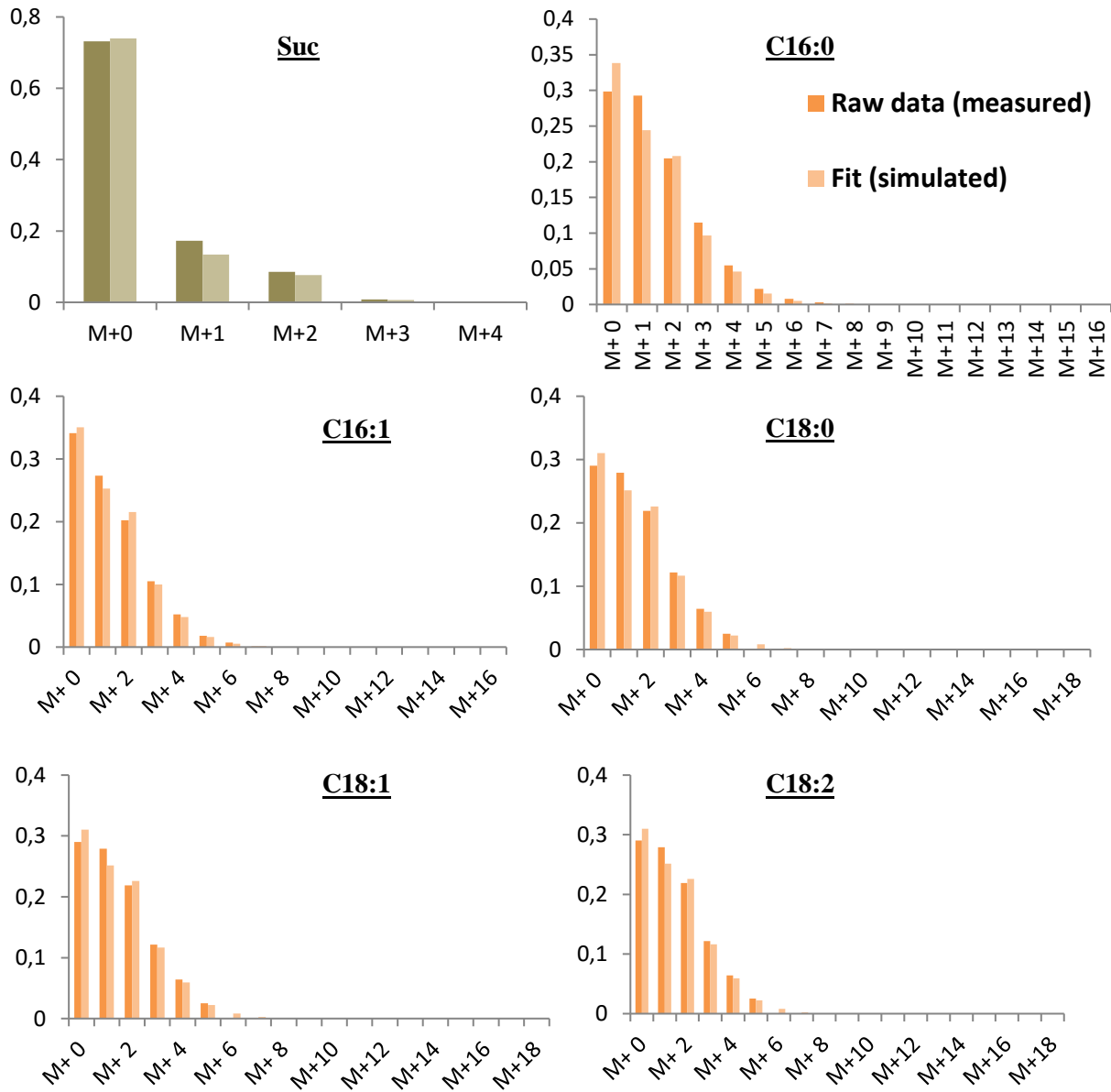




Annexe 13 : Comparaison des « fit » mesurés et simulés (MFA levure sur glycérol).







Annexe 14 : Calcul des flux métaboliques par MFA : souche JMY3501.

