



HAL
open science

Biologie intégrative du métabolisme lipidique chez les levures du genre *Blastobotrys*

Daniel Ruben Akiola Sanya

► **To cite this version:**

Daniel Ruben Akiola Sanya. Biologie intégrative du métabolisme lipidique chez les levures du genre *Blastobotrys*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLA002 . tel-02130480

HAL Id: tel-02130480

<https://theses.hal.science/tel-02130480>

Submitted on 15 May 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.

Biologie intégrative du métabolisme lipidique chez les levures du genre *Blastobotrys*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech, l'Institut des sciences et industries du vivant et
de l'environnement

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement
et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Biotechnologies

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 22 janvier 2019, par

Daniel Ruben Akiola SANYA

Composition du Jury :

Marie-Joëlle Virolle Professeur, Université Paris-Sud, (I2BC, Orsay)	Présidente du Jury
Fayza Daboussi Directeur de Recherche, INRA (LISBP, Toulouse)	Rapporteur
Jean-Luc Legras Ingénieur de Recherche INRA (SPO, Montpellier)	Rapporteur
Alexandre Chamas Docteur, INRA (SPO, Montpellier)	Examineur
Cécile Neuvéglise Directeur de Recherche, INRA (Micalis, Jouy-en-Josas)	Directeur de thèse
Anne-Marie Crutz-Le Coq Chargée de Recherche, INRA (Micalis, Jouy-en-Josas)	Invitée

Dédicace

Avec amour et profond respect je dédie ce précieux travail à mes parents.
Vous avez été toujours là aux moments où j'ai le plus besoin de vous.
Que ce travail soit la récompense des sacrifices que vous avez consentis
tout au long de ma formation académique ainsi que le fruit de votre soutien infaillible.

Remerciements

Au terme de cette thèse, je tiens en tout premier lieu à remercier mon superviseur, Cécile Neuvéglise, pour son encadrement et pour la confiance qu'elle m'a témoignée. Je suis aussi reconnaissant du modèle de rigueur et de passion communicative pour la science dont elle a fait preuve à mon endroit.

Mes remerciements vont à Anne-Marie qui a accepté de continuer à encadrer cette thèse et pour sa volonté constante de me rappeler les bonnes pratiques de microbiologie.

J'exprime aussi ma gratitude à Djamilia Onesime pour soutien permanent, ces conseils, le temps qu'elle accorde à chaque discussion portant sur mes expérimentations et pour les commandes de réactifs de laboratoire dont j'ai besoin.

Je profite aussi de l'occasion pour remercier, Stéphane THOMAS, qui m'a ouvert les yeux sur certains reflexes que j'avais et qui pouvaient nuire à mes expérimentations et aussi pour son enthousiasme infatigable, son enseignement patient dans l'utilisation de l'HPLC et de la GC indispensables tout au long de mes travaux.

Mes remerciements vont à ceux qui m'ont permis de réaliser mes travaux : Gotthard KUNZE et à son équipe de l'IPK pour m'avoir fourni les plasmides pBS-SA et pBS-SS ainsi que les transformants de *Blastobotrys raffinosisfermentans* personnalisés tout au long de mes recherches. Les postdoctoraux de l'équipe de Jean-Marc NICAUD, ont aussi été d'une aide précieuse pour les aspects biologie moléculaire de expérimentations.

Je remercie tout particulièrement le directeur de l'école doctorale ABIES AgroParisTech, pour accepter mon admission à AgroParisTech et avoir fait partie de mon comité de thèse. Je lui sais aussi gré de ces conseils durant les différentes formations visant à développer les talents d'un bon chercheur.

Je remercie aussi Alexandre Chamas pour m'avoir fourni le protocole de préparation et de transformation des cellules compétentes de levures utilisé dans lors de ma thèse.

Par ailleurs, sans les suggestions, les encouragements, le soutien et l'amitié de beaucoup de ceux et celles que j'ai côtoyés durant mes travaux de recherches, je ne serais pas allé jusqu'au bout de ma thèse. Qu'ils trouvent tous ici l'expression de ma profonde gratitude. Je ne pourrais pas tous les remercier convenablement, mais que chacun sache combien je lui suis redevable.

Je tiens à exprimer tout ma gratitude à la Banque Islamique de Développement pour avoir financé la réalisation de ma thèse en France.

Merci à ma famille, immédiate et lointaine, pour son soutien indéfectible et ses prières incessantes tout au long de ma thèse.

Liste des publications et communications

Communications

Sanya Daniel. Mon projet professionnel en 180 secondes. Journées ABIES, Paris, 22 février 2017 (communication orale)

Sanya Daniel. Production de lipides par une levure oléagineuse. Ma thèse en 180 secondes, Doc'J, Jouy-en-Josas, 2 mars 2017 (communication orale)

Sanya Daniel, Thomas Stéphane, Fouchard Florian, Neuvéglise Cécile, Crutz-LeCoq Anne-Marie. Lipid production in *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*. **13th Yeast Lipid Conference**, Paris (France), 17-19 Mai 2017 (poster).

Sanya Daniel. Lipid production in *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*. Doc-Micalis, Jouy-en-Josas, 2 juin 2017 (communication orale)

Publications

Sanya, D. R. A., & Amadji, L. G. (2018). Application of cow manure and inorganic fertilizer in one season and carryover of effects in sesame on tropical ferruginous soils. *African Journal of Agricultural Research*, 13(41), 2207-2223.

Stéphane Thomas, Daniel R. A. Sanya, Florian Fouchard, Huu-Vang Nguyen, Gotthard Kunze, Cécile Neuvéglise, Anne-Marie Crutz-Le Coq. *Blastobotrys adenivorans* and *Blastobotrys raffinosifermentans*, two sibling oleaginous yeast species, which accumulate lipids at elevated temperatures and from biomass-derived sugars. Article soumis à *Biotechnology for Biofuels*

Daniel Ruben Akiola Sanya, Djamila Onésime, Gotthard Kunze, Cécile Neuvéglise, Anne-Marie Crutz-Le Coq. Overexpression of native DGA1 and DGA2 genes in the oleaginous yeast *Blastobotrys raffinosifermentans*. Article en préparation

Sommaire

Dédicace.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des publications et communications	iv
Liste des abréviations.....	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	4
1. Les levures oléagineuses.....	4
1.1. Définition et exemples de levures oléagineuses	4
1.2. Applications biotechnologiques liées à l'exploitation des levures oléagineuses.....	6
1.2.1. Exemples de filières industrielles et de voies de recherche.....	6
1.2.2. Critères de sélection des levures d'intérêt	12
1.2.3. L'ingénierie génétique pour modifier le métabolisme	16
2. Le métabolisme des lipides chez les levures	20
2.1. Les lipides dans la cellule.....	20
2.1.1. Définitions	20
2.1.2. Les acides gras.....	21
2.1.3. Les lipides membranaires	22
2.1.4. Les lipides non-polaires ou lipides neutres.....	25
2.1.5. Le cycle de vie des lipides neutres	26
2.2. Les voies de biosynthèses et stockage des lipides	28
2.2.1. Biosynthèse des acides gras.....	28
2.2.2. Synthèse des TAG	33
2.2.3. Biogenèse des corps lipidiques.....	35
2.2.4. Rôle des acyltransférases.....	38
2.2.4.1. Les familles de ces enzymes et les gènes connus chez les levures.....	38
2.2.4.2. Effets connus de la surexpression de DGA1 et/ou DGA2.....	40
2.3. La remobilisation des lipides : TGL et β -oxydation.....	42
2.3.1. Triacylglycérol lipases.....	42
2.3.2. La dégradation par β -oxydation.....	43
2.4. Conditions d'induction de la production de lipides.....	45

2.5. Variation de la production de lipides en fonction de la température.....	47
2.5.1. Stratégies d'adaptation des eucaryotes aux variations de température.....	47
2.5.2 Effet de la température sur la quantité de lipides produits chez les levures oléagineuses....	50
3. <i>Blastobotrys adenivorans</i>	51
3.1. Taxonomie et souches connues	51
3.2. Physiologie	53
3.3. Une levure connue pour ses applications en biotechnologie.....	54
3.4. Outils génétiques	55
Objectifs de la thèse.....	59
Matériels et méthodes	61
1. Matériels biologiques	61
1.1. Souches de levures et bactéries	61
1.2. Vecteurs.....	61
2. Milieux de culture.....	63
2.1. Milieu de culture Luria Bertani de souche <i>E. coli</i> (LB)	63
2.2. Milieu sélectif pour les transformants d' <i>E. coli</i>	63
2.3. Milieux de culture utilisés pour les levures du genre <i>Blastobotrys</i>	63
3. Matériel physique	64
4. Méthodes d'évaluation du caractère oléagineux et de surexpression	65
4.1. Dosage du contenu en lipides	65
4.1.1. Culture et préparation des échantillons	65
4.1.2. Analyse du contenu en lipides.....	66
4.1.3. Analyse des acides organiques présents dans le surnageant de culture.....	66
4.1.4. Analyse en microscopie.....	66
5. Méthodes génétiques et de biologie moléculaire	67
5.1. Tests de croissance et d'auxotrophie.....	67
5.2. Procédures d'extraction de l'ADN génomique des levures du genre <i>Blastobotrys</i>	67
5.3. Procédures d'extraction de l'ADN plasmidique d' <i>Escherichia coli</i>	68
5.4. Estimation de la concentration de l'ADN	68
5.5. Les ligatures réalisées pour concevoir les modules d'expressions.....	68
5.6. Préparation et transformation des cellules compétentes d' <i>Escherichia coli</i>	69
5.7. Préparation et transformation de cellules compétentes de <i>B. raffinosi-fermentans</i>	70
5.8. Production de cassettes de surexpression de deux gènes natifs de <i>B. raffinosi-fermentans</i> , <i>DGA1</i> et <i>DGA2</i>	72

5.9. Tests de surexpression de DGA1 et DGA2 dans <i>B. raffinosifermentans</i>	72
5.10. Extraction d'ARN.....	76
5.11. Reverse transcription des ARNs pour obtenir des cDNA	76
5.12. PCR quantitative.....	76
5.13. Analyse des données de PCR quantitative	77
Résultats : Chapitre 1.....	79
1. Introduction	79
2. Article soumis.....	80
3. Synthèse des résultats	119
Résultats : Chapitre 2.....	121
1. Introduction et objectifs.....	121
2. Matériel et méthodes	121
2.1. Recherche d'homologues des gènes du métabolisme des lipides.....	121
2.2. Stratégies de conception du schéma métabolique	122
2.3. Description des logiciels de prédictions utilisés.....	123
3. Résultats	125
3.1. Les familles de gènes	125
3.2. L'adressage des protéines.....	129
3.3. Le schéma métabolique par comparaison à celui de <i>Yarrowia lipolytica</i>	134
4. Discussion	134
5. Conclusion.....	136
Résultats : Chapitre 3.....	137
1. Introduction	137
2. Stratégies utilisées	137
3. Article en préparation.....	138
4. Synthèse des résultats.....	176
Discussion générale.....	177
Conclusions et perspectives	183
Références bibliographiques.....	185

Liste des abréviations

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACL	ATP-Citrate Lyase
ACP	Acyl carrier proteins
ADN	Deoxyribonucleic acid
ALA	Alpha Linolenic Acid
ARA	Arachidonic acid
ARN	Ribonucleic acid
CDP-DAG	Cytidine Diphosphate Diacylglycerol
DAG	Diacylglycerols
DGA1	Diacylglycerol acyltransferase type 1
DGA2	Diacylglycerol acyltransferase type 2
DGAT	Diacylglycerol acetyltransferase
DHA	Docosahexaenoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FA	Fatty acids
FAS	Fatty acid synthase
GC	Gas Chromatography
hph	hygromycin B phosphotransferase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
LD	Lipid droplets
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PA	Phosphatidic acid
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RT-PCR	Real Time PCR
SE	Steryl Esters
TAG	Triacylglycerols
TEF	Translation Elongation Factor
TGL	TAG lipases

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position taxonomique de quelques levures oléagineuses	5
Tableau 2 : Applications industrielles de levures oléagineuses	7
Tableau 3 : Acides gras polyinsaturés produits avec les levures oléagineuses et utilisés comme suppléments alimentaires	9
Tableau 4 : Molécules dérivées d'acides gras et autres molécules produites par des levures oléagineuses	10
Tableau 5 : Exemples de production de lipides en bioréacteurs utilisant différents substrats et mode de culture	15
Tableau 6 : Impact de l'ingénierie métabolique dans <i>Y. lipolytica</i> et <i>R. toruloides</i> sur la production de lipides.	17
Tableau 7 : Composition en acides gras de quelques levures et champignons oléagineux	22
Tableau 8 : Classification taxonomique de l'espèce <i>B. adenivorans</i>	52
Tableau 9 : Liste non-exhaustive des promoteurs connus dans la littérature pour les levures	58
Tableau 10 : Souches de levure utilisées	61
Tableau 11 : Exemple de composition du milieu d'accumulation des lipides	64
Tableau 12 : Solutions utilisées pour préparer et transformer des cellules compétentes	71
Tableau 13 : Programme PCR d'amplification d'ADN génomique utilisant la polymérase Pyrobest	72
Tableau 14 : Programme PCR d'identification de DGA1 et DGA2	73
Tableau 15 : Liste des oligonucléotides utilisés dans l'ensemble de nos tests	75
Tableau 16 : Programmation des cycles de qPCR	77
Tableau 17 : Programmes utilisés pour la prédiction de l'adressage des protéines	123
Tableau 18 : Comparaison du nombre de membres dans les familles de gènes chez <i>Y. lipolytica</i> E150 et <i>B. raffinosifermantans</i> LS3	125
Tableau 19 : Adressages et prédictions finales de la localisation subcellulaire des gènes du métabolisme des lipides de <i>B. raffinosifermantans</i>	131

Liste des figures

Figure 1 : Conversion de l'acide ricinoléique (un acide gras hydroxylé) en γ -décalactone par raccourcissement de la chaîne carbonée et lactonisation	8
Figure 2 : Exemples de nomenclature de molécules d'acides gras avec leur extrémité méthyle et carboxylique.	21
Figure 3 : Céramide, structure de base des sphingolipides	23
Figure 4 : Structure d'un phospholipide.....	23
Figure 5 : Voies métaboliques reliant les lipides neutres au métabolisme des phospholipides	25
Figure 6 : Schéma synthétique du métabolisme des lipides	26
Figure 7 : Implications de la voie du pentose phosphate dans la synthèse des acides gras	29
Figure 8 : Synthèse des acides gras dans le complexe FAS	30
Figure 9 : Elongation et désaturation des acides gras	33
Figure 10 : Représentation chimique de la synthèse des TAGs dans la voie de Kennedy.....	35
Figure 11 : Structure d'un corps lipidique	36
Figure 12 : Modèle simplifié de la formation et de la croissance des LDs	37
Figure 13 : Redirection des DAGs des corps lipidiques vers le réticulum endoplasmique pour la synthèse des phospholipides.....	42
Figure 14 : La β -oxydation des acides gras.....	44
Figure 15 : Courbe standard d'accumulation des lipides par les organismes oléagineux	45
Figure 16 : Position phylogénétique de <i>B. raffinosifermentans</i> au sein des ascomycètes	53
Figure 17 : Morphologie de la souche LS3 soumise à trois niveaux de températures	55
Figure 18 : Le système Xplor®2	57
Figure 19 : Composantes fonctionnelles du plasmide Xplor2	62
Figure 20 : Plasmide portant les modules d'expression utilisés pour le clonage de gènes d'intérêt	62
Figure 21 : Les organelles d'une cellule eucaryote	124
Figure 22 : Schéma de la β -oxydation du peroxyosome	129
Figure 23 : Schéma métabolique de <i>B. raffinosifermentans</i>	135

Introduction générale

Introduction générale

Les lipides sont des composés hydrophobes comprenant une variété de molécules dont les acides gras et leurs esters qui constituent principalement les graisses et les huiles et qu'on retrouve dans les phospholipides constitutifs des membranes cellulaires (Passoth, 2017). Ils sont essentiels à n'importe quel organisme. La synthèse des acides gras se fait à partir de l'acétyl-CoA, qui est converti en lipides par une diversité de réactions biochimiques complexes, incluant également le facteur redox nécessaire aux réactions de réduction fourni par le NADPH. Les lipides microbiens ont suscité un intérêt considérable ces dernières années en raison de leur caractère inoffensif, de l'étude des dysfonctionnements métaboliques chez l'homme, et des possibilités de synthèse à grande échelle de molécules à haute valeur ajoutée comprenant des acides gras ou des dérivés. Ils présentent un potentiel valorisable en pharmacie, alimentation, biocarburants, cosmétiques, santé et industrie. Les procédés industriels centrés sur les lipides de levures oléagineuses en vue d'une production durable de carburants d'origine biologique sont intensément étudiés. Les lipides des levures oléagineuses contiennent principalement l'acide stéarique (C18:0), oléique (C18:1), linoléique (18:2) ainsi que de l'acide palmitique (16:0). La prédominance de l'acide oléique dans le profil des lipides des levures oléagineuses est aussi rapportée dans celui des huiles végétales. Ainsi, les lipides microbiens constituent des matières premières utilisables pour la production de biocarburants au même titre que les huiles végétales (Xin et al., 2009).

A ce jour, l'étude du caractère oléagineux des levures est limitée à quelques espèces identifiées principalement parmi les genres *Yarrowia*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* et *Trichosporon* (Sitepu et al., 2012 ; Leiva-Candia et al., 2014). *Yarrowia lipolytica* a acquis une position de 'modèle' de levure oléagineuse de par sa caractérisation de longue date (Barth et Gaillardin, 1997), sa capacité à assimiler efficacement des substrats hydrophobes et parce qu'elle possède les outils génétiques les plus avancés (Madzak, 2018). Toutefois, sa capacité à utiliser naturellement des pentoses ou certains dimères de glucose (abondants dans les hydrolysats de lignocellulose, résidus agricoles et forestiers) est limitée. Des criblages de nouvelles espèces pour identifier de nouvelles souches de levures oléagineuses sont en cours (Viñarta et al., 2016). Ces criblages sont orientés vers l'identification d'espèces oléagineuses naturellement aptes à utiliser des substrats peu coûteux et offrant des conditions de réduction des coûts de production sur divers plans.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux espèces *Blastobotrys adenivorans* et *Blastobotrys raffinosisfermentans*. Bien que présentant de nombreux avantages pour des

procédés biotechnologiques, leur étude et le développement de leurs applications sont le fait de quelques laboratoires seulement, dont celui de G. Kunze en Allemagne. Ces espèces sont connues pour leur capacité à croître sur des substrats divers et parfois inhabituels pour les levures comme l'adénine (d'où le nom *adeninivorans*). Elles possèdent également une caractéristique assez peu répandue chez les levures et intéressante d'un point de vue biotechnologique, leur thermotolérance. D'un point de vue génétique, elles sont transformables et disposent d'outils d'ingénierie génétique principalement développés au sein du laboratoire de G. Kunze.

Le génome de la souche LS3 de *B. raffinosifermentans*, récemment séquencé (Kunze et al., 2014), révèle sa relative proximité phylogénétique avec *Y. lipolytica*. En revanche, le caractère oléagineux de l'espèce n'avait pas été révélé. L'identification dans nos études de la présence de corps lipidiques dans les cellules et, dans le génome, d'une enzyme caractéristique des levures oléagineuses, l'ATP citrate lyase (Boulton et al., 1981), font de cette levure un organisme prometteur dans la diversification des levures utilisées pour la production de lipides. Le génome assez compact et de petite taille (environ 6000 gènes dans à peine 12 Mb), avec moins de familles multigéniques que celui de *Y. lipolytica*, offre la possibilité d'une approche de biologie des systèmes destinée à appréhender le fonctionnement des voies métaboliques de production de lipides. La compréhension de la fonction des enzymes de biosynthèse des acides gras chez cette levure, offre la possibilité de réorienter certaines voies d'intérêt vers une plus grande production de lipides.

C'est dans ce contexte de recherche d'espèces alternatives de levures oléagineuses que mon travail de thèse s'est inscrit. Nos objectifs visaient à définir et caractériser un nouveau modèle métabolique pour la production de lipides, complémentaire de celui de *Y. lipolytica*.

Après une introduction bibliographique en trois parties sur les levures oléagineuses et leurs applications, le métabolisme des lipides et les caractéristiques des deux espèces de *Blastobotrys*, je décline les objectifs de mon travail de thèse. Les résultats sont organisés en trois chapitres. Dans le premier chapitre, nous abordons l'analyse des traits oléagineux de *B. adeninivorans* et *B. raffinosifermentans* en relation avec différents substrats carbonés. Après, nous analysons l'effet de la température sur le profil des acides gras et sur la production totale de lipides. Le deuxième chapitre porte sur la reconstruction du métabolisme des lipides de la souche LS3 tandis que le troisième chapitre met en lumière les résultats de surexpression de deux gènes du métabolisme des lipides, *DGA1* et *DGA2*, connus pour intervenir dans l'étape finale de la conversion des diacylglycérols en triacylglycérols. Pour finir, l'ensemble des résultats acquis

au cours de ma thèse sont discutés dans une optique d'amélioration de la production de lipides afin de promouvoir *Blastobotrys* en tant que nouveau modèle oléagineux d'intérêt industriel.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Les levures oléagineuses

1.1. Définition et exemples de levures oléagineuses

Les levures oléagineuses sont des levures capables d'accumuler plus de 20 % de lipides dans leur biomasse sèche (Beopoulos et Nicaud, 2012). En 2011, près de 1500 espèces de levures ascomycètes et basidiomycètes appartenant à 149 genres étaient décrites et pour la plupart répertoriées dans la 5^{ème} édition du livre « The Yeasts - A taxonomic study » (Kurtzman et Boekout, 2011). Parmi ce grand nombre d'espèces, moins de 30 espèces sont connues pour leur caractère oléagineux (Qin et al., 2017). La position taxonomique de certaines de ces espèces est décrite dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Les levures oléagineuses étant attractives pour la production de lipides ou de dérivés qui couvrent de multiples domaines d'application, le criblage d'espèces à caractère oléagineux s'est développé (Viñarta et al., 2016) et le nombre connu de ces espèces est en constante augmentation.

Les levures oléagineuses les plus connues à l'heure actuelle sont principalement réparties dans les genres basidiomycètes *Cryptococcus*, *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, et *Trichosporon* et dans les ascomycètes *Yarrowia* et *Lipomyces* (Ageitos et al., 2011). Le genre *Yarrowia* regroupe des levures hemiascomycètes dimorphiques, appartenant à l'ordre des *Saccharomycétales* et capables de dégrader des substrats hydrophobes (Bankar et al., 2009, Michely et al., 2013). On les retrouve dans les environnements pollués par les hydrocarbures, dans les aliments comme le fromage, le yaourt, la viande et dans des produits de volaille. Certes, de façon naturelle, *Y. lipolytica* produit rarement plus de 20% de lipides sur du substrat glucose (Papanikolaou et al., 2006), mais cette production peut être supérieure à 50% (culture Fed-batch) ou être au-delà de 80% après manipulations génétiques (Dulermo et Nicaud, 2011). Les espèces du genre *Lipomyces* (van der Walt, 1992) sont identifiées dans le sol et retrouvées partout dans le monde. Les levures du genre *Cryptococcus* sont largement distribuées dans l'environnement naturel. Si la plupart d'entre elles mènent une vie non-symbiotique, certaines comme *C. curvatus* sont opportunistes (Findley et al., 2009). Dans le genre *Cryptococcus*, *C. curvatus* (Seo et al., 2014) accumule des lipides au-delà de 60 à 70% de son poids sec. Dans les genres *Rhodospodium* et *Rhodotorula*, certaines souches disposent d'un potentiel de stockage de lipides au-delà de 60% (Amaretti et al., 2010).

Tableau 1 : Position taxonomique de quelques levures oléagineuses

Phylum	Ordre	Genre	Lipides (%DCW)	Références
Ascomycota	Saccharomycétales	<i>Candida</i>	2%-27%	Chatzifragkou et al. (2011)
		<i>Yarrowia</i>	43%	Papanikolaou et Aggelis, 2002 ; Chatzifragkou et al. (2011)
Basidiomycota	Sporidiales	<i>Lipomyces</i>	40%-77,8%	McElroy et Stewart (1967); Oguri et al. (2012)
		<i>Rhodotorula</i>	22%-52%	Zhao et al. (2010); Chatzifragkou et al. (2011)
	Sporidiobolales	<i>Sporobolomyces</i>	30%-50%	Matsui et al. (2011)
		<i>Rhodospidium</i>	15%-37%	Sitepu et al, 2012,2013
	Filobasidiales	<i>Hannaella</i>	25%	Sitepu et al. (2013)
	Tremellales	<i>Cryptococcus</i>	33%-78%	El-Fadaly et al. (2009) ; Chi et al. (2011)
	Trichosporonales	<i>Trichosporon</i>	22,39%-64,50%	Franklin et al. (2011) ; Gujjari et al. (2011)
Leucosporidiales	<i>Leucosporidiella</i>	49%-62%	Rossi et al. (2009) ; Sitepu et al. (2013)	
	Ustilaginales	<i>Moniliella</i>	42%	Kitcha et Cheirsilp (2011)
Mucoromycota	Mucorales	<i>Cunninghamella</i>	21%-78%	Gema et al. (2002) ; Fakas et al. (2009) ; Chatzifragkou et al. (2011)
		<i>Thamnidium</i>	43%	Chatzifragkou et al. (2011)
		<i>Zygorhynchus</i>	42%	Chatzifragkou et al. (2011)
	Mortierellales	<i>Mortierella</i>	5-74%	Fakas et al. (2009), Chatzifragkou et al. (2010) Gao et al. (2013) ; Stressler et al. (2013)
				Zeng et al. (2013)

1.2. Applications biotechnologiques liées à l'exploitation des levures oléagineuses

Le métabolisme lipidique microbien peut donner naissance à divers molécules, utiles dans un vaste champ d'applications. Ces molécules sont des acides gras avec un nombre variable d'atomes de carbone et d'insaturation qui peuvent être éventuellement hydroxylés et méthylés, des huiles, ou diverses molécules de structure apparentées aux lipides. Tous ces composés peuvent le cas échéant faire l'objet de modifications obtenues soit par voie d'ingénierie métabolique soit ultérieurement à la production par les levures (lactonisation par exemple).

D'autre part, certains acides organiques, intermédiaires métaboliques produits par le cycle de Krebs, et notamment l'acide citrique précurseur de la synthèse d'acide gras, sont bien connus pour être abondamment sécrétés par certaines levures oléagineuses dans certaines conditions.

Enfin certaines enzymes du métabolisme lipidique microbien sont elles-mêmes exploitées en tant que telles.

1.2.1. Exemples de filières industrielles et de voies de recherche

Différentes molécules produites par les levures oléagineuses peuvent être utilisées dans les domaines tels que l'alimentation, la pharmacie, la cosmétique, la santé et l'industrie. Il est à noter qu'un nombre assez limité de molécules produites par les levures oléagineuses sont réellement disponibles sur le marché. A l'heure actuelle, pour des raisons de rentabilité économique, beaucoup de projets de recherche portent surtout sur la capacité à générer des produits à haute valeur ajoutée (et à plus faible volume), plutôt que sur la production à fort tonnage de produits de plus faible valeur.

Plusieurs exemples de produits commercialisés en exploitant des levures oléagineuses sont rassemblés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Applications industrielles de levures oléagineuses

Compagnies	Levure	Objectif de production	Statut	Applications	Références
^a DSM et DuPont	<i>Y. lipolytica</i>	Production de caroténoïdes	^b PR	Alimentaire (Colorant naturel ; Agent stabilisateur d'aliments)	Bailey et al., 2006, 2008 Sharpe et al. (2008)
DuPont (USA)	<i>Y. lipolytica</i>	Caroténoïdes	PR	Alimentaire	Sharpe et al. (2008)
		γ-Décalactone	PR	Alimentaire (Saveur de pêche)	Garcia et al. (2009)
		Lipase	PR	Process alimentaire, Détergent, Bioremédiation, Eaux usées, Saveurs	Bialecka-Florjanczyk et al., 2012; Johnson et Echavarri-Erasun (2011)
		NewHarvest™ Saumons Verlasso®	^c CM CM	Alimentaire (Huile enrichie en ^d EPA) Elevés avec la biomasse de YL	Xue et al. (2013) Zhu et Jackson (2015)
Skotan SA (Pologne)	<i>Y. lipolytica</i>	Levure fourragère	CM	Alimentation	Rywinska et al. (2013)
		pré-et-probiotique	CM	humaine/animale	
Pfizer & Co. (USA)	<i>Y. lipolytica</i>	Acide citrique	PR	Alimentaire (Additif alimentaire, contre détérioration oxydative)	Groenewald et al. (2014)
Baolingbao Biology Co., Ltd. (Chine)	<i>Y. lipolytica</i>	Produire de l'erythritol	PR	Alimentaire	Rywinska et al. (2013)
Genex corporation (USA)	<i>Rhodotorula rubra</i>	L-Phénylalanine ammonia-lyase	CM	Pharmacie	Pscheidt et Glieder (2008)
Toray Industries Inc. (Japon)	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Lactamase (EC 3.5.2.11)	CM	Industrie	Pscheidt et Glieder (2008)
Mayoly Spindler (France)	<i>Y. lipolytica</i>	Lipase LIP2	CM	Traitement en pharmacie (Pancréatique chronique)	Leblond et al. (2012)
Oxyrane (Start-up) (Belgique & UK)	<i>Y. lipolytica</i>	Enzymes lysosomales (Riche en ^e M-6-P)	PR	Pharmacie (Maladie de stockage humaine)	Geysens et Vervecken (2011) Ryckaert et Lerondel (2011)
Artechno (Belgique)	<i>Y. lipolytica</i>	Lipases de souches natives	CM	Environnement (Traitement d'eaux usées riches en lipides)	Bordes et al. (2011)
Novogy Inc. (USA)	<i>Y. lipolytica</i> et Levures Oléagineuses	Molécules d'intérêt pour carburants, lubrifiants produits chimiques	PR	Industrie	Friedlander et al. (2016)

^aPays-Bas, ^bPR : Projet de recherche, ^cCM : commercialisé, ^dAcide Eicosapentaénoïque, ^eMannose-6-Phosphate.

Le domaine alimentaire est un pourvoyeur de débouchés qui a suscité et suscite encore nombre de recherches. C'est notamment le cas des arômes avec l'utilisation de *Y. lipolytica* pour la conversion industrielle (Schrader et al. 2004) de l'acide ricinoléique en γ -décylactone (Fig. 1), un composé aromatique à la saveur de pêche trouvé naturellement dans les fruits et aliments fermentés, et qui bénéficie donc de l'appellation d'arôme naturel.

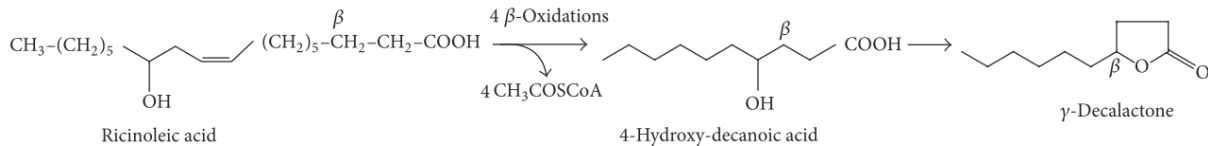


Figure 1 : Conversion de l'acide ricinoléique (un acide gras hydroxylé) en γ -décylactone par raccourcissement de la chaîne carbonée et lactonisation

Source : Gonçalves et al. (2014)

Les acides gras polyinsaturés (PUFA) attirent l'intérêt comme suppléments alimentaires et sont considérés comme à haute valeur ajoutée (Tableau 3). Ils sont connus pour avoir des effets bénéfiques multiples sur la santé humaine tels que la réduction des risques de crise cardiaque. Ils interviennent aussi dans le développement et l'amélioration des fonctions du cerveau ou celles rétiniennes et dans la fluidité membranaire (Uemura, 2012 ; Opekarová et Tanner, 2003). Comme ils sont très minoritaires voire inexistant dans la composition des lipides produits par la plupart des levures, de nombreux efforts actuels cherchent à en augmenter la production. Salunke et al. (2015) rapportent, par exemple, que la levure *L. starkeyi* produisait naturellement 56,03 mg/L de DHA avec 71,4 mg/L d'EPA et 42,2 mg/L d'ALA, mais après une modification génétique la production est passée à 1080 mg/L de DHA, 74,28 mg/L d'EPA et 126,72 mg/L d'ALA. La levure oléagineuse *Y. lipolytica* est aussi utilisée pour produire des acides gras polyinsaturés ω -3 (Xie et al., 2015), ω -6 (Liu et al., 2017) et acide docosahexaénoïque, en combinant l'activité des désaturases et élongases de *Mortierella alpina* et *Fusarium moniliforme* à l'inhibition des activités des peroxyosomes (Xue et al., 2013).

Tableau 3 : Acides gras polyinsaturés produits avec les levures oléagineuses et utilisés comme suppléments alimentaires

Noms	Longueur de chaîne	Acronyme
Acide α -linoléinique	C18:3 (ω 3)	ALA
Acide γ -linoléinique	C18:3 (ω 6)	GLA
Acide arachidonique	C20:4 (ω 6)	ARA
Acide eicosapentaénoïque	C20:5 (ω 3)	EPA
Acide docosahexaénoïque	C20:6 (ω 3)	DHA
Acide docosapentaénoïque	C22:5 (ω 3)	DPA

Y. lipolytica mais aussi *L. starkeyi* ou les levures du genre *Rhodotorula* ont fait l'objet de recherche et d'optimisation pour produire divers dérivés d'acides gras (alcools gras) ou des molécules telles que les terpenoïdes (β -carotène, lycopène) et les acides organiques (acide citrique, acide succinique). Certains de ces produits sont à haute valeur ajoutée ou pour lesquels la recherche est récente, ce qui explique la relative faiblesse de certains titres obtenus, de l'ordre de quelques dizaines de mg/L. Le Tableau 4 regroupe de récents exemples concernant l'obtention réussie de dérivés d'acides gras et produits non-dérivés d'acides gras.

Les alcools d'acides gras et les esters d'éthyle d'acides gras présentent un intérêt particulier en oléochimie, dans la production de surfactants, lubrifiants, revêtements de surface, peintures, plastiques et cosmétiques. McWilliams et al. (2017) rapportent que le marché mondial des acides gras naturels devrait atteindre 16,2 milliards de dollars d'ici 2021, contre 12,4 milliards de dollars en 2016 avec un taux de croissance annuel de 5,6%. Celui des produits dérivés devrait aussi atteindre 8,5 milliards de dollars d'ici 2021, contre 6,2 milliards de dollars en 2016 avec un taux de croissance annuel moyen de 6,8% (McWilliams, 2017).

Tableau 4 : Molécules dérivées d'acides gras et autres molécules produites par des levures oléagineuses

Molécules dérivées d'acides gras	Exemple	Organisme	Références
Esters d'éthyl d'acides gras	Mélange d'esters d'éthyl d'acide palmitique, d'acide palmitoléique, d'acide stéarique, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide arachidinique	<i>Y. lipolytica</i>	Xu et al. (2016)
Alcool d'acides gras	Hexadécanol	<i>Y. lipolytica</i>	Wang et al. (2016a)
	Hexadécanol et octadécanol	<i>L. starkeyi</i>	Wang et al. (2016b)
	Hexadécanol et octadécanol	<i>Y. lipolytica</i>	Wang et al. (2016b)
	Alcool stéarique, alcool palmitique et alcool oléique	<i>Y. lipolytica</i>	Xu et al. (2016)
	Alcool de stéaryl, alcool de cétyl	<i>R. toruloides</i>	Fillet et al. (2015)
PUFA	Acide γ -linoléique	<i>Y. lipolytica</i>	Sun et al. (2017)
	Acide Linoléique	<i>R. toruloides</i>	Wang et al. (2016c)
	Acide ω -3 Eicosapentaénoïque	<i>L. starkeyi</i>	Salunke et al. (2015)
Poly 3-hydroxybutyrate (PHB)		<i>Y. lipolytica</i>	Li Z.J. et al. (2016)
Terpenoides	α -Farnésène	<i>Y. lipolytica</i>	Yang et al. (2016)
	Limonène	<i>Y. lipolytica</i>	Cao et al. (2016)
	Campestrol	<i>Y. lipolytica</i>	Zhang et al. (2017)
	β -carotène	<i>Y. lipolytica</i>	Gao et al. (2017)
	Caroténoïdes	<i>R. toruloides</i>	Lee et al. (2016)
Molécules non-dérivées d'acides gras			
Acides organiques	Acides citriques	<i>Y. lipolytica</i>	Fu et al. (2016)
	Acide α -cétoglutarique	<i>Y. lipolytica</i>	Guo et al. (2016)
	Acide succinique	<i>Y. lipolytica</i>	Gao C. et al. (2016)

Par ailleurs, l'acide citrique, l'acide organique le plus produit en industrie par voie microbienne (Cavallo et al., 2017), est utilisé dans le domaine alimentaire comme additif contre la détérioration oxydative des arômes ou colorants, comme régulateur de pH dans certaines boissons ou en combinaison avec du bicarbonate dans des produits effervescents ou comme acidulant dans des formulations légèrement astringentes ou excipients des médicaments (Garcia-Fernandez et al., 2016). L'acide citrique est également largement utilisé par l'industrie chimique. Ces applications nécessitent de gros volumes de production. En dehors de l'acide citrique, *Y. lipolytica* est exploitée pour produire de l'acide succinique utilisé comme additif et complément alimentaire (Jost et al., 2015).

Les terpénoïdes encore appelés isoprénoïdes comprennent une vaste famille de produits naturels, incluant l' α -farnésène, le limonène, le campesterol et les caroténoïdes. Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de 40 atomes de carbones, dont les plus connus du grand public sont sans doute le lycopène et le β -carotène (Mata-Gómez et al., 2014 ; Buzzini et al., 2007). Ce sont des colorants naturels, de couleur jaune à rouge, qui ont une grande influence sur l'acceptabilité de nombreux aliments. Le marché réservé aux caroténoïdes est sans cesse croissant (Mannazzu et al., 2015). Dans le domaine de la santé, ces composés sont utilisés dans les programmes de réduction des risques de survenue de maladies dégénératives et de la cataracte (Tapiero et al., 2004). Bien que les levures du genre *Rhodotorula* soient connues pour leur pigment (levures rouges), leur production naturelle de caroténoïde est très variable et peut même être assez faible (Mata-Gómez et al., 2014). Au moyen de la disruption des gènes POX1 à POX6 et GUT2, Matthäus et al. (2014) ont réussi à produire du lycopène en conditions de culture Fed-batch en utilisant *Y. lipolytica*. D'autre part, Lee et collaborateurs (Lee et al., 2016) ont introduit un transporteur membranaire, Pdr10, dans *R. toruloides* pour améliorer la production de caroténoïdes dans un milieu de culture à deux phases : une phase aqueuse et une phase huileuse. La souche résultante a produit 2,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de caroténoïdes contre 1,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de caroténoïdes chez la souche sauvage de *R. toruloides*.

L' α -farnésène, est un constituant potentiel pour les biocarburants d'avions, c'est-à-dire un carburant biodégradable, biosourcé, dépourvu de sulfure et autres composés toxiques traditionnellement retrouvés dans le pétrole. L' α -farnésène a été produit dans une souche modifiée de *Y. lipolytica* par surexpression du gène de l' α -farnésène synthase de pomme et des gènes de la voie du mévalonate (Yang et al., 2016). La production d' α -farnésène (Tableau 4) avec un rendement de 33,98 mg/g, est la plus élevée jamais signalée chez une levure. De même, la production de limonène de 23,56 mg/L, est le niveau le plus élevé signalé dans *Y. lipolytica*.

Du campestérol est produit à raison de 942 mg/L par expression de l'enzyme DHCR7 de *Danio rerio* et de l'acyl-CoA oxydase 2, POX2 (Tableau 4 ; Zhang et al., 2017).

Une autre application dont fait l'objet *Y. lipolytica* est la production de monomère pour la production de plastiques biodégradables dont le poly-3-hydroxybutyrate (PHB). La synthèse de ce composé est dépendante de la fourniture en acétyl-CoA qui intervient aussi dans la synthèse des lipides. Li et al. (2017), ont modifié *Y. lipolytica*, pour produire du PHB, en partant du principe qu'une capacité élevée de *Y. lipolytica* à produire des lipides traduisait une fourniture efficace du précurseur acétyl-CoA, qui est aussi corrélée positivement avec une augmentation de la biosynthèse de PHB.

1.2.2. Critères de sélection des levures d'intérêt

L'intérêt porté aux levures oléagineuses repose sur leur capacité à produire des molécules d'intérêt à grande échelle à partir de substrats renouvelables sans compétition avec l'agroalimentaire et leur faculté à être manipulées génétiquement. A ces atouts s'ajoute l'aptitude à afficher une bonne croissance en condition de faible valeur de pH. Ce critère est utile pour s'affranchir des contaminations bactériennes.

La capacité naturelle à accumuler des lipides au-delà d'un certain seuil, la production de molécules valorisables en pharmacie, alimentation et biocarburant, l'utilisation de substrats peu coûteux et diversifiés ainsi que les performances élevées d'une espèce par rapport à une autre en conditions de cultures sont les critères prédominants de choix de levures oléagineuses.

Ainsi, les projets de recherche s'intéressent à des levures capables d'accumuler des lipides au-delà de 70% de leur poids sec (Munch et al., 2015) : les levures du genre *Lipomyces* et *Rhodotorula* par exemple. L'aptitude à utiliser les substrats qui permettent de minimiser les coûts de production des biocarburants et des lipides est aussi recherchée. En effet, le coût du glucose comme substrat de culture représente plus de 80% du coût total de production des biocarburants (Fei et al., 2011). Pour réduire ce coût et permettre à la production de lipides d'être rentable, les projets de recherche ont été orientés vers les substrats peu coûteux incluant les acides gras volatiles des graisses d'industrie, les hydrolysats lignocellulosiques (Yang et al., 2014) et les pentoses. En dehors du glucose, le xylose (un pentose) est la seconde source de carbone la plus abondante de la biomasse lignocellulosique (Lee et al., 1999). Certaines levures oléagineuses ont démontré des aptitudes à métaboliser des pentoses révélant ainsi un potentiel de production de lipides à partir de la biomasse lignocellulosique (Meesters et al., 1996). Par

exemple, le xylose est le meilleur substrat pour la production de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* (Hassan et al., 1994).

Y. lipolytica est quant à elle connue pour utiliser efficacement le glycérol (Mori et al., 2013) et les substrats hydrophobes ; elle est capable de convertir les résidus agro-industriels, tels que le glycérol industriel et la graisse en TAG d'intérêt (Silverman et al., 2016).

Les levures oléagineuses capables d'utiliser simultanément plusieurs sources de carbone sont aussi prises en compte. D'ailleurs, un intérêt particulier est porté aux levures capables d'utiliser simultanément le glucose et le xylose pour la raison évidente que la biomasse lignocellulosique est constituée de ces deux sucres en grande majorité (Juanssilfero et al., 2018). La levure oléagineuse *Trichosporon cutaneum* AS 2.571, utilise simultanément le glucose et le xylose pour atteindre un contenu en lipides de 39,2% à 59% de son poids sec (Hu et al., 2011). La levure oléagineuse *L. starkeyi* produit des lipides à raison de 50% de son poids sec en condition de co-fermentation du cellobiose et du xylose (Gong et al., 2012) et de 46,9% en condition de co-fermentation du glucose et du xylose (Anschau et al., 2014). Juanssilfero et al. (2017) ont atteint 84,9% de contenu en lipides avec *L. starkeyi* en condition de co-fermentation du glucose et du xylose.