Glucose					Glycérol				
R _{glucose}	Flux	Borne -	Borne +	Flux normalisé	R _{glycerol}	Flux	Borne -	Borne +	Flux normalisé
R1	1354,7	1354,6	1354,8	100,0	R1	1539,9	1539,8	1540,0	100,0
R2	0,0	0,0	0,1	0,0	R2	0,0	0,0	0,1	0,0
R3	3209,7	1803,3	3227,2	236,9	R3	1180,3	1061,8	1185,9	76,6
R4 net	1354,7	1354,6	1354,8	100,0	R4 net	1539,9	1539,8	1540,0	100,0
R4 exch	150,4	0,0	281,5	11,1	R4 exch	0,0	0,0	3442,0	0,0
R5	593,8	429,1	433,9	43,8	R5 net	-566,6	-569,0	-564,2	-36,8
					R5 exch	0,1	0,0	123,3	0,0
R6	866,4	811,5	813,2	64,0	R6 net	-320,0	-320,8	-319,2	-20,8
					R6 exch	1818,8	0,0	11702,0	118,1
R7 net	-866,4	-813,2	-811,5	-64,0	R7 net	320,0	319,2	320,8	20,8
R7 exch	27,7	28,8	83,8	2,0	R7 exch	855,6	0,0	3086,4	55,6
R8 net	-849,1	-795,9	-794,2	-62,7	R8 net	-1206,0	-1206,9	-1205,2	-78,3
R8 exch	1,2	0,0	3649400,0	0,1	R8 exch	0,0	0,0	131,2	0,0
R9	17,3	17,2	17,4	1,3	R9 net	-1526,0	-1526,2	-1525,9	-99,1
					R9 exch	1885300,0	1854900,0	2127700,0	122430,0
R10 net	-1837,2	-1784,1	-1782,2	-135,6	R10 net	-1001,8	-1002,8	-1000,9	-65,1
R10 exch	35,5	0,2	248,8	2,6	R10 exch	33,9	32,8	34,9	2,2
R11 net	-1837,2	-1721,4	-1277,5	-135,6	R11 net	-979,1	-980,1	-978,0	-63,6
R11 exch	0,0	1,5	1,5	0,0	R11 exch	0,0	0,0	3182,9	0,0
R12	1586,6	1027,0	1471,0	117,1	R12	888,1	886,7	889,4	57,7
R13	212,0	211,9	212,1	15,7	R13	143,8	143,7	143,9	9,3
R14	548,9	708,7	713,5	40,5	R14	422,8	420,4	425,2	27,5
R15	548,9	708,7	713,5	40,5	R15	422,8	420,4	425,2	27,5
R16 net	272,6	379,2	382,4	20,1	R16 net	246,6	245,0	248,2	16,0
R16 exch	3175500,0	31782,0	Inf	234406,1	R16 exch	5649700,0	5344600,0	6653500,0	366887,5
R17 net	276,2	329,5	331,1	20,4	R17 net	176,2	175,4	177,0	11,4
R17 exch	194,2	0,0	258830,0	14,3	R17 exch	0,0	0,0	Inf	0,0
R18 net	272,6	379,2	382,4	20,1	R18 net	246,6	245,0	248,2	16,0
R18 exch	1706300,0	272,9	Inf	125954,1	R18 exch	5649700,0	5344600,0	6653500,0	366887,5
R19 net	73,7	126,9	128,6	5,4	R19 net	100,5	99,7	101,3	6,5

R19 exch	0,0	0,0	Inf	0,0	R19 exch	0,0	0,0	Inf	0,0
R20 net	199,0	252,3	253,9	14,7	R20 net	146,0	145,2	146,8	9,5
R20 exch	1949400,0	984,2	Inf	143899,0	R20 exch	5493300,0	3983300,0	6429100,0	356731,0
R21 net	199,0	252,3	253,9	14,7	R21 net	146,0	145,2	146,8	9,5
R21 exch	152980,0	0,0	Inf	11292,5	R21 exch	5493300,0	4040900,0	5996200,0	356731,0
R22 net	199,0	252,3	253,9	14,7	R22 net	146,0	145,2	146,8	9,5
R22 exch	2003200,0	1009,2	Inf	147870,4	R22 exch	5493300,0	3983300,0	6435600,0	356731,0
R23	1634,3	804,4	1518,9	120,6	R23	903,4	844,4	904,5	58,7
R24	3,8	0,0	1506,7	0,3	R24	403,7	283,3	407,8	26,2
R25	329,4	138,9	1079,9	24,3	R25	445,6	384,6	446,7	28,9
R26	1116,9	624,1	1751,5	82,4	R26	667,8	549,5	671,9	43,4
R27	1116,9	624,1	1751,4	82,4	R27	667,8	549,4	671,9	43,4
R28 net	787,5	227,3	673,9	58,1	R28 net	222,2	162,9	225,6	14,4
R28 exch	165,3	14,2	462,7	12,2	R28 exch	149,8	146,4	209,1	9,7
R29	785,8	52,0	670,8	58,0	R29	162,9	162,6	223,6	10,6
R30	733,7	0,0	618,6	54,2	R30	0,0	0,0	60,7	0,0
R31 net	736,9	352,1	621,7	54,4	R31 net	59,3	0,0	62,7	3,9
R31 exch	2447400,0	0,0	7114700,0	180659,9	R31 exch	0,0	0,0	Inf	0,0
R32 net	774,5	389,7	659,3	57,2	R32 net	103,1	43,9	106,5	6,7
R32 exch	4947,3	0,0	Inf	365,2	R32 exch	0,0	0,0	Inf	0,0
R33 net	187,6	-1548,9	1395,1	13,8	R33 net	506,8	0,0	513,8	32,9
R33 exch	2070,8	0,0	Inf	152,9	R33 exch	0,0	0,0	Inf	0,0
R34	1,7	0,0	620,1	0,1	R34	59,3	0,0	62,5	3,9
R35	1,7	0,0	620,1	0,1	R35	59,3	0,0	62,5	3,9
R36	590,7	0,1	2747,0	43,6	R36	0,0	0,0	502,8	0,0
R38	929,3	69,0	2754,2	68,6	R38	161,0	157,9	665,5	10,5
R39	329,4	138,9	1079,9	24,3	R39	445,6	384,6	446,7	28,9
R40 net	2,1	-90,0	887,3	0,2	R40 net	344,3	283,3	345,5	22,4
R40 exch	0,0	0,0	Inf	0,0	R40 exch	6227900,0	6149000,0	6456600,0	404435,4
R41	0,4	0,0	568,4	0,0	R41	0,0	0,0	58,9	0,0
R42	0,4	0,0	568,4	0,0	R42	0,0	0,0	58,9	0,0
R43	1,9	0,0	596,7	0,1	R43	0,0	0,0	0,0	0,0
R44	51,9	51,6	52,2	3,8	R44	41,6	41,3	41,9	2,7
R45	3,4	3,3	3,5	0,3	R45	2,1	2,0	2,2	0,1
R46	35,7	35,5	36,0	2,6	R46	28,6	28,3	28,8	1,9