Les critères liés à l'utilisation de substrats peu coûteux et diversifiés tiennent compte des substrats renouvelables comme les déchets industriels (Ageitos et al., 2011 ; Freitas et al., 2014), les eaux usagées (Amaretti et al. (2010) et les résidus agro-industriels (Arous et al. (2016). Hall et al. (2011) ont montré que les eaux usagées supplémentées avec des sources de nutriments additionnels conduisent à un plus haut niveau d'accumulation de lipides que dans le cas des eaux usagées seules. Le niveau d'accumulation de lipides dans *R. glutinis* est plus élevé quand les déchets de production d'huile de palme sont combinés à une source additionnelle d'azote (Ahmad et al., 2003). Dans d'autres études, les boues d'épuration combinées avec la farine de poisson usagée génèrent des conditions de croissance et d'accumulation optimales de lipides chez *L. starkeyi* (Huang et al., 2011). Cette levure oléagineuse est capable d'utiliser le xylose, l'éthanol, le L-arabinose, ou un mélange de glucose et xylose (Zhao et al., 2008). Les levures du genre *Rhodospiridium* sont capables de convertir le glycérol et les biodéchets lignocellulosiques en lipides (Yu et al., 2011).

Un autre critère de choix retenu est la capacité de la levure oléagineuse à produire des molécules à haute valeur ajoutée telles que les caroténoïdes, en même temps que les lipides. C'est le cas des espèces *R. rubra*, *Sporobolomyces roseus*, et *Phaffia rhodozyma* (Hernández-Almanda et al., 2014). Au-delà de la production de molécules d'intérêt, les critères comme le niveau de

biosécurité et la capacité de floculation des souches de levure sont à considérer (Sitepu et al., 2014).

Le temps d'accumulation d'une quantité maximale de lipides dans les cellules est aussi un critère important surtout dans les cultures en bioréacteur. Ainsi, Beopoulos et al. (2008) ont identifié la phase stationnaire comme étant la meilleure phase d'accumulation des lipides. Au critère temps adéquat de collecte des cellules de levure s'ajoute l'aptitude naturelle des souches oléagineuses à tolérer les inhibiteurs chimiques de croissance qui interfèrent avec la croissance en fermenteur. Ces inhibiteurs comprennent le furfural, l'acide acétique et 5-hydroxyméthylfurfural (Zhao et al., 2012 ; Xavier et al., 2017). A ce sujet, il a été montré que la levure oléagineuse *L. starkeyi* produit 68,24% de lipides tout en supportant un mélange des inhibiteurs de croissance suivants : 5-hydroxyméthylfurfural, furfural, acide acétique, acide formique, acide lévulinique, vanilline et syringaldéhyde (Juanssilfero et al., 2018).

Le passage à l'échelle industrielle requiert l'utilisation de bioréacteurs qui permettent d'obtenir une densité cellulaire importante (biomasse) dans un grand volume et dans des conditions contrôlées (pH, aération). La culture peut être conduite selon trois modes (Christophe et al., 2012) : batch (les matières premières sont apportées en une fois au début), fed-batch (apport périodique d'éléments nutritifs frais), ou en continu (apport constant de nutriments et de matière première et retrait constant de bouillon de culture selon un taux de dilution à définir). L'optimisation des conditions pour chaque couple souche-produit permet d'améliorer les rendements et/ou les titres de production. Néanmoins, la conduite du bioréacteur peut être rendue difficile par certaines caractéristiques physiologiques des levures qui sont à prendre en compte, comme la présence de mycélium par exemple. La croissance excessive des mycéliums entraîne l'apparition de bouillons mycéliens dont la viscosité augmente avec les vitesses d'agitation dans les bioréacteurs, réduisant ainsi le transport de masse de nutriments, d'oxygène et de chaleur (Moreira et al., 2003).

Des exemples de production de lipides en bioréacteurs à l'échelle de la recherche sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Exemples de production de lipides en bioréacteurs utilisant différents substrats et mode de culture

Levures oléagineuses	Génotype	^a Lipides (g/g)	Lipides (%DCW)	Productivité (g/Lh ⁻¹)	Substrats	Mode	Référence
<i>Y. lipolytica</i>	<i>ACCI, DGA1, GapC (C. acetobutylicum), MCE2 (M. circinelloides)</i>	0,27	67	1,3	Glucose	Fed-batch	Qiao, 2017
	<i>ACCI, DGA1, AldH (E. coli), ZWF1 (S. cerevisiae), GSR, GPO</i>	0,25	81	0,97	Glucose	Fed-batch	Xu, 2017
	<i>ACCI, DGA1</i>	0,16	59	0,80	Acétate	Fed-batch	Xu, 2017
	<i>GPD1, DGA2, yKK, ssXR, ssXDH, Δpex1-6, ΔTGL3</i>	0,12	41,8	0,23	Xylose+Glycérol	Fed-batch	Ledesma-Amaro et al. (2016)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>		0,23	67	0,54	Glucose	Fed-batch	Li, 2007
<i>Rhodotorula glutinis</i>		0,18	63	0,84	Saccharose	Fed-batch	Lorenz, et al. 2017
<i>Cutaneotrichosporon oleaginous</i>		0,25	45	0,67	Glucose	Continu	Ivančić Šantek et al., 2017
<i>Cryptococcus curvatus</i>		0,25	83	0,47	Glucose	Fed-batch	Zhang et al., 2011

^aRendement : g de lipides par g de substrats

1.2.3. L'ingénierie génétique pour modifier le métabolisme

L'ingénierie métabolique peut être vue comme la science qui consiste à réorienter le métabolisme des cellules vers la production de nouvelles molécules. Dans le contexte du métabolisme des lipides, elle fournit des informations plus utiles et de nouvelles stratégies pour améliorer la production de lipides, optimiser les profils d'acides gras et améliorer l'utilisation de matières premières peu coûteuses et renouvelables. Cependant, transformer des cellules en des usines biologiques de production de molécules d'intérêt représente un défi car ces cellules développent des réseaux métaboliques complexes et les outils d'ingénierie utilisés pour modifier le métabolisme de ces cellules ne sont pas universels ou transférables d'un organisme à un autre. Les différentes études menées en utilisant l'ingénierie métabolique, pour améliorer la production des lipides, ciblent certains points clés que sont : i) la surexpression d'enzymes qui améliorent la voie de biosynthèse des acides gras; (ii) la surexpression d'enzymes qui améliorent la voie de biosynthèse des triacylglycérols (TAGs); (iii) la régulation des voies associées à la biosynthèse des TAGs ; (iv) le blocage partiel de voies métaboliques concurrentes; et (v) l'approche transgénique 'multigènes'. Le tableau 6 présente quelques exemples réalisés chez *Y. lipolytica* et *R. toruloides*.

Le choix du promoteur pour la surexpression des gènes est tout aussi important pour l'amélioration de la production des lipides, que le choix des gènes à étudier. En effet, le gène natif DGA1 de *R. toruloides* a été surexprimé en utilisant deux promoteurs forts (LPD_{in} et GDP1). Les résultats ont montré que la quantité de lipides accumulée dans *R. toruloides* avec le promoteur à intron LDP (LDP_{in}) est supérieure à celle obtenue avec le promoteur GDP de 21%. Elle est également supérieure de 55% à celle reportée dans la souche sauvage de *R. toruloides* (Liu et al., 2016).

Différentes combinaisons d'éléments génétiques sont utilisées pour créer des voies métaboliques avec des propriétés souhaitées. Les méthodes traditionnelles de la biologie moléculaire utilisaient des étapes successives de coupure de l'ADN par enzyme de restriction et de ligature, ce qui est long et coûteux. Actuellement, diverses méthodes sont disponibles pour assembler efficacement des fragments d'ADN, ce qui donne accès à la construction de voies métaboliques comportant plusieurs gènes, qui peuvent être combinés de façon différente. Entre autres méthodes nous pouvons citer : l'assemblage LCR (Réaction Cyclique de Ligase) et yeast Golden Gate (yGG) comme méthodes *in vitro* et l'assembleur d'ADN *in vivo*.

Tableau 6 : Impact de l'ingénierie métabolique dans *Y. lipolytica* et *R. toruloides* sur la production de lipides.

Gènes surexprimés ou délétés (enzymes)	Augmentation du contenu en lipides	Références
<i>¹Yarrowia lipolytica</i>		
ACC1 (ACC)	2 fois le contenu en lipides	Tai et Stephanopoulos, 2013
ΔGUT2 (GDPH)	3 fois le contenu en lipides	Dulermo et Nicaud, 2011
GDP1 (GDPH)	1,5 fois le contenu en TAG	Dulermo et Nicaud, 2011
ΔGUT2 (GDPH)	2,9 fois le contenu en TAG	Dulermo et Nicaud, 2011
GDP1, ΔGUT2 (GDPH)	5,6 fois le contenu en TAG	Dulermo et Nicaud, 2011
ΔTGL3,ΔTGL4 (TAG lipases)	1,6 à 1,8 fois le contenu en lipides	Dulermo et al., 2013
POX1-6 (AOXs), MEF1, GDP1, ΔGUT2	2 fois le contenu en lipides	Dulermo et Nicaud, 2011
ACC1, DGAT1	5 fois le contenu en lipides	Tai et Stephanopoulos, 2013
ΔSNF1	2,6 fois le contenu en lipides	Seip et al. (2013)
DGA1,ΔPEX10,ΔMFE1	15 fois le contenu en lipides	Blazeck et al. (2014)
ΔDGA1/2,ΔLRO1, ΔARE1, ΔMFE2, SUC2, DGA2 x3	2 fois le contenu en lipides	Gajdoš et al. (2015).
Δ9 stearyl-CoA desaturase SCD1, ACC1, DGA1	5 fois le contenu en lipides	Qiao et al. (2015)
<i>²Rhodospiridium toruloides</i>		
ACC1, DGA1	1,95 fois le contenu en lipides	Zhang et al. (2016)
ACC1, DGA1,SCD1	3 à 4 fois le contenu en lipides	Zhang et al. (2016)

¹L'espèce donneuse et receveuse de gènes est *Y. lipolytica*. ²L'espèce donneuse et receveuse de gènes est *R. toruloides*.

L'assemblage LCR ou Ligase Cycling reaction, est une méthode d'assemblage complexe de fragments d'ADN utilisant des ponts d'oligonucléotides monobrins, une ligase thermostable pour ligaturer les fragments d'ADN et plusieurs cycles de dénaturation, hybridation et ligation. Les fragments d'ADN utilisés ne nécessitent pas des régions terminales présentant une homologie avec les fragments d'ADN voisins (De et al., 2014). Cette méthode permet d'utiliser le même fragment d'ADN dans différents assemblages d'ADN, car les ponts d'oligonucléotides définissent les éléments avec lesquels les fragments d'ADN doivent être fusionnés. Elle permet aussi de réduire le coût des réactifs utilisés lors des opérations d'amplifications par PCR et de purification d'ADN. De même, l'assemblage d'ADN *in vivo* via la méthode LCR exige moins de temps (1 à 3 h) que celui réalisé via la méthode de recombinaison homologue chez les levures (36 à 72 h) car les transformants de levure doivent être sélectionnés et les ADN assemblés doivent être transférés des levures à *E. coli* afin d'obtenir des quantités suffisantes de construction d'ADN purifiée. Toutefois, cette méthode requiert l'utilisation d'oligonucléotides de petite taille pour l'amplification des fragments d'ADN. Elle requiert aussi la présence de « ponts d'oligonucléotides » et du groupe 5'phosphate, pour assembler les fragments d'ADN, générant ainsi des dépenses supplémentaires.

La méthode d'assemblage d'ADN « yeast Golden Gate » permet d'assembler, des unités de transcriptions constituées de promoteurs, de séquences codantes et de terminateurs (Agmon et al., 2015) et ensuite de les faire exprimer dans les levures. L'assemblage effectué regroupe quatre parties : les séquences du promoteur, du CDS (séquence codante), terminateur ainsi qu'un vecteur (pAV10), sans marqueur de sélection et origine de répllication de levure. C'est dans ce vecteur que les trois séquences précitées sont introduites. Son efficacité dépend de la méthode Golden Gate et de l'enzyme de type IIS utilisées. Elle peut être aussi liée à la composition du site de coupure ciblée par les enzymes de restrictions IIS et à la présence de plusieurs extrémités libérées par les enzymes de restriction. Les « mismatch » qui surviennent au cours des assemblages après digestion des CDS peuvent-être un inconvénient majeur de cette méthode.

L'assembleur d'ADN permet d'assembler des génomes ainsi que des voies biochimiques entières au travers de recombinaisons homologues en conditions *in vivo*. Il facilite l'assemblage de courts fragments d'ADN en fragments d'ADN de grandes tailles (9 kb à 19 kb) et l'insertion de voies biochimiques de 100 à 200 kb (30 à 50 gènes) dans des chromosomes de levure. Il ne requiert aucune recombinase exogène et permet de s'affranchir des procédures de clonage en plusieurs étapes, de la digestion effectuée par les enzymes de restriction et de la ligation *in vitro*.

Cependant, la présence de courte répétition de séquences (<25 pb) dans les molécules d'ADN, entraînant des chevauchements de séquences, peut influencer légèrement sur l'efficacité de l'assemblage fait via l'assembleur d'ADN (Shao et al., 2009).

En ce qui concerne les possibilités de modification du génome (délétion, addition ou remplacement de gènes), les nouvelles méthodes d'édition de génome, plus efficaces et précises, sont un outil indispensable.

Diverses variations du système CRISPR/Cas9 existent. CrEdit est une méthode qui combine la stabilité et la polyvalence du vecteur EasyClone à la précision du système CRISPR/Cas9. Elle cible les cassures double brin dans le but d'accroître significativement les intégrations homologues dans un contexte d'édition et de manipulation de l'ADN génomique (Ronda et al., 2015). La méthode d'assemblage Di-CRISPR (Delta integration CRISPR-cas) se base aussi sur les cassures doubles brins mais dans des sites delta (extrémités terminales des retrotransposons) du génome des levures pour favoriser l'insertion de différentes voies métaboliques (Shi et al., 2016). CasSEMBLR est une méthode qui combine la méthode *in vivo* d'assemblage d'ADN et le système CRISPR/Cas9 dans la production de souches polyvalentes (Jakočiūnas et al., 2015).

D'abord appliquées à *E. coli* et *S. cerevisiae*, ces méthodes se généralisent à d'autres microorganismes comme les levures oléagineuses. Schwartz et al. (2017) ont développé le système CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome de *Y. lipolytica*. Une édition simultanée de doubles et triples multigènes faite grâce au CRISPR/Cas9 a également été réalisée chez cette levure (Gao S. et al., 2016). Le système a permis une édition efficace de gènes uniques ou multiples par recombinaison homologue et non-homologue. Toujours chez *Y. lipolytica*, Holkenbrink et collègues ont construit 26 vecteurs pour 11 sites d'intégrations intergéniques spécifiques avec des marqueurs de sélection *Nat* (Nourseothricine), *Hph* (hygromycine B) ou *URA3* dans le système synthétique EasyCloneYALI. Les vecteurs intégratifs peuvent être clonés, via Assemblage USER®, pour exprimer un ou deux gènes. L'efficacité de l'intégration varie selon les sites et se situe entre 30 et 100% (Holkenbrink al., 2018).

Le système CRISPR/Cas9 présente des limites dans le sens où, une expression élevée de la Cas9 peut causer des effets indésirables voire létaux dans les cellules hôtes. L'expression élevée de la Cas9 combinée à la disruption de gène peut induire une absence de croissance parmi les transformants obtenus. Le niveau de ploïdie de la cellule hôte peut aussi influencer sur la performance du CRISPR/Cas9, dans la logique où l'efficacité obtenue avec un organisme haploïde peut être très différente de celle d'un organisme à forte ploïdie (Ryan et al., 2014).

2. Le métabolisme des lipides chez les levures

2.1. Les lipides dans la cellule

2.1.1. Définitions

Le terme de lipides regroupe des molécules de structure diverses, en grande partie constituées de carbone, d'hydrogène, et d'oxygène. La définition même de 'lipide' et la liste des molécules rassemblées sous ce vocable ont évolué ou varié en fonction des auteurs. Les lipides ont souvent été caractérisés comme peu solubles ou insolubles dans l'eau, mais solubles dans certains solvants organiques tels que le benzène, le chloroforme, l'éther diéthylique, l'hexane, le toluène et le méthanol (Chesworth et al., 1998). Bien qu'elle soit largement répandue chez les lipides, cette propriété s'est avérée trop restrictive pour prendre en compte certaines molécules, solubles dans l'eau. En 2005, le Comité International de Classification et de Nomenclature des Lipides a établi un système de classification complet (Fahy et al., 2005), dont la dernière révision date de 2011 (Fahy et al., 2011). Il a donné une définition ayant permis d'établir une classification des lipides en huit catégories: « we define lipids as hydrophobic or amphipathic small molecules that may originate entirely or in part by carbanion-based condensations of thioesters (fatty acyls, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, saccharolipids, and polyketides) and/or by carbocation-based condensations of isoprene units (prenol lipids and sterol lipids)».

Le mot lipide englobe donc les produits naturels tels que les vitamines, caroténoïdes, stéroïdes, terpènes, sels biliaires, acides gras et leurs dérivés esters et aminés.

Les lipides sont des constituants essentiels de tout organisme vivant. Ce sont des composantes structurales primaires des membranes cellulaires. Ils jouent un rôle dans l'intégrité cellulaire, les processus membranaires tels que l'endocytose et les transports vésiculaires (Daum et al. 1998 ; Souza et Pichler, 2007).

Dans la littérature, selon les disciplines ou champs d'application, les lipides sont souvent groupés sous d'autres catégories que celles de la classification, pour tenir compte de leur fonction ou de leur localisation par exemple. En ce qui concerne les levures oléagineuses, la distinction est souvent faite entre lipides membranaires (phospholipides) et lipides de stockage (souvent appelés lipides neutres). Nous nous intéresserons à ces deux groupes de lipides, et en premier lieu aux acides gras qui sont des composants majeurs de ces lipides.

2.1.2. Les acides gras

Ce sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatiques pouvant contenir deux à 24 atomes de carbone ou plus. De par le processus de biosynthèse, les acides gras naturels montrent généralement (mais pas exclusivement) un nombre pair de carbones. Par ailleurs, les chaînes carbonées peuvent contenir une (acide gras monoinsaturé) ou plusieurs double-liaisons (acide gras polyinsaturé) ou n'en contenir aucune (acide gras saturé). Les doubles liaisons peuvent avoir deux types de conformation, cis ou trans. De plus, les acides gras peuvent avoir divers dérivés comme des dérivés aminés. Leur diversité est donc grande, mais chez les levures, prédominent naturellement un petit nombre d'acides gras composés de chaînes à 16 et 18 carbones.

La nomenclature systématique (chimique), qui conduit à des noms complexes, est rarement utilisée. Leur nomenclature usuelle (biochimique) tient compte de la longueur de chaîne et des insaturations. La nomenclature n-x est utilisée pour désigner la double liaison à x carbones de l'extrémité méthyle et Δ^y pour celle à y carbones du groupe carboxyle. La figure 2 montre les structures de différents acides gras naturels. Dans le domaine alimentaire, la référence à l'extrémité méthyle désignée oméga (ω) est utilisée pour grouper les acides gras selon l'emplacement de la première double liaison : séries ω -3 -6 et -9 avec une allégation santé.


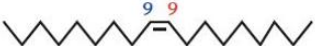

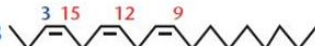

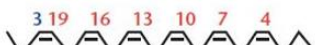
ω -characteristics	Methyl end	Carboxyl end	Saturation	Δ -characteristics
Stearic 18:0		COOH	Saturate	18:0
Oleic 18:1, ω -9		COOH	Monoene	18:1 Δ^9
Linoleic 18:2, ω -6		COOH	Polyene	18:2 $\Delta^9,12$
α -Linolenic 18:3, ω -3		COOH	Polyene	18:3 $\Delta^9,12,15$
EPA 20:5, ω -3		COOH	Polyene	20:5 $\Delta^5,8,11,14,17$
DHA 22:6, ω -3		COOH	Polyene	20:6 $\Delta^4,7,10,13,16,19$

Figure 2 : Exemples de nomenclature de molécules d'acides gras avec leur extrémité méthyle et carboxylique.

Stéarique désigne un acide gras saturé à 18 atomes de carbone sans double liaison. Acide oléique est un acide gras à 18 atomes de carbones avec une double liaison en position ω 9. L'acide linoléique contient deux doubles liaisons en position ω 6 et ω 9. L'acide Eicosapentanoïque (EPA) contient plusieurs doubles liaisons représentées par 20:5 ω 3. Source : Rustan et Drevon (2005).

Les profils d'acides gras généralement identifiés chez quelques levures oléagineuses sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition en acides gras de quelques levures et champignons oléagineux (Ahmad et al., 2015 ; Babau et al., 2013 ; Meng et al., 2009; Lazar et al., 2014)

Levures oléagineuses	Lipides ^a (%DCW)	Composition en acides gras					
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida curvata</i>	58	25	1	10	57	7	0
<i>Candida sp. 107</i>	42	44	5	8	31	9	1
<i>Cryptococcus albidus</i>	60	12	1	3	73	12	0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	7	3	47	8	0
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	30	2	12	36	15	4
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66	18	3	3	66	0	0
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	25	17,4	7,1	11,9	52,7	7,3	-

^aDCW : Biomasse sèche cellulaire

2.1.3. Les lipides membranaires

La membrane plasmique des cellules contient quatre types de lipides : les glycérophospholipides, les sphingolipides, l'ergostérol et les diacylglycérols.

L'ergostérol est la forme majoritaire de stérol retrouvée dans la membrane cellulaire des levures (à la place du cholestérol chez les mammifères).

Il influence la fluidité, la perméabilité ainsi que l'activité de certaines protéines membranaires. Il contrôle aussi les cycles cellulaires (Parks et Casey, 1995) et peut être un précurseur des stéroïdes (Bhatti et Khera, 2012) et de la vitamine D2 (Rajakumar et al., 2007). Il représente moins de 1% de la biomasse sèche cellulaire des levures oléagineuses. Pastinen et al. (Pastinen et al., 2017) ont reporté 0,20% d'ergostérol dans *Rhodotorula glutinis* VTT-C-01423, 0,30% dans *Rhodotorula toruloides* CBS12050, 0,54% dans *Rhodotorula toruloides* CBS350, 0,20% dans *Cryptococcus curvatus* CBS 5324, 0,16% dans *Cryptococcus curvatus* CBS 5324 et 0,83% dans *R. paludigenum* CBS 6566.

Les **sphingolipides** (SLs) sont formés à partir d'acides gras à très longue chaîne qui servent de composants structuraux de la surface des cellules. Ils interviennent aussi dans la régulation de

l'endocytose, protéolyse et contrôle du cycle cellulaire (Nielsen, 2009). La structure de base des SLs contient une base à longue chaîne (LCB ou squelette de sphingoïdes), un acide gras saturé lié par amide au LCB pour former un céramide et un groupe de tête polaire de nature très variable (Fig. 3).

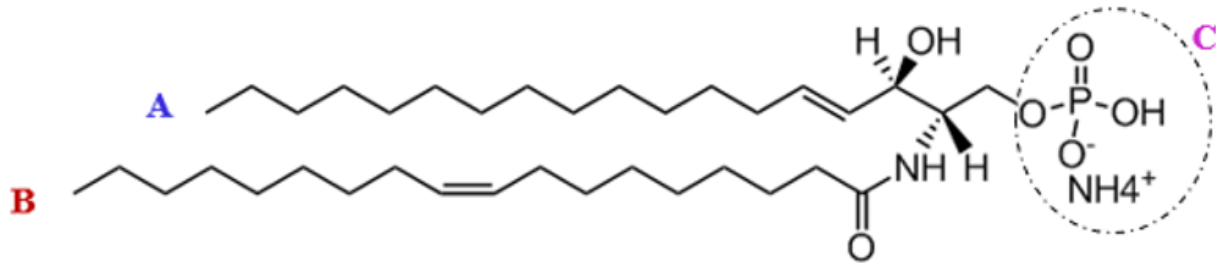


Figure 3 : Céramide, structure de base des sphingolipides
 (A) Portion sphingoïde LCB, (B) Portion d'acide gras attachée au LCB via une liaison amide et (C) Tête polaire. Source : <https://www.avantilipids.com>.

Les **glycérophospholipides** encore appelés phospholipides, sont constitués d'une chaîne principale de diacylglycérol (DAG) et d'un groupe phosphate, en position *sn*-3, lié à une tête polaire (Fig. 4).

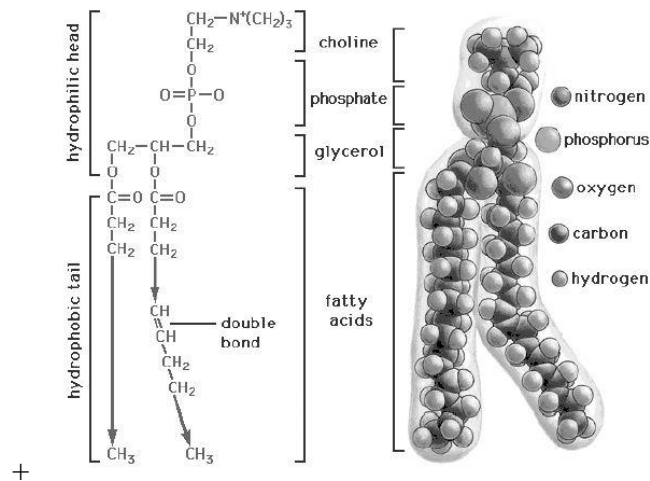


Figure 4 : Structure d'un phospholipide
 Source : Biochembayern (2013)

Les phospholipides les plus connus dans les levures sont les phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et cardiolipines ou CL. Les phospholipides les plus abondants chez *Y. lipolytica* sont : PE, PC et PI. PS et SL sont disponibles en faible quantité (Beopoulos et al., 2008). Par contre, dans *R.*

glutinis, Ham et Rhee (1998), rapportent que les phospholipides sont composés de 38,6% de PC et 43% de PS.

Les liens existant entre les phospholipides membranaires et les lipides de stockage sont doubles.

La croissance des corps lipidiques dans *Y. lipolytica* requiert la participation des phospholipides. Néanmoins, la contribution des phospholipides à la quantité totale de lipides des corps lipidiques en croissance est comprise entre 1,6 et 2% (Kerkhoven et al., 2016).

D'autre part, ils partagent des intermédiaires dans leur synthèse.

Une molécule clé de la synthèse des phospholipides est l'acide phosphatidique (PA). Cet acide dérive du glycérol-3-phosphate ou du dihydroxyacétone phosphate suivant un transfert d'acyl gras acyl dépendant. Les réactions sont catalysées par des gènes qui codent le glycérol-3-phosphate acyltransférase et le lysophospholipide acyltransférase (Athenstaedt et al., 1999 ; Riekhof et al., 2007).

La synthèse des phospholipides à partir des DAG, peut se faire par deux voies alternatives (Fig. 5), la voie du cytidinediphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) et la voie de Kennedy. Dans la voie CDP-DAG, le DAG est phosphorylé en PA par la diacylglycérol kinase Dgk1p (Fakas et al., 2011) et PA est ensuite métabolisé sous l'action catalytique de la cytidinediphosphate-diacylglycérol synthase exprimée par le gène CDS1 (Shen et al., 1996). Dans la voie de Kennedy, l'enzyme Pah1p catalyse la déphosphorylation de PA en présence de magnésium, et on obtient du DAG (Han et al., 2006). Dans cette voie, l'éthanolamine ou la choline sont phosphorylées et attachées au DAG dans le réticulum endoplasmique (Henry et al., 2012). PA est donc le point de croisement entre la voie du CDP-DAG et la voie de Kennedy (Athenstaedt et Daum, 1999). L'activité de l'enzyme Pah1p permet de décider si la cellule produira des lipides de stockage ou des phospholipides membranaires (Pascual et Carman, 2013). L'activité de Pah1p contrôle la formation des corps lipidiques dans le cytosol et dépend de la limitation en zinc, des phases de croissance cellulaire et d'une régulation opérée par les lipides et les nucléotides (Ploier et al., 2014).

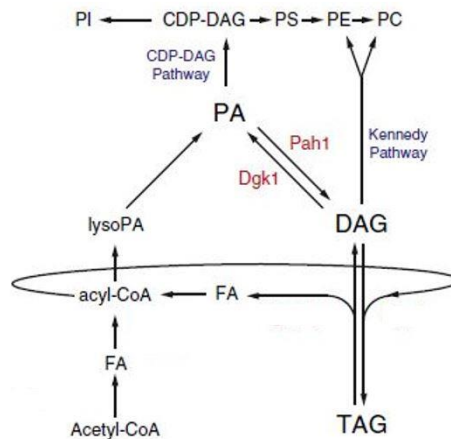


Figure 5 : Voies métaboliques reliant les lipides neutres au métabolisme des phospholipides
Source : Markgraf et al. (2014)

Les diacylglycérols sont constitués d'une molécule de glycérol liée à deux acides gras par des liaisons esters. Ce sont des molécules importantes dans les processus de biosynthèse et de dégradation des glycérophospholipides. L'abondance des DAGs dans la membrane des cellules entraîne un changement de structure de la bicouche de celle-ci. En effet, cette bicouche passe de la forme lamelle à la forme hexagone (Veiga et al., 1999). Les DAGs sont aussi impliqués dans des processus de fusion et de fission membranaire (Goñi et Alonso, 1999) ainsi que dans la signalisation et la transduction cellulaire (Carrasco et Mérida, 2007).

2.1.4. Les lipides non-polaires ou lipides neutres

Ce sont des molécules hydrophobes dépourvues de groupes chargés électriquement. Les cellules eucaryotes stockent les acides gras en excès sous forme de lipides neutres ou non-polaires, principalement des triacylglycérols et des esters de stérols, dans des compartiments appelés corps lipidiques (Zweytick et al., 2000). Les TAGs constituent la forme majoritaire de stockage des lipides neutres. Les autres lipides neutres cellulaires comprennent les acides gras libres et les caroténoïdes non polaires.

Le rôle prédominant des lipides neutres est le stockage de l'énergie (Ansari et al., 2015). Ils représentent aussi une forme de stockage des AG ou d'autres précurseurs afin de pouvoir répondre aux besoins de la synthèse des membranes. En condition de croissance, TAGs et esters de stérols (SEs) sont mobilisés pour la biogenèse des membranes. Les acides gras libérés sont alors canalisés vers la biosynthèse des phospholipides (Zanghellini et al., 2008).

Les SEs sont présents en concentration faible dans les levures oléagineuses. Cette forme estérifiée de stérol n'intervient pas dans le stockage d'énergie, n'est pas intégrée dans la structure des membranes cellulaires mais contribue à l'homéostasie du stérol.

La voie métabolique de synthèse des stérols est une voie biochimique complexe. Les cellules de levure synthétisent généralement les stérols en excès. Néanmoins, des mécanismes de détoxification existent pour éviter un impact nocif sur les membranes. Trois mécanismes de maintien de l'homéostasie du stérol sont connus : (a) estérification des stérols libres par des acides gras sous l'action des enzymes Are1p ou Are2p et entreposage dans les corps lipidiques (Zweytick et al., 2000) ; (b) régulation à la baisse des stérols de biosynthèse, et (c) acétylation des stérols permettant aux cellules de sécréter l'excès de stérol sous forme de stérol acétates.

2.1.5. Le cycle de vie des lipides neutres

Le contenu en lipides neutres d'une levure est le résultat de plusieurs processus à savoir, la synthèse d'acide gras, l'accumulation de lipides dans les corps lipidiques, la remobilisation de ces lipides et la dégradation des acides gras (Fig. 6).

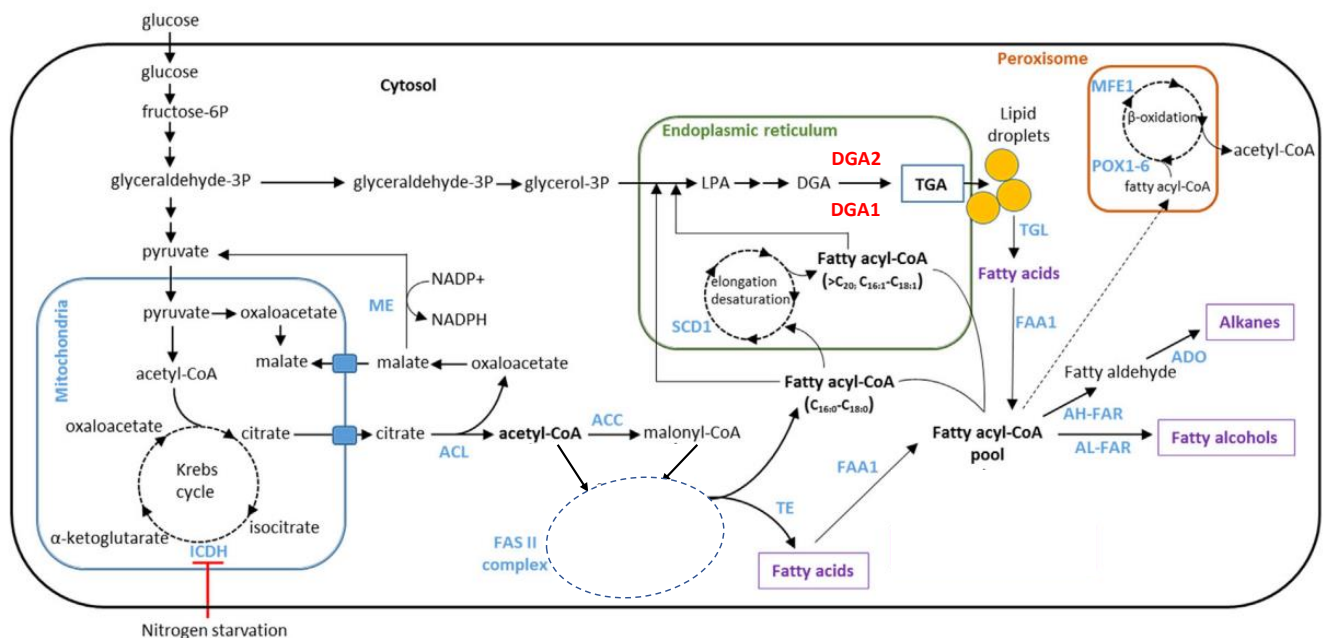


Figure 6 : Schéma synthétique du métabolisme des lipides
Source : d'après Adrio (2017)

Certaines levures sont également capables d'importer des acides gras contenu dans le milieu extérieur. On emploie parfois le terme d'accumulation 'ex novo', impliquant l'absorption d'acides gras, d'huiles et de triacylglycérols (TAG) du milieu de culture et leur accumulation sous une forme inchangée ou modifiée dans la cellule. Cette voie nécessite l'hydrolyse du substrat hydrophobe (par des lipases) et le transport des acides gras libérés dans la cellule.

Nous nous intéresserons ici à la synthèse 'de novo', impliquant la production, dans des conditions définies, de précurseurs d'acides gras tels que l'acétyl- et la malonyl-CoA et leur intégration dans la voie de biosynthèse des lipides.

Les voies biochimiques de la synthèse des lipides ne sont pas vraiment différentes entre organismes eucaryotes et sont similaires dans les levures oléagineuses et non-oléagineuses. La synthèse des lipides implique le cytosol et plusieurs compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les corps lipidiques (Klug et Daum, 2014). La biosynthèse des lipides implique essentiellement deux voies partant de l'acétyl-CoA, l'une conduisant aux stérols et l'autre conduisant à des acides gras (AG) incorporés ensuite dans des TAGs, des phospholipides, des steryl esters et des sphingolipides. Il est opportun de rappeler que 80 à 90% des lipides des levures oléagineuses sont stockés sous forme de TAG (Rossi et al., 2011). Le reste est sous forme d'esters de stérol, d'acides gras libres, de phospholipides, d'ergostérol et de diacylglycérols (Sutanto et al., 2018). Les lipides neutres tels que TAG et SE sont stockés dans des corps lipidiques (CL). Ce sont des organelles sphériques constituées d'une monocouche de phospholipides produites à partir du réticulum endoplasmique. La voie de stockage démarre par la production du glycerol-3-phosphate, réalisée par la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (GDP1) à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP), ou par acylation du glycérol via la glycérol kinase (GUT1).

Les acides gras synthétisés qui n'entrent pas dans la voie de biosynthèse des TAGs sont convoyés vers les peroxysomes où ils sont dégradés. Les peroxysomes sont des organelles spéciales de diamètre 0,1 μm entourées par une membrane unique. Les peroxysomes sont polyvalents et impliqués dans plusieurs voies métaboliques, spécialement celles de détoxification et de dégradation des acides gras connue sous le terme β -oxydation (Poirier et al., 2006). Le catabolisme des acides gras génère de l'énergie et des métabolites primaires pour les cellules. Une fois dans les peroxysomes, les acides gras sont soumis à des cycles de dégradation, résultant en une réduction séquentielle des acides gras raccourcis de deux atomes de carbone. L'acétyl-CoA, obtenu à la fin de cette série de dégradation, est ensuite transporté

par la carnitine acétyltransférase (CAT) dans les mitochondries où il entre dans le cycle de Krebs (Strijbis et al., 2010), fournissant ainsi de l'énergie aux cellules.

Les voies de synthèse des AG et des TAG, de remobilisation et de dégradation des acides gras sont détaillées dans les sections suivantes.

2.2. Les voies de biosynthèses et stockage des lipides

2.2.1. Biosynthèse des acides gras

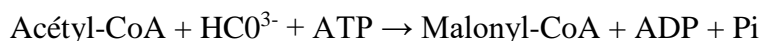
Les étapes initiales de la biosynthèse des AG se produisent dans le cytosol, sous l'action d'un complexe d'acides gras synthétase, le complexe FAS (Rossi et al., 2011). La biosynthèse des acides gras requiert une fourniture constante d'acétyl-CoA, de malonyl-CoA et de NADPH.

Les levures non-oléagineuses reçoivent la plupart du temps l'acétyl-CoA de la glycolyse alors que celles oléagineuses reçoivent l'acétyl-CoA du clivage du citrate dans le cytosol (Ratledge et Wynn, 2002). Notons ici que le citrate est fourni par le cycle de l'acide citrique (TCA ou cycle de Krebs) qui intervient en général dans les réactions cataboliques et anaboliques (Walker, 1998). Le surplus de citrate du cycle TCA est exporté hors des mitochondries par les transporteurs citrate/malate (Ratledge, 2002) vers le cytosol où il est clivé par l'ATP-citrate lyase (ACL) en acétyl coenzyme A et oxaloacétate suivant la réaction :



Une levure oléagineuse diffère de celle non-oléagineuse par la présence de l'ACL (Zhang et al., 2007). L'ACL, est en général constitué de deux sous-unités, codées par ACL1 et ACL2, et est négativement régulé par les acides gras exogènes (Rossi et al., 2011).

Outre l'acétyl-CoA, la synthèse des acides gras nécessite un apport continu de malonyl-CoA. L'Acétyl-CoA obtenu de l'équation précédente est converti par carboxylation en malonyl-CoA. Cette carboxylation est réalisée par l'acétyl-CoA transacétylase ou carboxylase, ACC (Al-Feel et al., 1992).



L'enzyme ACC, enzyme clé de synthèse de novo des acides gras, intervient également dans l'élongation de chaînes très longues d'acide gras (Schneiter et al., 1996).

Une fourniture adéquate en NADPH est importante pour la conversion des acétyl-CoA en acide gras (Certik et al., 1999). La fourniture cytosolique du NADPH se fait au travers de la voie du

pentose phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase ou la 6-phospho-gluconate déshydrogénase et/ou du cycle de transhydrogénase, qui transforme du NADH en NADPH grâce à l'activité de la pyruvate carboxylase, de la malate déshydrogénase et de l'enzyme malique. L'enzyme malique est codée par le gène MAE1. Néanmoins, dans *Y. lipolytica*, l'enzyme malique n'est pas impliquée dans la fourniture du NADPH (Zhang et al., 2013). La surexpression du gène MAE1 dans cette levure n'induit pas une accumulation de lipides (Beopoulos et al., 2009). Il a été donc supposé, dans *Y. lipolytica*, que le NADPH proviendrait de la voie du pentose phosphate (Tang et al., 2015 ; Zhao et al., 2015) et de la β -oxydation reverse (Ochsenreither et al., 2016). La figure ci-dessous résume l'implication de ces deux voies dans la synthèse du NADPH (Fig. 7).

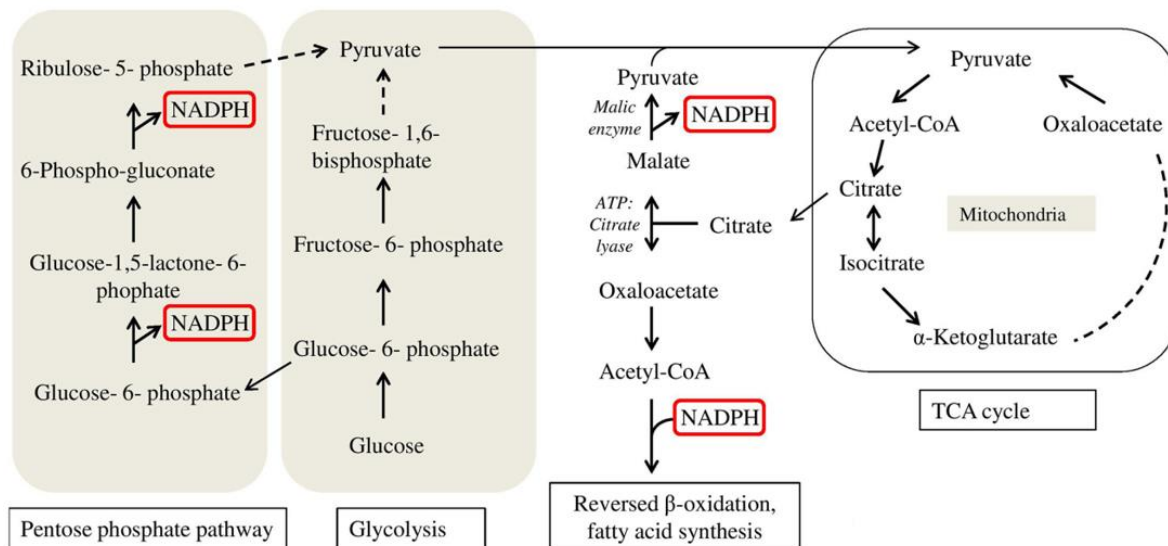


Figure 7 : Implications de la voie du pentose phosphate dans la synthèse des acides gras
Source : Ochsenreither et al. (2016).

La synthèse des acides gras est initiée par l'envoi de l'acétyl-CoA dans le complexe FAS (Fatty Acid Synthesis). Le Malonyl-CoA est transféré par l'acyle carrier CoA transacétylase vers l'acyle carrier protéine (ACP) du complexe FAS qui serait responsable de l'ajout de carbones aux acides gras et génère du CO_2 (Magdouli et al., 2014). Le complexe FAS démarre ainsi avec l'acétyl-ACP et le Malonyl-ACP (Fig. 8). Le Malonyl-ACP donne deux atomes de carbones dans une série de cycles à quatre réactions séquentielles catalysée par les acides gras synthases et des élongases. Il existe deux types de complexe FAS (Garay et al., 2014) : le complexe FAS I habituellement retrouvé dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et FAS II identifié chez les procaryotes. Chez certains eucaryotes, les mitochondries possèdent leur propre système de synthèse d'acides gras (Tehlivets et al., 2007) et synthétisent certains phospholipides (Henry et

al., 2012). Cette synthèse y est réalisée par un système FAS de type II, hébergeant des activités enzymatiques individuelles sur des polypeptides distincts. Le but principal de cette synthèse est de fournir de l'octanoyl-ACP qui sert de précurseur à l'acide lipoïque, cofacteur essentiel des réactions de décarboxylation oxydative.

Le complexe FAS des levures, implique des réactions séquentielles catalysées par les enzymes : β -cétolacyle synthase, β -cétolacyle réductase, β -hydroxylacyle-ACP ou Enoyl déshydratase, et Enoyl-ACP réductase (Ratledge, 2004). Cette réaction cyclique favorise l'élargissement des acides gras qui se fait par ajout de 2 atomes de carbone à chaque cycle et se termine normalement par la formation d'acides palmitiques (C16:0) et stéariques (C18:0) comme le montre la figure ci-dessous (Fig. 8). Dans ces réactions, une mole d'acide gras C16 requiert 14 moles de NADPH : 2 moles de NADPH sont utiles pour réduire le groupe 3-céto-acyle émergent après la condensation de l'Acétyl-CoA au Malonyl-CoA-ACP.

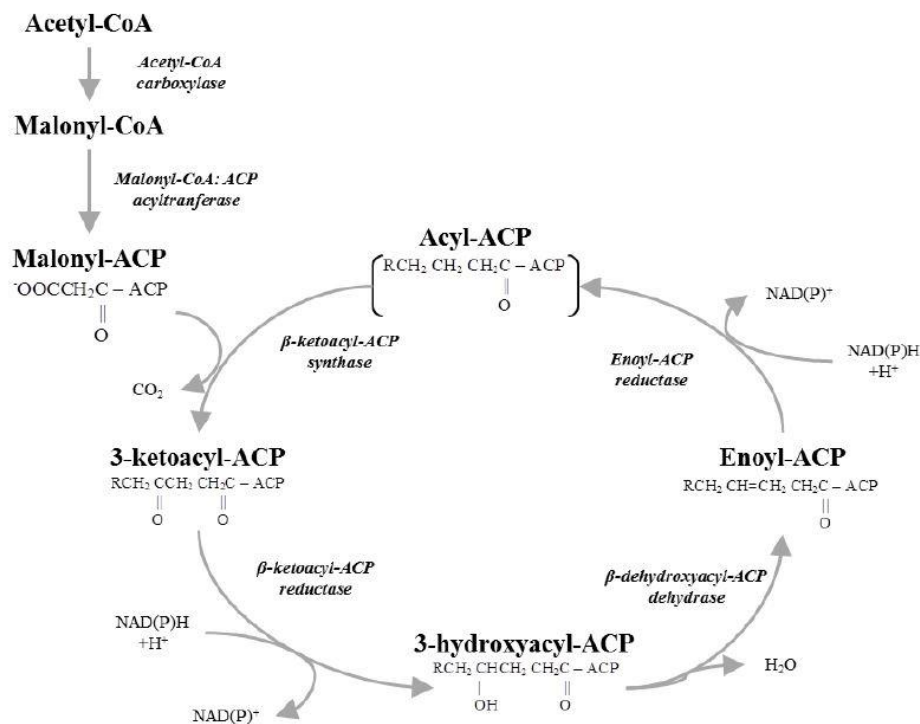


Figure 8 : Synthèse des acides gras dans le complexe FAS

Source : Harwook, (2010).

Le complexe FAS termine la croissance de la chaîne acyle par transfert de l'extrémité acyle à un accepteur CoA et réduction de la liaison β -carbonyl en méthylène grâce à l'activité des acides gras synthases FAS1 et FAS2. Le produit final de cette synthèse varie selon l'espèce de

levure. Ce complexe synthétise en abondance des acides gras saturés à 16 atomes de carbone (C16:0, acide palmitique) et en faible quantité ceux à 14 et 18 atomes de carbone (Schuster et al., 1995). Les acyl-CoA libérés par le complexe FAS I sont ensuite acheminés vers le réticulum endoplasmique. C'est dans ce compartiment que les AG sont transformés par l'action des élongases et désaturases (Bellou et al., 2016).

L'activité des élongases d'acide gras est fonctionnellement similaire à celle de la FAS mais utilise des acyl-CoA à chaîne plus longue, plutôt que l'acétyl-CoA, en tant que substrat. Trois systèmes distincts d'élongation d'acides gras avec une spécificité de longueur de chaîne différente ont été rapportés. Trois gènes codant les élongases d'acides gras, *ELO1*, *ELO2* et *ELO3* sont connus. *ELO1* code une protéine membranaire impliquée dans l'allongement des acides gras C14 en C16 (Dittrich et al., 1998, Toke et Martin, 1996). L'expression du gène *ELO1* est réprimée par l'acide palmitique et aussi en phase stationnaire (Gasch et al., 2000). La synthèse d'acides gras saturés et monoinsaturés de plus de 24 atomes de carbone est le résultat de l'activité de *ELO2*, alors que *ELO3* est indispensable pour la conversion de C24:0 en C26:0 (Oh et al., 1997). Dans la levure *Hansenula polymorpha*, trois différentes élongases ont été définies. L'élongase de type I transforme les acides gras C12 en C16 et les C16 en acides gras C18 (Toke et Martin, 1996, Schneider et al., 2000). L'élongase de type II allonge la palmitoyl-CoA (C16:0 activé par CoA) et la stéaroyl-CoA (C18:0 activé par CoA) en acides gras C22 et l'élongase de type III synthétise les acides gras de 20 à 26 atomes de carbone à partir des acides gras C18 activés par CoA (Rossler et al., 2003 ; Han et al., 2002).

Toutes les élongases identifiées jusqu'à présent *Elo1p*, *Elo2p*, *Elo3p* sont localisées dans le réticulum endoplasmique, où elles sont vraisemblablement organisées sous forme de complexe (Tehlivets et al., 2007).

La désaturation des AG démarre par la conversion de l'acide palmitique et stéarique en, respectivement, acide palmitoléique (C16:1*cis*9) et acide oléique (C18:1*cis*9). A partir de l'acide oléique, d'autres désaturations peuvent survenir, en position $\Delta 12$ ou $\Delta 15$ pour générer du C18:2 ou C18:3 (ALA, *cis* 9,12,15). Les acides gras insaturés communément générés dans les levures sont C16:1, C18:1, C18:2 et C18:3. Ils sont synthétisés par différentes désaturases fonctionnelles (Martin et al., 2007). Santomartino et al. (2017) ont reporté chez les levures une à trois désaturases différentes, appartenant à la famille Stéaroyl-CoA Désaturase (SCD ou $\Delta 9$ désaturase) et la famille des oméga désaturases ($\Delta 12$ et $\Delta 15$).

Toutes les espèces de levure contiennent un gène codant pour les SCDs, ce qui suggère que cette enzyme est essentielle à la viabilité cellulaire (Santomartino et al., 2017). Les SCDs ou enzymes Ole1p du réticulum endoplasmique codés par le gène *OLE1* (Oh et Martin, 2006), introduisent une double liaison en position 9 des acides palmitique (C16:0) ou stéarique (C18:0). L'activité de la désaturase Ole1p répond à un certain nombre de signaux environnementaux et nutritionnels afin de fournir des précurseurs essentiels pour l'assemblage de la membrane cellulaire, au fur et à mesure que les cellules croissent et s'adaptent à différentes conditions physiologiques et métaboliques. En général, chez *S. cerevisiae*, la transcription de *OLE1*, induite à basse température (Nakagawa et al., 2002), est réprimée par les acides gras insaturés (les produits) et favorisée par les acides gras saturés. La régulation de la transcription de *OLE1* est variable chez les levures. Dans *Kluyveromyces lactis*, la transcription est induite par l'hypoxie et l'éthanol (Micolonghi et al. 2012; De angelis et al. 2016). Elle est réprimée par les acides gras insaturés chez *Cryptococcus curvatus* (Meesters et Eggink, 1996), tandis que chez *H. polymorpha* (Lu et al. 2000) et *Lachancea kluyveri* (Kajiwara 2002) une répression faible ou une absence d'expression de *OLE1* est rapportée en présence des acides gras insaturés. La transcription d'*OLE1* est induite par le glucose dans *Candida parapsilosis* (Pereira et al. 2015). Des études sur le facteur Mga2 dans *Y. lipolytica* ont montré l'activité répressive de Mga2 sur les gènes *OLE1* et *FAD2* codant la désaturase $\Delta 12$ (Liu et al. 2015).

Les Oméga désaturases introduisent une double liaison entre le groupe carboxyle d'un acide gras et une double liaison déjà existante. Ils synthétisent du C18:2 (acide linoléique) et C18:3 (acide α -linoléique). En fait, $\Delta 12$ introduit une seconde double liaison en position $\Delta 12$, transformant C18:1, estérifié avec un phospholipide, généralement la phosphatidylcholine (Certik et Shimizu, 1999), en C18:2 (Bucek et al., 2014 ; Li Y. et al., 2008). $\Delta 15$ agit après $\Delta 12$ en introduisant une seconde double liaison et génère du C18:3 (Fig. 9).

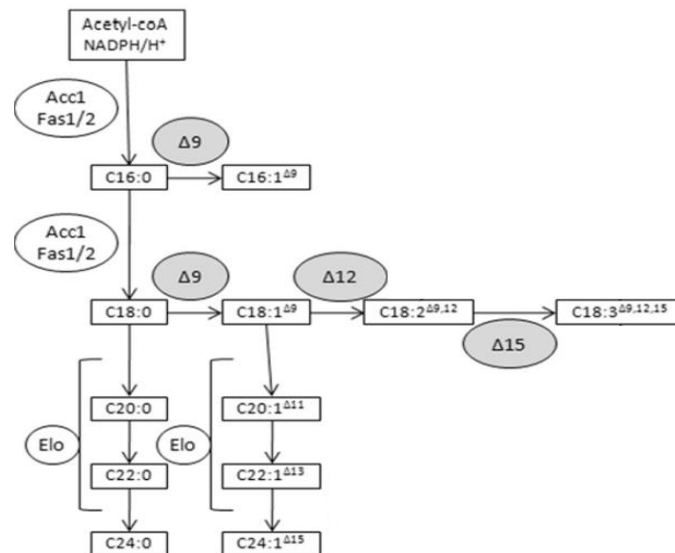


Figure 9 : Elongation et désaturation des acides gras
Source : Santomartino et al. (2017).

Les désaturases $\Delta 12$ (FAD) sont trouvées chez toutes les espèces de levure, sauf celles appartenant aux espèces *Saccharomycetaceae* dérivant de l'évènement de duplication complète du génome (Santomartino et al., 2017). Ces désaturases $\Delta 12$ sont codées par un gène unique, sauf chez l'hybride *Millerozyma farinosa* qui a deux gènes $\Delta 12$ identiques, PISO0C09088g et PISO0D09155g. Il existe des désaturases bifonctionnelles $\Delta 12/\Delta 15$ chez les champignons (Buček et al. 2014). Sur la base des valeurs d'identités élevées entre les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$, il a été suggéré que ces deux désaturases dérivent d'un ancêtre commun $\Delta 12$, à partir duquel les $\Delta 15$ ont évolué (Santomartino et al., 2017). Les désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$ disposent de trois motifs hautement conservés riches en histidine, HX3-4H, HX2-3HH et H/QX2-3HH (Meesapyodsuk et al., 2015).

Les oméga-désaturases peuvent réagir différemment aux conditions environnementales. Par exemple, *FAD2* a été induit et *FAD3* réprimé par hypoxie chez *K. lactis*. *FAD3* est également réprimé à basse température mais induit par l'éthanol (De Angelis et al. 2016). La transcription de $\Delta 12$ est induite à basse température dans *Rhodotorula glutinis* (He et al. 2015). Chez *H. polymorpha*, les acides gras insaturés ne répriment que la transcription de *FAD3*. *FAD2* et *FAD3* sont induits par l'hypoxie (Sangwallek et al. 2014).

2.2.2. Synthèse des TAG

La synthèse de TAG se fait généralement dans la voie de Kennedy et requiert des acyl-CoA et le G-3-P (Glycérol-3-phosphate). Le G-3-P peut être produit à partir du glycérol ou du dihydroxyacétone (DHAP). GUT1 code pour une glycérol kinase qui convertit le glycérol en

G-3-P dans le cytosol. Le G-3-P produit est ensuite oxydé en DHAP par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase codée par le gène GUT2. Le DHAP peut entrer dans la glycolyse ou la gluconéogenèse. Le G-3-P peut également être utilisé comme une structure de base pour la synthèse du TAG. Trois groupes acyles sont ajoutés au squelette G-3-P pour générer le TAG, et ce processus implique quatre étapes catalysées par une enzyme: (1) un groupe acyle est ajouté à la position sn-1 de G-3-P par un G-3-P acyltransférase (SCT1) pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA); (2) un second groupe acyle est ajouté à la position sn-2 par une 1-acyl G-3-P acyltransférase ou l'acide lysophosphatidique acyltransférase (SLC1) pour produire l'acide phosphatidique (PA); (3) le PA est ensuite déphosphorylé par l'acide phosphatidique phosphohydrolase (PAP), donnant le DAG et (4) le troisième groupe acyle est ajouté en position sn-3 par une acyltransférase de type diacylglycerol acyltransférase principalement (ex : Dga1p), ou dans une moindre mesure de type stérol acyltransférase (ex : Are1p). Il existe également une voie indépendante d'acyl-CoA. Dans la voie indépendante d'acyl-CoA, ce troisième groupe acyle est fourni par un glycérophospholipide (Fig. 10). Dans les eucaryotes, la production des LPA et PA peut se faire aussi dans la mitochondrie et les corps lipidiques (Coleman et Mashek, 2011).

Rappelons que les DAG peuvent découler de différentes voies : (i) de la déphosphorylation de l'acide phosphatidique synthétisé *de novo*, (ii) de la dégradation des phospholipides par des phospholipases et (iii) de la désacylation des TAGs (Henry et al., 2012).

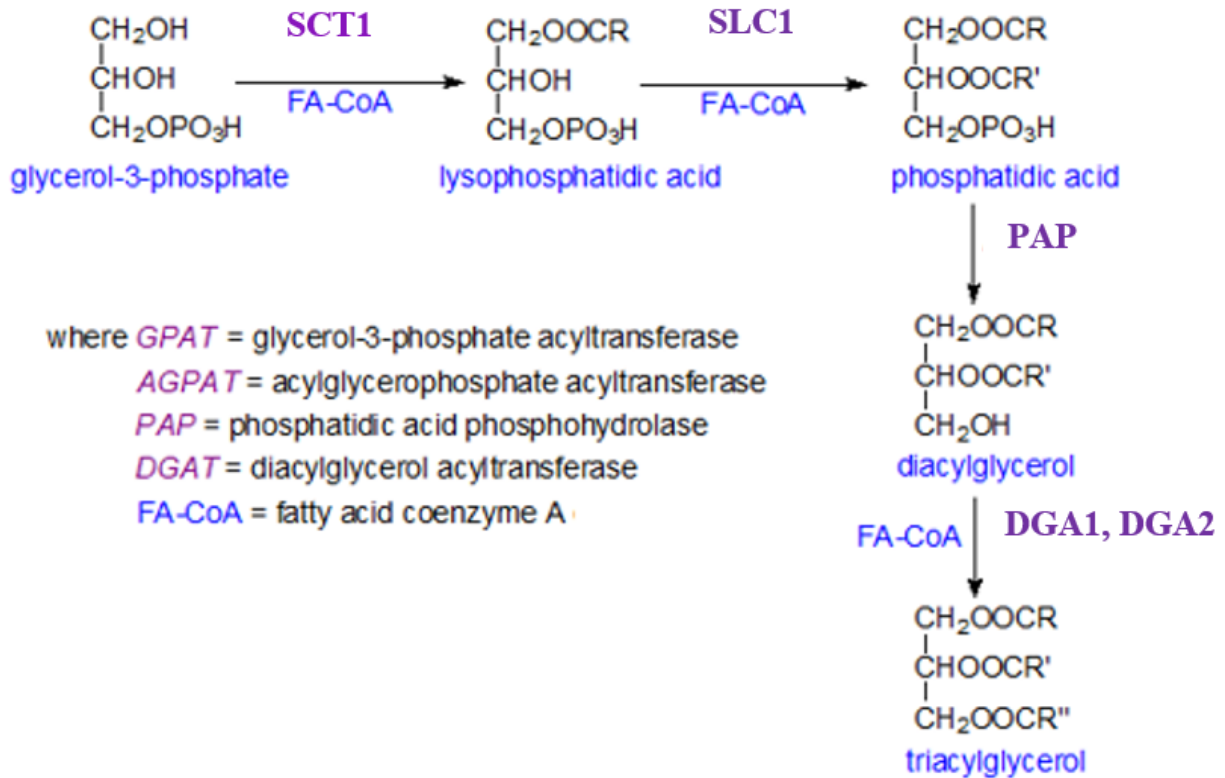


Figure 10 : Représentation chimique de la synthèse des TAGs dans la voie de Kennedy
 Source : <http://lipidhome.co.uk/lipids/simple/tag2/index.htm>

2.2.3. Biogenèse des corps lipidiques

La formation des corps lipidiques (LD) dépend uniquement de la synthèse de lipides neutres, TAG et SE (Sandager et al., 2002). La structure de base des LDs de cellule eucaryote, est composée d'un cœur hydrophobe et d'une monocouche de phospholipides (Fig. 11). Les lipides neutres les plus importants dans ce cœur sont: TAG et SE, mais d'autres lipides hydrophobes tels que les squalènes peuvent être présents selon les conditions de culture (Spanova et al., 2012). La plupart des mécanismes de biosynthèses des TAGs et SEs ont été mis en évidence dans *S. cerevisiae*. Dans les cellules de cette levure cultivées dans des conditions normales de laboratoire avec du glucose comme source de carbone, TAGs et SEs s'accumulent en proportion égales dans les LDs.

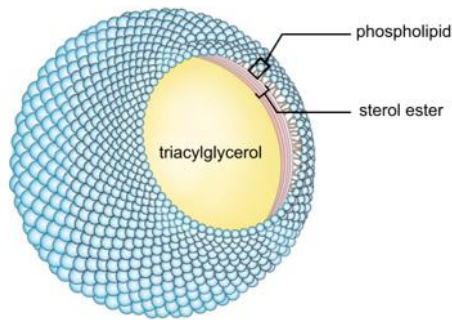


Figure 11 : Structure d'un corps lipidique

Source : Wang et al. (2014).

La taille, le nombre et la distribution des LDs varient sous différentes conditions physiologiques, indiquant qu'ils sont régulés par des signaux physiologiques. En phase exponentielle, de petits LDs très mobiles se dispersent et se connectent à l'espace périnucléaire et corticale du réticulum endoplasmique (ER) (Wang et al., 2014). Les LDs entourent généralement l'espace périnucléaire de l'ER et se dilatent. Ils continuent de croître et deviennent encore plus proéminents pendant la phase stationnaire. Ils peuvent changer rapidement de taille et de contenu. Les cellules cultivées dans de l'acide oléique présentent des LDs encore plus proéminents, avec uniquement des TAGs (Connerth et al., 2010). Les LDs sont des structures dynamiques en interaction avec l'ER (Jacquier et al., 2011 ; Wolinski et al., 2011), les peroxysomes (Binns et al., 2006), ou les mitochondries (Pu et al., 2011).

Plusieurs modèles ont été utilisés pour expliquer la biogenèse des corps lipidiques (Walther et Farese, 2009), mais le modèle le plus usité part du principe que les SEs et TAGs synthétisés, s'accumulent entre deux feuillettes de la bicouche phospholipidiques de l'ER et y constituent une structure en forme de lentille qui s'étend vers la face cytosolique de l'ER pour y former des corps lipidiques. Ces corps entourés d'une monocouche restent associés à l'ER ou se décollent de l'ER lorsqu'ils atteignent une dimension critique (Fujimoto et Parton, 2011; Walther et Farese, 2012). Ils peuvent être sous forme de structures autonomes. Jacquier et al. (2011) suggèrent que les LDs s'associent à l'ER au travers des phospholipides. Au cours de la croissance des LDs, certaines enzymes impliquées dans la synthèse des TAGs semblent être localisées dans les corps lipidiques, suggérant, que les lipides neutres ne sont pas uniquement générés dans l'ER (Wilfling et al., 2013). Czabany et al. (2008) ont montré que les enzymes connues du métabolisme des lipides, Dga1p, Lro1p, Are1p et Are2p, sont indispensables à la formation des corps lipidiques chez *S. cerevisiae* (Fig. 12).

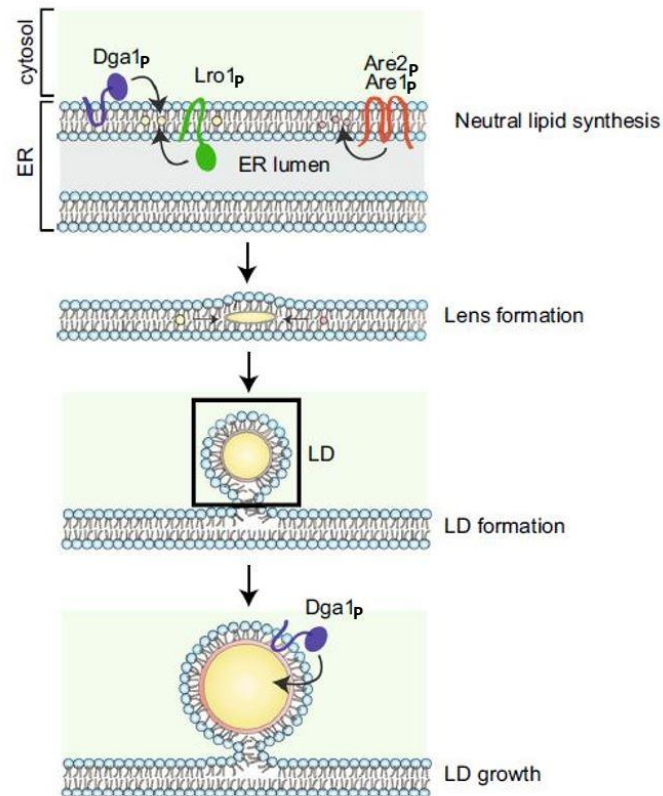


Figure 12 : Modèle simplifié de la formation et de la croissance des LDs
 Are1 et Are2 catalysent la synthèse des esters de stérols (SE), Dga1p et Lro1 catalysent la synthèse des triacylglycérols (TAGs). Les lipides neutres s'accumulent dans la bicouche de l'ER et une forme « lentille » apparaît. Les LDs naissants bourgeonnent vers le cytoplasme et croissent en recrutant Dga1p à leur surface pour la synthèse des TAGs.
 Source : Wang (2015).

Toutefois, le rôle de ces enzymes a été plus amplement étudié au cours de la synthèse des lipides neutres. Are1p et Are2p sont des enzymes exclusivement retrouvées dans le réticulum endoplasmique tandis que Dga1p a deux segments transmembranaires, permettant sa localisation à la fois sur la bicouche de l'ER et sur la monocouche des LDs. Lro1p est aussi une enzyme localisée dans l'ER et impliquée dans la synthèse des TAGs (Choudhary et al., 2011).

En fait, une hypothèse liée aux mouvements de Dga1p entre l'ER et LDs, lors de la formation des TAGs a été suggérée par Markgraf et al. (2014). Selon cette hypothèse, Dga1p quitterait l'ER pour les LDs en croissance afin de convertir les diacylglycérols en TAGs, lorsque les cellules sont en fin de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire. Elle reviendrait ensuite vers l'ER, lorsque le niveau de TAGs dans les LDs est suffisamment réduit.

D'autres études proposent un nouveau modèle structural de corps lipidiques suggérant qu'en dessous de 18°C, un coeur liquide constitué de TAG est entouré de SEs partiellement ordonnés

et recouverts d'une monocouche de phospholipides dans laquelle une faible quantité de protéines est incorporée (Spanova et al., 2012).

2.2.4. Rôle des acyltransférases

2.2.4.1. Les familles de ces enzymes et les gènes connus chez les levures

Les enzymes impliquées dans la conversion des DAGs en TAGs jouent un rôle important dans l'accumulation des lipides. Comme nous l'avons vu, la synthèse de TAGs se fait par une réaction dépendante d'acyl-CoA, catalysée par l'acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférase (DGAT) et/ou une réaction indépendante d'acyl-CoA, catalysée par une phospholipide:diacylglycérol acyltransférase (PDAT), Lro1p (Czabany et al., 2007). Des gènes codant des DGAT (EC 2.3.1.20) sont présents dans les organismes eucaryotes, y compris les plantes, les animaux et les champignons (Gong et al., 2013). Ces enzymes catalysent la réaction d'acylation finale qui convertit le diacylglycérol (DGA) en TAG (Grum-Grzhimaylo et al., 2016). La protéine exprimant l'activité PDAT, Lro1p, a à la fois une activité de phospholipase et d'acyltransférase. Elle intervient dans l'estérification des DAGs, en utilisant le groupe sn-2 des phospholipides en tant que donneur d'acyle (Dahlqvist et al. 2000) mais ne peut pas synthétiser les esters de stéryl (Oelkers et al. 2000).

Trois familles de DGAT ont été reportées chez les levures : DGAT1, DGAT2 et DGAT3. Aucune structure tridimensionnelle n'est disponible pour ces DGATs (Misra et al., 2013 ; Caldo et al., 2015). DGAT1 identifiée à l'origine par homologie de séquence avec l'acyl-CoA/cholestérol acyltransférase (ACAT), qui catalyse l'estérification du stérol chez les mammifères (Cases et al., 1998), fait partie de la famille des protéines membranaires O-acyltransférases (MBOAT). Les membres de cette famille catalysent le transfert des acides gras vers des groupes hydroxydes ou thiols des lipides ou des protéines (Hofmann, 2000). Ils ne catalysent pas la synthèse des esters de cholestérol. DGAT1 est absente dans *S. cerevisiae* mais présente dans *Y. lipolytica* (Oelkers et al., 2002 ; Beopoulos et al., 2012). L'activité catalytique de l'enzyme DGAT1 est localisée dans sa partie C-terminale alors que l'extrémité N-terminale contient des motifs conservés d'arginines, connus pour leur implication dans la localisation subcellulaire de certaines protéines membranaires (Michelsen et al., 2005).

DGAT2, isolée pour la première fois du champignon oléagineux *Mortierella ramanniana*, fait partie de la famille des monoacylglycérol acyltransférases et wax esters synthases (Yen et al., 2008 ; Cases et al., 1998). L'activité catalytique de l'enzyme DGAT2 est due aux motifs HPHC

présents dans cette enzyme (Liu et al., 2012). DGAT3 est une acyltransférase soluble isolée dans une fraction du cytosol des cotylédons d'arachide (Saha et al., 2006).

DGAT1 et DGAT2 sont localisées dans le réticulum endoplasmique et les corps lipidiques. Elles ne présentent pas de séquences homologues. De nombreuses études ont montré que DGAT2 est l'enzyme la plus efficace pour la synthèse des TAGs (Czabany et al., 2007 ; Zhang L. et al., 2018).

Les premiers gènes classés comme membre de la famille DGAT1, ont été identifiés par la similarité des séquences de leurs enzymes avec les enzymes ACAT, mais ils codent des protéines possédant une activité DGAT (Yen et al., 2008). Le gène DGA1 de *S. cerevisiae* ou *Y. lipolytica* ne présente pas d'homologie de séquence avec DGAT1 ou ACAT1/2 et code une diacylglycérol acyltransférase de type 2 (DGAT2). Le gène DGA2, homologue du gène DGAT1 des plantes et correspondant au gène ARE2 de *S. cerevisiae*, code une diacylglycérol acyltransférase de type 1 (DGAT1). Les enzymes DGAT de *R. toruloides* appartenant à la famille DGAT2 jouent un rôle plus important dans l'accumulation des lipides que celles appartenant à la famille DGAT1 (Wang et al., 2016d).

Dans la levure non-oléagineuse *S. cerevisiae* et celle oléagineuse *Y. lipolytica*, le stockage des lipides neutres (TAG et SE) est assuré par quatre acyltransférases (Wang, 2015). La levure *S. cerevisiae* possède deux gènes ARE1 et ARE2 exprimant respectivement des acyl-CoA:cholestérol acyltransférases Are1p et Are2p (Yu et al., 1996) impliquées dans la synthèse des esters de stérol (SE) alors que *Y. lipolytica* n'en possède qu'un seul, ARE1. Les SEs représentent 50% des lipides de stockage chez *S. cerevisiae* (Daum et al., 1998) alors qu'elles sont en faible proportion dans *Y. lipolytica*, 2 à 5% (Mlickova et al., 2004). Le substrat préféré de Are2p est l'ergostérol, tandis que Are1p synthétise des esters de lanostérol (Zweytick et al., 2000). La plus grande activité de synthèse des SEs est assurée par Are2p alors que Are1p semble n'être activée que dans des conditions d'anaérobies. Ces deux enzymes peuvent contribuer dans une certaine mesure et avec une faible efficacité à la synthèse des TAGs résiduels dans des cellules dépourvues de Dga1p et Lro1p, mais la synthèse des TAGs est principalement réalisée par Dga1p ou Lro1p. L'enzyme Are2p, en particulier, est capable d'une activité DGAT mise en évidence en condition *in vitro* (Oelkers et al., 2002). Toutefois, l'acyltransférase Are1p de *Y. lipolytica* n'est pas impliquée dans la synthèse des TAGs (Beopoulos et al., 2012).

La levure *S. cerevisiae* possède un seul gène DGA1 dont l'enzyme Dga1p est responsable de l'activité majoritaire de synthèse des TAGs alors que *Y. lipolytica* possède deux gènes, DGA1

et DGA2, exprimant respectivement les enzymes Dga1p et Dga2p. Ces enzymes utilisent un acyl-CoA comme donneur d'acyle et 1,2-sn-diacylglycerol comme accepteur d'acyle.

Dga1p et Lro1p ont des fonctions variables sous différentes conditions de croissance. L'activité de Lro1p est plus importante en phase exponentielle, alors que la contribution de Dga1p à la synthèse des TAGs, semble croître durant la croissance et est significative en phase stationnaire (Oelkers et al., 2002, Beopoulos et al., 2009). L'enzyme Lro1p catalyse le transfert des acides gras des phospholipides vers les DAGs (Choudhary et al., 2011). Les donneurs d'acyle préférés de cette enzyme sont les phospholipides, PC et PE, suggérant que le rôle majeur de Lro1p se trouve dans le remodelage des phospholipides membranaires (Kohlwein, 2010). La surexpression du gène natif LRO1 de *Y. lipolytica* rétablit l'accumulation de TAG dans cette levure (Beopoulos et al., 2014).

2.2.4.2. Effets connus de la surexpression de DGA1 et/ou DGA2

Les stratégies principalement axées sur les voies de biosynthèse des TAG dans le but d'augmenter la production de lipide regroupent : la surexpression et la disruption de gène.

Le terme "surexpression" prédomine dans les études faites sur les organismes unicellulaires, impliquant une expression accrue au-delà d'une certaine norme, après identification des niveaux d'expression du modèle normal. L'approche génétique classique pour explorer les voies biologiques commence généralement par l'identification de mutations capables de provoquer un phénotype d'intérêt. La surexpression d'un gène endogène peut induire des phénotypes mutants, fournissant aux manipulateurs un outil de comparaison avec les phénotypes natifs.

Cependant, on ne peut supposer à l'avance, que l'expression accrue d'un gène endogène puisse perturber une cellule ou un organisme, mais les phénotypes provoqués par cette surexpression abondent (Prelich, 2012). Plusieurs études ont porté sur le rôle des gènes DGA1 et DGA2 du métabolisme des lipides de *Y. lipolytica*. Selon Wilfling et al. (2013), le gène DGA2 localisé dans le réticulum endoplasmique est responsable de la synthèse des TAGs dans les corps lipidiques nouvellement formés alors que DGA1 localisé dans la membrane de ces mêmes corps est responsable à la fois de l'accumulation des TAGs et l'augmentation de la taille des corps lipidiques.

La surexpression de ACC1 et de DGA1 dans *Y. lipolytica* fait croître le pourcentage total de lipides de 18 à 61% (Tai et Stephanopoulos, 2012). La surexpression des gènes natifs DGA2 et GPD1 de *Y. lipolytica* couplée à la disruption de six gènes POX (POX1-6) et de TGL4 accroît le contenu en lipides qui passe de 18 à 55% (Sagnak et al., 2018). Rappelons que TGL4 de *Y. lipolytica* est positivement régulée par TGL3 (lipase primaire), connue pour ne posséder aucune

activité lipase du fait de l'absence d'un motif clé d'acide aminé spécifique à l'activité des lipases (Dulermo et al., 2013).

Des études menées par Friedlander et collègues (Friedlander et al. 2016) sur la surexpression de gène natif, DGA1 ou DGA2, dans *Y. lipolytica*, ont montré que la surexpression de DGA2 accroît la production de lipide de 65% comparativement à celle du gène DGA1. Ces mêmes auteurs, ont surexprimé le gène endogène DGA2 de *Y. lipolytica* dans la souche sauvage NS125 de *Y. lipolytica* dans laquelle le gène endogène DGA1 de cette levure avait été préalablement surexprimé. Ils ont conclu que DGA2 a un effet positif sur la production de lipides lorsqu'il est combiné à DGA1 et aussi que DGA2 surexprimé dans la souche sauvage de *Y. lipolytica* devient un facteur limitant pour la production de lipide lorsque l'activité de DGA1 est abondante dans cette levure.

Plusieurs protéines sont connues pour leur rôle régulateur dans la conversion des sources de carbone en TAG: enzyme malique (ME), ATP citrate lyase (ACL), acétyl-CoA carboxylase (ACC), glycéron-phosphate O-acyltransférase. (SCT), 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase (SLC1), stéaroyl-CoA désaturase (SCD) et phospholipide: diacylglycérol acyltransférase (LRO).

Dulermo et Nicaud ont réussi à doubler la production de lipides, de *Y. lipolytica*, en surexprimant le glycérol-3-P déshydrogénase (GPD1) et en disruptant l'isoforme du glycérol-3-P déshydrogénase, GUT2, chez une souche déficiente en β -oxydation (ApoX1-6) (Dulermo et Nicaud, 2011). Qiao et ses collègues ont été en mesure de multiplier par cinq la production de lipides, chez *Y. lipolytica*, en surexprimant la désaturase delta-9 stéaroyl-CoA (SCD) en plus du gène ACC1 et DGA1 (Qiao et al., 2015). Zhang et al. (2016) ont réussi à obtenir une production de lipides de 89,4 g/L, chez *R. toruloides*, grâce à la surexpression de la stéaroyl-CoA désaturase (SCD). L'expression simultanée des gènes SCD, ACC et DGA1 dans une souche modifiée de *Y. lipolytica* a généré 55 g/L de lipides. De plus, la souche modifiée présentait également plusieurs phénotypes favorables, notamment une croissance rapide et une tolérance élevée aux sucres. Pour aller plus loin, ce groupe a mis au point cinq voies cytosoliques d'acétyl-CoA dans *Y. lipolytica* (Xu et al., 2016). La souche portant la voie d'acétyl-CoA (carnitine acétyltransférase, Cat2) a été la plus performante avec un poids cellulaire sec de 91,6 g/L et une production de lipides de 66,4 g/L. Pour augmenter la production de lipides chez *Y. lipolytica*, Friedlander et al. (2016) ont coexprimé DGA1 de *R. toruloides* et DGA2 de *Claviceps purpurea*, dans une souche sans activité TLG3, une lipase intracellulaire responsable de la dégradation des TAG, ce qui a permis d'obtenir 85 g/L de lipide.

2.3. La remobilisation des lipides : TGL et β -oxydation

Le renouvellement des lipides accumulés se produit vers la fin de la phase stationnaire pour faire face à la pénurie de sources externes de carbone et à des fins de maintenance de l'intégrité des cellules (Makri et al., 2010). Ce renouvellement peut se faire par l'intermédiaire des lipases intracellulaires et/ou par catabolisme via la β -oxydation.

2.3.1. Triacylglycérol lipases

Une théorie liée au mécanisme de consommation des lipides neutres, en particulier des TAGs a été mise en évidence dans *S. cerevisiae* par Markgraf et collaborateurs (Markgraf et al., 2014). Selon cette théorie (Fig. 13), les TAGs sont d'abord hydrolysés en DAG et acides gras par la lipase Tgl3p, dans des cellules en fin de stade stationnaire et chez lesquelles la croissance a repris. Ensuite l'enzyme Ice2p, protéine membranaire de l'ER disposant d'un domaine cytoplasmique interagissant avec les LDs, intervient dans la réorientation des DAGs issus des premières phases de dégradation de TAG, depuis les LDs vers l'ER. Enfin, ces DAGs sont utilisés par l'enzyme Dgk1p et la voie de Kennedy pour la synthèse des phospholipides. Ce mécanisme empêche ainsi une accumulation toxique des DAGs.

Les lipases (E.C.3.1.1.3) sont des sous-classes d'hydrolases définies comme étant des triacylglycérol acylhydrolases. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons esters, des tri-, di-, et monoacylglycérol des longues chaînes d'acides gras, en acide gras et glycérol (Fickers et al., 2011).

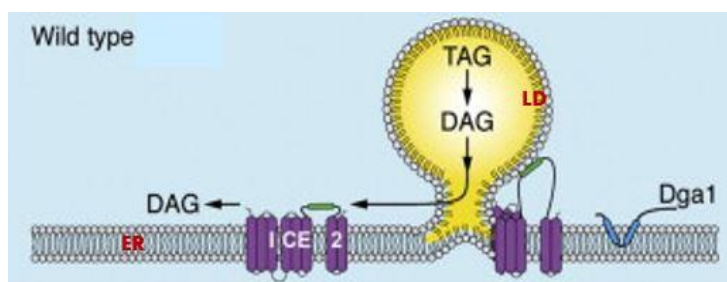


Figure 13 : Redirection des DAGs des corps lipidiques vers le réticulum endoplasmique pour la synthèse des phospholipides

Source : Modèle adapté de Markgraf et al. (2014).

La première étape du catabolisme, chez *Y. lipolytica*, implique l'hydrolyse des TAGs en acide gras et glycérol par les lipases (Fickers et al., 2005). Cette levure produit plusieurs lipases, incluant des enzymes intracellulaires, rattachées aux cellules, et des lipases extracellulaires

(Lopes et al., 2008). Les lipases extracellulaires permettent l'assimilation des molécules constitutives des TAGs contenus dans le milieu extérieur. Middelhoven et al. (1991) ont démontré que la levure *B. adenivorans* est capable de dégrader les triacylglycérols, du Tween 20 et des huiles. Avant assimilation de ces substrats, les liaisons esters sont hydrolysées par une seule lipase extracellulaire (Böer et al., 2005), Alip1p contrairement à *Y. lipolytica* chez qui plus de 10 lipases sont impliquées dans ce processus. Les triglycérides lipases (TGL) sont des enzymes intracellulaires. Ainsi, les TAGs stockés sont mobilisés par les lipases Tgl2p, Tgl3p, Tgl4p, Tgl5p dans *S. cerevisiae* (Athenstaedt et Daum, 2003, 2005) et par les lipases Tgl3 et Tgl4, dans *Y. lipolytica* (Dulermo et al., 2013). Ces lipases dégradent les TAGs en DAG et acides gras libres.

Les lipases contiennent le motif (G/A) XSXG (Ham et al., 2010). La sérine de ce motif est essentielle pour l'activité des lipases Tgl2 et Tgl4 de *S. cerevisiae* (Kurat et al., 2006). Les lipases peuvent avoir une activité multifonctionnelle. C'est le cas de la lipase Tgl4p de *S. cerevisiae* qui hydrolyse aussi bien les TAGs que les SEs. Il a été identifié pour cette lipase, la présence du motif lipase très conservé (GXSXG) (Debelyy et al., 2011), du motif phospholipase GXGXXG et (G/A) XGXXG avec un domaine A2 dont l'activité est réalisée en absence de Ca^{2+} et des activités lysophospholipide acyltransférase (Rajakumari et Daum, 2010) d'hydrolyse d'esters de stérol. Les lipases Tgl3p et Tgl5p possèdent aussi le motif GXSXG.

La Tgl4p de *Y. lipolytica* contient le motif, (G/A) XSXG, typique des hydrolases sérine, mais la Tgl3 n'en contient pas (Dulermo et al., 2013). Dans la Tgl3, la sérine, qui s'est avérée essentielle pour l'activité des lipase Tgl2p et Tgl4p de *S. cerevisiae*, est remplacée par une lysine. La présence de l'acide aminé lysine dans les lipases est inhabituelle. Ce remplacement n'est pas exclusif à *Y. lipolytica*, on le trouve également dans la lipase intracellulaire Ptl1 de *S. pombe* (Yazawa et al., 2012) et l'homologue de la Tgl3 de *Y. lipolytica* dans la levure oléagineuse apparentée *Candida galli*. Dulermo et al. (2013) concluent que la lipase Tgl4p de *Y. lipolytica* assure l'activité principale de dégradation des TAG mais que Tgl3p, de cette même levure, régule positivement l'activité de la Tgl4p sans toutefois assumer une fonction de lipase. D'autre part, dans *Y. lipolytica*, des estérases agissent sur les esters de stérol et libèrent du stérol et des acides gras libres (Beopoulos et al., 2009).

2.3.2. La dégradation par β -oxydation

Les enzymes du peroxyosome interviennent aussi dans la mobilisation des lipides non-polaires (Thoms et al., 2011 ; Debelyy et al., 2011). Le processus de dégradation des acides gras via la

voie de la β -oxydation dans *Y. lipolytica*, se présente en quatre étapes dans les peroxysomes, (Fig. 14).

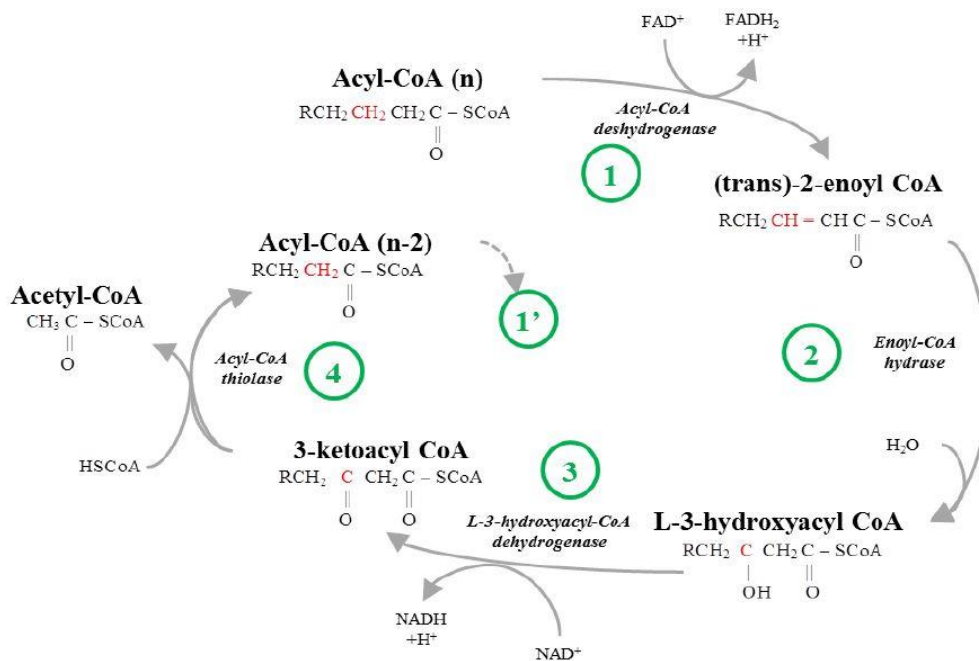


Figure 14 : La β -oxydation des acides gras
Source : Paselk et al. (2006).