R47	29,7	29,6	29,8	2,2	R47	24,3	24,1	24,4	1,6
R48	7,5	7,4	7,6	0,6	R48	4,7	4,6	4,8	0,3
R49	2,0	1,8	2,2	0,1	R49	1,0	0,9	1,2	0,1
R50	1,8	1,7	2,0	0,1	R50	0,8	0,6	0,9	0,1
R51	0,4	0,3	0,5	0,0	R51	0,6	0,5	0,7	0,0
R52	12,7	12,7	12,9	0,9	R52	10,9	10,8	11,0	0,7
R53	3,4	3,3	3,5	0,3	R53	2,1	2,0	2,2	0,1
R54	4,0	3,9	4,1	0,3	R54	3,3	3,2	3,4	0,2
R55	22,2	22,1	22,3	1,6	R55	19,5	19,4	19,6	1,3
R56	7,5	7,4	7,6	0,6	R56	4,7	4,6	4,8	0,3
R57	0,2	0,1	0,3	0,0	R57	0,3	0,2	0,4	0,0
R58	1,4	1,4	1,5	0,1	R58	0,2	0,1	0,3	0,0
R59	0,4	0,3	0,5	0,0	R59	0,6	0,5	0,7	0,0
R60	17,3	17,2	17,4	1,3	R60	13,9	13,8	14,0	0,9
R61	669,4	596,8	1217,3	49,4	R61	441,4	440,8	442,2	28,7
R62	0,0	62,6	505,7	0,0	R62	22,7	22,7	23,0	1,5
R63 net	-51,2	14,6	103,2	-3,8	R63 net	7,4	7,4	7,5	0,5
R63 exch	0,0	345,2	369520,0	0,0	R63 exch	0,0	0,0	1438,6	0,0
R64 net	80,4	-74,0	14,7	5,9	R64 net	7,4	7,4	7,5	0,5
R64 exch	22,8	0,0	265,6	1,7	R64 exch	0,0	0,0	2707100,0	0,0
R65	327,2	192,4	369,7	24,2	R65	101,2	101,0	101,6	6,6
R66	2,7	2,6	2,8	0,2	R66	16,4	16,3	16,5	1,1
R67 net	93,6	93,4	93,8	6,9	R67 net	90,5	90,3	90,7	5,9
R67 exch	0,0	0,0	0,0	0,0	R67 exch	0,0	0,0	0,0	0,0
R68	21,9	21,8	22,0	1,6	R68	48,7	48,6	48,8	3,2
R69	282,8	149,6	149,8	20,9	R69	24,6	24,5	24,8	1,6
R70	133,1	0,0	133,1	9,8	R70	0,0	0,0	0,0	0,0
R71	9,7	9,6	9,8	0,7	R71	16,7	16,6	16,8	1,1
R72	8,4	8,3	8,5	0,6	R72	28,9	28,8	29,0	1,9
R73	9,7	9,6	9,8	0,7	R73	16,7	16,6	16,8	1,1
R74	1,6	0,0	177,2	0,1	R74	0,0	0,0	0,1	0,0
R75	0,0	0,0	0,1	0,0	R75	0,0	0,0	0,1	0,0
R76	6,0	5,9	6,1	0,4	R76	22,5	22,4	22,6	1,5
R77	0,0	0,0	0,1	0,0	R77	0,0	0,0	0,1	0,0
R78	48,1	48,0	48,2	3,5	R78	15,3	15,2	15,4	1,0
R79	29,2	29,1	29,3	2,2	R79	14,9	14,8	15,0	1,0
R80	48,1	48,0	48,2	3,5	R80	15,3	15,2	15,4	1,0
R81	29,2	29,1	29,3	2,2	R81	14,9	14,8	15,0	1,0
R82	149,7	149,6	149,8	11,0	R82	24,6	24,5	24,7	1,6
R83	0,0	0,0	0,1	0,0	R83	0,0	0,0	0,1	0,0
R84	0,0	0,0	0,0	0,0	R84	0,0	0,0	0,0	0,0

R85	0,0	0,0	0,1	0,0	R85	0,0	0,0	0,1	0,0
R86	0,0	0,0	0,1	0,0	R86	0,0	0,0	0,1	0,0
R87	0,0	0,0	0,1	0,0	R87	0,0	0,0	0,1	0,0
R88	0,0	0,0	0,1	0,0	R88	0,0	0,0	0,1	0,0
R89	1,6	0,0	177,2	0,1	R89	0,0	0,0	0,1	0,0
R90	2,7	2,6	2,8	0,2	R90	16,4	16,3	16,5	1,1
R91	48,1	48,0	48,2	3,5	R91	15,3	15,2	15,4	1,0
R92	29,2	29,1	29,3	2,2	R92	14,9	14,8	15,0	1,0
R93	8,0	7,9	8,1	0,6	R93	31,4	31,3	31,5	2,0
R94	9,7	9,6	9,8	0,7	R94	16,7	16,6	16,8	1,1
R95	8,4	8,3	8,5	0,6	R95	28,9	28,8	29,0	1,9
R96	149,7	149,6	149,8	11,0	R96	24,6	24,5	24,7	1,6
R97	6,0	5,9	6,1	0,4	R97	22,5	22,4	22,6	1,5
R98	21,9	21,8	22,0	1,6	R98	48,7	48,6	48,8	3,2
R99	0,0	0,0	0,1	0,0	R99	0,0	0,0	0,1	0,0
R100	0,0	0,0	0,1	0,0	R100	0,0	0,0	0,1	0,0
R101	0,0	0,0	0,1	0,0	R101	0,0	0,0	0,1	0,0

Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Les flux normalisés sont alors exprimés en $\mu\text{mol}\cdot 100\mu\text{mol de glucose}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Annexe 15 : Liste des réactions en abrégations (modèle FBA-Levure).

R	Réactions	V _{réactions}	Enzymes/réactions
R1	GLC.ext -> GLC	Vg	Rate of glucose uptake
R2	Cit.c -> Cit.ext	Vc	Rate of citrate release
R3	CO2 -> CO2.out	Vco2	Rate of CO ₂ release
R4	GLC <-> G6P	Vhk	Hexokinase 1
R5	G6P -> F6P	Vgpi	Glucose-6-phosphate isomérase
R6	F6P -> FBP	Vpfk	Phosphofruktokinase
R7	DHAP + G3P <-> FBP	Vald	Aldolase
R8	G3P <-> DHAP	Vtpi	Triose phosphate isomérase
R9	DHAP -> Glyc3P	Vgpdh	Glycerol-3-phosphate deshydrogenase
R10	PG3 <-> G3P	Vgapdh	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
R11	PEP <-> PG3	Veno	Enolase
R12	PEP -> Pyr.c	Vpk	Pyruvate kinase
R13	G6P -> Glycogen	Vgsy	Glycogene synthase
R14	G6P + NADP -> 6PG + NADPH	Vg6pdh	Glucose-6-phosphate deshydrogenase
R15	6PG + NADP -> Ru5P + CO2 + NADPH	V6pgdh	6-phosphogluconate déshydrogénase
R16	Ru5P <-> X5P	Vrpe	Ribulose-phosphate-3-épipimérase
R17	Ru5P <-> R5P	Vrpi	Ribose-5-phosphate isomérase
R18	S7P + G3P <-> R5P + X5P	Vtk	Transketolase
R19	F6P + G3P <-> E4P + X5P	Vtk	Transketolase
R20	S7P + G3P <-> E4P + F6P	Vta	Transaldolase
R21	Pyr.c -> Pyr.m	Vpyrt	Pyruvate transporter (Cytosol/mitochondria)
R22	Mal.c -> Mal.m	Vmalt	Malate transporter (Cytosol/mitochondria)
R23	Cit.m -> Cit.c	Vcitt	Citrate transporter (Mitochondria/Cytosol)
R24	Pyr.m -> AcCoA.m + CO2	Vpdhm	Mitochondrial Pyruvate deshydrogenase
R25	OAA.m + AcCoA.m -> Cit.m	Vcs	Citrate synthase
R26	Cit.m <-> ICit	Vaco	Aconitase
R27	ICit -> AKG + CO2	Vidh	Isocitrate deshydrogenase
R28	AKG -> suc + CO2	Vkdh	α -ketoglutarate deshydrogenase and succinyl-CoA synthetase
R29	suc <-> Fum	Vsdh	Succinate deshydrogenase
R30	Fum <-> Mal.m	Vfum	Fumarase
R31	Mal.m <-> OAA.m	Vmaldh	Malate deshydrogenase
R32	ICit -> Glx + suc	Vicitl	Isocitrate lyase
R33	Glx + AcCoA.c -> Mal.c	Vmals	Malate synthase
R34	Mal.m -> Pyr.m + CO2	Vmalm	Mitochondrial malic enzyme
R35	Pyr.m + CO2 -> OAA.m	Vpc	Pyruvate carboxylase
R36	Cit.c -> OAA.c + AcCoA.c	Vacitl	ATP-Citrate lyase
R37	OAA.c <-> Mal.c	Vmaldhc	Cytosolic malate deshydrogenase
R38	Pyr.c -> ACA + CO2	Vpdc	Pyruvate decarboxylase
R39	ACA -> ACE	Vadh	Aldehyde deshydrogenase
R40	ACE -> AcCoA.c	Vacoal	Acetate CoA ligase
R41	AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + AcCoA.c + 14*NADPH -> FA16 + 14*NADP	Vfas16	Fatty acid synthase (C16 Fatty acid synthesis)
R42	FA16 -> FA16_1	Vfad16	Fatty acid desaturase (C16 Fatty acid désaturation)
R43	SAM + FA16_1 -> FA17_CA + SAH	Vcfa17	CFA synthase (synthèse de C17:CFA)
R44	FA16 + AcCoA.c + 2*NADPH -> FA18 + 2*NADP	Vfas18	Fatty acid synthase (C18 Fatty acid synthesis)
R45	FA18 -> FA18_1	Vfad18	Fatty acid desaturase (C18 Fatty acid désaturation)
R46	FA18_1 -> FA18_2	Vfad181	Fatty acid desaturase (18_1 Fatty acid désaturation)
R47	SAM + FA18_1 -> FA19_CA + SAH	Vcfa19	CFA synthase (synthèse de C19:CFA)
R48	FA18 + AcCoA.c + 2*NADPH -> FA20 + 2*NADP	Vfas20	Fatty acid synthase (C20 Fatty acid synthesis)
R49	FA20 + AcCoA.c + 2*NADPH -> FA22 + 2*NADP	Vfas22	Fatty acid synthase (C22 Fatty acid synthesis)
R50	FA22 + AcCoA.c + 2*NADPH -> FA24 + 2*NADP	Vfas24	Fatty acid synthase (C24 Fatty acid synthesis)