Six acyl-CoA oxydases différentes (Aox1-6, codées par les gènes *POX1* à *POX6*) catalysent la première et la dernière étape limitante de la β -oxydation. Aox2p est très active et hautement spécifique aux acides gras à longue chaîne (Luo et al., 2002), tandis qu'Aox3p agit de préférence sur les acides gras à chaîne courte (Luo et al., 2000). Luo et al. (2000) et Thevenieau (2006) ont aussi identifié l'implication de Aox1p et Aox6p dans la dégradation des acides dicarboxyliques (DCA). Les protéines (Aox) sont assemblées en complexe acyl-CoA oxydase dans le cytosol de *Y. lipolytica* avant d'être importées dans les peroxysomes, sous une forme hétéropentamère. Aox2p et Aox3p jouent un rôle clé dans ce processus (Titorenko et al., 2002) et sont spécifiques aux acides gras à longues chaînes (Beopoulos et al., 2013). Les protéines Aox jouent également un rôle majeur dans la division peroxysomale. Les deuxièmes et troisièmes étapes de la β -oxydation sont catalysées par une enzyme multifonctionnelle codée par le gène *MFE*, qui présente des activités hydratase et déshydrogénase. La quatrième étape est catalysée par la 3-cétoacyl-CoA-thiolase codée par le gène *POT1*. La dernière étape de la β -oxydation est catalysée par une acétoacétyl-CoA thiolase, d'origine peroxysomale, codée par *PAT1* en association avec la thiolase codée par *POT1*.

2.4. Conditions d'induction de la production de lipides

La production de lipides chez les organismes oléagineux est affectée par le ratio molaire carbone sur azote noté C:N, l'aération, les sels inorganiques, le type et la complexité des sources de carbone utilisées, le système de culture adopté (flasques, batch, fed-batch etc) et le milieu de culture. Les levures oléagineuses génèrent des réserves de lipides lorsque le carbone est en excès, mais d'autres nutriments clés tels que l'azote, le phosphore, le soufre et le zinc sont épuisés (Wu et al., 2011). La courbe standard d'accumulation des lipides (Fig. 15), montre qu'à la fin de la consommation de l'azote, le glucose en excès est utilisé pour la production de biomasse et l'accumulation des lipides.

Ainsi, une relation directe entre le ratio C:N et l'accumulation des lipides a été mise en évidence. Par exemple la levure *Rhodotorula glutinis* produit plus de lipides lorsque le ratio C:N atteint 350 mais au-delà de ce seuil, la croissance est inhibée (Beopoulos et al., 2009b). *Lipomyces starkeyi* cultivée dans un milieu à base de boues d'épuration supplémentée avec du glucose montre 68% d'accumulation de lipides à avec un ratio C:N de 150, et une teneur en lipides de 40% avec un ratio C:N de 60 (Angerbauer et al., 2008).

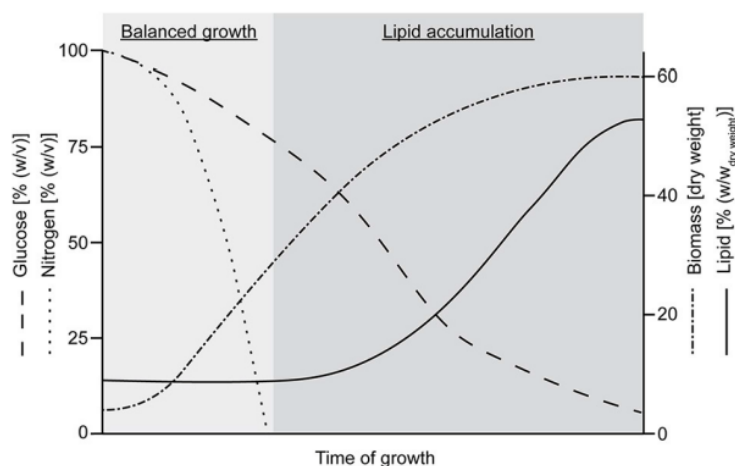


Figure 15 : Courbe standard d'accumulation des lipides par les organismes oléagineux
Source : Oschenreither et al. (2016).

L'aération des cultures peut accélérer la biodégradation des lipides synthétisés (Martins et al., 2012) ou l'oxydation des acides gras libres en acides gras insaturés (Sha, 2013). D'autre part, une forte aération peut intensifier la dégradation des lipides en augmentant l'activité de l'acyl-

CoA oxydase (Papanikolaou et al., 2007). De plus, le taux de consommation d'oxygène décroît au cours de la transition de la croissance aux phases de production de lipides dans des souches transformées génétiquement (Blazeck et al., 2014).

L'effet du pH est tout aussi remarquable dans la production de lipides. En effet, une différence évidente en production de lipide a été identifiée chez *Rhodotorula glutinis* cultivée à différents pH. On reporte ainsi chez cette levure une production de 12% de lipides à pH 3, 48% à pH 5, 44% à pH 6 (Johnson et al. 1992).

Curran et collègues (Curran et al., 2000) se sont penchés sur une composante des milieux d'accumulation des lipides. Lors d'une expérience en milieu YNB (Yeast Nitrogen Base) utilisant la levure *S. cerevisiae*, ils ont remarqué que le dioctylphtalate contenu dans le milieu YNB préparé au laboratoire est responsable de la proportion élevée d'acide gras insaturés relevée chez *S. cerevisiae* (73%) comparativement au milieu YNB (YNB Difco sans acide aminé) commercialisé (42%).

Les lipides sont accumulés en condition d'excès du flux de carbones et de limitation d'un ou de plusieurs nutriments essentiels pour la prolifération cellulaire comme l'azote, le phosphore, le zinc, le fer ou le magnésium. Ces conditions augmentent la production de lipides du fait que, presque aucun flux de carbone n'est redirigé vers la formation de biomasse (Huang et Zhang, 2011). Cependant, la conséquence de cette stratégie est qu'une faible production de biomasse réduit aussi l'ensemble de la production de lipides (Dey et Maiti, 2013). La limitation d'azote est très importante dans la genèse des lipides. Néanmoins, en cas d'épuisement prolongé des nutriments, une perte possible de l'activité physiologique des cellules peut survenir (Granger et al., 1993). Au cours de la croissance, l'azote est nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines pendant que le flux de carbone est réparti entre les processus énergétiques et anaboliques générant des hydrates de carbone, des lipides, des acides nucléiques et des protéines. Quand l'azote devient limitant, la croissance ralentit et la synthèse des protéines et des acides nucléiques semblent s'interrompre. Dans les espèces oléagineuses, le carbone en excès est canalisé dans la voie de synthèse des lipides, entraînant une accumulation intracellulaire de TAGs dans les corps lipidiques (Papanikolaou et al., 2001 ; Amaretti et al. ; 2010).

Dans les levures oléagineuses, la limitation en azote active l'adénosine monophosphate-déaminase (AMP-déaminase) (Ratledge et Wynn, 2002), qui permet la fourniture d'ammonium aux cellules sans azote. En conséquence, la concentration des AMP dans la mitochondrie diminue (Saxena et al., 1998), conduisant à une baisse de l'activité de l'isocitrate

déshydrogénase (ICDH). Le cycle de l'acide citrique (TCA) est bloqué au niveau de l'isocitrate. L'aconitase intervient dans l'accumulation du citrate dans la mitochondrie. L'excès de citrate pourra alors servir de précurseur de l'acétyl-CoA pour la synthèse des AG et/ou être excrété.

2.5. Variation de la production de lipides en fonction de la température

2.5.1. Stratégies d'adaptation des eucaryotes aux variations de température

La membrane des cellules eucaryotes représente une limite sélective et dynamique entre les cellules et le milieu externe et entre différents compartiments intracellulaires. En général, les cellules ajustent la proportion d'acide gras saturés et insaturés de leur bicouche lipidique en réponse aux stress environnementaux (Romero et al., 2018).

Les changements de température affectent presque tous les processus cellulaires et biochimiques, et induisent des réponses adaptatives pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Par exemple, l'élévation ou la baisse de la température augmentent ou diminuent la fluidité de la membrane plasmique (Ma et al., 2015).

Les changements de température qui s'opèrent en dehors de la plage optimale tolérable pour la croissance d'une cellule eucaryote induisent des anomalies dans plusieurs processus biologiques. Deux types de processus biologiques soumis à l'effet de la température sont: les activités enzymatiques (Razavi et al., 2017 ; Singh et al., 2016) et la fluidité des membranes cellulaires (Hassan et al., 2016). La modification du degré de saturation et celle de la longueur moyenne des acides gras (Rusell, 2008) sont utiles pour maintenir la fluidité membranaire à un niveau optimal favorable aux activités biologiques : les désaturases de lipides convertissent les acides gras saturés en acides gras insaturés en réponse aux changements de températures (de Mendoza et al., 2014 ; Holthuis et Menon, 2014).

Les doubles liaisons dans les lipides génèrent des repliements dans la chaîne hydrocarbonées acyle des acides gras et ainsi accroissent la fluidité de la membrane. Ce processus fondamental de maintien de la fluidité membranaire est appelée adaptation homéovisqueuse (HVA) et se produit dans les eucaryotes, les bactéries et les archées (Shmeeda et al., 2002 ; Ma et al., 2015). Les acides gras insaturés à chaînes courtes induisent plus de lipides fluides que ceux saturés à chaînes longues (Puig-Castellvi et al., 2018).

Chez les levures, trois réponses possibles au changement de températures ont été rapportées pour la composition en acides gras : (1) la régulation de la longueur de la chaîne principale des acides gras, (2) le changement du degré d'insaturation des acides gras, (3) la régulation à la fois

de la longueur de la chaîne principale d'acide gras et du degré d'insaturation en étroite relation avec un intervalle de température donné.

La première réponse a été identifiée dans *S. cerevisiae*. Par exemple, la souche BG7FI de *S. cerevisiae* affiche un pourcentage très élevé d'acides gras à chaînes courtes (C6 à C14) quand elle est cultivée entre 20 et 30°C. De même la longueur de chaîne des acides gras dans cette souche diminue dans cette plage de température (Sinigaglia et al., 1993).

La seconde réponse est rapportée chez *R. toruloides*. Cette levure réagit à l'augmentation de la température en diminuant le degré d'insaturation de ces acides gras. Cependant, la variation du degré d'insaturation sous l'effet de la température n'est pas une réponse universelle chez les levures (Suutari et al., 1990). En effet, le pourcentage d'acide gras insaturés ne varie pas dans *Saccharomyces uvarum* à différentes températures de croissance (Torija et al., 2003).

La troisième réponse a été identifiée dans les levures *Candida utilis*, *Candida oleophila* et *L. starkeyi* (Suutari et al., 1990). En effet, dans ces trois levures, un changement de la longueur de la chaîne principale des acides gras s'observe en dessous de 20 à 26°C, tandis qu'une décroissance du degré d'insaturation des acides gras survient au-dessus de 20 à 26°C. De plus, dans *L. starkeyi*, le degré d'insaturation décroît de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Dans la levure oléagineuse *R. minuta* IIP-33 (Saxena et al., 1998), la synthèse de longues chaînes d'acides gras C₁₆, C₁₈, C_{18:1} et C_{18:2} est prédominante entre 30°C et 32°C alors que les courtes chaînes (C₇, C₈, C₉) sont prédominantes à 38°C. De même, le degré d'insaturation des acides gras est maximal à 32°C puis décroît à 38°C. Il a été supposé que cette décroissance du degré d'insaturation est due à la faible activité des désaturases à 38°C qui s'accompagne d'un accroissement des chaînes courtes saturées (C₇, C₉) dans les lipides produits.

Suutari et al. (1990) ont observé des variations des espèces d'acides gras, C_{16:0} (acide palmitique), C_{18:1} (acide oléique) et C_{18:2} (acide linoléique), dans le profil lipidique de *L. starkeyi*, *C. utilis* et *R. toruloides*, sous l'effet de la température. Dans ces trois levures, le niveau de l'acide palmitique augmente avec la température optimale de croissance tandis que celui de l'acide oléique décroît dans les levures *C. utilis* et *L. starkeyi*. D'autre part, le niveau de C_{18:2} augmente avec les températures supérieures à 20°C mais décroît à 30°C. Une corrélation positive a été reportée entre l'augmentation de la teneur en acide linoléique et la température, chez *C. utilis*, pour des températures de croissance supérieures à 20°C. Néanmoins entre 20 et 30°C, cette corrélation est négative.

Une variation de la proportion de C_{18:1} par rapport à celle de C_{18:2}, sous l'effet de la température, a été aussi signalée. En effet, chez *Zygosaccharomyces rouxii*, la proportion de

C18:1 à 35°C est plus élevée que celle de C18:2 et le contraire est observé à 21°C (Golden et al., 1994).

L'adaptation à la température peut reposer sur d'autres molécules que les seuls acides gras.

Selon Puig-Castellvi et collaborateurs (2018), la cellule de levure ajuste la fluidité de sa membrane par une modification de la composition des différentes familles de lipides (acylglycérides, phospholipides, céramides) présentes plutôt qu'une modification de la longueur moyenne et du degré d'insaturation des différents acides gras correspondants. Ainsi ces auteurs ont repéré une proportion élevée de phosphatidylinositol, acide phosphatidique, phosphatidyléthanolamine, lysophosphatidyléthanolamine, lysophosphatidylcholine et céramides à 40°C. De 30 à 37°C par contre, ce sont les concentrations du lysophospholipide, phosphatidylcholine, esters de cholestérol qui étaient les plus élevées. Toutefois, la longueur moyenne de chaîne de phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, lysophosphatidyléthanolamine et acylglycérides croît lorsque la température augmente alors que celle de l'acide phosphatidique, phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, et triacylglycéride décroît. Les phosphocholines, glycérophosphocholine et cholines présentent dans la membrane s'accumulent aussi avec l'augmentation de la température (30 à 40°C).

Les stérols sont à la fois des molécules de signalisation et des lipides structuraux qui affectent fortement la fluidité et la perméabilité membranaire. Daum et al. (1998) ont montré que les cellules de levures ne sont pas viables sans stérols. Ce sont des composés qui s'intercalent entre les chaînes d'acides gras, stabilisent et renforcent la bicouche lipidique des membranes. Ils favorisent la condensation des lipides qui sont dans un état liquide-cristallin ainsi qu'une liquéfaction des lipides sous forme de gel (Gunde-Cimerman et al., 2014). Le passage de la phase liquide cristalline à celle de gel se fait lorsque la température décroît (Martinez et Morros, 1996).

Huang et al. (2012) rapportent également que les céramides peuvent promouvoir la survie cellulaire dans des conditions extrêmes de stress thermique.

Zhang et al. (2018) ont identifié un gène de résistance aux températures élevées, *SPT23*, chez la levure *P. pastoris*. Ils ont aussi prouvé que ce gène joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie lipidique. Yu et al. (2012a) ont prouvé que Spt23p régule la transcription des désaturases d'acides gras. Notons ici, que l'expression du gène *OLE1*, qui code la désaturase $\Delta 9$ dans *S. cerevisiae*, est hautement régulée par les acides gras (Choi et al., 1996), l'oxygène

(Nakagawa et al., 2001), la température et les ions (Romero et al., 2018). OLE1 est aussi régulé par les facteurs de transcriptions Spt23 et Mag2. Ces facteurs sont activés suite à l'altération de la composition en acide gras des membranes liée à une baisse de la température, de la disponibilité en oxygène ou des acides gras insaturés (Jiang et al., 2001).

D'autres paramètres comme la phase de croissance, la présence d'oxygène et les conditions de cultures et de métabolisme peuvent influencer sur la réponse au stress thermique. Par exemple, les cellules de *S. cerevisiae* en phase stationnaire sont plus résistantes à l'élévation de la température que celles en phase exponentielle (Steels et al., 1994). Plusieurs études ont montré que les cellules de *S. cerevisiae*, à capacité respiratoire élevée et cultivées sur du carbone fermentescible sont plus résistantes à l'élévation de la température que celles cultivées sur du carbone non-fermentescible (Hou et al., 1991 ; Sanchez et al., 1992 ; Elliot et Fletcher, 1993).

2.5.2 Effet de la température sur la quantité de lipides produits chez les levures oléagineuses

L'effet de la température sur la quantité de lipide totale accumulée par les cellules est variable en fonction de la souche de levure oléagineuse. Les températures trop élevées ou trop basses influencent la croissance cellulaire et la production de lipides (Sha, 2013).

L'effet de la température sur la production de lipides a été étudiée chez *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-SP314, *Rhodosporidium glutinis* CGMCC 2258 et *Rhodosporidium kratochvilovae* SY89. Dans la première souche, la quantité maximale de lipides produite est obtenue à 28°C (13.9 g/L) et la quantité minimale à 25°C (10,8 g/L). Dans la seconde souche, la production de lipides à 24°C est plus élevée que celle à 30°C (Zhang et al., 2014). La troisième souche a été soumise à 20, 25, 30, 35 et 40°C et la production la plus élevée de lipides n'a été reportée qu'à 30°C (Jiru et al., 2017). De même, l'augmentation de la température de 30 à 35°C entraîne une baisse de la production de lipide des levures oléagineuses *Rhodosporidium* TJUWZ4 et *Cryptococcus* TJUWZ11. A 35°C, cette production est encore plus faible dans *Cryptococcus* TJUWZ11 comparativement à *Rhodosporidium* TJUWZ4. La production de lipide la plus élevée (0.19g/g) est identifiée chez *Rhodosporidium* TJUWZ4 à 30°C et chez *Cryptococcus* TJUWZ11 (0.12g/g) à 30°C (Wang et al., 2017). Chez *Y. lipolytica*, la production la plus élevée de lipides est identifiée pour cette levure à 28°C et la plus faible à 24 et 33°C (Papanikolaou et al., 2002).

3. *Blastobotrys adenivorans*

3.1. Taxonomie et souches connues

La levure *Blastobotrys adenivorans* est un organisme ascomycète, haploïde, non-pathogène (Wartmann et Kunze, 2000). C'est un organisme décrit pour la première fois par Middelhoven et al. (1984), qui ont isolé une souche de cette espèce du sol aux Pays-Bas et l'avaient nommé *Trichosporon adeninivorans*. La première souche décrite de cette espèce était la CBS8244^T. Cette souche affichait des activités biochimiques inhabituelles, incluant une capacité d'assimilation d'une large gamme d'amines, adénine et plusieurs autres composés puriques comme source unique d'énergie et de carbone. Une seconde souche, LS3 (PAR-4), ayant des caractéristiques similaires à la précédente a été isolée d'hydrolysats de bois en Sibérie (Gienow et al., 1990). D'autres souches ont été ensuite isolées d'ensilage de maïs à 25 ou 30°C aux Pays-Bas et de sols riches en humus en Afrique du Sud (Van der Walt et al., 1990). Un nouveau nom de genre, *Arxula* Van der Walt, M.T. Smith et Yamada, a été proposé pour la classification de toutes ces souches. Aucune reproduction sexuée n'est observée chez tous les représentants de ce nouveau genre proposé, montrant que toutes ces souches sont anamorphiques. Van der Walt et al. (1990) ont identifié tous les représentants du genre *Arxula* comme étant des ascomycètes arthroconidiales (présence de spores asexuées résultant de la fragmentation d'un hyphes segmenté en cellules simples) et xérotolérantes (organismes capables de supporter une pression osmotique élevée).

Lors de sa description, le genre *Arxula* comprenait deux espèces, l'espèce type du genre, *Arxula terrestre* (Van der Walt et Johanssen) et *Arxula adenivorans* (Middelhoven, Hoogkamer te-Niet and Kreger-van Rij). *Arxula terrestre* et *Arxula adenivorans* utilisent comme source d'énergie et de carbone, l'adénine (très lentement), l'acide urique, la butylamine, la pentylamine, la putrescine. Cependant, *A. terrestre*, contrairement à *A. adenivorans*, n'a aucune capacité de fermentation, n'assimile pas l'amidon soluble, le mélibiose, le mélézitose, la propylamine et l'hexylamine (Middelhoven et al., 1984).

La classification la plus récente de cette espèce a été faite par Kurtzmann et Robnett (2007). En effet, *Arxula adenivorans* (Tableau 8) a été classée dans le genre *Blastobotrys* après une comparaison phylogénétique détaillée avec d'autres espèces apparentées. Ce genre est constitué de 25 espèces anamorphes et téléomorphes. Comme nous le verrons dans le chapitre 1, une analyse récente menée au laboratoire a permis de reclassifier une souche de *B. adenivorans* en *Blastobotrys raffinosisfermentans* : la souche séquencée LS3.

Tableau 8 : Classification taxonomique de l'espèce *B. adenivorans*
D'après Kurtzmann et Robnett (2007)

Règne	Eucaryotes
Embranchement	<i>Champignon</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycètes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Genre	<i>Blastobotrys</i>
Espèce	<i>adenivorans</i>

Le génome de la souche LS3 de *B. raffinosifermentans* est constitué de quatre chromosomes, *Arad1A*, *Arad1B*, *Arad1C* et *Arad1D* de 1659397, 2016785, 3827910, et 4300524 nucléotides chacun, pour une taille totale de 11,8 Mb (Kunze et al., 2014). Avec 914 introns contenus dans 6116 gènes, *B. raffinosifermentans* est l'une des espèces hémiascomycètes les plus riches en introns.

B. raffinosifermentans est une levure très distante de *S. cerevisiae*. Sur l'arbre phylogénétique présenté en Fig. 16, cette levure se retrouve à côté de l'espèce *Y. lipolytica* mais possède 2520 protéines sur un total de 5147 protéines, qui n'ont pas d'orthologues dans cette espèce. De plus, le génome présente peu d'évènements de duplication de gènes (Kunze et al., 2014). La souche LS3 identifiée comme étant asexuée possède un locus MAT. Kunze et al. (2014) ont en effet identifié la présence du facteur de transcription *Mata1* (ARAD1D19294g, MTAL1), observé également chez *Y. lipolytica*. Elle ne dispose pas de *Mata2* (MATL2) contrairement à *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*. Son contenu en G+C d'environ 48,1% est similaire à celui de *Y. lipolytica* E150 (49,0%), mais significativement plus élevé que celui de *S. cerevisiae* S288c (38,3%) et de *Debaryomyces hansenii* CBS767 (36,3%). Cependant, la taille de son génome (11,8Mb) est inférieure à celle de *S. cerevisiae* S288c (12,1 Mb) et de *D. hansenii* CBS767 (12,2 Mb).

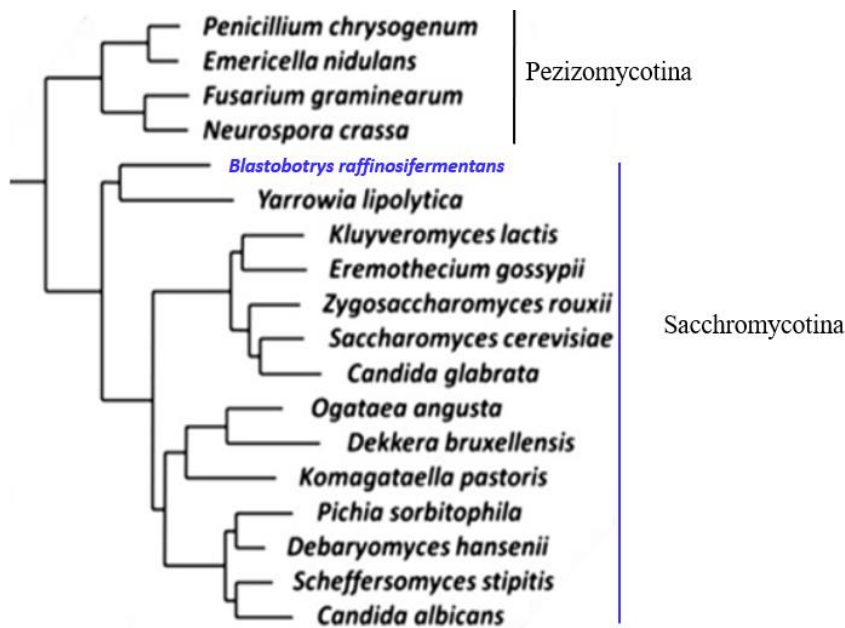


Figure 16 : Position phylogénétique de *B. raffinosisfermentans* au sein des ascomycètes
Source : d'après Kunze et al. (2014).

3.2. Physiologie

B. adenivorans et *B. raffinosisfermentans* peuvent assimiler rapidement la plupart des sucres, polyalcools et acides organiques exceptés le L-rhamnose, l'inuline, le lactose, le lactate et le méthanol. Plusieurs composés azotés, dont les acides aminés et les dérivés puriques, sont métabolisés comme unique source d'énergie, de carbone et d'azote. *B. raffinosisfermentans* peut aussi assimiler des n-alkylamines et des diamines. Elle peut également croître sur l'acide urique et l'acide tannique et dégrader l'amidon soluble (Middelhoven et al., 1991, 1992 ; Gienow et al., 1990 ; Yang et al., 2000). Cette espèce assimile également des dialcools, l'acide carboxylique, l'acide dicarboxylique, du n-butanol et d'autres composés analogues dépourvus d'azote. Elle dégrade certains phénols, hydroxybenzoates, acide tannique et est capable d'utiliser l'urotropine d'azote (Middelhoven et van Doesburg, 2007). *B. raffinosisfermentans* pousse dans des milieux de culture contenant 17,5% de NaCl (Hahn et al., 2006) et produit de la glucoamylase. Cette enzyme supporte des températures de 60 à 70°C et une plage de pH variant entre 4,0 et 5,5 (Büttner, 1991). Les cellules de la souche LS3 à 42°C, subissent une transition réversible de forme bourgeonnante vers des formes mycéliennes. Le bourgeonnement est rétabli lorsque la température de culture repasse en dessous de 42°C. Wartmann et al. (2002) ont identifié deux types de ¹glycosylation utiles à la production de protéines hétérologues chez cette espèce. Le type O-glycosylation identifié chez les formes levures et le type N-glycosylation

¹ La **glycosylation** est une réaction enzymatique consistant à lier de façon covalente un glucide à une chaîne peptidique, une protéine, un lipide ou d'autres molécules.

chez la forme levure et la forme mycélienne. L'expression du gène ADH de *Rhodococcus ruber* et *Rhodococcus erythropolis* ont permis d'utiliser cette levure comme catalyseur biologique de la synthèse des alcools chiraux. De même, *B. adenivorans* est utilisée comme donneur de gène et biosenseur dans la détection des œstrogènes, androgènes et glucocorticoïdes (Bischoff et al., 2017).

3.3. Une levure connue pour ses applications en biotechnologie

B. raffinosifermentans est très efficace dans la production de protéines recombinantes (Böer et al., 2009) du fait de ses excellentes caractéristiques de croissance dans des conditions de fermentations (Knoll et al., 2007). Elle est utilisée comme catalyseur biologique pour la synthèse de divers produits biotechnologiques tels que, l'interleukine (Böer et al., 2007b), le sérum albumine humaine, l'acide phytique phosphatase (Kaur et al., 2007), 1-(S)-phényléthanol (Giersberg et al., 2012) ou β -D-galactopyranoside (Rauter et al., 2013). Elle est aussi utilisée pour produire des aliments à faible teneur en purine (Jankowska et al., 2013b) et pour la détection d'activité oestrogénique dans des milieux aqueux variés (Kaiser et al., 2010). C'est aussi, un organisme donneur de gènes (Wartmann et Kunze, 2003).

La grande diversité des composés assimilés par cette levure indique la présence d'une multitude d'enzymes de dégradation. En effet, *B. raffinosifermentans* produit des enzymes hydrolytiques telles que les glucoamylases, invertases ou cellobiases, hydrolysant les di-, tri-, et polysaccharide. Elle secrète aussi des enzymes incluant des RNases, protéases, acides phosphatases, tréhalases, invertases, xylosidases, pectinases et phytases (Wartmann et Kunze, 2000). *B. raffinosifermentans* est capable de sécréter des niveaux élevés de phytase extracellulaire (Sano et al., 1999) et intracellulaire (Olstorpe et al., 2009), dans les milieux de culture contenant du phytate. Elle peut donc être utilisée dans l'alimentation animale. L'analyse de son génome a révélé la présence de presque tous les gènes nécessaires à la dégradation de la purine en CO₂ et NH₃ (Jankowska et al., 2013a).

La souche sibérienne LS3 de *B. raffinosifermentans* présente un dimorphisme dépendant de la température. Cette souche est sous forme levure à des températures inférieures à 42°C, pseudo-hyphes à 42°C et des mycéliums à 43°C et au-delà (Fig. 17).

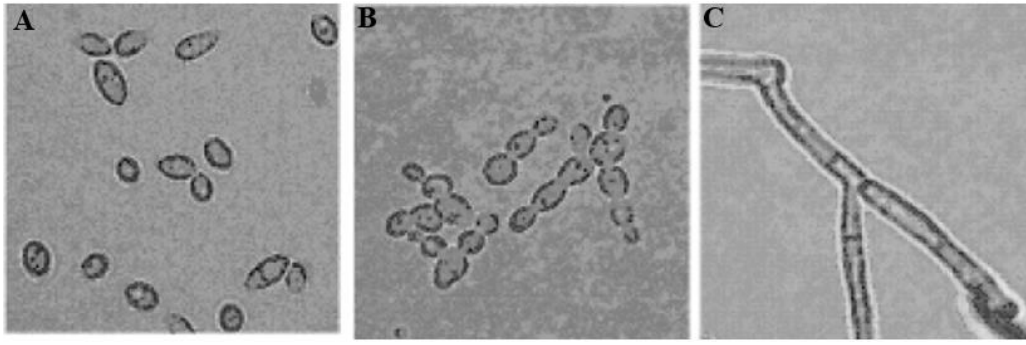


Figure 17 : Morphologie de la souche LS3 soumise à trois niveaux de températures LS3 cultivée sur un milieu YEPD à 30°C (A), 42°C (B) et 45°C (C).
Légende : Figure adaptée de Wartmann et Kunze (2003).

La capacité de cette souche à croître à des températures allant jusqu'à 48°C sans adaptation antérieures à des températures élevées (thermotolérance), présente un intérêt biotechnologique unique. En effet, sa capacité de croissance à des températures élevées, fait d'elle, une levure valorisable dans la saccharification et les fermentations simultanées. Cette souche survit aussi quelques heures à 55°C (Wartmann et al., 1995). L'aptitude au dimorphisme présente un avantage supplémentaire : les formes mycéliennes secrètent deux fois plus de protéines que les formes levures (Wartmann et al., 2000). *B. raffinosifermentans* est halotolérante (Yang et al., 2000) et affiche une croissance maximale entre pH 2,8 et 6,5. Elle supporte aussi un pH compris entre 2 et 10 (Stöckmann et al., 2014). Le passage de la forme levure à la forme hyphe chez d'autres levures oléagineuses peut aussi dépendre du pH, des sels d'ammonium ou de la création de conditions anaérobiques en milieu de culture. Par exemple, la souche W29 de *Y. lipolytica* est présente sous forme levure à un pH de 3 à 4 (milieu acide) tandis que la forme hyphe est observée à pH 7 (Ruiz-Herrera et Sentandreu, 2002).

3.4. Outils génétiques

Des outils génétiques ont été développés pour *B. raffinosifermentans*, permettant un certain nombre de manipulations génétiques. Le développement de ces outils est essentiellement dû aux travaux de l'équipe de Gotthard Kunze sur la souche LS3 (IPK, Gatersleben, Allemagne). Cette levure est considérée comme une plateforme attractive d'expression de protéines recombinantes. De ce fait, des systèmes d'expression, incluant vecteurs et promoteurs ont été développés.

L'analyse de l'expression de certains gènes de LS3 a permis d'identifier quelques promoteurs utiles. Ainsi, on note le promoteur du gène AHSB4 (codant l'histone H4), exprimé chez les

champignons en présence d'une forte ou d'une faible concentration de NaCl (Wartmann et al., 2003a), qui est un régulateur d'expression de gènes hétérologues, spécialement en condition de fermentation sur un milieu de culture à osmolarité élevée (au-delà de 10% de NaCl) (Satyanarayana et Kunze, 2010). D'autre part, le promoteur du gène TEF1 de *B. raffinosifermentans* est utilisé pour une expression forte et constitutive d'un gène hétérologue (Rösel, et Kunze, 1995). Enfin, pour construire des souches transgéniques de LS3, un vecteur Xplor®2 a été mise au point (Fig. 18).

Xplor®2 est un système, incluant le gène de résistance à la kanamycyne (Kanr), dans lequel des modules de sélection (promoteur ALEU2-ATRP1m), d'expression, de répllication autonome séquence HARS1 de *Hansenula polymorpha*, mais qui ne marche pas chez la souche LS3) ou de chaperon (promoteur AHSB4-gène HpCNE1-terminateur PHO5) peuvent être insérés (Steinborn et al. 2007; Kang et Gellissen, 2005; Böer et al., 2009). Des sites multiclonaux sont situés entre deux segments 25S d'ADNr (ADN ribosomique) disposés dans la même direction, mais dans un sens opposé à l'ADN génomique. Après insertion des modules appropriés, la partie de *E. coli* de la construction plasmidique peut être éliminée par une simple restriction avec *AscI* ou *SbfI*. En outre, le choix de l'enzyme de restriction détermine si le fragment linéarisé doit cibler (*SbfI*) ou non (*AscI*) l'ADNr, permettant l'introduction dans le génome d'une cassette d'ADN sous forme YRC (Cassettes d'expression intégratives d'ADNr de levure) ou YIC (Cassette d'expression intégrative de levure). Ce système est déjà utilisé pour produire des souches modifiées de *B. adenivorans* capables d'excréter des protéines recombinantes : phytase dérivée de *Klebsiella*, interféron α de l'homme, tannases (Böer et al., 2009,2011) et β -galactosidase (Rauter et al., 2013). Ce système est également utilisé pour produire en condition de flasque, 10 g/L d'un polymère dégradable (Biernacki et al., 2017) : poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). Des promoteurs ont été aussi développés dans le cadre de la manipulation des levures oléagineuses en général et de *B. adenivorans* en particulier (Tableau 9).

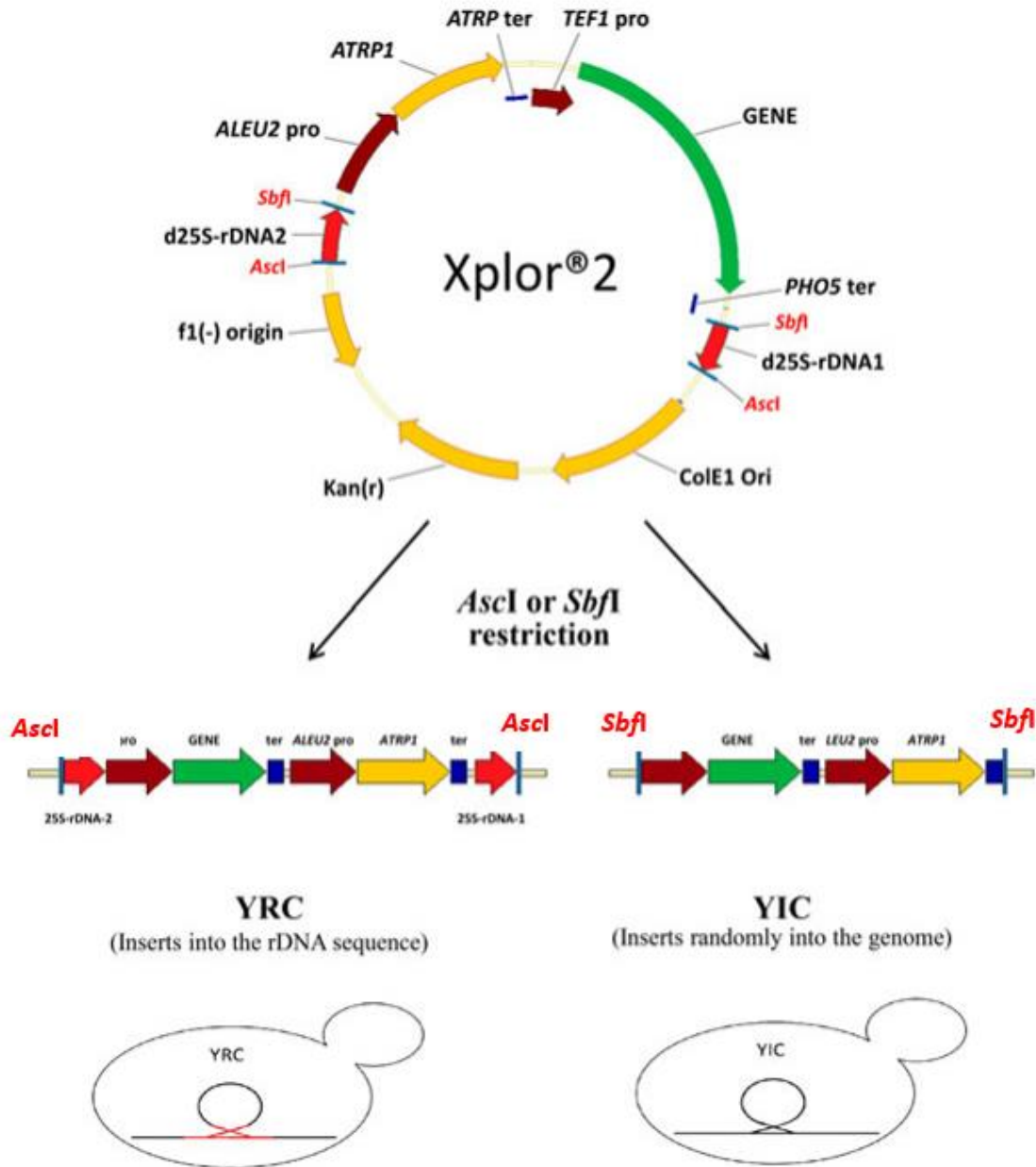


Figure 18 : Le système Xplor[®]2

Ce système est un plasmide de bactérie contenant un marqueur de sélection de levure et des modules d'expression insérés entre deux fragments de la sous-unité 28S de l'ADN ribosomique. Pour extraire la cassette de surexpression du plasmide, les séquences bactériennes sont éliminées par restriction *AscI* et *SbfI*. Le choix de l'enzyme de restriction déterminera si la cassette d'expression contenant le gène d'intérêt s'insérera par recombinaison homologue en ciblant l'ADN ribosomique (cassette intégrative YRC générée par restriction *AscI*) ou de façon aléatoire dans le génome (cassette intégrative YIC générée par restriction *SbfI*).

Tableau 9 : Liste non-exhaustive des promoteurs connus dans la littérature pour les levures

Type	Promoter	Organism	References
Strong	AHSB4 promoter (<i>B. adenivorans</i> encoding histone H4)	<i>A. adenivorans</i>	Wartmann et al. (2003)
	GAA promoter (<i>B. adenivorans</i> -derived glucoamylase)	<i>A. adenivorans</i>	Bui et al. (1996)
	ALIP promoter (lipase-encoding <i>B. adenivorans</i> ALIP1 gene)	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2005b)
	AINV promoter (Promoter of invertase gene in <i>A. adenivorans</i>)	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2004b)
	AXDH promoter (Enzyme xylitol dehydrogenase of <i>B. adenivorans</i>)	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2004)
	AYNT1 promoter(Nitrate transporter from <i>B. adenivorans</i>)	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2009a)
	AYNR1 promoter (Nitrate reductase from <i>B. adenivorans</i>)	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2009a)
Strong	TDH3 promoter	<i>S. cerevisiae</i> D452-2	Wei et al. (2018)
	GDP1 promoter	<i>Y. lipolytica</i> NS297	Liu et al. (2016)
	EXP1 promoter	<i>Y. lipolytica</i>	Liu et al. (2016)
	LPD1in promoter (Lipid Droplet protein 1 gene)	<i>Rhodotorula. toruloides</i>	Liu et al. (2016)
Strong	GDP1 promoter	<i>Rhodotorula. toruloides</i>	Liu et al. (2016)
	<i>A. adenivorans</i> derived TEF1 strong constitutive promoter	<i>A. adenivorans</i>	Böer et al. (2009)
	pAOX1	<i>Pichia pastoris</i>	Couderc and Baratti (1980)
	UAS1B8-TEF MIN synthetic hybrid promoter	<i>Y.lipolytica</i>	Hussain et al. (2016)
	ATP-citrate lyase (ACL) promoter	<i>Rhodotorula toruloides</i>	
Strong	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) promoter	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Liu et al. (2013),
Strong	pFAS1, pACC1 and pLDP1	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Liu et al. (2016)
	Intronic (LDP1in) promoter	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Liu et al. (2016)
Strong	Xylose reductase promoter (pXYL1)	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Den Haan and Van Zyl (2001),

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Contexte

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, les levures oléagineuses sont connues pour leur capacité à produire des molécules à valeur ajoutées valorisables dans divers domaines bénéfiques pour l'homme et les animaux. Ces domaines regroupent l'alimentation, la santé, l'environnement, la pharmacie, les cosmétiques et les biocarburants. Divers projets de recherche se sont intéressés au métabolisme des lipides de différentes espèces de levures. La levure la plus étudiée dans l'équipe B2L (Biodiversité et Biotechnologie des levures) de l'institut national de la recherche agronomique est la levure oléagineuse *Y. lipolytica*. Grâce à l'ingénierie génétique et métabolique, ses capacités de production de lipides ont pu être considérablement augmentées pour en faire un modèle biotechnologique dominant. Par contre, sa capacité naturelle à utiliser certains substrats dont le xylose, constituant abondant de la biomasse ligno-cellulosique, est limitée. C'est pourquoi, le groupe DivY au sein duquel j'effectue ma thèse, s'est intéressé à d'autres levures d'intérêt biotechnologique, potentiellement oléagineuses et capables d'utiliser un panel plus large de sucres. L'identification de corps lipidiques et des deux gènes codant l'ATP:citrate lyase dans les levures du genre *Blastobotrys* ont été à l'origine de mon sujet de thèse et ont motivé l'orientation de mes travaux de recherche vers les espèces *B. adenivorans* et *B. raffinosifermentans*.

Objectif général

Le but de ma thèse est d'étudier les capacités oléagineuses de ces deux espèces et d'essayer de réorienter le métabolisme des lipides de cette levure vers plus d'accumulation de lipides ou vers des profils d'acides gras spécifiques.

Objectifs opérationnels

Les objectifs fixés au cours de ma thèse peuvent être regroupés en trois parties.

i) Caractériser le contenu quantitatif et qualitatif en acides gras des deux espèces *Blastobotrys* en fonction de différents substrats (glucose, xylose, sucres complexes, substrats hydrophobes) et de la température de culture. Le facteur température est intéressant à double titre : il peut avoir un impact sur la nature des acides gras synthétisés et la quantité de lipides stockés ; du fait du dimorphisme dépendant de la température connu chez ces espèces, il permettrait

d'appréhender l'impact de la filamentation sur le stockage des lipides. Une souche de chaque espèce (LS3 et CBS8244T) a été utilisée, leur température de transition morphologique étant différente. Cette partie est décrite dans le chapitre 1 qui fait l'objet d'une publication soumise à *Biotechnology for Biofuels*.

ii) Reconstruire le schéma du métabolisme des lipides de *B. adenivorans* grâce au génome complet séquencé et aux connaissances acquises dans notre équipe sur les gènes du métabolisme des lipides de *Y. lipolytica*. Il s'agissait en premier lieu d'identifier les homologues de certaines familles de gènes ainsi que des gènes clés utilisés comme gènes candidats pour l'ingénierie génétique. Ceci fait l'objet du chapitre 2.

iii) Modifier le métabolisme des lipides par voie génétique en adaptant les outils d'ingénierie génétique de l'équipe de Gotthard KUNZE (IPK, Gatersleben, Allemagne). Les étapes envisagées pour cette partie étaient les suivantes :

- Surexpression de deux gènes du métabolisme des lipides, DGA1 et DGA2, pour réorienter les flux de carbone vers le stockage des lipides.
- Caractérisation génétique (nombre de copies des cassettes de surexpression insérées dans le génome) et phénotypique (croissance, contenu en lipides) des mutants obtenus.
- Recherche d'éventuelles des corrélations entre capacité oléagineuse, nombre de copies et niveau de transcription des gènes DGA1 et DGA2.
- Identification des métabolites intermédiaires de type acides organiques sécrétés dans le milieu de culture.

Cette partie est présentée dans le chapitre 3, qui fera l'objet d'une publication prochainement soumise à *FEMS Yeast Research*.

L'ensemble de mes travaux constitue un socle expérimental pour proposer les levures du genre *Blastobotrys* comme des modèles de levures oléagineuses alternatifs aux modèles déjà existants dont celui représenté par *Y. lipolytica*.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1. Matériels biologiques

1.1. Souches de levures et bactéries

Il existe dans les collections internationales de levures, différentes souches sauvages de *B. adenivorans* et *B. raffinosifermentans*. L'équipe a utilisé sept souches de ces collections (Tableau 10). Les souches auxotrophes nous ont été fournies par Gotthard Kunze (IPK, Gatersleben, Allemagne).

Pour les constructions génétiques la souche bactérienne DH5 α d'*Escherichia coli* a été utilisée (Promega, France). Son génotype est F80dlacZDm15, recA1, endA1, gyrA96 thi-1, hsdR17(rk-,mk+), supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argF)U169.

Tableau 10 : Souches de levure utilisées

Souches	Origine	Génotypes	Références/source
<i>Blastobotrys adenivorans</i>			
CBS8244 ^T	Sol, Pays-Bas	Wild type	CBS
CBS 7350	Silo de maïs, Pays-Bas	Wild type	CBS
CBS 7766	Foie/intestin de lézard, Suède	Wild type	CBS
<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>			
LS3	Hydrolysats de bois, Sibérie	Wild type	Wartmann et Kunze (2003)
CBS 7370	Sol, Afrique du sud	Wild type	CBS
CBS7377	Sol, Afrique du sud	Wild type	CBS
CBS 8335	Sol, Italie	Wild type	CBS
G1212	Dérivée de LS3	<i>aleu2</i> ALEU2:: <i>atrp1</i>	Steinborn et al. (2007)
G1214	Dérivée de LS3	<i>aleu2</i> ALEU2:: <i>aura3</i>	Giersberg et al. (2012)
G1216	Dérivée de LS3	<i>aleu2</i> ALEU2:: <i>aade2</i>	Alvaro-Benito et al. (2012)

CBS : CBS-KNAW culture collection, Utrecht, Pays-Bas

1.2. Vecteurs

Toutes les manipulations génétiques reposent sur l'utilisation du système Xplor 2 (Fig. 20) conçu par le laboratoire de Gotthard Kunze (IPK, Gatersleben, Allemagne). Il contient des éléments de séquences nécessaires à la propagation et la sélection dans *E. coli* (origine de réplication, marqueur de résistance à la Kanamycine), ainsi qu'une portion bipartite de séquences d'ADN ribosomique 26S de *B. raffinosifermentans* entre lesquelles on peut incorporer cinq modules d'expression, grâce à un panel de sites de restriction différents et uniques sur le plasmide (*SacII*, *NotI*, *SpeI*, *AfeI*, *SalI* et *ApaI* sur la figure 19). Les modules de surexpression de gènes d'intérêt sont constitués d'un ensemble promoteur fort (TEF1), gène

d'intérêt, terminateur (PHO5) cloné dans le plasmide pBS-TEF1-PHO5-SA (Figure 20) digérable par les enzymes *SalI*-*ApaI* avant insertion dans Xplor2 digérés par les mêmes enzymes.

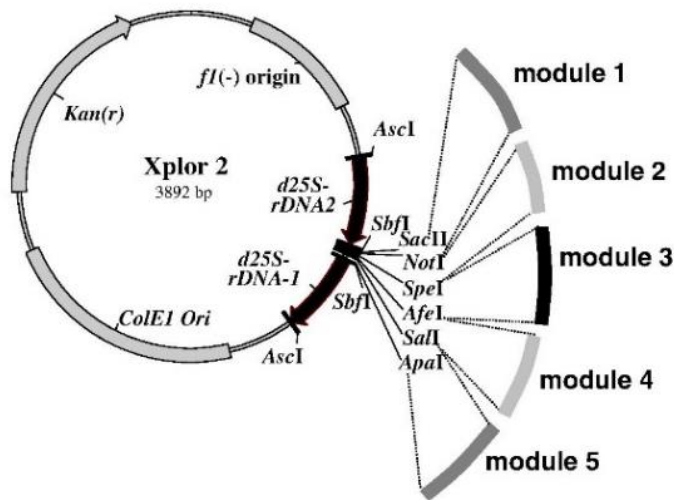


Figure 19 : Composantes fonctionnelles du plasmide Xplor2
Source : Böer et al. (2009).

Le plasmide pBS-TEF1-PHO5-SA (Fig. 20) est un plasmide dérivé de pBlueScript (Böer et al., 2009). Il contient une origine de réplication et un marqueur de résistance à l'ampicilline. Il porte de plus le promoteur TEF1 constitutif issu de *B. raffinosifermentans* et le terminateur PHO5 issu de *S. cerevisiae*. Ce plasmide a été utilisé pour cloner les gènes d'intérêt à intégrer dans le système Xplor2.

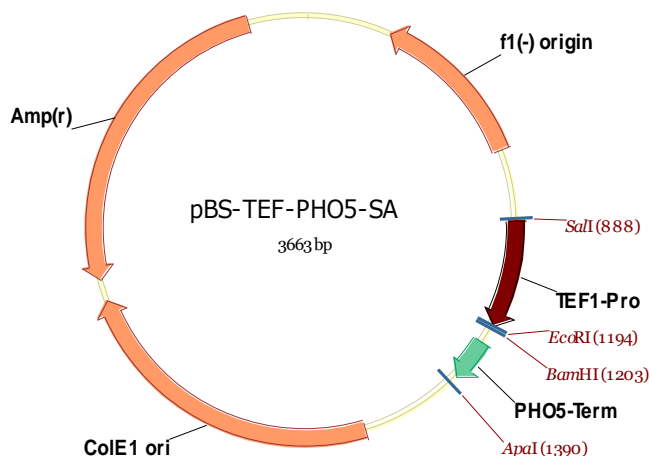


Figure 20 : Plasmide portant les modules d'expression utilisés pour le clonage de gènes d'intérêt
Source : Borrero et al. (2012)

Pour surexprimer nos gènes d'intérêt dans l'espèce *B. raffinosifermentans*, nous avons utilisé des versions de Xplor2 contenant des marqueurs d'auxotrophie et de résistance à l'hygromycine. Les plasmides Xplor2.2 et Xplor2.3, fournis par l'équipe de Gotthard Kunze possèdent respectivement les gènes *TRP1* et *URA3* permettant de rétablir la prototrophie dans les souches G1212 et G1214 (Steinborn et al., 2007). Le marqueur de résistance à l'hygromycine (*hph* de *E. coli*) a été utilisé pour intégrer dans le génome une seconde copie des gènes d'intérêt. La cassette de résistance à l'hygromycine a été intégrée dans le vecteur Xplor 2 en utilisant les sites de restriction *ApaI* et *Sal I* (module 5).

2. Milieux de culture

Les milieux de culture exploités pour nos différents travaux regroupent les milieux de culture d'*E. coli*, de sélection de transformants d'*E. coli*, de culture des espèces du genre *Blastobotrys*, de sélection des transformants de *B. raffinosifermentans* et d'accumulation des lipides.

En général, nous utilisons des milieux de culture stérilisés à 121°C pendant 20 min à l'autoclave. Cependant, il arrive pour certains tests de sélection de transformants de préparer nous-même les milieux de culture, en filtrant séparément les constituants du milieu.

2.1. Milieu de culture Luria Bertani de souche *E. coli* (LB)

Il est constitué de 10 g/L de Bactotryptone, 5 g/L d'extraits de levure (Yeast, Difco, Detroit, MI), 10 g/L de NaCl et le pH est ajusté à 7.

2.2. Milieu sélectif pour les transformants d'*E. coli*

C'est un milieu LB qui contient de la kanamycine 50 µg/mL ou de l'ampicilline à 50 µg/mL selon que le transformant recherché est résistant à la kanamycine ou à l'ampicilline.

2.3. Milieux de culture utilisés pour les levures du genre *Blastobotrys*

Milieu complet YPD

Il est constitué de 10 g/L de Bactopeptone, 10 g/L d'Extrait de levure (Yeast, Difco, Detroit, MI) et de 10 g/L de glucose.

Milieu minimum YNB w/o

Il contient 6,7 g/L de Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (Difco, Detroit, MI), 5 g/L de NH₄Cl, 50 mM de PO₄NaK à pH 6,8 et 10 g/L de glucose. Selon les

colonies auxotrophes criblées, on ajoute une solution 100X de tryptophane, 100X d'adénine et 100X d'uracile pour une concentration finale de 0,01%.

Milieu d'accumulation de lipides

Ce milieu est composé sur la base d'un ratio C:N massique de 60 et 30 g/L de glucose ou d'autres sources de carbone (Cellobiose, arabinose, saccharose, xylose, fructose, glycérol, galactose et amidon). Le tableau 11 donne un exemple de milieu glucose avec un ratio C:N de 60. Lorsque les tests doivent se faire dans une culture contenant de l'acide oléique, la source de carbone est composée de 0,5% de glucose et 2,5% d'acide oléique.

Tableau 11 : Exemple de composition du milieu d'accumulation des lipides

Composition	Concentration finale	Volume pour 250 mL
YNB 34g/L w/o	1,7 g/L	12,5 mL
NH ₄ Cl 250 g/L	0,75 g/L	0,75 mL
Tampon phosphate 1M, PO ₄ NaK, pH 6,8	50 mM	12,5 mL
Glucose 50%	30 g/L	15 mL
Eau Milliq qsp	-	209,25 mL

3. Matériel physique

Dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse (GC), le matériel utilisé est constitué de :

Un lyophilisateur BIOBLOCK Scientific Christ connecté à une pompe vacubrand 2.0 pour faciliter une évaporation par sublimation.

Une machine GC Varian 430 FID et son passeur 8400. Cette machine est équipée d'un injecteur qui supporte 275°C et délivre 1 µL par injection. Elle est équipée de quatre colonnes et permet une programmation de 100°C pendant 1,5 min puis une augmentation 15°C/min jusqu'à 185° puis 30°C jusqu'à 220°C (maintenu pendant 4,17 min). Ces colonnes Agilent VF-23ms 30 m x 0,25 supportent un débit de 1 mL/min d'hydrogène fourni par des générateurs d'hydrogène MNH250 et NM plus de DBS.

Les autres matériels sont : seringues, vortex, centrifugeuse Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R centrifugeuse, Vial de 10 mL ou de 2 mL Agilent Technologies, Tube en verre Pyrex®, Acide sulfurique Sigma, Méthanol et d'hexane de Sigma/Flukal Analytical LC-MS CHROMASON.

Dans le cas du dosage en HPLC, nous avons utilisé une machine HPLC ultimate 3000 (Dionex) composée d'une pompe isocratique délivrant un débit de 0,6 mL/min de H₂SO₄ 0,01N, d'une colonne Bio-Rad® HPX-87H 300x7,8 mm. La détection est réalisée en UV, à 210 nm, et en réfractométrie (Shodex RI-01). L'analyse des chromatogrammes est réalisée grâce au logiciel Chroméléon (Thermo Scientific). L'HPLC analyse le contenu des injections de 10 µL d'échantillon à une température de colonne de 35°C et une pression de 68 à 77 bar. L'analyse complète d'un échantillon se fait en 20 min et les sucres ou acides organiques sont obtenus par correspondance à des standards connus.

4. Méthodes d'évaluation du caractère oléagineux et de surexpression

4.1. Dosage du contenu en lipides

4.1.1. Culture et préparation des échantillons

Un milieu riche (YPD) et un milieu minimum (YNB) ont été utilisés. Le milieu YPD a servi à mettre en place la pré-culture 24 h après étalement des souches sur YPD solide en boîte de Petri et les cultures proprement dites ont été faites dans du YNB avec un ratio massique C:N de 60. Les pré-cultures en YPD ont été faites dans des fioles de 500 mL sans baffles et introduites dans un incubateur INFORS HT Minitron à 28°C avec une vitesse d'agitation de 160 rpm. Après 24 h, les pré-cultures ont été utilisées pour un ensemencement de 100 mL de culture YNB à une DO initiale de 0,5 unité de densité optique à 600 nm. Pour les tests de température, les cultures sont incubées dans des conditions d'agitation similaires à 4 températures : à 28°C dans un incubateur ThermoFisher MaxQ8000, à 37°C dans une chambre chaude, et à 42°C et 45°C dans des incubateurs INFORS HT Minitron. A trois temps d'incubation (4h30, 24h et 72h), 11 mL de chaque échantillon ont été prélevés et répartis comme suit : 10 mL dans un tube Falcon de 15 mL (antérieurement pesé à vide sans bouchon) et 1 mL dans un tube Eppendorf de 1,5 mL réservé pour le suivi de la biomasse (lecture à une DO de 600 nm). Les tubes Falcon sont centrifugés et 1 mL de surnageant est conservé à -20°C puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min après décongélation pour un dosage des sucres. Les culots des cultures qui contiennent uniquement le glucose sont lavés deux fois avec 2 mL d'eau ultrapure tandis que ceux des cultures qui contiennent de l'acide oléique sont lavés 2 à 3 fois avec de la BSA 0,5% (Bovin Serum Albumin) et une fois avec du NaCl 0,9%, avec entre chaque lavage une étape de centrifugation à 3000 rpm pendant 3 min. A la fin des rinçages, les culots sont repris dans 2 mL d'eau puis conservés à -20°C.

4.1.2. Analyse du contenu en lipides

Les culots conservés à -20°C sont lyophilisés pendant 48 heures. Les tubes contenant les lyophilisats sont pesés et des aliquots de 13 à 20 mg sont prélevés. Les acides gras contenus dans ces aliquots sont trans-estérifiés après ajout à chaque aliquot de 2 mL d'un mélange constitué de méthanol (100 mL), d'acide sulfurique fumant (2 mL) et de 100 µL (0,5 mg) d'un standard interne en C12:0 (Sigma) ou de seulement 50 µL de ce dernier si l'échantillon à doser n'atteint pas 13 mg (soit la majorité des échantillons à 4h30). Après incubation à 80°C pendant 1h30, 2 mL d'hexane sont apportés afin de permettre de recueillir un surnageant huileux dont le contenu en acide gras est dosé en chromatographie en phase gazeuse (GC). Le dosage est effectué en GC sur une colonne Varian Factor Four vf-23 ms. Les acides gras de différentes longueurs de chaîne sont identifiés par comparaison à des standards d'esters de méthyle commerciaux (FAME 32, FAME mix C16-C18, FAME C4-C24, Supelco, France, C16 :1 (n-9), Cayman, France) et quantifiés grâce à l'étalon interne, C12:0.

La concentration de chaque pic d'acide gras affiché par la GC s'identifie par la formule suivante :

Concentration de l'AG_x = (Concentration du C12:0) x (Aire AG_x / Aire C12:0)

4.1.3. Analyse des acides organiques présents dans le surnageant de culture

Pour le dosage des sucres et acides organiques du milieu de culture, le tube de 1,5 mL contenant le surnageant de culture est centrifugé à 11250 rpm pendant 2 min 30 s. Le surnageant est dilué 10 fois et dosé en HPLC (UltiMate 3000, Dionex-Thermo Fisher Scientific, UK) avec une colonne Aminex HPX87H couplée aux UV (210 nm) et à des détecteurs à indice de réfraction (RI). Les acides organiques sont quantifiés en UV et les sucres en RI après « réintégration » des pics en se référant à la ligne de base des pics des échantillons et à des pics de standards connus.

4.1.4. Analyse en microscopie

Lors des prélèvements, une coloration des lipides neutres est faite avec 1 µL de Bodipy® 493/503 (Invitrogen) pour 100 µL de suspension cellulaire. Après incubation 15 min à température ambiante, les cellules sont visualisées avec un microscope Zeiss Axio Imager M2 (Zeiss, Le Pecq, France) équipé d'un objectif 100× et d'un filtre Zeiss pour la microscopie à fluorescence. Le logiciel Axiovision 4.8 (Zeiss, Le Pecq, France) a été utilisé pour l'acquisition des images.

5. Méthodes génétiques et de biologie moléculaire

5.1. Tests de croissance et d'auxotrophie

En prélude aux différentes manipulations génétiques, des tests de croissance sur du YPD et d'auxotrophie sur YNB (supplémentés pour contrôle par adénine, tryptophane ou uracile en fonction des besoins) des souches de *B. raffinosifermentans* G1212 [*aleu2* ALEU2::*atrp1*], G1214 [*aleu2* ALEU2::*aura3*], G1216 [*aleu2* ALEU2::*aade2*] ont été réalisés. Cependant, le test de croissance de G1216 n'était pas concluant du fait de la présence d'un phénotype hétérogène sur YPD illustrant une instabilité de cette souche. Nous l'avons donc écartée des expériences.

En outre, les différents tests génétiques sont réalisés en utilisant : (a) l'ADN génomique, extrait selon les étapes du protocole d'extraction d'ADN génomique de *Y. lipolytica* (cf. ci-dessous) et (b) l'ADN des plasmides obtenus à l'aide du protocole miniprep de QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol).

5.2. Procédures d'extraction de l'ADN génomique des levures du genre *Blastobotrys*

Ces procédures sont basées sur celles de Hoffman et Winston (1987), et peuvent se subdiviser en quatre phases :

(a) la récolte des cellules

La souche d'intérêt est étalée d'abord sur boîte YPD et ensuite les colonies isolées sont cultivées dans 10 mL de YPD liquide (overnight). Un volume de 2 mL de culture est prélevé et centrifugé pendant 1 min à 13000 rpm. On évacue le surnageant et le culot cellulaire est repris dans 1 mL d'eau puis à nouveau centrifugé.

(b) l'extraction au phénol-chloroforme

Le surnageant est évacué et on ajoute au culot 0,2 mL de tampon de lyse (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton 2%, SDS 1%), 0,2 mL de phénol chloroforme et 0,3 g de billes de verre (0,5 mm de diamètre), puis on vortexe à vitesse maximale pendant 5 min pour casser les cellules et on centrifuge ensuite pendant 5 min à 13000 rpm.

(c) la précipitation à l'éthanol

Après centrifugation, on précipite l'ADN dans de l'éthanol. Pour cela, on introduit 200 µL de la phase aqueuse dans un tube de 1,5 mL dans lequel on ajoute 500 µL d'éthanol pur. L'ensemble est mélangé par inversion (6 à 8 fois) puis centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min.

Le surnageant est évacué et le reste est lavé au moyen de 700 µL d'éthanol 70%. A cette étape on inverse le mélange 6 à 8 fois de suite puis on le centrifuge pendant 3 à 5 min à 13000 rpm. Ensuite on évacue le surnageant restant et on sèche l'ADN à température ambiante sous une hotte à flux laminaire pendant 15 à 20 min.

(d) la resuspension de l'ADN

L'ADN est finalement suspendu dans 100 µL d'eau puis traité avec 1 µL d'une solution à 10 mg/mL de RNase A (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG) et incubé à 37°C pendant 30 min. L'ADN est de nouveau précipité avec de l'acétate de sodium et de l'éthanol pur puis rincé à l'éthanol 70%. Il est repris, après 15 min de séchage sur paillasse, dans 40 µL d'eau stérile.

5.3. Procédures d'extraction de l'ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

Des cultures de 24 h sont faites dans 10 mL de LB à 37°C. Nous utilisons 3 mL pour l'extraction de plasmides en suivant les étapes du protocole QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN.

5.4. Estimation de la concentration de l'ADN

Elle regroupe la séparation sur gel d'agarose en électrophorèse et la vérification de la qualité de l'ADN ainsi que sa concentration au Nanodrop 2000/2000C.

La vérification sur gel d'agarose se fait avec des gels de 0,8% (poids/volume) pour une séparation de fragments de taille supérieure ou égale à 1000 pb, dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) dans lequel on ajoute du bromure d'éthidium (0,5 µg/L). Les échantillons migrés sur gel sont composés de 1 µL d'ADN, 1 µL de bleu de charge (6X, Sigma) et 4 µL d'eau. On utilise en général 4 µL de marqueur de poids moléculaire, déposé dans le premier puit du gel d'agarose et on fait migrer les échantillons entre 50 et 100 Volt pendant 35 à 45 min. Le gel est observé ensuite dans un appareil transilluminateur UV à 365 nm pour permettre la fluorescence du BET.

5.5. Les ligatures réalisées pour concevoir les modules d'expressions

La ligation s'effectue au moyen d'une ligase d'ADN du phage T4 qui crée une liaison ester entre fragment 5' phosphate et un fragment 3'OH. Elle se fait avec deux fragments (vecteur, insert) digérés et purifiés selon un ratio vecteur/insert de 1/3 à 1/6 dans un volume de réaction de 20 µL avec pour les vecteurs et inserts retenus, respectivement 40 et 60 ng/µL. Ensuite, 10 µL de la ligation sont utilisés pour transformer 100 µL de cellules compétentes *E. coli*.

5.6. Préparation et transformation des cellules compétentes d'*Escherichia coli*

Les cellules compétentes *E. coli* DH5 α sont préparées selon le protocole adapté de Hanahan (1983) : la souche *E. coli* est ré-isolée sur milieu LB gélosé complémenté avec 10 mM de MgCl₂ et incubé une nuit à 37°C. Le milieu SOB prévu pour la culture de cette souche est préchauffé sur la nuit à 37°C. Ce milieu contient 20 g de Bacto tryptone, 5 g de Bacto Yeast Extract, 5 g de NaCl. Le tout est dissout dans 950 mL d'eau dans laquelle on ajoute 10 mL d'une solution de KCl 250 mM et le mélange est ajusté à pH7 avec du NaOH à 10N (100 μ L environ) et le volume complété à 1000 mL. Après, le mélange est stérilisé à 121°C pendant 20 min. On réalise ensuite une pré-culture par ensemencement de 10 mL de milieu SOB avec quelques colonies et on laisse incuber à 37°C jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,3. 5 mL de cette pré-culture sont utilisées pour ensemercer 100 mL de milieu SOB pour être à une DO finale de 0,015. La culture ainsi réalisée est laissée incuber à 37°C à 200 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600 nm} finale de l'ordre de 0,4 à 0,8. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 4000 rpm dans une centrifugeuse à +4°C. On évacue ensuite le surnageant et le culot est repris doucement dans 3 mL de tampon 1 froid (acétate de potassium 30mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glycérol 15%, pH ajusté à 5,8). On additionne 13 mL de tampon 1 froid et on mélange lentement. Les cellules sont gardées à 4°C pendant 5 min et après sont centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min à +4°C. On évacue le surnageant et les cellules sont reprises dans 4 mL de tampon 2 (PIPES 10mM, RbCl₂ 10mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15%, pH ajusté à 6,8) froid. On laisse incuber pendant 15 min à +4°C. Les cellules sont ensuite aliquotées par 100 μ L ou 200 μ L dans des tubes Eppendorf disposés au préalable dans de la carboglace pendant 5 min et on conserve finalement les cellules à -80°C.

Les tubes de compétentes, congelés à -80°C, sont décongelés dans de la glace pour une durée de 10 à 15 min. On dispose aussi dans la glace les tubes de ligature. Ensuite, 50 à 100 μ L de cellules compétentes de *E. coli* sont directement introduites dans les tubes contenant les ligatures. On incube le mélange dans la glace pendant 30 min puis on effectue un choc thermique à 42°C pendant 1 min sans agitation. Le tube du bain marie à 42°C est récupéré et placé à nouveau dans de la glace pendant 5 min. On ajoute à 50 μ L de cellules compétentes, 100 μ L de LB-glucose et le mélange est incubé à 37°C pendant 60 min pour une sélection kanamycine ou 30 à 60 min pour une sélection ampicilline. Enfin, on étale 50 μ L de la transformation sur boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif adéquat. On laisse les boîtes à incuber à 37°C.

5.7. Préparation et transformation de cellules compétentes de *B. raffinosi-fermentans*

Le protocole suivi est celui fourni par le laboratoire de Gotthard Kunze (IPK, Gatersleben, Allemagne). Dans ce protocole, la transformation se fait dans une solution contenant du sorbitol appelée Sorbitol Based Solution. En prélude à cette préparation un étalement sur boîte YPD est effectué 72 h à l'avance. Deux pré-cultures successives sont ensuite réalisées en YPD liquide avec une colonie isolée de l'étalement précédent. Les deux pré-cultures successives sont faites à 30°C dans 10 mL de YPD liquide supplémentés de 50 µg/mL de tryptophane ou 50 µg/mL d'uracile, respectivement pour les souches G1212 et G1214 et cultivées sur la nuit. Un volume adéquat de la seconde pré-culture est utilisé pour ensemençer une culture de 100 mL de YPD liquide à une DO_{600nm} de 0,5. Cette culture est supplémentée de 50 µg/mL de tryptophane ou de 50 µg/mL d'uracile. La culture est incubée à 160 rpm à 30°C dans un incubateur HT INFORS Minitron jusqu'à atteindre une DO de 1,5 après une durée d'au moins 3,5 h. La culture à la bonne DO est centrifugée pendant 5 min à 5000 rpm à 4°C. Les culots de cellules obtenus après évacuation du surnageant sont suspendus dans 50 mL d'un mélange contenant du sorbitol 1M (Sorbitol Based Solution, Tableau 12), puis centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les nouveaux culots de cellules sont suspendus dans 2 mL de Sorbitol Based Solution et aliquotés par 200 µL puis refroidis dans des supports métalliques préalablement laissés à -80°C, avant d'être stockés à -80°C.

La transformation est faite avec 20 µL d'ADN carrier de saumon (Yeastmaker™ Carrier DNA, Takara Clontech) à 10 µg/µL préchauffé pendant 5 min à 100°C. En fait, après digestion du ²fragment d'ADN d'intérêt par l'enzyme *AscI*, pendant 2 h, et inactivation des effets de cette enzyme à 65°C, pendant 20 min, 1 à 2 µg du fragment digéré sont additionnés à 2 µg d'ADN carrier et 200 µL de cellules compétentes G1212 ou G1214 de *B. raffinosi-fermentans*. Le mélange est vigoureusement secoué pendant 5 min à 37°C à 1400 rpm dans un thermomixeur. On ajoute ensuite 1,4 mL de PEG-bicine (Tableau 12) et on laisse incuber le mélange pendant 60 min à 30°C sans secouer au préalable. On centrifuge à 5000 rpm pendant 5 min puis le surnageant est jeté et remplacé par 1,4 mL de NaCl-bicine. Le tout est centrifugé et le surnageant évacué à nouveau. Enfin, on ajoute 500 µL de NaCl-bicine (Tableau 12) qu'on répartit sur quatre boîtes de YNB tamponnés contenant pour un volume final de 500 mL : 250 mL d'agar, 17 mL de YNB liquide à 34 g/L, 10 mL de NH₄Cl à 250 g/L, 10 mL de glucose

² Le fragment d'ADN d'intérêt est le module d'expression prévu pour être exprimé dans les cellules compétentes de la souche G1212-*trp*⁻, cas des simples transformants et DGA1-10 ou DGA2-22, pour les doubles transformants.

50%, 25 mL de tampon phosphate 1M et 188 mL d'eau. Ces boîtes sont incubées à 28°C. On utilise en parallèle des témoins de transformation conçus en remplaçant les plasmides par de l'eau. Les transformants apparaissent en général sur les boîtes de transformation après trois jours d'incubation. Après quantification du nombre total de cellules apparues sur les milieux de sélections, une comparaison est faite avec les témoins de transformation. Les transformants retenus sont cultivés dans 10 mL de YPD liquide pendant 24 h à 160 rpm à 28°C puis 5 mL sont centrifugés et sauvegardés dans du glycérol 80% à -80°C.

Tableau 12 : Solutions utilisées pour préparer et transformer des cellules compétentes

Tampons	Composition	Concentration finale
Solution contenant du sorbitol	Sorbitol	1 M
	Bicine	10 mM
	Ethylène glycol	3 % (v/v)
	DMSO	5 % (v/v)
	Autoclavage et stockage à 4°C	
Solution de PEG-bicine	PEG-1000	40 % (v/v)
	Bicine	0,2 M
	pH ajusté à 8,35 avec du NaOH, autoclavage et stockage à -20°C	
Solution de NaCl-bicine	NaCl	0,15 M
	Bicine	10 mM
	pH ajusté à 8,35 avec du NaOH, autoclavage et stockage à -20°C	

5.8. Production de cassettes de surexpression de deux gènes natifs de *B. raffinosifermentans*, *DGA1* et *DGA2*.

Les gènes *DGA1* et *DGA2* de la souche LS3 sont amplifiés par PCR en utilisant l'ADN polymérase Pyrobest (Takara Clontech). Le programme de PCR est réalisé dans un appareil Thermo cycler 2720, AB Applied Biosciences (CA, USA) et les réactions de PCR sont faites dans un volume total de réaction de 50 µL contenant : 2 µL à 0,2 µM des amorces (Eurogentec) forward et reverse du gène d'intérêt, 1 µL d'ADN génomique de LS3 (matrice) à 100 ng/µL, 4 µL de dNTP mixture à 2,5 mM chaque (50 mM Tris-HCl, pH8,2 ; 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Tween 20, 0,1% NP-40, 50% Glycérol), 5 µL de Buffer Pyrobest 10X (contient du Mg²⁺), 0,25 µL de la polymérase Pyrobest (5 U/µL) et 36 µL d'H₂O (Tableau 13).

Tableau 13 : Programme PCR d'amplification d'ADN génomique utilisant la polymérase Pyrobest

PCR	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	30 s	30
Hybridation	¹ 55°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min/kb	1
Elongation finale	72°C	3 min	

¹Le choix de la température d'hybridation s'est faite en fonction de la température de fusion des amorces utilisées.

Les produits d'amplification sont ensuite purifiés à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN puis digérés et ligaturés avec le plasmide pBS-TEF1-PHO5. La ligature est utilisée pour transformer *E. coli*. Après sélection des transformants et purification des plasmides, la cassette pTEF1-gène d'intérêt-terPHO5 ainsi obtenue est insérée dans Xplor2 après digestion. Les plasmides résultants sont digérés par *AscI*, pour permettre l'insertion de la cassette d'expression dans l'ADN ribosomique du génome de *B. raffinosifermentans* par recombinaison homologue.

5.9. Tests de surexpression de *DGA1* et *DGA2* dans *B. raffinosifermentans*

Les tests de surexpression font suite aux tests d'aptitude des souches de *B. raffinosifermentans* à être transformées.

Ces tests sont réalisés en deux étapes : (1) Production de simples transformants, (2) utilisation de compétentes de ces simples transformants pour produire des doubles transformants. Entre ces deux étapes et après la troisième étape un test de stabilité a été réalisé.

Production de simples transformants

La procédure de surexpression de DGA1 et DGA2 est présentée dans la section Matériel et Méthodes de l'article du Chapitre 3. Une fois les cassettes d'expression produites dans le système Xplor2, 1 à 2 µg des plasmides résultants sont transformés dans les compétentes G1212 ou G1214. Des transformants qui contiennent DGA1 ou DGA2 sont retenus après vérification de la présence de ces gènes par PCR sur colonie (Tableau 14). La liste des amorces utilisées est donnée dans le tableau 15.

Stabilisation des transformants de *B. raffinosifermentans*

Le test de stabilisation s'effectue par trois passages sur milieu minimum YNB et trois passages sur milieu riche YPD. Après le premier passage sur YNB, trois colonies individuelles sont prélevées, puis une seule colonie pour chaque est retenue à chaque étape pour les deux passages suivants en YNB et les trois passages en YPD. Après le dernier passage en YPD, trois colonies sont analysées en PCR pour la présence des gènes insérés. Les amorces OLA006 et OLA009 ont été utilisées pour les transformants contenant le marqueur TRP1, puis OLA018, OLA019 et OLA020 pour la seconde série de transformants contenant le gène de résistance à l'hygromycine. L'ensemble des transformants ayant les insertions de gènes attendus ont été sauvegardés et stockés à -80°C.

Tableau 14 : Programme PCR d'identification de DGA1 et DGA2

PCR avec TaqMix DSBIO	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	8 min	1
Dénaturation	94°C	30 s	
Hybridation	55°C	30 s	30
Elongation	72°C	1 min/kb	
Elongation finale	72°C	3 min pour DGA1 et 5 min pour DGA2	1

Tableau 15 : Liste des oligonucléotides utilisés dans l'ensemble de nos tests

¹ OLA	Nom des plasmides	Nom des oligos	Cibles	Séquences d'ADN
Oligos de clonage				
OLA010		LS3-DGA1fw	DGA1	atgaatTCATGGTTCGGTTCGCTCC
OLA011		LS3-DGA1rv	DGA1	atggatcCATTACTCTACAAACGTAAGCtc
OLA003		LS3-DGA2fw	DGA2	atgaatTCGTCATGGCTACCGCTACCGC
OLA004		LS3-DGA2rv	DGA2	atcctagGCTACTGGTGCTTCATATTC
Quantitative RT-PCR				
TFC1-1		TFC1-ARAD1C43868g-Fw	TFC1	CTCCACCCAGGTTCTCTCAC
TFC1-1		TFC1-ARAD1C43868g-Rv	TFC1	ATAGAGAACCTTGCTAGGATAAGGATCA
DGA1-2		DGA1-ARAD1C08250g-Fw	DGA1	GGTGAAGACCTGGACCCTGA
DGA1-2		DGA1-ARAD1C08250g-Rv	DGA1	CTCCAGGCAGGATGTCCA
DGA2-2		DGA2-ARAD1D42460g-Fw	DGA2	CAAATCGACCGCACACAACCA
DGA2-2		DGA2-ARAD1D42460g-Rv	DGA2	CCTTGGAACACGCTTACAGTA
Oligos de vérification				
OLA006		ScPho5t-rv	PHO5t	GGGTATTCGTATTTAGTTTCC
OLA009		TEF1p-Fw	TEF1	TTCCTTGTCAACTCACACC
OLA018	DGA1 & DGA2 V		hph	CAGGACATATCCACGCCCTC
OLA019	Hygro-DGA1-rev	DGA1-5'Rev	DGA1	AAAGGAGCGAACCGAACCAT
OLA020	Hygro-DGA2-rev	DGA2-5'Rev	DGA2	ACCGTAGCAATAGCGGTAGC
OLA007	pBS1-Asc	Xplor		CTCTTCGCTATTACGCCAG
OLA008	pBS2-Asc	Xplor		GAGCGCAACGCAATTAATG
OLA014	hphF-BsrGI		hph Genscript	attgtacACTAAACTGTACACAATGAAGAAG
OLA015	hphR-SalI		hph Genscript	ttgtcgaCTACTCTTTGGCCCCGTGGT
OLA016	hphY1-BsrGI			ACTGTACACAATGAAGAAGCC
OLA017	t-xpr2-SalI			ttgtcgacTTGCCACCTACAAGCCAG
hph1	pARE12,14,15		hph <i>E. coli</i>	CAGGACATATCCACGCCCTC

¹OLA : Oligos de *Blastobotrys*, *EcoRI* : gaatTC, *BamHI* : ggatcC, *AvrII* : cctagG, *SalI* : gtcgaC, *BsrGI* : tgtacA

5.10. Extraction d'ARN

Les culots de cellules collectés puis congelés et l'équivalent de 1 unité de DO_{600} est resuspendue dans 1 mL de TRIzol dans un tube à vis de 2 mL. On ajoute 200 mg de billes de zirconium (100 μm , Biospec Products). Les tubes sont rigoureusement agités au broyeur MP-FastPrep-24, trois fois pendant 60 s à 6,5 m/s puis incubés 5 min à froid dans de la glace avant et après traitement. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 13300 rpm à 4°C. Après récupération du surnageant limpide, on ajoute un volume d'éthanol (95-100%) puis le mélange est transféré par pipetage dans les colonnes du Direct-zol RNA miniprep plus Kit (Zymo research). Ensuite, on suit les étapes selon les recommandations du fournisseur Zymo research. Une des étapes du protocole consiste à traiter l'ARN directement sur la colonne à la DNase qui est incluse dans le kit. L'ARN est finalement élué avec 50 μL d'eau RNase free.

Les ARNs ainsi extraits sont quantifiés au nanodrop puis leurs pureté et qualité sont vérifiées à l'aide du bioanalyseur 2100 (Agilent RNA 6000 nano).

5.11. Reverse transcription des ARNs pour obtenir des cDNA

750 ng d'ARN totaux traités à la DNase sont utilisés pour préparer les cDNA. On utilise le kit Superscript IV Vilo Master Mix (Invitrogen). 4 μL de Mix Vilo sont utilisés par réaction dans un volume final de 20 μL . On suit les étapes selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). Les cDNA sont dilués au 1/3 (20 μL de cDNA + 40 μL d'eau) et 3 μL sont utilisés pour la qRT-PCR.

5.12. PCR quantitative

Le passage en qPCR suit les étapes suivantes :

Préparation des amorces : les amorces sont définies avec le logiciel LightCycler Probe Design Software 2.0 en tenant compte d'une température d'hybridation comprise entre 60 et 62°C et après commande, elles sont réceptionnées à 100 μM . Elles sont ensuite utilisées à 2,5 μM en qPCR.

Préparation de l'ADN génomique des différentes souches à tester : l'ADN est dilué à 60 ng/ μL . On fait 4 dilutions successives au 1/3 (10 μL d'ADN + 20 μL H_2O). Les dilutions et le reste des étapes de la qPCR se font à l'aide de cônes à filtre.

Les mix de réactions sont répartis dans des capillaires de type LightCycler© 2.0 System (Roche) avec un volume final de 15 μL . La machine qPCR peut contenir jusqu'à 32 capillaires. Le Mix de réaction contient pour un échantillon à traiter : 3 μL de mix enzymatique (enzyme,

tampon de réaction, MgCl₂), 3 µL de primers (Eurogentec) et est complété à 15 µL avec de l'eau. Le programme d'amplification est donné dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Programmation des cycles de qPCR

Nom du programme	Température (°C)	Durée	Pente(°C/s)	Mode d'acquisition	Cycles
Dénaturation	95	8 min	20	Aucun	1
Amplification	95	10s	20	Aucun	45
	60	6s	20	Aucun	
	72	6s	20	Unique	
Fusion	95	0s	20	Aucun	1
	65	30s	20	Aucun	
	65	0s	0,1	Continu	
Refroidissement	35	60s	20	Aucun	1

5.13. Analyse des données de PCR quantitative

La qPCR est utilisée pour identifier le nombre de copies de gène d'intérêt récupéré par les transformants obtenus dans nos différents tests. L'analyse des données est faite grâce aux Ct (Cycle threshold) générés par la machine qPCR. Nous avons utilisé le gène TFC1 comme standard interne. Les Ct obtenus en qPCR avec les amorces DGA1-2, DGA2-2 et TFC1-1 (Tableau 15) sont utilisés comme suit :

- (1) Calcul des ΔCT pour chaque gène (DGA1, DGA2, TFC1):

$$\Delta CT = Ct \text{ des transformants} - Ct \text{ du contrôle (G1212-trp+)}$$

- (2) Utilisation du $Ratio = \frac{(target)^{\Delta CT_{target}(\text{Control-Sample})}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(\text{Control-Sample})}}$ dans le calcul de ratio

impliquant un gène d'intérêt (sample) et un gène utilisé comme référence (control).

Dans l'équation, la lettre E est la moyenne de l'efficacité de la PCR ($10^{(-1/pente)} - 1$) pour chaque gène étudié : DGA1, DGA2 et TFC1.

Deux types de ratio ont été calculés :

- le ratio DGA1 vs. DGA2 pour les simples transformants (référence ici est le gène DGA2) ainsi que DGA1 vs. DGA2 et DGA2 vs. DGA1 (référence ici est le gène DGA1) pour les doubles transformants.
- le ratio DGA1 vs. TFC1 et DGA2 vs. TFC1 dans lesquels la référence est le gène TFC1.

- (3) Ces ratios sont calculés pour chacune des dilutions retenues pour les analyses en qPCR (1/3, 1/9, 1/81) et la moyenne ainsi que l'écart-type sont calculés en utilisant les ratios générés des trois dilutions précitées.

- (4) L'estimation du nombre de copies de gène est faite à partir des deux types de ratio mentionnés au point (2).

Résultats

Résultats : Chapitre 1

Caractérisation du caractère oléagineux de *Blastobotrys adenivorans* et *B. raffinosifermentans* : Effet des sources de carbone et de la température

1. Introduction

Les espèces *B. adenivorans* et *B. raffinosifermentans* possèdent des caractéristiques industrielles et pharmaceutiques de production d'enzymes et ne nécessitent pas d'ingénierie supplémentaire pour utiliser les sucres pentoses. Elles sont manipulables génétiquement, codent des enzymes impliquées dans de nombreuses voies métaboliques peu fréquentes chez les levures hémiascomycètes et contrairement à *Y. lipolytica*, n'ont pas fait l'objet d'ingénierie génétique très avancés. Une autre caractéristique originale de cette levure est d'avoir une tolérance élevée à la température (jusqu'à 48°C), au pH, à la salinité tout en étant capable de métaboliser une gamme très variée de substrats mais peu de choses sont connues sur le métabolisme lipidique de cette levure. Mes travaux de recherche consistaient, tout d'abord, à élucider les capacités oléagineuses des levures du genre *Blastobotrys* et ensuite à réorienter le métabolisme des lipides vers plus d'accumulations de lipides ou vers des profils d'acides gras spécifiques. En général, au-delà de la présence du gène de l'ATP citrate lyase (ACL), trait important des levures oléagineuses, c'est l'accumulation d'une quantité de lipides supérieure à 20% du poids sec des cellules qui permet d'affirmer qu'une levure est oléagineuse.

Ce chapitre est dédié à l'étude des capacités oléagineuses de ces deux espèces. Nous discutons de l'impact des substrats et du ratio C:N sur l'accumulation de lipides, ainsi que de l'effet de la température sur le profil lipidique et la production totale de lipides. En effet, ces composantes peuvent être manipulées pour améliorer la production de lipides des levures oléagineuses. Dans un premier temps, nous avons utilisé deux souches de *B. adenivorans* et deux souches de *B. raffinosifermentans* pour évaluer leurs aptitudes oléagineuses sur substrat glucose et xylose. Puis deux souches (LS3 et CBS8244^T), chacune représentative d'une espèce ont été choisies pour analyser l'effet de 7 substrats différents. C'est finalement le substrat glucose qui a été retenu pour évaluer l'effet de la température sur le profil d'acides gras et l'accumulation des lipides chez ces deux souches. Les expérimentations discutées dans ce chapitre sont réalisées en flasques et ont montré le caractère oléagineux des levures du genre *Blastobotrys*. Nous montrons également que tant les substrats que la température de croissance ont un impact sur le profil lipidique, bien qu'étant souche spécifique.