R51	FA16 -> FA16_TAG	Vat16	Acyl-transférase
R52	FA16_1 -> FA16_1_TAG	Vat161	Acyl-transférase
R53	FA17_CA -> FA17_CA_TAG	Vatcfa17	Acyl-transférase
R54	FA18 -> FA18_TAG	Vat18	Acyl-transférase
R55	FA18_1 -> FA18_1_TAG	Vat181	Acyl-transférase
R56	FA18_2 -> FA18_2_TAG	Vat182	Acyl-transférase
R57	FA19_CA -> FA19_CA_TAG	Vatcfa19	Acyl-transférase
R58	FA20 -> FA20_TAG	Vat20	Acyl-transférase
R59	FA22 -> FA22_TAG	Vat22	Acyl-transférase
R60	FA24 -> FA24_TAG	Vat24	Acyl-transférase
R61	Glyc3P -> TAG	Vtag	TAG synthesis
R62	Met -> SAM	Vsam	Methionine adenosyltransferase
R63	SAH -> Met	Vmets	SAM-Dependant methylase, S-adenosylhomocystéine hydrolase, Methionine synthase
R64	AKG -> Glu	Vtam	Transaminase
R65	PG3 + Glu -> Ser + AKG	Vser	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase and phosphoserine phosphatase
R66	Ser <-> Gly + C1	Vgly	Glycine hydroxymethyltransferase
R67	Gly <-> CO2 + C1	Vglydh	Glycine dehydrogenase
R68	OAA.c + Glu -> Asp + AKG	Vasp	Aspartate transaminase
R69	Asp -> Asn	Vasn	Asparagine synthase
R70	Glu <-> Gln	Vgln	Glutamine synthase
R71	Glu + NADPH -> Pro + NADP	Vpro	γ -glutamyl kinase, γ -glutamyl phosphate reductase and Pyrroline-5-carboxylate reductase
R72	Asp + 2*NADPH -> Thr + 2*NADP	Vthr	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine kinase, threonine synthase
R73	Thr -> Gly + AcCoA.c	Vthraldo	L-threonine aldolase
R74	Pyr.m + Glu -> Ala + AKG	Vala	Alanine transaminase
R75	Glu + Glu + CO2 + Gln + Asp -> AKG + Arg + Glu + Fum	Varg	Glutaminase, carbamoyl-phosphate synthase, amino-acid N-acetyltransferase, acetylornithine aminotransferase, N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, acetylglutamate kinase, amino-acid N-acetyltransferase, ornithine carbamoyltransferase, argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase
R76	Pyr.m + Pyr.m + Glu + 2*NADPH -> Val + CO2 + AKG + 2*NADP	Vval	Acetolactate synthase, 2-acetolactate mutase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase and branched-chain-amino-acid transaminase
R77	Ser + AcCoA.c + Asp + CO2 -> Cys + ACE + suc + CO2	Vcys	Cystathionine beta-synthase, cystathionine gamma-lyase
R78	Asp + C1 + AcCoA.c + NADPH -> Met + ACE + NADP	Vmet	Aspartate kinase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase, homoserine dehydrogenase, homoserine O-acetyltransferase, cystathionine gamma-synthase and homocysteine S-methyltransferase
R79	AKG + AcCoA.c + Glu + Glu + 2*NADPH -> Lys + CO2 + AKG + AKG + 2*NADP	Vlys	Homocitrate synthase, homoaconitase, homoaconitate hydratase, homoisocitrate dehydrogenase, aromatic amino acid aminotransferase, L-2-aminoadipate reductase, saccharopine dehydrogenase and saccharopine dehydrogenase
R80	AcCoA.m + Pyr.m + Pyr.m + Glu + NADPH -> Leu + CO2 + CO2 + AKG + NADP	Vleu	Acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase, 2-isopropylmalate synthase, 3-isopropylmalate dehydratase, 3-isopropylmalate dehydrogenase and branched-chain amino acid aminotransferase
R81	PEP + PEP + E4P + Glu + NADPH -> Phe + CO2 + AKG + NADP	Vphe	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate mutase, prephenate dehydratase and aromatic amino acid aminotransferase
R82	PEP + PEP + E4P + Glu + NADPH -> Tyr + CO2 + AKG + NADP	Vtyr	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, chorismate

			mutase, prephenate dehydrogenase and aromatic amino acid aminotransferase
R83	Ser + R5P + PEP + E4P + PEP + Gln + NADPH -> Trp + CO2 + G3P + Pyr.c + Glu + NADP	Vtrp	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase, pentafunctional AROM polypeptide, chorismate synthase, anthranilate synthase, anthranilate phosphoribosyltransferase and tryptophan synthase
R84	R5P + C1 + Gln + Asp -> His + AKG + Fum	Vhis	Ribose 5-phosphate isomerase A, ribose-phosphate pyrophosphokinase, ATP phosphoribosyltransferase, phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase, phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase, glutamine amidotransferase, imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, histidinol-phosphate aminotransferase, histidinol-phosphatase and phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase
R85	Thr + Pyr.m + Glu + NADPH -> Ile + CO2 + AKG + NADP	Vile	Threonine dehydratase, acetolactate synthase, ketol-acid reductoisomerase, dihydroxy-acid dehydratase and branched-chain amino acid aminotransferase
R86	Cys + Ser + Gly -> CysSerGly_prot	Vcsgprot	synthèse protéines : pool cys ser et gly
R87	Asp + Asn -> AspAsn_prot	Vaaprot	synthèse protéines : pool asp asn
R88	Phe + Trp -> PheTrp_Prot	Vtptprot	synthèse protéines : pool phe trp
R89	Tyr + His -> TyrHis_Prot	Vthpprot	synthèse protéines : pool tyr his
R90	Glu + Gln -> GluGln_Prot	Vgggprot	synthèse protéines : pool glu gln
R91	Ala + Val -> AlaVal_Prot	Vavprot	synthèse protéines : pool ala val
R92	Arg -> Arg_prot	Vaprot	synthèse protéines : pool arg
R93	Ile -> Ile_prot	Viprot	synthèse protéines : pool ile
R94	Lys -> Lys_prot	Vlprot	synthèse protéines : pool lys
R95	Pro -> Pro_prot	Vpprot	synthèse protéines : pool pro
R96	Thr -> Thr_prot	Vtprot	synthèse protéines : pool thr
R97	Met -> Met_prot	Vmprot	synthèse protéines : pool met
R98	Leu -> Leu_prot	Vleuprot	synthèse protéines : pool leu

Annexe 16 : Calcul des flux métaboliques par FBA : souches JMY3501, JMY5289 et JMY5578.