Lorsque je suis arrivé au laboratoire, des données avaient déjà été acquises par Stéphane Thomas (co-premier auteur du papier) sur les capacités d'accumulation de 4 souches (section « Ability for lipogenesis in *B. raffinosifermentans* and *B. adenivorans* » des résultats). Ma contribution a été d'identifier la production de lipides des souches LS3 et CBS8244^T sur sept substrats carbonés avec un ratio C:N de 60 et de tester l'impact de quatre températures (28°C, 37°C, 42°C et 45°C) sur les profils lipidiques.

2. Article soumis

Les résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'une publication soumise à *Biotechnology for Biofuels*.

***Blastobotrys adenivorans* and *B. raffinosifermentans*, two sibling yeast species, which accumulate lipids at elevated temperatures and from biomass-derived sugars.**

Stéphane Thomas^{*1}, Daniel R. A. Sanya^{*1}, Florian Fouchard¹, Huu-Vang Nguyen¹, Gothard Kunze², Cécile Neuvéglise¹, Anne-Marie Crutz-Le Coq^{§1}

* these authors contributed equally to this work

§ corresponding author

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

² Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Correnstr. 3, D-06466 Gatersleben, Germany

Abstract

Background. In the context of sustainable development, yeasts are one class of microorganisms foreseen for producing oil from diverse renewable feedstocks, specifically non-competitive with food supply. However, there is still limitation to their cost-effective use in bulk productions, such as biodiesel, partly due to possible poor use of desired substrates or little robustness in the practical bioconversion process. We investigated the natural capacity of *Blastobotrys adenivorans*, already known as biotechnological yeast, to store lipids in different conditions.

Results. Genotyping of seven strains revealed that the species was actually composed of two different groups, one of which (including well-known strain LS3) could be reassigned to *Blastobotrys raffinosifermentans*. We showed that, under nitrogen limitation, strains in both species could synthesize lipids over 20% of their dry cell weight during shake-flask cultivation in glucose or xylose medium for 96 h. Besides, organic acids were excreted in the medium. We observed that LS3, our best lipid-producing strain, could also accumulate lipids from exogenous oleic acid and synthesize lipids from different sugar substrates, up to $38.1 \pm 1.6 \%$ and $36.6 \pm 0.5 \%$ (while growing in cellobiose) of its dry cell weight, respectively. Interestingly, both species, represented by LS3 and CBS 8244^T,

could grow without much filamentation in the lipogenic medium in the 28-45°C temperature array and reached lipid titers ranging from 1.76 ± 0.28 to 3.08 ± 0.49 g/L in flasks. In these conditions, maximum bioconversion yield ($Y_{FA/S} = 0.093 \pm 0.017$) was obtained with LS3 at 37°C. The presence of genes for predicted subunits of an ATP:citrate lyase in the genome of LS3 reinforces its oleaginous character.

Conclusions. *B. adenivorans* and *B. raffinosifermentans*, which are known as xerotolerant and genetically-tractable, are promising yeasts of the Saccharomycotina, that could be further developed through genetic engineering for the production of microbial oil. To our knowledge, this is the first report of efficient lipid storage in yeasts cultivated at a temperature above 40°C.

Keywords

Microbial oil, lipid metabolism, biotechnology, Saccharomycotina, thermotolerance, oleaginous yeasts

BACKGROUND

Harnessing renewable substrates to produce microbial oil for biodiesel or other applications has appeared a scientific and environmental issue for the last two decades. Many new oleaginous yeasts (i.e. able to accumulate lipids over 20% of their dry cell weight) are screened for and can be found in different taxa. However, if some of them are immediately suitable for providing interesting enzymes (such as sugar hydrolases), their capacity to be customly engineered could demand additional efforts. Conversely, known genetically tractable yeasts may not have been tested for their oleaginous potential yet.

Blastobotrys adenivorans is part of a basal clade of the Saccharomycotina phylum [1], diverged long before *Saccharomyces cerevisiae*. The species was first described in 1984, under the name of *Trichosporon adeninovorans* [2], and successively reclassified into the genera *Arxula* (*adeninivorans*) in 1990 [3] and *Blastobotrys* in 2007 [1]. A few natural isolates, that come from soil, plant (wood hydrolysate, silage) or animal origin, have been described in the literature or deposited in culture collections. Among them, the type strain CBS 8244^T and the industrial strain LS3 have been better studied, the latter being used to develop auxotrophic recipients for genetic transformation [4,5].

Since the early 1990s, the species has attracted attention because of interesting biochemical, physiological and genetic properties. First, it exhibits a versatile metabolism, indicative of the presence of various degradative enzymes and linking pathways to central metabolism [6]. One to several strains are capable of assimilating a number of sugar substrates, such as D-galactose, D-xylose, L-arabinose, raffinose, sucrose, trehalose, cellobiose, starch, arbutin and can also ferment some of them (glucose, sucrose, starch somehow) [6,7]. Organic acids (e.g. pyruvate, acetate, butyrate) as well as aromatic compounds (e.g hydroxybenzoates) may also be source of growth [6,7]. Moreover, various nitrogenous compounds may serve as nitrogen source (e.g. urea, formamide, ethanolamine, most amino acids), as both carbon and nitrogen sources (e.g. adenine, acetamide, uric acid, putrescine and some amino acids) [6,7], or as an energy source via nitrate reductase [8]. Second, *B. adenivorans* exhibits extremophilic traits, such as osmotolerance and thermotolerance; it is able

to grow up to 48°C [9]. The latter character is particularly interesting as only few yeasts, and especially few biotechnological yeasts, have been found to grow over 40°C [10,11]. In addition, as shown in the case of the LS3 strain, temperature switched a reversible developmental state on, cells being mainly in the yeast and (pseudo)hyphae forms at lower and higher temperature (above 42°C), respectively [9]. Third, in a purpose of metabolic engineering, valuable information and tools are brought by the complete genome sequence of strain LS3 [12] and the development of integrative plasmids and recipient strains for genetic engineering [13]. The small size of the haploid genome of this yeast (11.8 Mb) is an additional advantage for gene function studies or chassis strain development for different applications.

B. adenivorans has earned its stripes as a biotechnological yeast, being in particular engineered in Kunze's lab for use as a biosensor, as a platform for protein expression or as a solventogenic yeast engineered for butanol production [13]. In more recent years, the ability of *B. adenivorans* to produce lipids or more specifically polyunsaturated fatty acids has been mentioned [14,15]. Effective cultivation in bioreactors is also an important trait to be assessed and developed. Stöckmann *et al.* reported achievement of a biomass titer of 240 g/L under pressure [16]. This species could therefore be a valuable alternative to the well-known oleaginous yeasts *Yarrowia lipolytica* (also belonging to the Saccharomycotina), *Rhodotorula (Rhodosporidium) toruloides* and *Lipomyces starkei* on which many of the recent research efforts focused [17].

In this paper, we assessed the ability of *Blastobotrys* species to naturally produce and accumulate lipids from a set of different substrates. Several strains known as *B. adenivorans* were used in order to examine the robustness of lipid production in the species. However, in the course of our study, strain genotyping showed that these strains could be divided into two different groups and various marker sequences actually placed the LS3 group into the *Blastobotrys raffinosifermentans* species. Taking advantage of the thermotolerance of these yeasts, lipid production was assayed at different temperatures, up to 45°C. In sum, we show that the natural capacity of these two species to produce lipids is promising and may be an alternative to currently-studied oleaginous yeasts.

RESULTS AND DISCUSSION

The genome of strain LS3 encodes a putative ATP:citrate lyase

The complete genome sequence of LS3 (first identified as *B. adenivorans*, then reassigned to *B. raffinosifermentans*; see below and Table 1), already recognized of biotechnological interest, was published few years ago [12]. Accurate functional annotation of whole genomes is a complex and time-consuming process, which implies that conserved functions are borne by similar proteins and which involves sequence comparison with sometimes distant reference organisms for which experimental data are available. First-round sequence annotation mainly used *S. cerevisiae* as a reference, a well-studied but non oleaginous yeast, which may have biased a pertinent annotation for some genes involved in lipid metabolism. We thus decided to mine the genome of LS3 for some specific genes involved in this metabolism, using proteins of *Y. lipolytica*, a well-studied oleaginous yeast, as a query (Table 2). First of all, cytoplasmic ATP:citrate lyase (ACL), which could efficiently convert respiratory citrate to acetyl-coA for fatty acid (FA) biosynthesis, has been pointed out as a (first biochemical then genetic) signature of oleaginous yeasts [18–20]. ACL, whose subunits are typically encoded by distinct two genes in yeasts, could be confidently predicted in LS3 by its high amino acid similarity with this enzyme in *Y. lipolytica* (Table 2). The presence of these genes suggested the natural oleaginous character of these yeasts. Second, we found that LS3 possesses a copy of an AAL-like gene coding putative peroxisomal acyl-coA synthetase (Table 2). Homologous gene products in *Y. lipolytica*, which possesses a family of ten genes of Acy/Aryl-CoA-ligases (AAL), were shown to be responsible for activation of FAs into acyl-coA [20]. Although different kinds of acyl-coA synthetases are found in yeasts (e.g. Faa2 in *S. cerevisiae*), the distribution of these particular AAL-like genes was hypothesized to be biased towards oleaginous species [20]. Third, formation of triacylglycerol (TG) was examined. In yeasts, TG synthesis relies on esterification of diacylglycerol, itself a product of the Kennedy pathway in common with glycerophospholipid synthesis [21]. This last step of TG formation has been considered a limiting step for oil storage. The

esterification reaction involves acyl-coA dependent diacylglycerol acetyltransferases (DGAT) and/or phospholipid:diacylglycerol acetyltransferases (PDAT) which use phospholipids as FA donors. *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* [22], and *B. raffinosifermentans* LS3 (Table 2) all possess one gene coding a PDAT enzyme. As to DGAT, *S. cerevisiae* possesses only one gene, whereas *Y. lipolytica* [23,24], and LS3 (Table 2) have two DGAT, possibly emphasizing the capacity of the latter for TG storage.

Nitrogen limitation and lipid accumulation in strain LS3

Oleaginous yeasts usually synthesize and abundantly store lipids into lipid droplets under specific environmental conditions, one of which is nitrogen limitation [25,26]. Besides FA synthesis, these yeasts can import and direct exogenous FAs into the lipid storage pathway, sometimes with particularly high efficiency, as in the well-known oleaginous yeast *Y. lipolytica*. [27].

We examined the capacity of strain LS3 to store lipids after neo synthesis from glucose or after accumulation from exogenous oleic acid. For this, we performed flask cultivation in YNB media with two different carbon sources a fixed concentration of 30 g/L (glucose or a mixture of oleic acid and glucose) and two different concentrations of NH₄Cl as unique nitrogen source (5 g/L and 0.75 g/L) to vary carbon-to-nitrogen ratio (C/N). Efficient lipid storage could occur from both substrates, in an amount above 30% of the dry cellular weight (DCW). However, as expected, it strongly relied on low concentration of nitrogen when glucose was the sole substrate (Fig. 1 A). When the exogenous FA C18:1 was provided, the FA profile of the strain was enriched in C18:1 (Fig. 1 B), suggesting the entry of the fatty acid directly into the storage pathway. As shown by BODIPY staining, storage occurs in the form of neutral lipids in lipid droplets in both cases (Fig. 1 C). Preliminary results obtained by HPLC estimated that over 85% of stored lipids were triglycerides (TG) (A. Beopoulos, personal communication). Our results indicate that strain LS3 has good natural capacity for both lipogenesis and lipid accumulation upon FA uptake and may be qualified as oleaginous. Interestingly, in reaching around 30% of its dry cellular weight (DCW) as lipids from glucose, LS3 showed a better natural lipogenic potential than well-known *Y. lipolytica* W29 (WT parental strain for most engineered high-

lipid producing strains). When similarly cultivated in YNB-based low-nitrogen sugar media, the latter synthesized and stored lipids up to 15 % of its DCW [28,29].

Diversity among strains and species assignment

To assess the oleaginous character of the species, we decided to enlarge our investigation to several strains. Strains LS3 and CBS 8244^T (type strain of *B. adenivorans*) were previously suggested to belong to different genetic subgroups regarding the size of their four chromosomes and DNA-fingerprints [30]. For this reason, five strains of various origins obtained from the CBS collection (Table 1) were genotyped along with LS3 and CBS 8244^T.

Using *AluI* fingerprinting of intergenic spacer rDNA (IGS), we observed that the seven strains were clearly distributed into two distinct groups, a first group of three strains including CBS 8244^T, and a second group of four strains including LS3 (Fig. 2 A). ITS and D1D2 sequences revealed that the second group was homogenous for this marker (no sequence polymorphism between strains) while differing from the former group by 3 to 5 nucleotides (Fig. S1, Fig. 2 B). mtCOXII sequence in CBS 7370 and LS3 confirmed the proximity of these strains, while diverging from CBS 8244^T (Fig. 2 B). By using YeastIP database for identification [31], the sequence of these markers in strains constituting the LS3 group matched better to *Blastobotrys raffinosifermentans*. This species, closely related to *B. adenivorans*, was described in 2007 while represented by a unique strain at that time [32]. Our results underlined the existence of two groups among strains previously identified as *B. adenivorans* and resulted in a reassignment of the LS3 group to the *B. raffinosifermentans* species.

Capacity for sugar assimilation in *B. raffinosifermentans* and *B. adenivorans*

We examined the ability of the different strains to grow on a three different simple carbohydrates, potentially useful as carbon and energy sources for microbial oil production. When cultivated in minimal medium supplemented with glucose or xylose, all strains exhibited rather similar growth curves, which reflect efficient assimilation of these substrates (maximum growth rate from 0.13 to

0.16 h⁻¹ and stationary phase reached within 24-30 h in microplates). In contrast, glycerol promoted a much slower and delayed growth, depending on strain and substrate concentration (Fig. S2). For *B. raffinosifermentans* strains, maximum growth rate ranged from 0.078 to 0.12 h⁻¹ and from 0.025 (CBS 8335) to 0.1 h⁻¹ in 10 g/L and 2 g/L glycerol, respectively. This phase was generally preceded by much slower growth phase or lag phase, especially in low concentration of glycerol, extending up to 60 h. For strains of the *B. adenivorans* species (CBS 8244^T group), growth stayed very weak (10 g/L glycerol) or not visible (2 g/L glycerol) after 96 h cultivation in microplates (Fig. S2). In plate assays with 10 g/L glycerol, growth was also reproducibly observed to be delayed relative to glucose, and all seven strains reached lower-density streaks on glycerol after 7 days at 28°C. The lowest-density lawn on glycerol was observed for the group of *B. adenivorans* strains (not shown). As a control, *Y. lipolytica* W29 grew similarly on both glycerol and glucose plates.

Glycerol assimilation is a typical variable trait among yeasts [33]. Glycerol is generally regarded as an efficient carbon source for *Y. lipolytica* and even a preferred substrate especially as it is first consumed when both glycerol and glucose are present [34,35]. In contrast, most strains of *S. cerevisiae* do not grow in synthetic glycerol media without successful adaptation or medium supplementation with complex compounds, amino acids or nucleobases [33]. Our result underlines a difference in glycerol catabolism between *Y. lipolytica* and the two *Blastobotrys* species under study, or at least in its regulation. More favorable environmental conditions or conditions of possible adaptation remain to be determined for efficient glycerol assimilation. However, glycerol is not only a potential substrate for growth but also the precursor backbone esterified by FAs in triglycerides. Sugar/glycerol blends or glycerol co-feeding have been successful in improving lipogenesis [36,37] and would be interesting to evaluate in this particular context of poor glycerol catabolism, providing that transport would not be a limiting step.

Ability for lipogenesis in *B. raffinosifermentans* and *B. adenivorans*

To evaluate the robustness of lipogenesis among strains and investigate possible phenotypic diversity regarding this trait, two strains of each species (LS3 and CBS 7377 in one hand, CBS 8244^T and CBS 7766 in the other), were assayed for their time-course lipid production. They were cultivated in glucose or xylose, in which all strains grew easily. OD₆₀₀, FA content of the cells as well as sugars and organic acids in the medium were periodically measured throughout the 96 h cultivation in flasks under nitrogen limitation (0.75 g/L and 0.5 g/L NH₄Cl in YNB medium with 30g/L carbon source, leading to a mass carbon-to-nitrogen ratio of 60 and 90, respectively). In these conditions, for all strains, lipogenesis began at the start of growth. Highest lipid content of the cells was reached after 72 h, and ranged from 14% to 29% of DCW (Fig. 3 & 4). Compared to C/N 60, C/N 90 had at best a limited beneficial effect on lipogenesis (up to 10% better) but it lowered growth and global sugar consumption.

The four strains exhibited different behaviors in terms of growth and observed metabolism regarding lipid accumulation, organic acid excretion or sugar consumption. No strict correlation with their belonging to one or the other species *B. raffinosifermentans* or *B. adenivorans* was detected. CBS 7377 was the slowest and least efficient strain for lipid accumulation whereas LS3 (of the same species) reached the highest lipid content. Conversely, the OD reached by LS3 in stationary phase was the lowest of all strains. The results for both strains of *B. adenivorans* were more similar to each other. On the whole, both species, cultivated in low-nitrogen medium, reached lipid content above 20%. Sugar uptake was more efficient for LS3 than for other strains, in all media (Fig. 3 & 4). With few exceptions, < 75% of initial sugar has been consumed at the end of experiment. This leaves room for optimization of medium and culture conditions. Within the time of the experiment, *B. raffinosifermentans* LS3 reached the highest lipid content among all 4 strains while *B. adenivorans* CBS 8244^T accumulated lipid more slowly and probably did not reach its maximum. Noteworthy, ACL was also found in *B. adenivorans* CBS 8244^T, the genome sequence of which has been recently analyzed in view of lipid production [38].

Excretion of organic compounds is a well-known competing sink for lipid production, particularly that of citric acid, both an intermediate of TCA cycle and a precursor for acetyl-coA in oleaginous yeasts. In our shake flask experiments, two different organic acids were excreted in the medium, as identified by the HPLC method of calibration with external standards: citric and acetic acids. Globally, their cumulative concentration in the medium (Fig. 3 & 4) tended to raise regularly with time and reached a range of 3.4 ± 0.2 g/L (CBS 7766 cultivated in xylose C/N 90) to 10.1 ± 0.6 g/L (LS3 cultivated in xylose C/N 90) at the end of experiment. LS3 revealed singular in regard of excreted organic acids, both in terms of their total concentration, which did not increase after 50-60 h of cultivation in some media, and relative proportion of acetic to citric acid. While acetic acid was the most abundant organic acid excreted by all other strains, citric acid was equivalent or more abundant in LS3 (Fig. S3). In glucose media in particular, the final concentration of acetic acid was at least twice as less as that of citric acid. This lower final concentration in acetic acid was due to an early reach of a plateau (C/N 90, Fig. S3) or clear reuptake of this compound (C/N 60, Fig. S3), while glucose was not exhausted. In terms of their FA composition, *Blastobotrys* strains had synthesized and stored at 96 h of cultivation four main FAs accounting for more than 96% of the total FA amount: C18:1 (43-52%, depending on strain and medium), C16:0 (23-27%), C18:2 (11-20%) and C18:0 (4-11%) (Fig. S4). C16 and C18 FAs are typical most abundant FAs in a wide range of yeasts or fungi [39,40]. However, the relative proportion varies according to yeasts and culture/media conditions. Compared to natural isolates of *Y. lipolytica* W29 [29] and CBS6124^T [41], the FA fraction of these *Blastobotrys* species, cultivated in similar lipogenic conditions, is richer in C16:0 (13-17% vs 24-26%). Conversely, it is particularly poor in mono unsaturated C16:1. The latter feature was also noted when *B. adenivorans* CBS 8244^T was cultivated in YPD [42].

Constant but only very low levels of C17 chain-length FA (< mg/g DCW) were found here. Indeed, yeasts are not known for naturally synthesizing such odd-chain FAs, unless fed with odd-carbon precursors or benzoate for example [43–45]. Olstorpe et al. [15] reported FA profiles for CBS 8244^T and CBS 7377 cultivated in YPD medium which were unexpectedly poor in oleic acid (3-11% of total

FA at 30°C) and rich in C17:1 (20-29% of total FA at 30°C). The reason for the observation of these uncommon profiles is unknown, especially since Froissard et al [42] contrarily reported the same four main FAs in *B. adenivorans* CBS 8244^T cultivated in YPD at 28°C as those we observed here.

Lipid synthesis from various carbon sources

Sugars found in plant as reserve sugars or constitutive of lignocellulosic fibers as well as the industrial by-product glycerol are attracting substrates for microbial oil production. The LS3 strain, our best lipid producer, was tested for its ability to accumulate lipids while growing in various hexoses, the sugars (i. e. cellobiose, glucose, sucrose, fructose), likely rapidly assimilated, 96 h cultivation grossly represents the maximum of lipid synthesis and storage in our shake flask cultures since the rise between 72 h and 96 h stayed within 5.5% (Table S1). In contrast, glycerol appeared the least favorable for bioconversion into lipids (total FAs reached only $16,1 \pm 0.4$ % of DCW), probably because of its slow assimilation, which also impacted the OD reached at 96 h: 11.4 ± 1.0 % in glycerol instead of 16.8 ± 0.4 % in cellobiose. Small differences in the composition of FA profiles relative to that obtained in glucose were noted especially when LS3 was grown in starch or glycerol (Table S1). Such variations depending on culture conditions have already been reported for other oleaginous yeasts [46]. In all cases however, C18:1 remained the main FA, followed in decreasing proportion, by C16:0, C18:2 and C18:0 (Table S1).

In conclusion, all tested substrates from simple to complex ones could be turned into lipids by strain LS3, although with varying efficiency.

Efficient lipid synthesis at high temperature

B. adenivorans and *B. raffinosifermentans* (represented by strains in Table 1) are known to grow at 45°C. This can be valuable for consolidated bioprocesses, especially those involving degradation of hemicellulose/xylanes or so-called saccharification, best performant at temperature above 40°C [11,47]. Besides, temperature is known to influence plasma membrane composition, which must

adapt to preserve an adequate level of fluidity and therefore its function. The nature of FAs, including their chain length and degree of unsaturation, has been involved [48–50] and we reasoned that these FAs may be stored or recycled accordingly. We thus decided to investigate the ability of two strains, LS3 (*B. raffinosifermentans*) and CBS 82244^T (*B. adenivorans*), to grow and produce lipids at four different temperatures 28°C, 37°C, 42°C and 45°C.

Cultures in C/N 60 glucose media were periodically monitored by OD₆₀₀ and microscopy to evaluate temperature-dependence for growth capacity of the strains and possible filamentation. Both strains grew at each temperature tested (Fig. S5). However, in contrast to CBS 8244^T, growth of LS3 was lowered with high temperatures (42°C and 45°C) (Fig. S5 for OD, Fig. 6A for biomass in g/L). In our lipogenic YNB medium, hyphae were only transitorily detected (Fig. S5), contrarily to other media such as YPD which gradually pushed the LS3 and CBS 8244^T cells into (pseudo)hyphae above 37°C and 42°C, respectively ([9], our unpublished results in YPD medium).

The amount of cellular FAs, as growth, revealed quite independent of temperature for CBS 8244^T (Fig. 6B). Instead, LS3 showed an optimum at 37°C for its lipid content (around 20 % and 25 % higher than at 28°C and 42°C, respectively). Unexpectedly, sugar consumption was temperature-dependent for both CBS 8244^T and LS3, with opposite trends however (Fig. 6C). For strain LS3, glucose consumption was lower at elevated temperatures (42°C and 45°C), in line with the lower biomass obtained. Instead, glucose consumption of strain CBS 8244^T was higher at elevated temperatures, though the amounts of lipid and biomass were globally conserved. In sum, bioconversion yields ($Y_{FA/S}$) calculated after 72 h flask-cultivation were within the range of 0.048 to 0.093 (Fig. 6D and Table S2). Higher yields were obtained at lower temperatures (28°C, 37°C) for both strains; the difference was more pronounced for LS3 however. In their lowest range (e.g. for CBS 8244^T at all temperatures), $Y_{FA/S}$ overcame at least by 50% those reported for *Y. lipolytica* strains not engineered for lipid metabolism such as W29 (0.032 in [29]), or derived strain (0.023 in [51]) cultivated for longer periods, or approach the values obtained for *Y. lipolytica* strain NS18 specially selected for biotechnological applications (0.06 in [52]). In the highest range, the best yield ($Y_{FA/S} = 0.093$ at 37°C) was close to that of *Y. lipolytica*

strains engineered for lipid production, such as highly genetically modified JMY3501 (0.10 in [29]) or DGA1-overexpressing strain (0.094 in [51]). We conclude that, despite a moderate decrease in the amount of stored FAs for LS3 cultivated above 37°C, lipid metabolism of *B. adenivorans* and *B. raffinosifermentans* was still active at high temperature, up to 45°C.

Finally, we examined FA composition for each strain at each temperature, early in the culture (4h30) and at 24 h and 72 h (Fig. S6 and Table S3). The most divergent profiles between the two strains were globally observed at 4h30. At that stage, as lipid content of the cells is still low (4-8 % DCW), structural lipids are likely to significantly contribute to these differences. In this regard, a specific trait of CBS 8244^T relative to LS3 is its richness in both C16:0 and C18:2, rather independent of the temperature (37°C– 45°C). At later times, the proportion of accumulated C18:0 contributed to distinguish the two strains (at least 60% higher in CBS 8244^T than in LS3 at 72 h). The same bias was also observed after 96 h cultivation of two other strains at 28°C in the respective species *B. adenivorans* (CBS 7766) and *B. raffinosifermentans* (CBS 7377) (Fig. S4). On the whole, at 72 h, the degree of unsaturation (DUS) of total FAs is slightly lower in CBS 8244^T than in LS3 whatever the temperature (by 6 to 14%).

Growth temperature had only a moderate effect on global FA composition of the cells. In the 28-45°C temperature array, no specific temperature-dependent FA could be detected, the same four main FAs remained and their relative abundance had rather moderate impact on the global DUS and chain length index (C16/C18). For each strain, at each stage of growth, temperature-dependent variation (max difference) of DUS and C16/C18 was under 8.5% and 38%, respectively. Other authors also observed that the group of major FAs in total lipids of different yeast species remained the same over a wide range of temperatures [48,53,54]. Though, DUS and C16/C18 could be altered by more than 25% and 100%, respectively [53,54]. Their detailed analysis revealed complex alteration in the abundance of FAs and its dependence on the range of temperatures, the specific nature of FAs (in particular presence of C18:3 or C16:1) in the species and on the lipid class (the different categories of phospholipids, triacylglycerols). In our analysis which considered only total lipids, modest alteration of FA composition also appeared complex and depending on strain and range of

temperature. However, we noticed a similar effect of elevated temperatures for both CBS 8244^T and LS3 at 72 h on some particular FAs (Fig. S6). From 28°C to 42°C, C16:0 and C18:1 moderately decreased in proportion of total lipids whereas C18:0 and C18:2 increased. As a consequence, increasing temperatures led to closer proportions of C16:0 and C18:2 (likely stored at that stage). The FA profile at 45°C was rather similar to that at 42°C for each strain.

Asides, we observed that, independent of temperature, cellular FAs quantified at early times of the culture did not quite reflect the proportions of FAs that will be later accumulated. Formation and storage of FAs depend on the regulation, activity and specificity of FA elongation and desaturation machineries and of acyltransferases which remain to be explored in these yeasts. Comparing FA proportions at 4h30 and 72 h, we observed that C18:1 accumulated preferentially to C18:2 in CBS 8244. Instead, C16:0 was preferentially stored over C18:0 in LS3.

As a conclusion, lipid metabolism of LS3 and CBS 8244^T strains was rather robust in the range of temperatures 28°C-45°C. Temperature had a moderate impact on the amount and nature of total cellular FAs, though LS3 showed an optimum of lipid production at 37°C. This robustness of lipogenesis to temperature variation was not observed for strains of the thermophilic species *Kluyveromyces marxianus*. Eleven strains very recently screened for lipogenesis all showed higher FA content at 42°C (10% of DCW, mainly stored as free fatty acids, for the best strain) than at 30°C [55].

CONCLUSIONS

Harnessing microbial lipid metabolism to produce oils or other chemicals of interest is a promising alternative to petroleum or plant oil. However, limitations in use of yeasts have been pointed out, such as poor utilization of certain types of substrates, weak xerotolerance, limited yield in lipid conversion in competition with other metabolic pathway or difficult culturing in bioreactor (filamentation, foaming). We believe that the availability of a set of various microorganisms may be useful in view of different applications. *B. adenivorans* and *B. raffinosifermentans* exhibit many advantageous traits, such as their xerotolerance and their efficient lipid metabolism up to 45°C.

Fruitful developments should arise from their metabolic engineering, permitted by existing genetic tools or future tools of genome editing and facilitated by their small genome.

MATERIALS AND METHODS

Strains, genotyping, identification

Yeast strains formerly classified as *B. adenivorans* are listed in table 1. LS3 was in the collection of IPK, other strains were obtained from the CBS-KNAW collection.

Genotyping of these strains was performed by intergenic spacer rDNA amplification and *A/ul* Fingerprinting (IGSAF). The IGSAF technique has been successfully used to differentiate previously misidentified species in different taxa [56,57].

Entire ITS + D1D2 region of rDNA was amplified from genomic DNA in a single run as previously described [58] with the primer pair ITSF (5' AGGAACTAAAAGTCGTAACAAG) and DDR (5' GGTTTTACACCCAAACACTC). After sequencing, the ITS and D1D2 sequences were delimited before multiple alignment with clustalX [59]. Sequences used for strain identification were as follows: ITS-D1D2 for LS3 was extracted from all genome sequence at the GRYC database (<http://gryc.inra.fr>); ITS-D1D2 fragments for CBS 8244, CBS 7350, CBS 7766, CBS 8335, CBS 7377, CBS 7370 and mitochondrial mtCOXII (partial sequence) for CBS 7370 and LS3 were deposited at ENA under accession numbers LR031515 to LR031520 ; type strain sequences for the mt COXII marker were retrieved via Yeast IP and had the Genbank accession numbers DQ443105.1 (CBS 6800) and DQ443104.1(CBS 8244).

BLAST search

Homologous gene products shared by *Y. lipolytica* E150 and *B. raffinosifermentans* LS3 were searched for by reciprocal BLASTP with the BLOSUM62 matrix using facilities of the GRYC database (<http://gryc.inra.fr>) and a threshold of $1.e^{-40}$.

Media and growth conditions

Rich medium YPD (yeast extract, peptone and glucose, 10 g/L each) was used for precultures and minimal medium (YNB) supplemented with different carbon sources for cultures. All YNB-based media contained 1.7 g/L yeast nitrogen base (without amino acids and ammonium sulfate, Difco, Paris), NH₄Cl as the nitrogen source and were buffered with 50 mM phosphate buffer (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, pH 6.8). Cells were cultured at 28°C otherwise indicated. Absorbance at 600 nm (OD₆₀₀) was measured with a LKB-Novaspec II spectrophotometer (Pharmacia), except for growth tests in microplates.

Growth tests were carried out in 96-well microplates (Greiner) incubated in a BIOTEK synergy MX plate reader, under strong and constant agitation. OD₆₀₀ was measured every 20 minutes. Wells were filled with 190 µl YNB-based buffered media with glucose, xylose or glycerol (at both 10 g/L and 2 g/L concentrations), all supplemented with 5 g/L NH₄Cl. They were inoculated with 10 µl of a cell suspension from overnight preculture in YPD, normalized to OD₆₀₀ of 4 by addition of the desired volume of YNB (without carbon) to the cell pellet.

Cultures for lipid accumulation

These experiments were carried out in 500 mL baffled flasks, filled with 100 mL YNB-based medium and incubated under agitation at 160 rpm in a Minitron incubator (INFOR-HT, Switzerland). Carbon sources were added at a concentration of 30 g/L. When indicated, carbon-to-nitrogen mass ratio (C/N) was adjusted to 60 and 90 by 0.75 g/L and 0.5 g/L NH₄Cl, respectively. Oleic acid (65.0-88.0%, Sigma-Aldrich) used in this study contained 70% C18:1(n-9) cis, 3% C18:1(n-9) trans, 7% C18:2(n-6), 1.2% C17:1, 3.9% C16:0, 4.7% C16:1(n-7), 0.9% C16:1(n-9) and other FAs in low proportions [60]. Cultures were routinely performed at 28°C. The experiment at different temperatures was carried out for 72h in four incubators in which temperature was recorded by USB thermometers.

Precultures were grown 20 h at 28°C in flasks filled with YPD and were used for culture inoculation at OD_{600nm} of 0.5. YPD of the preculture was prior eliminated by centrifugation and suspension of the cells in YNB without carbon and nitrogen.

FA and biomass quantification

Lipid content of cells was determined by quantifying their FA fraction. Cells from 10 mL culture samples were collected in pre-weighed tubes, washed twice in water (for cultures in sugar-based medium) or successively twice in a mixture of BSA 0.5% and NaCl 0.9% and once in water (for oily medium), and eventually resuspended in 1 mL water. After freeze-drying for 24 hours at -55°C (Alpha 1-2Dplus, Bioblock Scientific), samples in their tubes were weighed and stored at -20°C. Difference in tube weights represented the mass of cells found in 10 mL of culture and permitted to calculate biomass in g/L.

Fatty acids methyl esters (FAMES) were recovered from 10-20 mg aliquots of freeze-dried cells (2-4 mg in samples collected at 4h30) according to a hot methanol-H₂SO₄ method adapted from Browse et al. [61], and analyzed by gas chromatography on a Varian 430 equipped with a flame-ionization detector and a FactorFour vf-23 ms column as previously described [29]. FAMES were identified by comparison with commercial standards (FAME32; Supelco); an internal FA standard (equivalent of injected 100 µg C12:0 from Sigma) introduced in each sample prior to transesterification enabled FA quantification in the analyzed aliquots.

The terms FA fraction or lipid content were interchangeably used in the text and were expressed with respect to DCW (FA fraction of 1% DCW = 10 mg FA per g of dry cell).

FA profiles and index

Main identified FAs were as follows: C18:1(n-9)cis (oleic acid, simplified as C18:1 in the text), C18:0 (stearic acid), C18:2(n-6)cis (linoleic acid, simplified as C18:2), C16:0 (palmitic acid). Were also identified C16:1(n-9)cis (palmitoleic acid) or C16:1(n-7) both grouped under C16:1. Unidentified or

minor FAs were grouped under 'others'; among them C18:3 was sporadically detected (relative amount < 0.45%).

Degree of unsaturation [50] was calculated as follows: (percentage of monoemes + 2x percentage of dienes)/ total percentage of four main FAs. C16/C18 [53] was calculated as the ratio of carbon-chain length of 16 to carbon-chain length of 18 in the four main FAs.

Quantification of sugars and organic acids

Immediately after centrifugation of culture samples, supernatants were conserved frozen (-20°C). Prior to analysis, they were homogenized, centrifuged again to eliminate any remaining cell and were diluted 10 times in water. They were analyzed by HPLC (UltiMate 3000, Dionex-ThermoFisher Scientific, UK) coupled to UV (210 nm) and RI detectors. The Aminex HPX87H column (Thermo Scientific, Waltham, MA) was eluted with 0.01 N H₂SO₄ at 35°C at a flow rate of 0.6 mL/min. Peak integration, identification and quantification were performed using CHROMELEON software (Thermo Scientific, USA) and via comparisons to standards (purchased at Sigma-Aldrich).

Cell imaging

Images were acquired using a Zeiss Axio Imager M2 microscope (Zeiss, Le Pecq, France) fitted with an objective Apochromat 100x/1.40 oil M27, and operated with Axiovision 4.8.2 software. Fluorescently-stained lipid bodies were visualized using Zeiss filters 45 and 46, after incubating culture samples with 1.5 µg/mL BODIPY[®] Lipid Probe (493/503 (D-3922), Invitrogen) for at least 15 min at room temperature.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

not applicable

Consent for publication

not applicable

Availability of data and material

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by INRA; DS was funded by IDB (Islamic development bank) during its Ph.D.

Authors' contributions

CN and AMCLC conceived and supervised the study. ST and DS performed experiments for lipid production and participated in their analysis. FF performed preliminary experiments for lipid production and carried out growth tests with AMCLC. VN performed IGSAF and genotyping. GK provided strain LS3 and knowledge on the species and discussed the results. AMCLC wrote the manuscript, all authors commented on. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank A. Beopoulos, R. Ledesma-Amaro and Jean-Marc Nicaud for helpful discussions. R. Ledesma-Amaro is acknowledged critical reading of the manuscript.

References

1. Kurtzman CP, Robnett CJ. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Res.* 2007;7:141–51.
2. Middelhoven WJ, Hoogkamer-Te Niet MC, Kreger-Van Rij NJ. *Trichosporon adenivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1984;50:369–78.
3. Van der Walt JP, Smith MT, Yamada Y. *Arxula* gen. nov. (Candidaceae), a new anamorphic, arthroconidial yeast genus. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1990;57:59–61.
4. Samsonova IA, Kunze G, Bode R, Bottcher F. A set of genetic markers for the chromosomes of the imperfect yeast *Arxula adenivorans*. *Yeast.* 1996;12:1209–17.

5. Rosel H, Kunze G. Integrative transformation of the dimorphic yeast *Arxula adeninivorans* LS3 based on hygromycin B resistance. *Curr Genet.* 1998;33:157–63.
6. Middelhoven WJ, de Jong IM, de Winter M. *Arxula adeninivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1991;59:129–37.
7. Buttner R, Bode R, Birbaum D. Alcoholic Fermentation of Starch by *Arxula adeninivorans*. *Zentralbl Mikrobiol.* 1992;147:225–30.
8. Boer E, Schroter A, Bode R, Piontek M, Kunze G. Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adeninivorans*. *Yeast.* 2009;26:83–93.
9. Wartmann T, Kruger A, Adler K, Duc BM, Kunze I, Kunze G. Temperature-dependent dimorphism of the yeast *Arxula adeninivorans* Ls3. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1995;68:215–23.
10. Robert V, Cardinali G, Casadevall A. Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. *BMC Biol.* 2015;13:18.
11. Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquie-Moreno MR, Thevelein JM. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res.* 2015;15.
12. Kunze G, Gaillardin C, Czernicka M, Durrens P, Martin T, Boer E, et al. The complete genome of *Blastobotrys (Arxula) adeninivorans* LS3 - a yeast of biotechnological interest. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7:66.
13. Malak A, Baronian K, Kunze G. *Blastobotrys (Arxula) adeninivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research. *Yeast.* 2016;33:535–47.
14. Maskow T, Rollich A, Fetzer I, Ackermann JU, Harms H. On-line monitoring of lipid storage in yeasts using impedance spectroscopy. *J Biotechnol.* 2008;135:64–70.
15. Olstorpe M, Pickova J, Kiessling A, Passoth V. Strain- and temperature-dependent changes of fatty acid composition in *Wickerhamomyces anomalus* and *Blastobotrys adeninivorans*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2014;61:45–50.
16. Stockmann C, Scheidle M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, et al. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adeninivorans*, a re-assessment. *Microb Cell Fact.* 2009;8:22.
17. Adrio JL. Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 2017;
18. Boulton CA, Ratledge C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP:citrate lyase. *J Gen Microbiol.* 1981;127:169–76.
19. Vorapreeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology.* 2012;158:217–28.
20. Dulermo R, Gamboa-Melendez H, Ledesma-Amaro R, Thevenieau F, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* AAL genes are involved in peroxisomal fatty acid activation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861:555–65.

21. Liang MH, Jiang JG. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Prog Lipid Res.* 2013;52:395–408.
22. Athenstaedt K. YALIOE32769g (DGA1) and YALIOE16797g (LRO1) encode major triacylglycerol synthases of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811:587–96.
23. Beopoulos A, Haddouche R, Kabran P, Dulermo T, Chardot T, Nicaud JM. Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93:1523–37.
24. Zhang H, Damude HG, Yadav NS. Three diacylglycerol acyltransferases contribute to oil biosynthesis and normal growth in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Chichester Engl.* 2012;29:25–38.
25. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribebarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res.* 2009;48:375–87.
26. Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:1047–50.
27. Beopoulos A, Nicaud JM, Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90:1193–206.
28. Dulermo T, Lazar Z, Dulermo R, Rakicka M, Haddouche R, Nicaud JM. 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.* 2015;1851:1107–17.
29. Lazar Z, Dulermo T, Neuveglise C, Crutz-Le Coq AM, Nicaud JM. Hexokinase-A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng.* 2014;26:89–99.
30. Kunze G, Kunze I. Characterization of *Arxula adenivorans* strains from different habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1994;65:29–34.
31. Weiss S, Samson F, Navarro D, Casaregola S. YeastIP: a database for identification and phylogeny of *Saccharomycotina* yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2013;13:117–25.
32. Kurtzman CP, Robnett CJ. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Res.* 2007;7:141–51.
33. Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environ Microbiol.* 2017;19:878–93.
34. Papanikolaou S, Rontou M, Belka A, Athenaki M, Gardeli C, Mallouchos A, et al. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Eng Life Sci.* 2017;17:262–81.
35. Workman M, Holt P, Thykaer J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express.* 2013;3:58.
36. Bommareddy RR, Sabra W, Maheshwari G, Zeng A-P. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microb Cell Factories.* 2015;14:36.

37. Ledesma-Amaro R, Lazar Z, Rakicka M, Guo Z, Fouchard F, Coq AC, et al. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose. *Metab Eng.* 2016;38:115–24.
38. Brevnova EE, Iv AJS, VAN DJP. Increasing lipid production and optimizing lipid composition [Internet]. 2015 [cited 2018 Aug 1]. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2015184277A1/zh>
39. Bharathiraja B, Sridharan S, Sowmya V, Yuvaraj D, Praveenkumar R. Microbial oil - A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresour Technol.* 2017;233:423–32.
40. Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80:749–56.
41. Wei Y, Siewers V, Nielsen J. Cocoa butter-like lipid production ability of non-oleaginous and oleaginous yeasts under nitrogen-limited culture conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101:3577–85.
42. Froissard M, Canonge M, Pouteaux M, Cintrat B, Mohand-Oumoussa S, Guillouet SE, et al. Lipids containing medium-chain fatty acids are specific to post-whole genome duplication *Saccharomyces* yeasts. *Bmc Evol Biol.* 2015;15.
43. Amara S, Seghezzi N, Otani H, Diaz-Salazar C, Liu J, Eltis LD. Characterization of key triacylglycerol biosynthesis processes in rhodococci. *Sci Rep.* 2016;6:24985.
44. Matatkova O, Gharwalova L, Zimola M, Rezanka T, Masak J, Kolouchova I. Using Odd-Alkanes as a Carbon Source to Increase the Content of Nutritionally Important Fatty Acids in *Candida krusei*, *Trichosporon cutaneum*, and *Yarrowia lipolytica*. *Int J Anal Chem.* 2017;2017:8195329.
45. Rezanka T, Kolouchova I, Sigler K. Precursor directed biosynthesis of odd-numbered fatty acids by different yeasts. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60:457–64.
46. Yun EJ, Lee J, Kim DH, Kim J, Kim S, Jin Y-S, et al. Metabolomic elucidation of the effects of media and carbon sources on fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol.* 2018;272–273:7–13.
47. Abdel-Banat BMA, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85:861–7.
48. Suutari M, Liukkonen K, Laakso S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol.* 1990;136:1469–74.
49. Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, et al. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;69:363–72.
50. Arthur H, Watson K. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *J Bacteriol.* 1976;128:56–68.
51. Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng.* 2013;15:1–9.