R1	JMY3501		JMY5289		JMY5578	
	Flux	Flux normalisé	Flux	Flux normalisé	Flux	Flux normalisé
R1	1355,0	100,0	1110,4	100,0	1200,0	100,0
R2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R3	3220,4	237,7	2994,5	269,7	3998,6	333,2
R4	1355,0	100,0	1110,4	100,0	1200,0	100,0
R5	424,9	31,4	555,2	50,0	758,1	63,2
R6	810,3	59,8	795,3	71,6	932,5	77,7
R7	-810,3	-59,8	-795,3	-71,6	-932,5	-77,7
R8	-793,0	-58,5	-784,4	-70,6	-924,9	-77,1
R9	17,3	1,3	10,9	1,0	7,6	0,6
R10	-1781,4	-131,5	-1696,0	-152,7	-1941,7	-161,8
R11	-1718,7	-126,8	-1692,2	-152,4	-1931,9	-161,0
R12	1467,9	108,3	1677,2	151,0	1892,5	157,7
R13	212,0	15,6	183,8	16,6	157,6	13,1
R14	718,1	53,0	371,5	33,5	284,4	23,7
R15	718,1	53,0	371,5	33,5	284,4	23,7
R16	385,4	28,4	240,1	21,6	174,5	14,5
R17	332,7	24,6	131,3	11,8	109,9	9,2
R18	-255,4	-18,8	-123,8	-11,2	-97,1	-8,1
R19	-130,0	-9,6	-116,3	-10,5	-77,4	-6,4
R20	255,4	18,8	123,8	11,2	97,1	8,1
R21	1516,0	111,9	1677,2	151,0	1899,4	158,3
R22	1192,2	88,0	814,5	73,3	802,5	66,9
R23	923,6	68,2	575,2	51,8	534,1	44,5
R24	1591,2	117,4	1583,8	142,6	1889,3	157,4
R25	1591,2	117,4	1583,8	142,6	1889,3	157,4
R26	667,6	49,3	1008,5	90,8	1355,2	112,9
R27	206,2	15,2	721,1	64,9	1035,6	86,3
R28	153,9	11,4	387,6	34,9	754,7	62,9
R29	615,3	45,4	675,0	60,8	1074,3	89,5
R30	652,9	48,2	687,1	61,9	1086,8	90,6
R31	1514,2	111,7	1501,6	135,2	1889,3	157,4
R32	461,4	34,0	287,4	25,9	319,6	26,6
R33	461,4	34,0	287,4	25,9	319,6	26,6
R34	330,9	24,4	0,0	0,0	0,0	0,0
R35	77,0	5,7	82,2	7,4	0,0	0,0
R36	923,6	68,2	575,2	51,8	534,1	44,5
R37	730,9	53,9	527,0	47,5	482,9	40,2
R38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R39	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R41	52,0	3,8	32,9	3,0	22,7	1,9
R42	3,4	0,3	2,8	0,3	2,4	0,2
R43	0,0	0,0	2,0	0,2	1,8	0,2
R44	35,8	2,6	22,3	2,0	15,7	1,3
R45	29,7	2,2	18,9	1,7	10,8	0,9
R46	7,5	0,6	8,2	0,7	0,1	0,0
R47	0,0	0,0	2,6	0,2	5,7	0,5
R48	2,1	0,2	1,0	0,1	3,6	0,3
R49	1,9	0,1	0,8	0,1	0,5	0,0

R50	0,4	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0
R51	12,8	0,9	7,8	0,7	4,6	0,4
R52	3,4	0,3	0,8	0,1	0,6	0,1
R53	0,0	0,0	2,0	0,2	1,8	0,2
R54	4,0	0,3	2,4	0,2	1,3	0,1
R55	22,2	1,6	8,1	0,7	5,0	0,4
R56	7,5	0,6	8,2	0,7	0,1	0,0
R57	0,0	0,0	2,6	0,2	5,7	0,5
R58	0,2	0,0	0,2	0,0	3,1	0,3
R59	1,5	0,1	0,3	0,0	0,4	0,0
R60	0,4	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0
R61	17,3	1,3	10,9	1,0	7,6	0,6
R62	0,0	0,0	4,6	0,4	7,5	0,6
R63	0,0	0,0	4,6	0,4	7,5	0,6
R64	597,7	44,1	413,8	37,3	388,2	32,3
R65	62,7	4,6	3,8	0,3	9,9	0,8
R66	14,6	1,1	3,8	0,3	3,0	0,2
R67	14,6	1,1	3,8	0,3	3,0	0,2
R68	192,7	14,2	48,2	4,3	51,2	4,3
R69	2,7	0,2	16,3	1,5	17,6	1,5
R70	93,7	6,9	71,6	6,4	74,8	6,2
R71	21,9	1,6	209,9	18,9	150,5	12,5
R72	149,7	11,0	3,5	0,3	3,5	0,3
R73	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R74	9,7	0,7	2,6	0,2	2,2	0,2
R75	8,4	0,6	4,6	0,4	6,6	0,6
R76	9,7	0,7	2,6	0,2	2,2	0,2
R77	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R79	6,0	0,4	0,0	0,0	13,0	1,1
R80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R81	48,1	3,5	0,0	0,0	6,9	0,6
R82	29,2	2,2	7,5	0,7	5,9	0,5
R83	48,1	3,5	0,0	0,0	6,9	0,6
R84	29,2	2,2	7,5	0,7	5,9	0,5
R85	149,7	11,0	3,5	0,3	3,5	0,3
R86	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R87	2,7	0,2	16,3	1,5	17,6	1,5
R88	48,1	3,5	0,0	0,0	6,9	0,6
R89	29,2	2,2	7,5	0,7	5,9	0,5
R90	8,0	0,6	59,5	5,4	55,4	4,6
R91	9,7	0,7	2,6	0,2	2,2	0,2
R92	8,4	0,6	4,6	0,4	6,6	0,6
R93	149,7	11,0	3,5	0,3	3,5	0,3
R94	6,0	0,4	0,0	0,0	13,0	1,1
R95	21,9	1,6	209,9	18,9	150,5	12,5
R96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R97	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Les flux normalisés sont alors exprimés en $\mu\text{mol}\cdot 100\mu\text{mol de glucose}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Annexe 17 : Analyse MOMA de la souche de levure *Yarrowia lipolytica* JMY5578 et de ses dérivées.