52. Friedlander J, Tsakraklides V, Kamineneni A, Greenhagen EH, Consiglio AL, MacEwen K, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:77.
53. Suutari M, Rintamaki A, Laakso S. The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*. *J Am Oil Chem Soc*. 1996;73:1071–3.
54. Suutari M, Rintamaki A, Laakso S. Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: alterations in fatty acid chain length and unsaturation. *J Lipid Res*. 1997;38:790–4.
55. Cernak P, Estrela R, Poddar S, Skerker JM, Cheng Y-F, Carlson AK, et al. Engineering *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Synthetic Biology Platform Host. *mBio*. 2018;9.
56. Nguyen H-V, Gaillardin C, Neuveglise C. Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. *FEMS Yeast Res*. 2009;9:641–62.
57. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen H-V. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn JMD*. 2011;13:12–22.
58. Nguyen H-V, Boekhout T. Characterization of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck, 1898) and related hybrids: assessment of molecular markers that predict the parent and hybrid genomes and a proposal to name yeast hybrids. *FEMS Yeast Res [Internet]*. 2017 [cited 2018 Sep 5];17. Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fox014>
59. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma Oxf Engl*. 2007;23:2947–8.
60. Dulermo R, Gamboa-Melendez H, Dulermo T, Thevenieau F, Nicaud JM. The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica*. *Fems Yeast Res*. 2014;14:883–96.
61. Browse J, McCourt PJ, Somerville CR. Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem*. 1986;152:141–5.

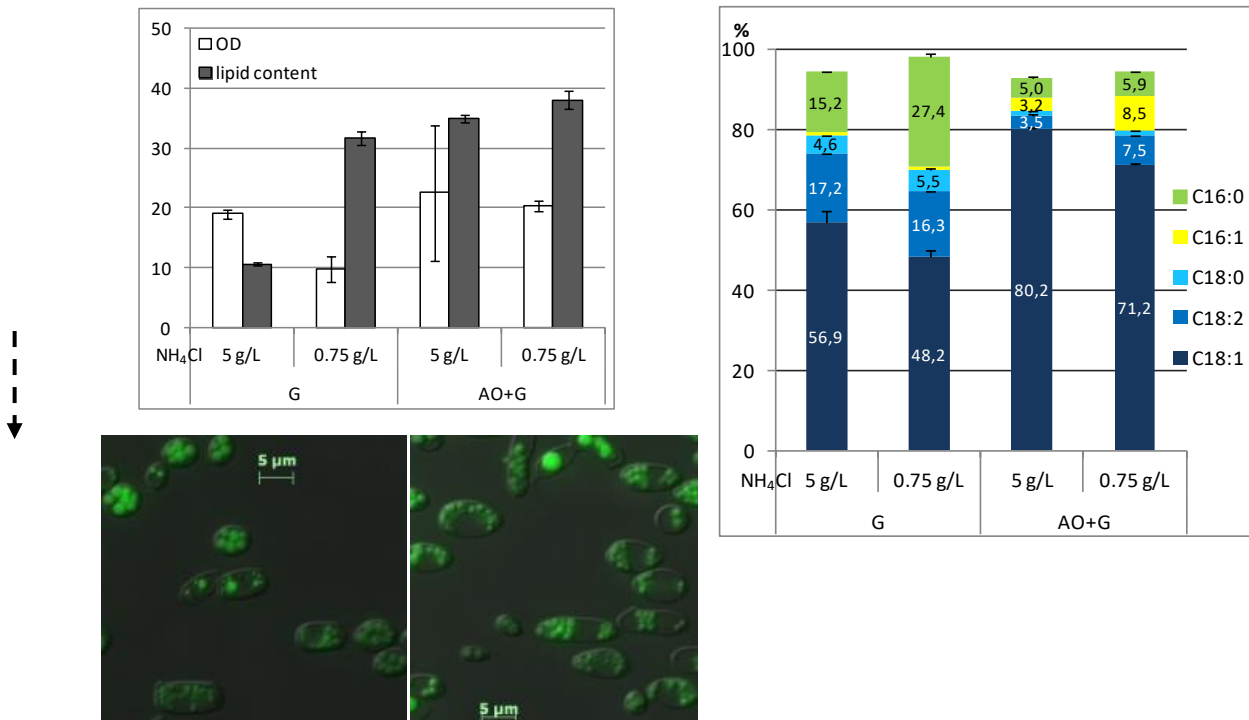


Figure 1. Effect of nitrogen limitation on the synthesis and accumulation of lipids in strain LS3.

LS3 was cultivated for 72h in YNB-based medium. The concentrations of 5 g/L and 0.75g/L NH₄Cl led to a C/N ratio of 9 and 60, respectively, for cultures in glucose (G) and to a C/N ratio of 16 and 106, respectively, for cultures in mixture of oleic acid and glucose (AO+G). A. Cell density was expressed as OD₆₀₀ and total lipid content as % of dry cell weight. Average values and standard deviations (n=2) are presented on histograms. B. Relative part (%) of main FAs in each FA profile. C. BODIPY-stained lipid droplets in cells sampled from low-nitrogen cultures in glucose (left) and in presence of oleic acid (right).

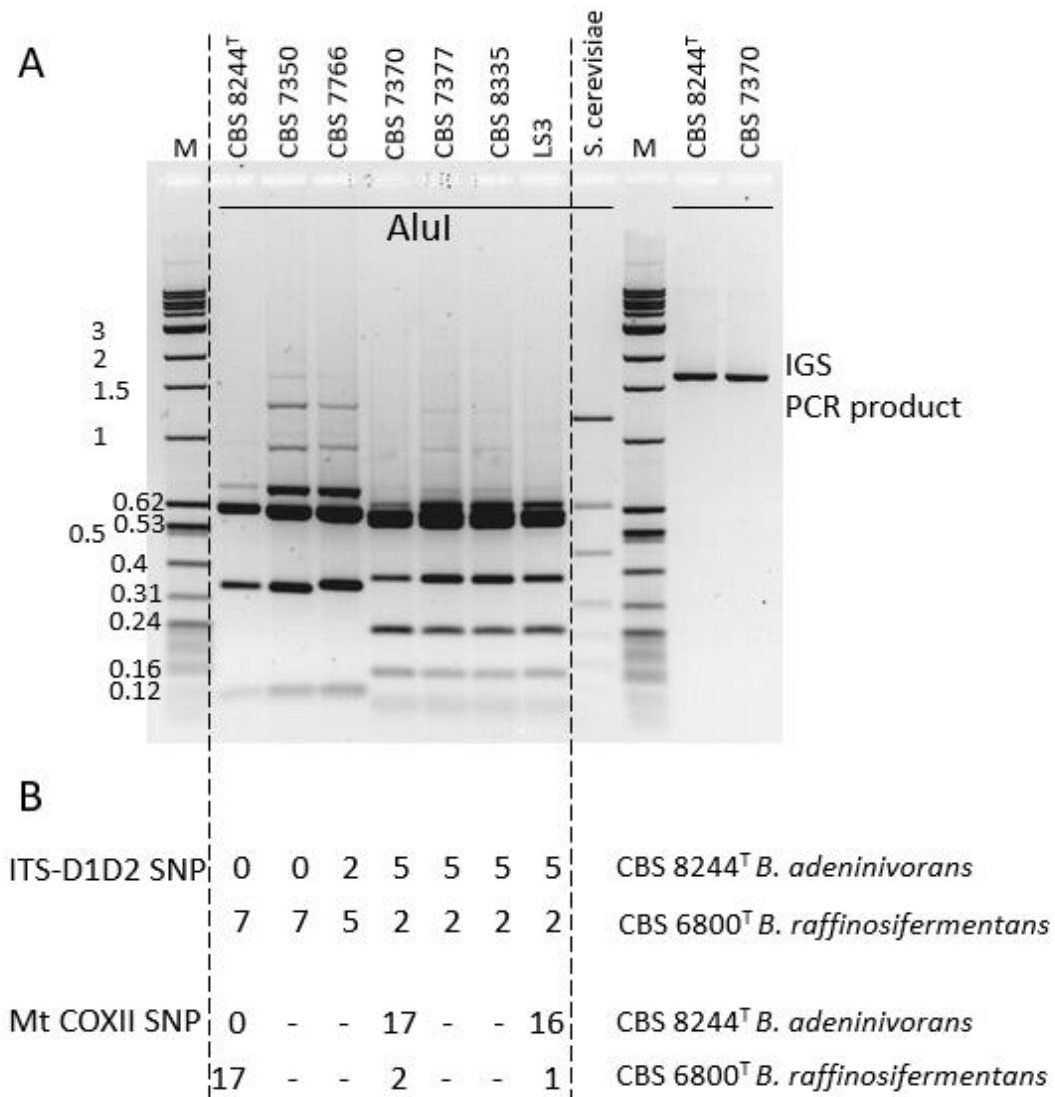


Figure 2. Two genotypic groups in strains previously identified as *B. adenivorans* and relation with *B. raffinosifermentans*.

A. IGS profiles. Right part of agarose gel shows an example of the PCR product obtained for two strains. Left part of the gel shows *AluI* restriction profiles for the 7 strains, while that of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 42367 was carried out as a control. M wells are occupied by molecular weight standard, a mixture of NEB quick-load 1 kb ladder and pBR322 *MspI*-digest, for which the size of some bands is indicated in kb. B. Single nucleotide polymorphism (SNP) in the ITS-D1D2 (1086 nt) and mitochondrial COXII (598 nt) sequences. The number of SNP (including one indel in ITS) is indicated for these markers for each comparison between the strain above and the type strains at the right. (-) means not determined.

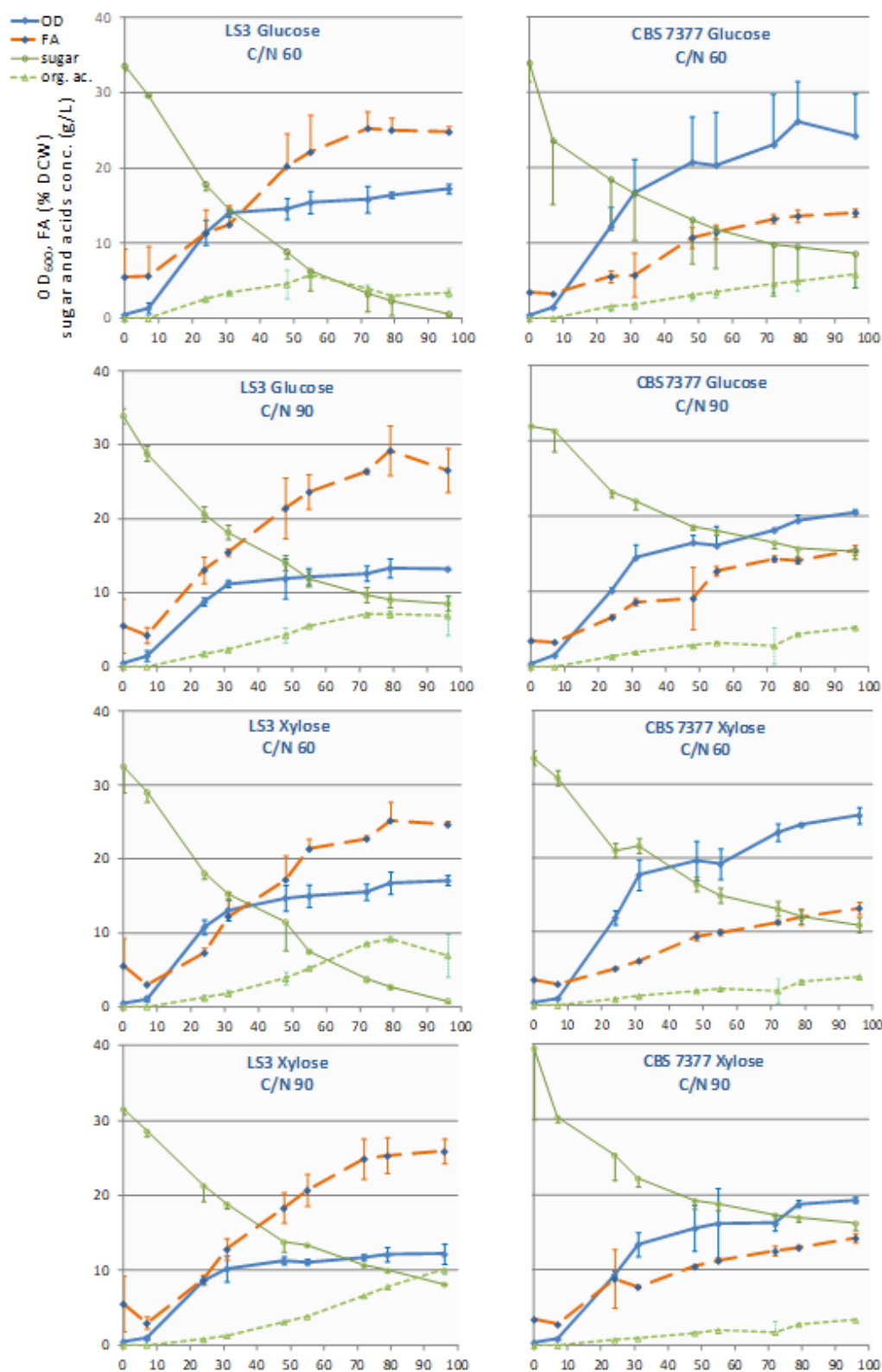


Figure 3. Bioconversion of sugars into lipids during growth of two strains of *B. raffinosifermentans* in nitrogen-limited media.

Glucose and xylose were each used as C source with two different C/N ratios. Average values and standard deviation ($n=3$) for OD 600, residual sugar in the medium (g/L), cumulative organic acids (g/L) and FA content (% DCW) were plotted over time (h).

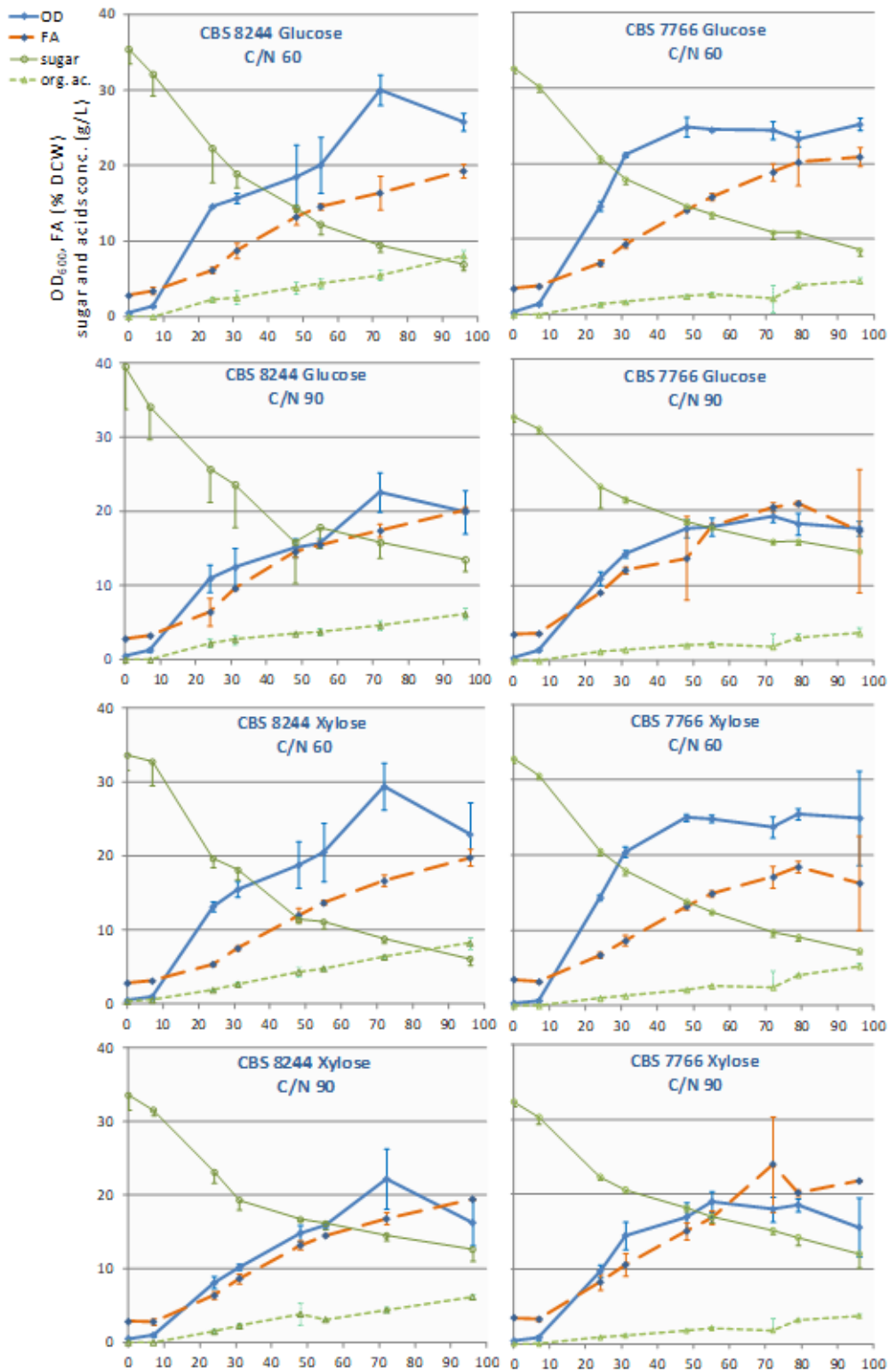


Figure 4. Bioconversion of sugars to lipids during growth of two strains of *B. adenivorans* in nitrogen-limited media.

Glucose and xylose were each used as C source with two different C/N ratios. Average values and standard deviation (n=3) for OD 600, residual sugar in the medium (g/L), cumulative organic acids (g/L) and FA content (% DCW) were plotted over time (h).

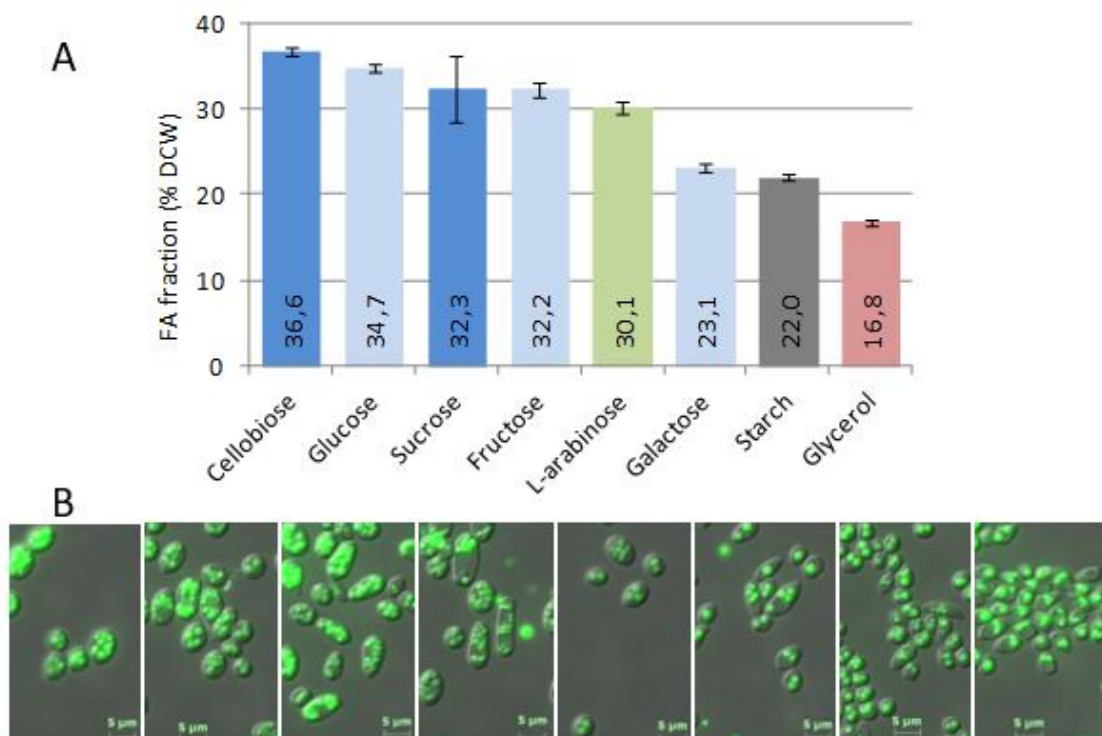


Figure 5. Bioconversion of different sugars into lipids.

LS3 was cultivated for 72h in N-limited YNB medium (0.75g/L NH_4Cl) supplemented with the indicated sugars at 30g/L. A. total lipid content (% DCW) presented as a bar with average value and mean deviation (n=2) and a color code indicative of the nature of carbon source: green, C5 monosaccharide; light blue, C6 monosaccharide; blue, disaccharide; grey, polysaccharide; red, polyol. B. Microscope images after Bodipy staining of the 72h-cultivated cells in the relevant medium (same order as histograms).

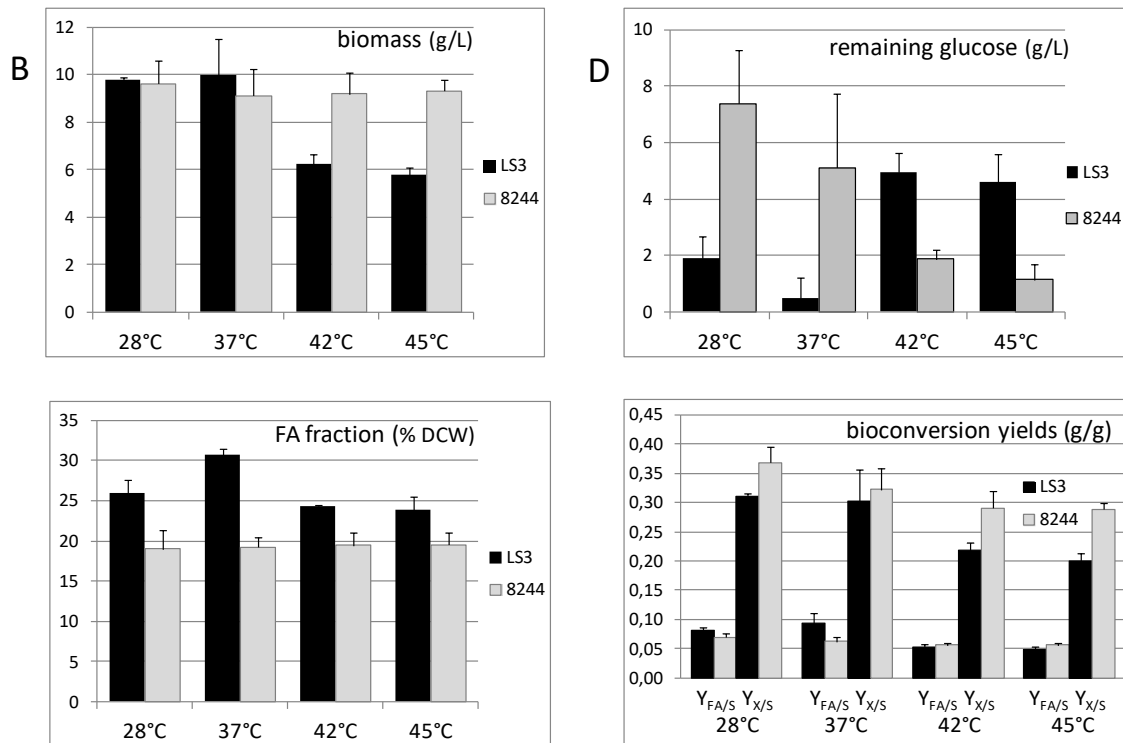


Figure 6. 72h shake-flask cultures of strains LS3 and CBS 8244^T at different temperatures.

Biomass (A), FA content of the cells (B) and glucose concentration in the medium (C) were measured after 72h cultivation in N-limited YNB medium (30g/L glucose and 0.75g/L NH₄Cl), and yields (D) were calculated. Average values and standard deviations (n=4) are presented in the histograms.

Table 1. List of strains, received as *Blastobotrys adenivorans* and reassigned into two different species

Strain	Synonym*	Isolated from	By	Reference	new species assignment
CBS 8244 ^T	CSIR 577 CLIB 1468	Soil, The Netherlands (after adenine-enriched cultivation)	Middelhoven, 1983	(Middelhoven et al., 1984)	<i>B. adenivorans</i> (type strain)
CBS 7766		Reptil (liver and intestines), Sweden	Mattsson, 1993		<i>B. adenivorans</i>
CBS 7350		Maize silage, The Netherlands	Middelhoven, 1987		<i>B. adenivorans</i>
LS3		Wood hydrolysates, Russia (Siberia)	Kapultsevich, selected as industrial strain	(Wartmann et al., 1995)	<i>B. raffinosifermentans</i>
CBS 8335		Soil (clay-like, pH 8.5), Italy	Middelhoven 1996		<i>B. raffinosifermentans</i>
CBS 7370	CSIR 1117	Soil (humus-rich), South Africa	van der Walt	(Van der Walt et al., 1990)	<i>B. raffinosifermentans</i>
CBS 7377	CSIR 1118	Soil, South Africa	van der Walt, 1988	(Van der Walt et al., 1990)	<i>B. raffinosifermentans</i>

* CSIR, Council for Scientific and Industrial Research (Pretoria, South Africa); CLIB at CIRM-Levures (France)

Table 2. Selected genes of lipid metabolism in the genome of *B. raffinosifermentans* LS3

Gene identifier	Previous function / similarities [reference yeast]*	New function prediction	amino acid % identity (coverage)	process
ARAD1B07414	Succinyl CoA ligase (alpha subunit) [sc]	ATP:citrate lyase (subunit) EC:2.3.3.8	88% (cover. 99%) with YALIOE34793	formation of cytosolic acetyl coA, precursor of FA synthesis
ARAD1D32164	Succinyl CoA ligase (beta subunit) [sc]	ATP:citrate lyase (subunit) EC:2.3.3.8	82 % (cover. 100%) with YALIOD24431	formation of cytosolic acetyl coA, precursor of FA synthesis
ARAD1C08250	Acyl-coA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) [sc]	DGAT (no change) EC:2.3.1.20	69 % (cover. 59%) with YALIOE32769	Formation of TG
ARAD1D42460	Acyl-CoA:sterol acyltransferase [sc]	DGAT EC:2.3.1.20	42 % (cover. 86%) with YALIOD07986	Formation of TG
ARAD1C30118	Weakly similar to FAT2 pero-xisomal AMP binding protein [sc]	Acyl coA synthetase	38% (cover. 99%) with YALIOE12419 (group of 10 paralogs). PTS1 motif [§]	Formation of acyl coA (peroxisomal activation of FA)
ARAD1D01914	Delta-9 fatty acid desaturase [sc]	Desaturase (no change)	63% (cover. 99%) with YALIOC05951, [56]	Formation of monounsaturated FA
ARAD1D11396	Delta-12 fatty acid desaturase [ca]	Desaturase (no change)	63% (cover. 95%) with YALIOB10153, [56]	Formation of polyunsaturated FA

* sc = *S. cerevisiae*; ca = *Candida albican* - [§]AKL in C terminus of the protein which likely targets it to peroxisome.

```

                                1 1
                                230 0
                                1 620 4
                                8 719 0
CBS 8244  TTGTCTTAGGACATTTT/GTG/AGCTGGGACCGAGGACTGCGCATCTGCTAGGATGTTGGCG
CBS 7350      A          T GTG A
CBS 7766      C          T GCG A
LS3        C          - ACA T
CBS 7370      C          - ACA T
CBS 7377      C          - ACA T
CBS 8335      C          - ACA T

```

Figure S1. Polymorphism in the ITS-D1D2 nucleotide sequence.

For each of the seven strains, a fragment spanning rDNA ITS-D1D2 was PCR-amplified. Their sequences were multi-aligned and restricted to a common fragment of non ambiguous 1086 nt. The sequence of the reference strain (CBS8244^T) is indicated as follow: it is in extent from nt 1 to 8 and from nt 1040 to 1086; within slashes, only sites of polymorphism are shown with their coordinates at the top, reading downward. SNP are indicated below for other strains, the hyphen representing a single nt deletion.

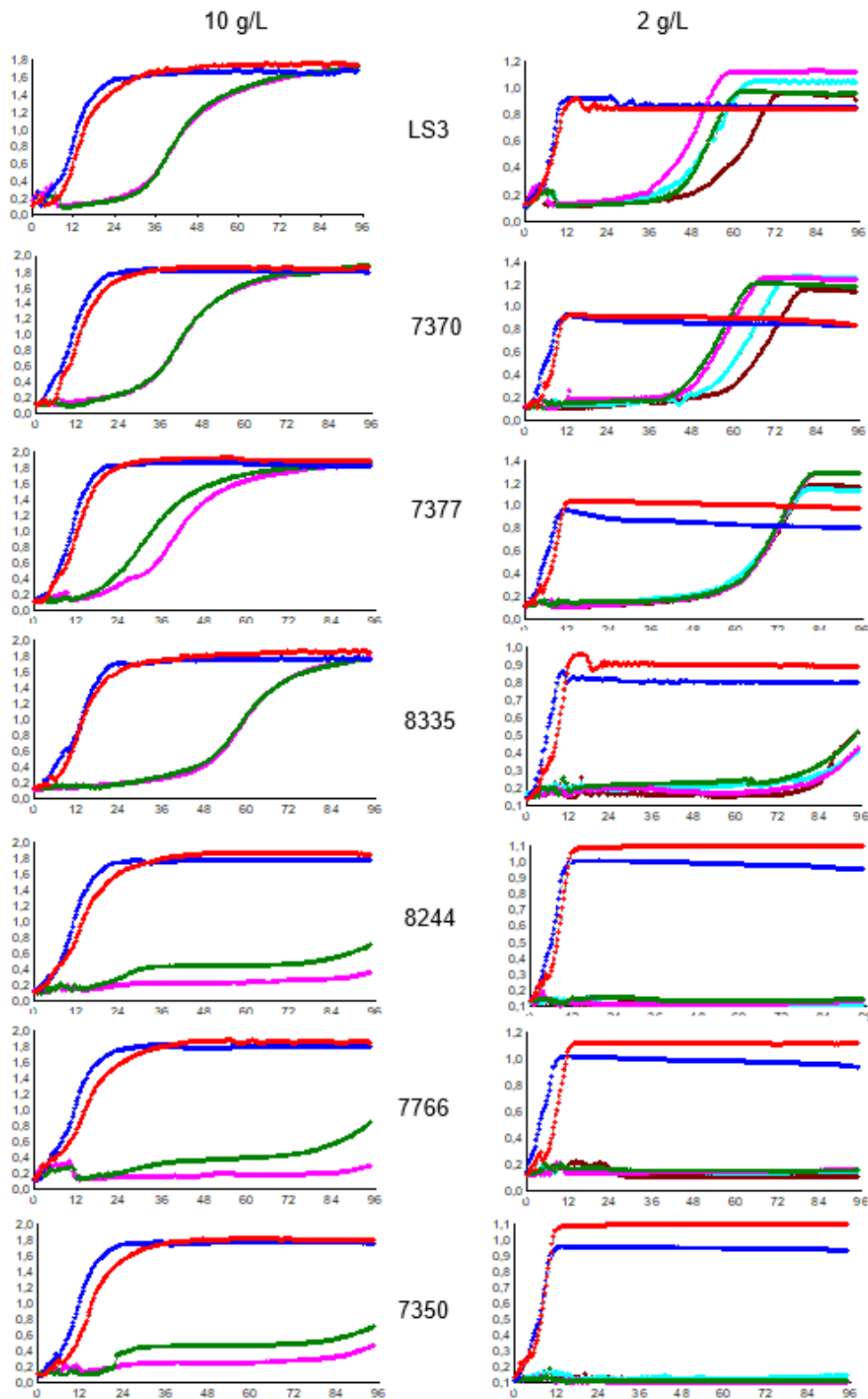


Figure S2. Growth of *B. adenivorans* and *B. raffinosifermentans* in three different substrates.

Representative growth curves plotting OD_{600} against time (hours) are shown; several curves were selected for growth in glycerol to give insights into the observed variability. Xylose (red curves), glucose (dark blue curves) and glycerol (other colors) were used at 10 g/L (left panel) or 2 g/L (right panel) to cultivate the 7 strains in 96-well microplates. Upper four strains constitute the group reassigned to *B. raffinosifermentans*. Note that max OD cannot be correctly resolved at higher concentration of substrate due to intrinsic limitation of microplate reader.

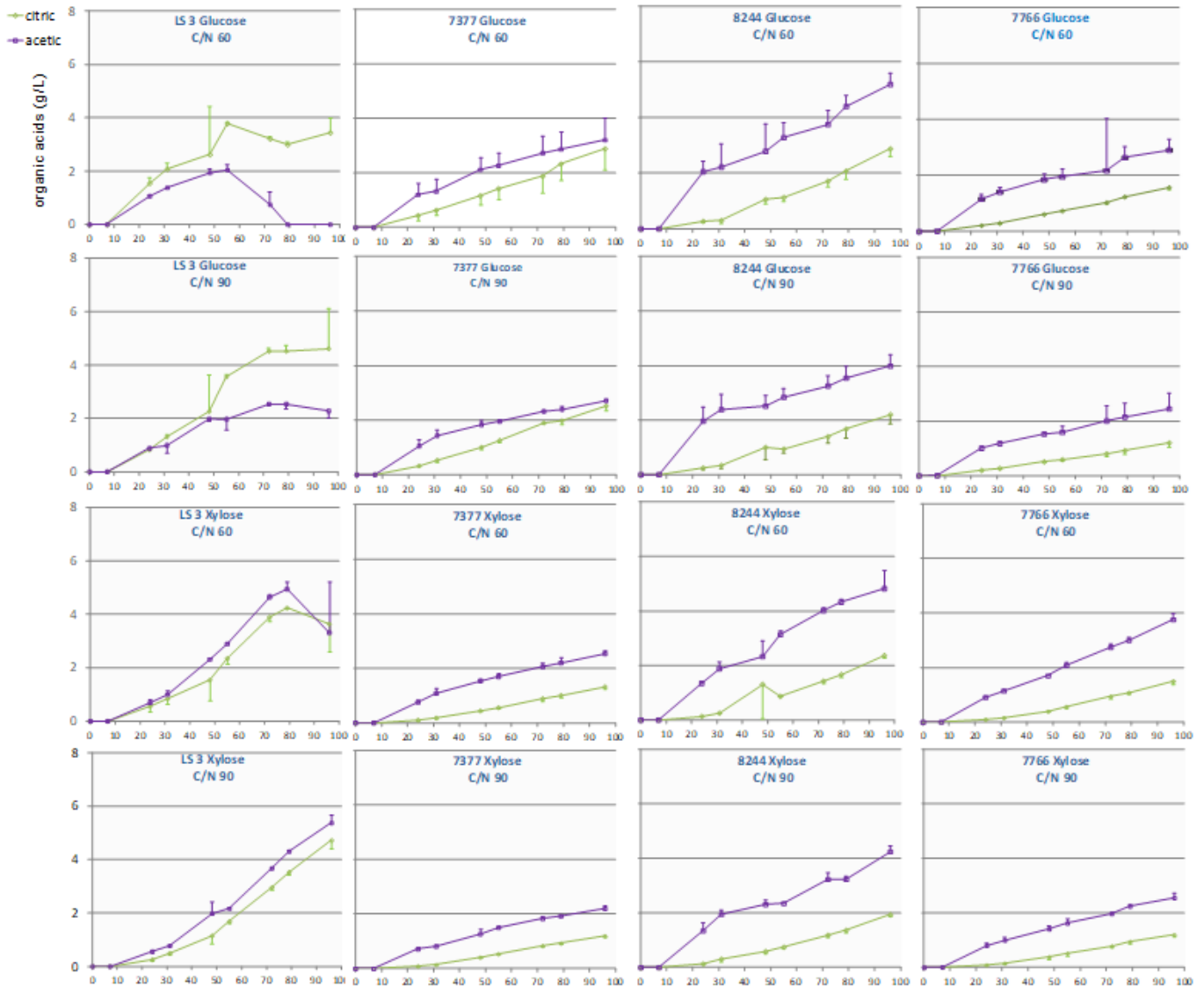


Figure S3. Organic acids excreted in lipogenic culture conditions.

The indicated strains were grown in glucose or xylose at 30 g/L with two different C/N ratios. The concentration of acetic and citric acids in culture supernatants (average values and standard deviation, n=3) is plotted over time (h).

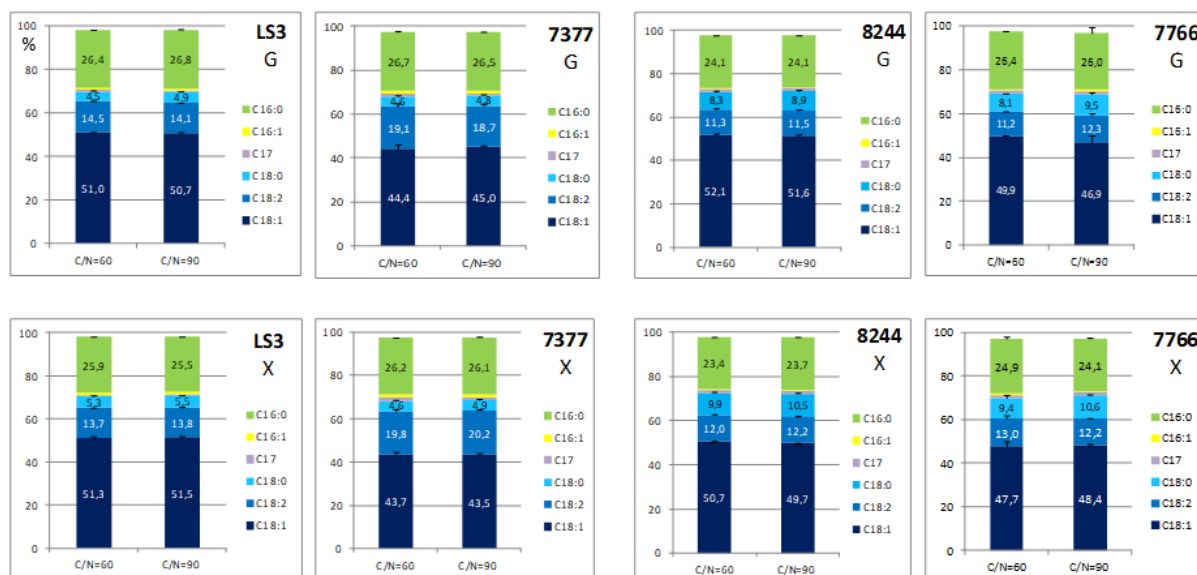


Figure S4. FA composition of strains of *B. raffinosifermentans* and *B. adenivorans* after growth in lipogenic medium.

The indicated strains were grown for 96h in glucose (G) or xylose (X) at 30 g/L with two different C/N ratios as indicated. The proportion of the different FAs is given in percentage of total FA fraction.

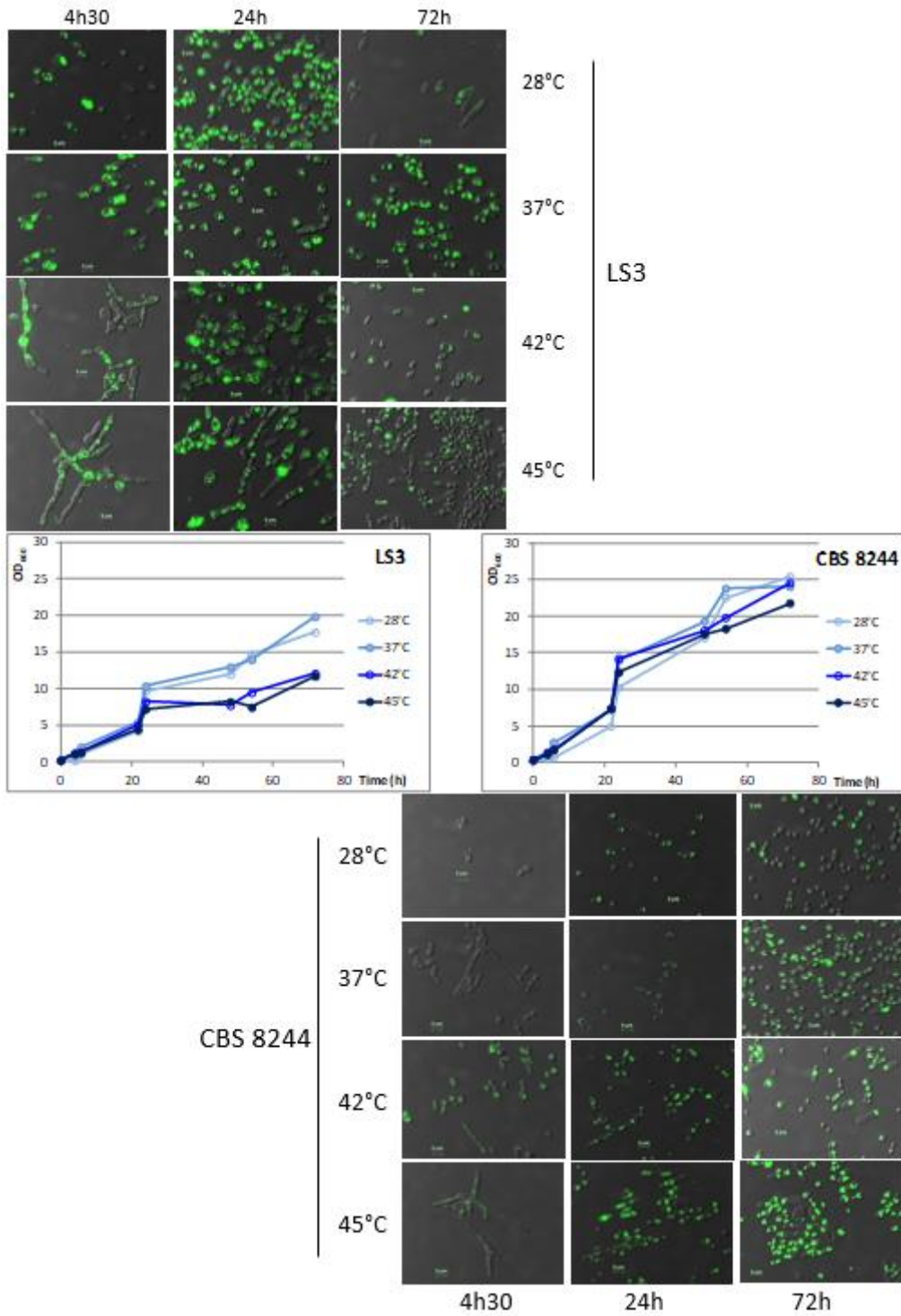


Figure S5. Growth curves and microscope images of strains LS3 and CBS 8244^T at different temperatures. Neutral lipids were colored with Bodipy.