R	FBA (JMY5578)	JMY578a : R61 +40%	JMY5578b : R61 +40% et R13 -34%	JMY5578c : R61 +40%, R13 -34% et R27 -50%
R1	1200,0	1200,0	1200,0	1200,0
R2	0,0	0,0	0,0	0,0
R3	3998,6	4010,2	4074,9	3984,4
R4	1200,0	1200,0	1200,0	1200,0
R5	758,1	730,9	690,7	679,2
R6	932,5	930,3	944,1	941,6
R7	-932,5	-930,3	-944,1	-941,6
R8	-924,9	-919,7	-928,2	-923,6
R9	7,6	10,6	15,9	18,0
R10	-1941,7	-1944,4	-1989,3	-1977,9
R11	-1931,9	-1938,0	-1979,5	-1959,4
R12	1892,5	1912,1	1940,6	1885,2
R13	157,6	151,6	100,0^c	71,5^c
R14	284,4	317,5	409,3	449,3
R15	284,4	317,5	409,3	449,3
R16	174,5	199,4	253,4	262,4
R17	109,9	118,0	155,9	186,9
R18	-97,1	-106,2	-136,4	-149,8
R19	-77,4	-93,2	-117,0	-112,7
R20	97,1	106,2	136,4	149,8
R21	1899,4	1895,5	1909,6	1836,4
R22	802,5	1935,9	1940,9	2034,3
R23	534,1	1131,8	1211,2	1337,2
R24	1889,3	2459,3	2459,7	2468,0
R25	1889,3	2459,3	2459,7	2468,0
R26	1355,2	1327,5	1248,5	1130,8
R27	1035,6	459,0	427,0	217,3^d
R28	754,7	191,3	198,3	114,2
R29	1074,3	1059,8	1019,7	1027,8
R30	1086,8	1087,2	1068,9	1065,2
R31	1889,3	2365,2	2365,1	2399,8
R32	319,6	868,5	821,4	913,5
R33	319,6	868,5	821,4	913,5
R34	0,0	657,9	644,7	699,8
R35	0,0	94,1	94,6	68,2
R36	534,1	1131,8	1211,2	1337,2
R37	482,9	1067,3	1119,5	1120,8
R38	0,0	17,6	31,0	48,7
R39	0,0	17,6	31,0	48,7
R40	0,0	17,6	31,0	48,7
R41	22,7	31,6	47,4	54,1
R42	2,4	3,3	5,0	7,2
R43	1,8	2,5	3,8	4,2
R44	15,7	21,9	32,9	33,4
R45	10,8	15,1	22,7	23,2
R46	0,1	0,1	0,2	0,4
R47	5,7	8,0	12,0	11,9

R48	3,6	5,0	7,5	6,4
R49	0,5	0,7	1,1	0,1
R50	0,1	0,1	0,2	0,0
R51	4,6	6,4	9,6	13,5
R52	0,6	0,8	1,2	2,9
R53	1,8	2,5	3,8	4,2
R54	1,3	1,8	2,7	3,8
R55	5,0	7,0	10,5	11,0
R56	0,1	0,1	0,2	0,4
R57	5,7	8,0	12,0	11,9
R58	3,1	4,3	6,5	6,3
R59	0,4	0,6	0,9	0,0
R60	0,1	0,1	0,2	0,0
R61	7,6	10,6^a	15,9^b	18^b
R62	7,5	10,5	15,8	16,1
R63	7,5	10,5	15,8	16,1
R64	388,2	377,8	398,8	412,5
R65	9,9	6,5	9,7	18,6
R66	3,0	5,4	9,7	18,6
R67	3,0	5,4	9,7	18,6
R68	51,2	64,5	91,7	216,4
R69	17,6	18,5	21,3	89,5
R70	74,8	92,3	122,5	76,4
R71	150,5	123,5	52,4	24,9
R72	3,5	0,0	0,0	0,0
R73	0,0	0,0	0,0	0,0
R74	2,2	0,0	0,0	0,0
R75	6,6	16,6	29,7	0,4
R76	2,2	0,0	0,0	0,0
R77	0,0	0,0	0,0	0,0
R78	0,0	0,0	0,0	0,0
R79	13,0	0,0	0,0	0,0
R80	0,0	0,0	0,0	0,0
R81	6,9	1,1	0,0	0,0
R82	5,9	10,8	19,5	0,0
R83	6,9	1,1	0,0	0,0
R84	5,9	10,8	19,5	37,1
R85	3,5	0,0	0,0	0,0
R86	0,0	0,0	0,0	0,0
R87	17,6	18,5	21,3	89,5
R88	6,9	1,1	0,0	0,0
R89	5,9	10,8	19,5	37,1
R90	55,4	63,8	73,3	38,9
R91	2,2	0,0	0,0	0,0
R92	6,6	16,6	29,7	0,4
R93	3,5	0,0	0,0	0,0
R94	13,0	0,0	0,0	0,0
R95	150,5	123,5	52,4	24,9
R96	0,0	0,0	0,0	0,0
R97	0,0	0,0	0,0	0,0
R98	0,0	0,0	0,0	0,0

^a: V = +40% ; ^b: V = [+40% ; Inf] ; ^c: V = -34% ; ^d: V = -50%.

Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. R61 en surlignage orange correspond à la réaction de synthèse des TAG.

Abstract

Growing world population and depletion of fossil resources have led to an increasing food and energy demand. While oleaginous plants are mostly cultivated for their fruits or their seeds in food industry, they are also valued in as an alternative to petrochemicals (biolubricant, biofuels). The production of lipids and unusual fatty acids increased the interest for unicellular organisms: yeasts.

The aim of this work is to study two biological models: flax seed (*Linum usitatissimum*), whose oil is made up of 57% omega-3, and yeast *Yarrowia lipolytica*, exploited as a biotechnological chassis. The approach used to understand lipid metabolism is fluxomics. In addition, the development of a predictive model based on isotopic labelling (MFA) or constraint-based one (FBA) allows a dynamic analysis of the metabolism.

The comparative study of three flax lines (with different oil and omega-3 levels) provided a better understanding of the mechanisms leading to lipid accumulation (up to 44.2 g.100 gDW⁻¹). Therefore, we have been able to show that sucrose assimilation and starch remobilization are essential for fatty acid precursors and cofactors synthesis. Strong involvements of cytosolic glycolysis (G3P, acetyl-CoA) and pentose phosphate pathway (NADPH) have been noted, while protein and cell wall synthesis are limiting steps. In addition, PDAT would be a central enzyme for the incorporation of PUFA into TAGs.

The study of three *Yarrowia lipolytica* strains also helped us to better understand yeast metabolism. The assimilation of an alternative carbon source to glucose, glycerol, led to a major metabolic redirection towards gluconeogenesis. The TAG synthesis flux especially uses glycolysis and a part of TCA cycle to convert citrate into acetyl-CoA. Kennedy pathway optimizations (*GPD1* and *DGA2* gene overexpression) allowed a lipid content improvement: +72% compared to a strain optimized for the synthesis of unusual fatty acids (*LROI* gene expression, encoding for a PDAT enzyme). The main competitive pathways are carbohydrate synthesis (glycogen) and citrate secretion (here repressed thanks to slow glucose assimilation). PDAT (*LROI* gene) also led to unusual fatty acid accumulation.

Key Words: Fluxomics, Lipid metabolism, Unusual fatty acids, Oleaginous organisms, Flax seed, *Yarrowia lipolytica*.

Résumé

Une population mondiale croissante et l'épuisement des ressources fossiles a conduit à une augmentation de la demande alimentaire et énergétique. Si les plantes oléagineuses sont majoritairement exploitées pour leurs fruits et leurs graines riches en huiles dans le secteur agroalimentaire, elles sont également valorisées comme alternative aux produits pétrosourcés (biolubrifiants, biocarburants). La production de lipides et d'acides gras inhabituels a rapidement suscité un intérêt envers les organismes unicellulaires : les levures.

L'objectif de ce travail consiste à étudier deux modèles biologiques : la graine de lin (*Linum usitatissimum*), dont l'huile est constituée à 57% d'oméga-3, et la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*, exploitée comme châssis biotechnologique. L'approche utilisée pour appréhender le métabolisme lipidique est la fluxomique. De plus, la conception d'un modèle prédictif reposant sur un marquage isotopique (MFA) ou la contrainte (FBA) permet une analyse dynamique du métabolisme.

L'étude comparative de trois lignées de lin (teneurs en huile et oméga-3 différentes) a permis une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'accumulation des lipides (jusqu'à 44,2 g.100g⁻¹ MS). Ainsi, nous avons pu montrer que l'assimilation du saccharose et la remobilisation de l'amidon sont essentiels à la synthèse des précurseurs et du NADPH nécessaires à la synthèse des AG. Une forte implication de la glycolyse cytosolique et de la voie des pentoses phosphate plastidiale a pu être notée, tandis que la synthèse des protéines et de la paroi cellulaire a été une étape plutôt limitante. De plus, la PDAT semblerait être une enzyme essentielle à l'incorporation d'acides gras polyinsaturés dans les TAG.

L'étude de trois souches de *Yarrowia lipolytica* a également permis d'appréhender le métabolisme de la levure. L'assimilation d'une source de carbone alternative au glucose (glycérol) a entraîné une redirection métabolique majeure vers la néoglucogénèse. Le flux majoritaire pour la synthèse des TAG emprunte la glycolyse et une partie du cycle de Krebs, afin de convertir le citrate en acétyl-CoA. L'optimisation de la voie Kennedy (*GPD1* et *DGA2*) a permis une amélioration du contenu en lipides : +72% par rapport à une souche optimisée pour la synthèse des acides gras inhabituels (expression du gène *LROI*, codant pour une PDAT). Les principales voies compétitives sont la synthèse de glucides de réserve et la sécrétion de citrate, réprimée ici grâce à une assimilation de glucose modérée. La PDAT est là encore impliquée dans l'accumulation des acides gras inhabituels

Mots Clés : Fluxomique, Métabolisme des lipides, Acides gras inhabituels, Organismes oléagineux, Graine de lin, *Yarrowia lipolytica*.