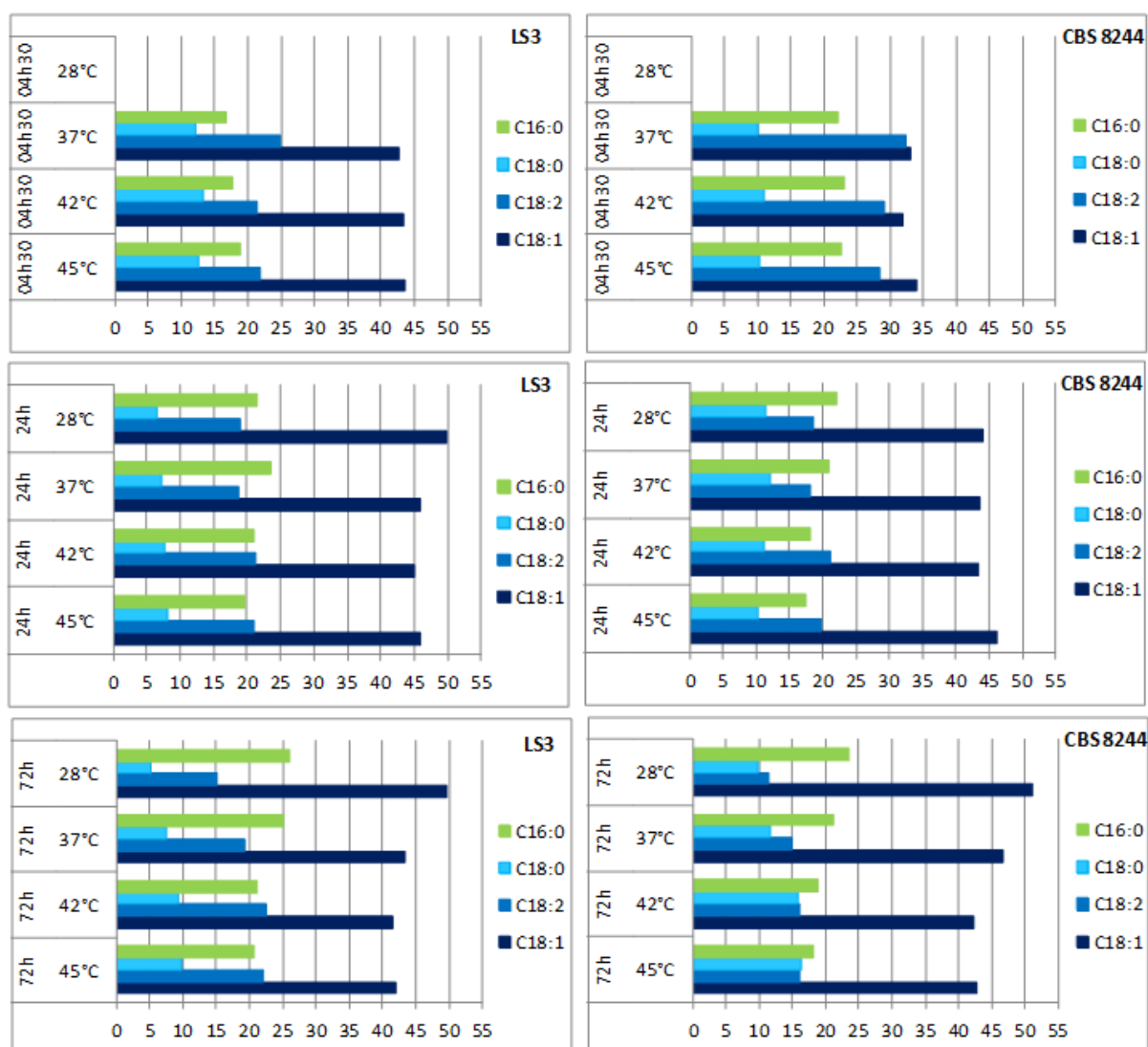


Figure S6. Relative composition of the FA fraction of strains LS3 and CBS 8244^T at different times and temperatures of cultivation in glucose lipogenic medium.

Percentage of total FA fraction (average values, n>2) is represented as a color bar for each of the four main FAs. See Table S3 for complete data.

Table S1. Total amount and composition (%) of the FA fraction of LS3 cells after growth in various substrates. Average values and mean deviation (n=2) are indicated

Substrate	Time	FA fraction (% DCW)	C18:1	C16:0	C18:2	C18:0	Others
Cellobiose	72h	34.8 ± 1.2	45.1 ± 0.6	28.1 ± 0.2	16.8 ± 0.4	6.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1
	96h	36.6 ± 0.5	45.5 ± 0.8	27.8 ± 0.0	17.1 ± 0.3	6.0 ± 0.1	3.5 ± 0.5
Glucose	72h	32.9 ± 1.2	48.8 ± 0.4	27.4 ± 0.3	14.7 ± 0.22	5.4 ± 0.3	3.7 ± 0.2
	96h	34.7 ± 0.5	48.5 ± 0.3	27.4 ± 0.3	15.0 ± 0.1	5.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2
Sucrose	72h	30.7 ± 2.2	49.6 ± 1.5	26.4 ± 0.1	14.7 ± 1.23	5.4 ± 0.1	3.9 ± 0.3
	96h	32.3 ± 3.9	49.2 ± 1.2	26.5 ± 0.1	14.9 ± 1.1	5.1 ± 0.1	4.3 ± 0.2
Fructose	72h	31.9 ± 0.2	51.3 ± 0.5	26.1 ± 0.1	13.8 ± 0.5	5.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
	96h	32.2 ± 0.9	50.0 ± 1.0	25.9 ± 0.1	14.1 ± 0.3	5.3 ± 0.1	4.6 ± 0.7
L-arabinose	72h	27.3 ± 1.1	44.0 ± 0.1	26.7 ± 0.4	19.7 ± 0.0	4.5 ± 0.1	5.1 ± 0.6
	96h	30.1 ± 0.6	48.0 ± 3.2	26.8 ± 0.9	16.1 ± 2.3	4.9 ± 0.4	4.3 ± 0.4
Galactose	72h	18.6 ± 1.6	50.7 ± 0.8	25.2 ± 0.1	15.3 ± 0.2	4.6 ± 0.0	4.1 ± 0.6
	96h	23.1 ± 0.6	50.9 ± 0.5	25.1 ± 0.2	14.7 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.0
Starch	72h	19.3 ± 2.1	55.1 ± 0.9	21.9 ± 0.5	12.1 ± 0.6	6.7 ± 0.4	4.1 ± 0.4
	96h	22.0 ± 0.4	55.1 ± 0.1	21.9 ± 0.1	12.1 ± 0.2	5.9 ± 0.3	4.9 ± 0.1
Glycerol	72h	13.2 ± 0.3	46.1 ± 0.1	19.2 ± 0.0	22.3 ± 0.4	6.3 ± 0.1	6.0 ± 0.4
	96h	16.8 ± 0.4	47.3 ± 1.2	19.4 ± 0.4	20.4 ± 0.7	6.0 ± 0.1	7.0 ± 2.3

Table S2. Calculation of yields after 72 h cultivation

		Lipid titer g/L	DCW g/L	$Y_{FA/S}$	$Y_{X/S}$
LS3	28°C	2.54 ± 0.16	9.78 ± 0.10	0.080 ± 0.007	0.310 ± 0.006
	37°C	3.08 ± 0.49	10.00 ± 1.49	0.093 ± 0.017	0.303 ± 0.053
	42°C	1.51 ± 0.12	6.22 ± 0.43	0.053 ± 0.004	0.218 ± 0.014
	45°C	1.38 ± 0.17	5.77 ± 0.34	0.048 ± 0.006	0.200 ± 0.013
CBS 82244 ^T	28°C	1.83 ± 0.28	9.62 ± 1.00	0.070 ± 0.006	0.369 ± 0.027
	37°C	1.76 ± 0.28	9.12 ± 1.13	0.062 ± 0.007	0.322 ± 0.035
	42°C	1.78 ± 0.11	9.20 ± 0.91	0.056 ± 0.003	0.291 ± 0.029
	45°C	1.82 ± 0.17	9.32 ± 0.46	0.056 ± 0.004	0.289 ± 0.011

Table S3. Total amount and relative composition (%) of the FA fraction of strains LS3 and CBS 8244^T over time at different temperatures.

LS3

		FA fraction (% DCW)	C18:1	C16:0	C18:2	C18:0	C17:0	Others	DUS	C16/C18	
4h30	28°C	6.2 ± 1.5	35.3 ± 0.9	19.0 ± 0.5	36.5 ± 1.5	9.1 ± 0.1	0.0	0.0			(n=2)*
	37°C	7.3 ± 1.4	42.7 ± 0.7	16.8 ± 0.3	24.9 ± 4.2	12.2 ± 1.9	1.0 ± 0.6	2.7 ± 1.3	0.95	0.21	(n=3)
	42°C	8.1 ± 1.8	43.4 ± 2.9	17.6 ± 0.6	21.3 ± 1.3	13.3 ± 1.3	0.9 ± 0.2	3.4 ± 2.9	0.89	0.23	
	45°C	7.4 ± 1.5	43.7 ± 2.7	18.7 ± 1.0	21.8 ± 0.8	12.7 ± 0.5	1.0 ± 0.3	2.2 ± 1.5	0.89	0.24	(n=3)
24h	28°C	14.0 ± 1.7	49.8 ± 1.3	21.4 ± 1.0	19.0 ± 0.9	6.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1	2.8 ± 0.4	0.90	0.28	
	37°C	18.0 ± 1.4	45.9 ± 0.3	23.6 ± 0.9	18.8 ± 0.7	7.2 ± 0.5	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.3	0.87	0.33	
	42°C	16.3 ± 1.6	45.0 ± 0.8	21.1 ± 0.4	21.2 ± 0.6	7.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.9	0.91	0.29	
	45°C	13.0 ± 0.9	46.0 ± 1.2	19.8 ± 0.9	21.1 ± 0.4	8.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	0.92	0.26	
72h	28°C	26.0 ± 1.7	49.6 ± 0.9	26.0 ± 0.6	15.1 ± 0.3	5.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	0.83	0.37	
	37°C	30.8 ± 0.7	43.3 ± 0.6	25.1 ± 0.5	19.2 ± 0.5	7.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.9 ± 0.4	0.85	0.36	
	42°C	24.3 ± 0.3	41.5 ± 0.5	21.0 ± 0.2	22.4 ± 0.4	9.3 ± 0.3	1.3 ± 0.2	4.4 ± 0.6	0.90	0.29	
	45°C	23.9 ± 1.6	42.1 ± 0.3	20.7 ± 0.2	22.0 ± 0.2	9.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	4.2 ± 0.3	0.90	0.38	

CBS 8244^T

		FA fraction (% DCW)	C18:1	C16:0	C18:2	C18:0	C17:0	Others	DUS	C16/C18	
4h30	28°C	7.1 ± 3.4	27.4 ± 2.1	28.8 ± 8.9	30.1 ± 17.2	11.7 ± 3.5	0.0	2.0 ± 2.8			(n=2)
	37°C	4.4 ± 0.8	33.1 ± 2.9	22.2 ± 0.8	32.5 ± 3.1	10.1 ± 0.8	1.0 ± 0.2	1.7 ± 1.6	1.00	0.29	
	42°C	4.9 ± 1.8	31.9 ± 2.6	23.0 ± 1.2	29.2 ± 6.3	10.9 ± 4.6	1.2 ± 0.1	4.1 ± 3.9	0.94	0.32	
	45°C	5.1 ± 1.1	34.0 ± 2.0	22.6 ± 0.4	28.6 ± 2.9	10.2 ± 1.5	1.8 ± 0.7	2.9 ± 2.1	0.94	0.31	
24h	28°C	8.0 ± 1.1	44.0 ± 0.4	22.0 ± 0.5	18.5 ± 0.6	11.4 ± 0.3	1.1 ± 0.4	2.9 ± 0.6	0.84	0.30	
	37°C	10.4 ± 1.5	43.6 ± 0.7	21.0 ± 0.8	18.0 ± 0.4	12.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3	3.9 ± 0.6	0.83	0.29	
	42°C	9.2 ± 0.3	43.3 ± 0.3	18.2 ± 0.8	21.1 ± 0.8	11.2 ± 1.0	1.4 ± 0.2	4.7 ± 0.8	0.90	0.24	
	45°C	8.9 ± 0.4	46.1 ± 1.5	17.4 ± 0.5	19.7 ± 0.5	10.3 ± 1.5	1.2 ± 0.1	5.4 ± 0.2	0.90	0.23	
72h	28°C	19.0 ± 2.4	51.0 ± 0.7	23.6 ± 0.4	11.5 ± 0.5	9.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1	3.2 ± 0.2	0.76	0.33	
	37°C	19.2 ± 1.3	46.6 ± 0.3	21.1 ± 0.4	14.8 ± 0.5	11.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1	4.1 ± 0.2	0.79	0.29	
	42°C	19.5 ± 1.6	42.3 ± 0.8	18.9 ± 0.4	16.2 ± 0.4	15.8 ± 0.6	1.7 ± 0.1	5.1 ± 0.4	0.80	0.25	
	45°C	19.5 ± 1.5	42.7 ± 0.6	18.1 ± 0.4	16.0 ± 0.4	16.3 ± 0.6	1.6 ± 0.1	5.3 ± 0.3	0.76	0.24	

* Tables give average values and standard deviation for n=4 except otherwise indicated.

3. Synthèse des résultats

Lors des tests mis en place sur les levures du genre *Blastobotrys*, nous avons d'abord montré avec succès le caractère oléagineux des souches étudiées. En effet, utilisant la souche LS3, nous sommes parvenus à une accumulation de 30% de lipides dans un milieu de culture YNB contenant 3% de glucose à 28°C et composé avec un ratio C:N de 60. Le pourcentage identifié chez les levures reconnues comme étant oléagineuses est de 20%.

Les autres tests ont été faits avec sept sources de carbone à un ratio C:N 60, et nous ont permis d'identifier un pourcentage total de lipides d'environ 35% sur acide oléique, 34% sur cellobiose, 30% sur fructose, L-arabinose et saccharose, 20% sur amidon et 15% sur glycérol. Le substrat acide oléique a été utilisé car il est prouvé que les levures oléagineuses sont capables de le prélever du milieu de culture et de le stocker directement dans les corps lipidiques alors que des processus de synthèse sont mis en place en présence d'autres sources de carbone non lipidiques. Soulignons ici, que la différence de stockage en milieu lipide (substrat acide oléique, 35%) et en milieu de synthèse (substrat glucose, 30%) n'est pas significative chez la levure LS3 alors qu'elle l'est chez *Y. lipolytica* (15% sur glucose et 52,2% sur acide oléique ; Michely et al., 2013). En parallèle à ces différents tests, nous avons analysé les profils lipidiques identifiés avec l'acide oléique et ceux liés aux autres sources de carbone. Ainsi, le profil obtenu avec l'acide oléique est constitué majoritairement de C18:1 (70%), C16:1 (7-8%), C18:2 (7%), et C16:0 (5,6-6%). Sur les autres substrats par contre, il est constitué de moins de C18:1 (44-56%) et de C16:1, mais de plus de C16:0 (19-28%), C18:2 (12-22%) et C18:0 (4-7%). L'acide oléique est le composé majoritaire quel que soit le substrat. Toutefois, le déplacement du profil d'acides gras vers une plus grande proportion d'acide oléique (70% de C18:1) et l'obtention de 35% de lipides suggèrent qu'une modification des voies de synthèse et de stockage des acides gras pourrait permettre d'augmenter encore la quantité de lipides.

Le troisième aspect de nos tests permettait d'analyser les variations du profil lipidique et de l'accumulation totale de lipide sous l'effet de la température (28, 37, 42 et 45°C) sur un milieu YNB à 3% de glucose. Nous avons montré que la quantité de lipides accumulés est influencée par la température chez LS3. Le niveau maximum d'accumulation de LS3 est obtenu à 37°C avec 18% à 24 h et jusqu'à 30,5% après 72 h d'incubation. Ceci n'est pas le cas pour CBS8244^T, dont le contenu en lipides est stable à 72 h quelle que soit la température.

Les analyses des profils lipidiques ont montré que l'acide gras le plus abondant reste le C18:1 quelle que soit la température mais que le reste du profil lipidique change au cours du temps. Nous avons aussi regardé la morphologie des cellules (levure et hyphes) prises par *B.*

raffinosifermentans en fonction de la température. Nos investigations en milieu YNB-glucose n'ont pas permis de corréler le passage de la forme levure à la forme d'hyphe à une température spécifique.

Résultats : Chapitre 2

Reconstruction du métabolisme des lipides de la souche LS3

1. Introduction et objectifs

Le métabolisme lipidique regroupe les différentes voies biochimiques impliquées dans la synthèse, l'accumulation, la dégradation et la réutilisation de molécules dérivées par les cellules. Ces différentes voies impliquent des réactions enzymatiques. Les voies anaboliques incluent des mécanismes réducteurs conduisant à la production de nouveaux matériaux cellulaires, tandis que les voies de dégradation sont des processus oxydatifs qui retirent des électrons des substrats ou intermédiaires de substrats utilisés pour générer de l'énergie. Il existe une diversité liée à la manière dont les intermédiaires métaboliques et les molécules biochimiques finales sont utilisés dans les voies métaboliques de production de lipides. La connaissance de cette diversité est d'une importance capitale lorsqu'on envisage d'orienter les voies métaboliques d'une levure vers la synthèse d'un composé d'intérêt.

Dans ce chapitre, je présente la reconstruction des voies du métabolisme lipidique chez la levure *B. raffinosifermentans* LS3. L'identification des gènes a été effectuée par BLAST à partir des protéines identifiées chez *Y. lipolytica* par Stéphanie Michely au cours de sa thèse (Michely, thèse de doctorat, 2014). Les gènes candidats ont ensuite été analysés pour déterminer l'adressage des protéines et le comparer à celui de *Y. lipolytica*. Les adressages protéiques portent sur la reconnaissance des séquences de l'extrémité des protéines des gènes utilisés afin de les disposer dans les différents compartiments cellulaires. L'intention de ce chapitre est de proposer un schéma métabolique relatant les différentes voies impliquées dans le métabolisme des lipides chez cette espèce.

2. Matériel et méthodes

2.1. Recherche d'homologues des gènes du métabolisme des lipides

Les gènes du métabolisme des lipides de la souche LS3 de *B. raffinosifermentans* ont été identifiés par homologie de séquence avec les gènes de la souche E150 de *Y. lipolytica*, en utilisant un Blast bidirectionnel avec un seuil de $1.e^{-10}$. Ce Blast est réalisé comme suit : un premier blastp (protéines de E150 contre le protéome de LS3) a permis de proposer des gènes candidats et un blast réciproque (candidats de LS3 contre le protéome de E150) a permis de

confirmer qu'il ne s'agissait pas d'un autre homologue. Les séquences nucléiques et protéiques de E150 et LS3 sont disponibles dans GRYC (<http://gryc.inra.fr>).

Dans sa thèse, Stéphanie Michely a considéré 204 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dont 136 sont répartis dans 37 familles de gènes. Pour s'affranchir de la redondance pour l'identification d'homologues chez *B. raffinosifermentans* LS3, nous nous sommes limités à ne considérer qu'un gène par famille pour faire les blasts et nous avons réduits le nombre de familles ou de gènes qui n'avaient pas un lien direct avec le métabolisme des lipides. Ce sont donc au total 108 gènes de la souche E150 de *Y. lipolytica* qui ont été utilisés pour le blast. Ces 108 gènes représentent 184 gènes chez E150.

2.2. Stratégies de conception du schéma métabolique

La représentation schématique des principales voies métaboliques de synthèse des lipides est faite en s'inspirant de celle disponible dans le cas de *Y. lipolytica*. Ce schéma est réalisé avec le logiciel Inkspace 0.91 et la liste des gènes du métabolisme des lipides de la souche LS3, établie par comparaison à la souche E150 de *Y. lipolytica*. Les séquences protéines de ces gènes sont récupérées dans GRYC (<http://gryc.inra.fr>).

Les voies métaboliques retenues pour la représentation schématique du métabolisme des lipides sont les suivantes : la glycolyse (convertit le glucose en pyruvate), le cycle de Krebs de la mitochondrie (produit du citrate, convertit le pyruvate en acétyl-CoA), le complexe FAS du cytosol (produit des acides gras C16 et C18), le cycle d'élongation et désaturation, le stockage des lipides et la β -oxydation du peroxyosome, pour ce qui concerne les voies de synthèses des lipides. Les compartiments dans lesquels sont retrouvées ces voies sont : le cytosol (glycolyse et cycle FAS par exemple), les mitochondries (cycle du citrate, cycle FAS mitochondrial), le réticulum endoplasmique (élongation/désaturation), les corps lipidiques (stockage des TAGs) et le peroxyosome (β -oxydation).

Après avoir retenu les voies et les compartiments utiles pour la conception du schéma métabolique, l'adressage potentiel des protéines est prédit *in silico*. Définir un adressage consiste à identifier la localisation subcellulaire des gènes du métabolisme des lipides en se basant sur la séquence protéique, notamment la séquence C-terminale ou N-terminale. Les localisations potentielles dans les compartiments cellulaires des protéines identifiées sont faites à l'aide de 5 programmes de prédictions que sont : MultiLoc2-HighRes(Champignon), Euk-mPLoc2.0, Cello v.2.5 subcellular localization predictor, PSORTII Prediction et MITOPROT. Ces outils ont été utilisés en ligne sur des serveurs listés dans le tableau 17. Une inspection

visuelle du motif de la séquence C-terminale des protéines a aussi été réalisée pour déterminer un éventuel motif PTS1 (Peroxisome targeting signal) : (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M). La localisation finale d'une protéine est déduite en comparant les résultats obtenus des 5 programmes de prédictions et en tenant aussi compte du motif PTS1 ainsi que des informations de la littérature.

Tableau 17 : Programmes utilisés pour la prédiction de l'adressage des protéines

Nom du programme	Adresse du serveur	Référence
MultiLoc2-HighRes (Champignon)	http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2 .	Blum et al.,2009
Euk-mPLoc2.0	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2	Chou et Shen,2010
Cello v.2.5 subcellular localization predictor	http://cello.life.nctu.edu.tw/	Yu et al., 2004,2006
PSORTII Prediction	https://psort.hgc.jp/helpwww2.html	Nakai et Kanehisa, 1991, 1992
MITOPROT	http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitoølter	Claros et Vincens, 1996

2.3. Description des logiciels de prédictions utilisés

Euk-mPLoc2.0

Euk-mPLoc2.0 s'intéresse aux protéines ayant des localisations multiples du fait de l'importance de ces types de protéines pour les recherches fondamentales et la pharmacie (Chou et Shen, 2010). Il ne reconnaît que des protéines d'origine eucaryote et couvre 22 localisations subcellulaires illustrées dans la figure ci-dessous (Fig. 21).

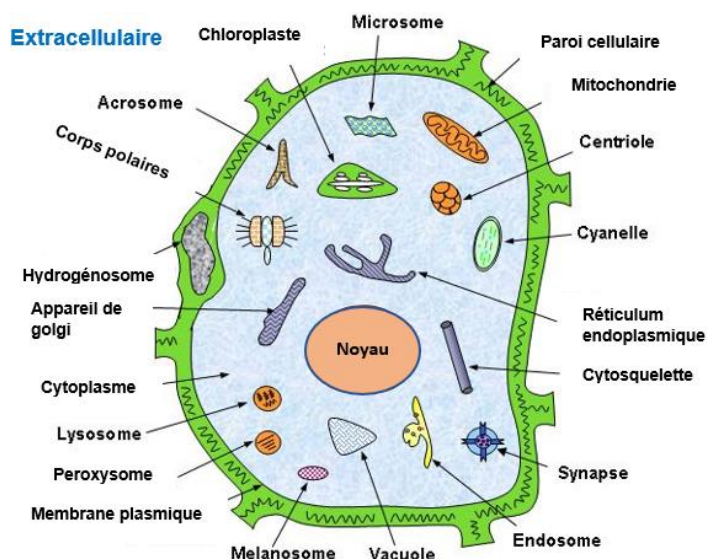


Figure 21 : Les organelles d'une cellule eucaryote

Source : <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/Readme.htm>

Multiloc2-HighRes

MultiLoc2-HighRes est un système de prédiction qui couvre 11 localisations subcellulaires des protéines chez les eucaryotes (Blum et al., 2009). Cependant, nous avons opté pour 9 localisations possibles en excluant les lysosomes et les chloroplastes.

Cello

Cello v.2.5 calcule un pourcentage de confiance pour la localisation subcellulaire des séquences protéiques d'organismes eucaryotes. C'est un serveur qui tient compte de la composition en acides aminés, la composition en di-peptides, la composition en acides aminés partitionnés en séquences de longueur égale et la composition en séquences basée sur les propriétés physico-chimiques des acides aminés (Yu et al., 2006).

PSORTII

Le programme PSORTII a été entraîné en utilisant les séquences de levure de SWISS-PROT (Boeckmann et al., 2003) avec les annotations de Csank et al. (2002). Il couvre les localisations dans les compartiments suivants : cytosquelette, cytoplasme, noyau, mitochondries, vésicules, réticulum endoplasmique (ER), Golgi, vacuole, membrane plasmique, peroxyosome, espace extracellulaire, y compris la paroi cellulaire. Pour certains de ces compartiments des motifs spécifiques sont associés à des localisations potentielles.

MITOPROT

MITOPROT tient compte des séquences cibles et des parties hydrophobes de l'extrémité N-terminale des séquences protéines et ne prédit qu'une localisation mitochondriale.

3. Résultats

3.1. Les familles de gènes

Nous nous sommes basés sur la connaissance des gènes du métabolisme des lipides de *Y. lipolytica* pour identifier par Blast leurs homologues dans la souche LS3 de *B. raffinosifermantans*. *Y. lipolytica* est connue pour avoir une expansion de certaines familles de gènes impliquées dans ce métabolisme. C'est le cas par exemple des lipases qui comptent 16 gènes chez la souche E150, ou encore des Fatty-acyl coA oxidase (gènes POX) dont on dénombre 6 membres. Nous nous sommes limités à ne considérer qu'un seul gène par famille chez E150 pour faire les blasts, soit 108 protéines. La liste des 108 familles de gènes de *Y. lipolytica*, est donnée dans le tableau 18.

Les résultats de la recherche d'homologues nous permettent de prédire 166 gènes chez LS3 qui seraient impliqués dans le métabolisme des lipides, contre 184 chez E150 si on considère ces 108 familles de gènes.

Tableau 18 : Comparaison du nombre de membres dans les familles de gènes chez *Y. lipolytica* E150 et *B. raffinosifermantans* LS3

Fonction des gènes	Noms de gènes	E150	LS3
Glycolyse	PYK1	1	1
Métabolisme du pyruvate	PDB1	1	1
	PDA1	1	1
Métabolisme central	DAK3	3	1
	PDC1	1	2
	ACL1	1	1
	ACS2	1	2
	ACL2	1	1
	PDH1	1	1
	LAT1	1	1
	IDH1	2	2
	KGD1	1	2
	KGD2	1	1
LPD1	1	1	

	ACO1	2	2
	IDP1	1	1
	ACR1	1	4
	LSC1	1	1
	LSC2	1	1
	FUM1	1	1
Métabolisme des CoA	ACH1	1	1
Métabolisme secondaire (carnitine)	CNT1	3	4
	ALD2	2	8
carnitine shuttle (acetyl-coA)	CAT2	1	1
carnitine shuttle (transport)	CRC1	1	1
Métabolisme du glycérol	GPD1	1	1
	GUT2	1	1
	GUT1	1	1
	GCY1	6	4
	GRE3	1	1
Métabolisme du lactate	DLD2	1	3
Métabolisme du cholestérol	HMG1	1	1
Transport	ABC1	5	8
Transport/activation	FAA1	1	4
	FAT1	4	5
	PXA1	1	1
	AAL1	10	1
	PXA2	1	1
	ANT1	1	1
	ANT2	1	1
Régulation de la transcription	POR1	1	5
Synthèse cytosolique & mitoch.	ACC1	1	1
Synthèse cytosolique	FAS1	1	1
	FAS2	1	1
Synthèse mitochondriale	ETR1	1	1
	ACPM1	2	2
	HTD2	1	1
	OAR1	1	0
	MCT1	1	1
Synthèse de DAG	PAH1	1	1
	SCT1	1	1
	SLC1	1	1
Synthèse à partir d'aldéhyde	HFD3	4	2
Désaturase	OLE1	1	1
	FAD2	1	1
Elongation	ELO1	1	1
	ELO2	1	1
Stockage des TAG	ARE1	1	1

	DGA1	1	1
	LRO1	1	1
	DGA2	1	1
Catabolisme de la leucine	BAT1	1	1
	BAT2	1	1
	BKT1	1	1
	ERG10	1	1
	ERG13	1	1
	IVD1	1	1
	MCC1	1	1
	MCC2	1	1
	PDA2	1	1
	PDB2	1	1
	MGH1	1	1
	MVA1	1	1
	SKT1	1	2
Mobilisation (TG lipase)	TGL32	1	1
	TGL4	1	1
	TGL1	1	1
	TGL3	1	1
	TGL2	1	0
Hydrolyse (estérase)	LIP1	4	4
	LIP2	16	0
β oxydation péroxysomale	MFE2	1	2
	POX3	6	1
	POT1	1	3
β oxydation mitochondriale	HBD1	1	1
	ACD1	4	5
	ECH2	1	2
β oxydation péroxysomale & mito	PAT1	1	1
Auxiliaire de la β oxydation	EHD3	1	2
	ECH1	1	1
	SPS191	3	2
	ISO1	5	0
ω oxydation (alcool, aldehyde)	CPR1	1	1
Autres voies	LYS4	1	1
	MAE1	1	1
	LDH1	1	1
	PDX1	1	1
	PYC1	1	1
	TES1	1	1
	AGX1	1	1
	YAS1	1	1
	YAS2	1	1

YAS3lf	1	1
YAT1	1	1
YHM2	1	1
YMC1	2	2
YMC2	1	1

Sur l'ensemble des 108 gènes ou familles de gènes de E150, 80 sont présents en même nombre de gènes chez LS3. Par exemple, il existe 4 estérases chez E150 et LS3. Il existe aussi un gène de chaque sous-unité de l'ATP-citrate Lyase (ACL1, ACL2) chez E150 et LS3. Nous avons entre autres gènes, les gènes du métabolisme central, les gènes de la glycolyse (PYK1), du cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) ou TCA (ACO1, IDP1, IDH1, LSC1, LSC2, LAT1, PHD1, FUM1), du métabolisme du pyruvate (LPD1, PDA1), les gènes responsables de la synthèse ou élongation (ACC1, ELO1, ELO2), les gènes du complexe FAS (FAS1, FAS2), les gènes de la β -oxydation (HBD1, PAT1) et des enzymes auxiliaires de la β -oxydation (ECH1), les gènes de remobilisation des lipides, les lipases (TGL1, TGL3, TGL32, TGL4) et les estérases (LIP1), les gènes du stockage des lipides (ARE1, DGA1, DGA2), des gènes transporteurs ou activateurs (PXA1, PXA2) et des désaturases (FAD2, OLE1). Nous avons aussi des gènes du métabolisme de la carnitine (CRC1), du catabolisme de la leucine (BAT1, BAT2, PDA1, PDB1, BKT1, IVD1, ERG10...).

Pour 24 autres gènes ou familles de gènes, nous pouvons noter une différence de redondance entre E150 et LS3. Six familles de E150 ont moins de membres chez LS3 comme par exemple les gènes AAL qui codent des Aryl/acyl-coA ligases au nombre de 10 chez E150 contre un seul chez LS3, ou encore les gènes POX impliqués dans la beta-oxydation des acides gras qui sont six chez E150 mais un seul gène est présent chez LS3. A ces gènes s'ajoutent les dihydroxyacétones kinases (DAK3), qui sont 3 chez E150 mais un seul est présent chez LS3, les gènes HFD3 (Fatty aldehyde dehydrogenase) au nombre de 2 chez LS3 mais qui sont 4 chez E150, les gènes ALK1 (Cytochrome P450 inducible par n-alcane) qui sont 12 chez E150 et 5 chez LS3. Au contraire, pour 18 gènes, nous notons une expansion chez LS3. Ce sont par exemple les gènes ALD avec 8 membres chez LS3 contre 2 chez E150, ou les gènes POT1 qui codent des thiolases, avec 3 membres chez LS3 contre un seul chez E150. Les gènes FAT1, sont au nombre de 5 chez LS3 contre 4 chez E150. Les gènes POX et POT1 mentionnés précédemment sont présentés dans la figure ci-dessous (Fig. 22).

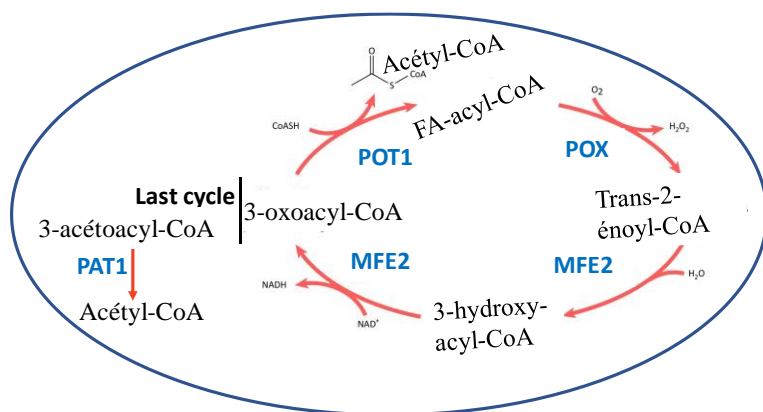


Figure 22 : Schéma de la β -oxydation du peroxyssome

Source : notre étude

Au final, ce sont 4 gènes de E150 pour lesquels nous n'avons pas trouvé d'homologues chez LS3. Il s'agit des gènes ISO1, OAR1, LIP2 et TGL2. Le gène OAR1 porte l'activité 3-oxoacyl-ACP-réductase et intervient dans la synthèse des acides gras localisée dans les mitochondries. LIP2 code une lipase extracellulaire, Lip2p, utile mais pas essentielle à l'hydrolyse des TAGs car des mutants de *Y. lipolytica* chez qui ce gène a été interrompu continuent d'hydrolyser les TAGs. Le gène TGL2 code une lipase intracellulaire chez *S. cerevisiae* localisée dans les mitochondries. Le rôle de ce gène dans le métabolisme des lipides n'est pas très bien connu mais il intervient dans la survie cellulaire en conditions de stress chez *S. cerevisiae*. La présence de ces gènes n'est probablement pas indispensable au métabolisme de *B. raffinosifermantens* du fait que d'autres gènes pourraient assumer leur fonction.

Nos travaux ont porté ensuite sur la localisation de ces gènes dans les différents compartiments cellulaires : appareil de golgi, cytosol, corps lipidiques, peroxyssomes, réticulum endoplasmique, noyau, membrane plasmique, mitochondries et vacuole.

3.2. L'adressage des protéines

Les prédictions finales de la localisation cellulaire des gènes du métabolisme sont faites sur la base de la somme des informations rapportées par l'ensemble des outils de prédiction utilisés et la littérature. Ainsi, sur les 166 gènes candidats identifiés, seulement 53 gènes présentent un adressage avec une prédiction claire, c'est-à-dire cohérente avec la littérature ou entre les différentes méthodes entre elles. Les gènes restants n'ont pas révélé un adressage concluant car les logiciels utilisés ne prédisent pas la même localisation subcellulaire. Les adressages réalisés avec succès sont principalement des adressages mitochondriaux (27 sur 53 dans le tableau 19), dans le cytoplasme (13 sur 53) ou encore des signaux de l'extrémité C-terminale des protéines

dans les peroxysomes, comme par exemple les motifs AKL, SKL et ARL. Le tableau ci-dessous (Tableau 19) présente les prédictions finales de 53 gènes du métabolisme des lipides ainsi que les signaux observés.

Tableau 19 : Adressages et prédictions finales de la localisation subcellulaire des gènes du métabolisme des lipides de *B. raffinosifermentans*

Gènes	¹ MultiLoc2	² PsortII (%)	Cello	Euk-mPLoc2.0	³ MitoProtII	PSTS1	Prédiction
ACH1	C (0,74)	C (43,5), Mi (26,1)	C, Mi				cytoplasmic
PYK1	C (0,89)	C (47,8),N (17,4),Mi (17,4)	C	Ch			cytoplasmic
IDP1	C (0,96)	C (52,2), N (13,0)	C	C,Mi,P			cytoplasmic
ACL1	C (0,94)	C (34,8), N (34,28)	Mi,C	N			cytoplasmic
KGD2	Mi (0,97)	Mi (95,7)	Mi	Mi	Mi (0,9996)		mitochondrial
PDH1	Mi (0,86)	C (52,2),N (17,4),Mi (13,0)	C	C,Mi	Mi (0,9926)		mitochondrial
LAT1	C (0,9)	C (65,2), N (13,0)	C	Mi			cytoplasmic
LDH1	C (0,5),P (0,38)	C (65,2), N (21,7)	Mi,C	C,ER, N,Mb			cytoplasmic
PDB1	Mi (0,9)	C (73,9),N (21,7)	Mi	Mi	Mi (0,9853)		mitochondrial
PDB2	Mi (0,95)	Mi (39,1),C (26,1),ER (17,4)	Ch		Mi (0,9952)		mitochondrial
PDA1	C (0,62),Mi (0,31)	C (69,6),N (21,7)	Mi	Mi	Mi (0,8620)		mitochondrial
MAE1	C (0,98)	C (65,2), N (13,0)	C	C			cytoplasmic
PAH1	C (0,56),N (0,42)	N (78,3),C (13,0)	N	N			nuclear
PDA2	Mi (0,98)	N (60,9),C (21,7),Mi (17,4)	Mi,C,N	C,Mi,N			mitochondrial
LSC2	Mi (0,95)	Mi (47,8), C (30,4), N (13,0)	Mi	Mi	Mi (0,8988)		mitochondrial
FUM1	Mi (0,96)	C (56,5), Mi (17,4)	Mi,C	C,Mi	Mi (0,9922)		mitochondrial
GPD1	Mi (0,57),C (0,39)	Mi (87,0)		C	Mi (0,9881)		mitochondrial
GUT1	C (0,71)	C (56,5),N (17,4)	C	C			cytoplasmic
GRE3	Mi (0,77)	C (39,1), Mi (21,7),N (13,0)	Mi,C	C	Mi (0,9569)		mitochondrial
MCT1	Mi (0,69)	Mi (47,8), N (34,8), C (13,0)	Mi,Mb	Mi	Mi (0,9155)		mitochondrial
HMG1	ER (0,39), G (0,31)	Mb (65,2), ER (34,8)	Mb	ER			endoplasmic reticulum
YAS3lf	N (0,93)	N (73,9),C (13,0)	N	N			nuclear
CAT2	Mi (0,69)	N (34,8),C (30,47),Mi (26,1)	Mi	P	Mi (0,996)		mitochondrial
CRC1	C (0,97)	C (65,2),nuclear(21,7)	Mi,Mb	P			cytoplasmic

LPD1	Mi (0,96)	Mi (39,1),C (30,4),N (13,0)	Mi	C,Mi	Mi (0,9402)		mitochondrial
MCC1	Mi (0,86),C (0,14)	C (47,8),Mi (26,1),N (13,0)	C	C	Mi (0,9498)		mitochondrial
PXA2	Mi (0,69),P (0,19)	ER (44,4),Mi (11,1),Mb (11,1)	Mb	P	Mi (0,9883)		mitochondrial
TES1	P (1,0)	P (77,8),Mi (11,1),C (11,1)	C,N	P		SKL	peroxisomal
MVA1	Mi (0,79),C (0,2)	C (60,9),Mi (26,1)	Mi	Mi	Mi (0,9861)		mitochondrial
MGH1	Mi (0,97)	Mi (52,2),C (30,4),N (8,7)	Mi	Mi	Mi (0,9979)		mitochondrial
ELO1	G (0,55)	ER (77,8)	Mb	ER			endoplasmic reticulum
OLE1	C (0,86)	ER (66,7),C (11,1),Mb (11,1)	Mb,Mi	ER			endoplasmic reticulum
FAS2	C (0,96)	C (52,2), N (43,5)	C	Mi			cytoplasmic
ETR1	Mi (0,81)	Mi (34,8), C (30,4), N (17,4)	Mi	Mi	Mi (0,99)		mitochondrial
PDX1	Mi (0,95)	Mi (52,2),N (34,8)	N,C,Mi	Mi	Mi (0,9879)		mitochondrial
YAS2	N (0,96)	N (60,9),C (26,1)	N	N			nuclear
HTD2	Mi (0,69)	C (34,8), N (26,1),Mi (17,4)	Mi,Mb	P	Mi (0,9552)		mitochondrial
ACC1	C (0,97)	C (56,5)	C	C			cytoplasmic
DGA1	ER (0,36)	Mi (43,5),C (21,7),ER (17,4)	Mb	ER			endoplasmic reticulum
DGA2	P (0,91)	Mb (60,9), ER (39,1)	Mb	ER			endoplasmic reticulum
LRO1	P (0,21),Mb (0,11)	Mi (39,1),C (17,4),ER (17,4)	Ch	ER			endoplasmic reticulum
LYS4	Mi (0,83)	Mi (39,1),C (21,7),ER (17,4),G (13,04)	Ch	Mi	Mi (0,9869)		mitochondrial
HBD1	P (0,98)	C (39,1),Mi (26,1)	Mi	Mi, P	Mi (0,9828)	AKL	mitochondrial,peroxisomal
YAS1	N (0,99)	N (73,9),C (17,4)	N	C,N			nuclear
PAT1	P (0,97)	P (77,8),Mi (11,1),C (11,1)	P	P	0.2235	SKL	peroxisomal
CPR1	ER (0,62)	C (34,8), Mi (21,7)	ER	ER			endoplasmic reticulum
BKT1	Mi (0,98)	C (43,5), Mi (43,5)	C,Mi	Mi	Mi (0,976)		mitochondrial
BAT1	Mi (0,73%)	C (39,1), Mi (21,7),N (26,1)	Mi,C	C,Mi,N	Mi (0,997)		mitochondrial
BAT2	C (0,83)	C (60,9),N (21,7)	C,Ch	C			cytoplasmic
ERG13	C (0,97)	C (43,5),N (30,4)		N			cytoplasmic

IVD1	Mi (0,98)	C (56,5),N (30,4),Mi (8,7)	Mi	Mi	Mi (0,9815)	mitochondrial
MCC2	Mi (0,97)	C (34,8),Mi (26,1),N (17,4)	Mi	Mi	Mi (0,9989)	mitochondrial
AGX1	Mi (0,93)	Mi (82,6)	Mi	P	Mi (0,999)	mitochondrial

^aYALI: *Yarrowia lipolytica* E150, ^bARAD: *Blastobotrys raffinosifermentans* LS3

C : cytoplasm, N : nuclear, Mi : Mitochondria, Mb : Membrane, P : Peroxisome, ER : Réticulum endoplasmique, Ch : Chloroplaste, Ex : Extracellulaire.

¹MultiLoc2-highRes with Matthews correlation coefficient (MCC), ²Prediction accuracy in %, ³Probability

$$MCC = \frac{tptn - fpfn}{\sqrt{(tp + fp)(tp + fn)(tn + fp)(tn + fn)}}$$

3.3. Le schéma métabolique par comparaison à celui de *Yarrowia lipolytica*

Le schéma métabolique de la souche LS3 de *B. raffinosifermentans* en cours de conception ci-dessous (Fig. 22) est dessiné à partir des résultats des prédictions des différents serveurs mentionnés plus haut et du schéma métabolique de *Y. lipolytica*. Ce schéma montre cinq compartiments impliqués dans la production des lipides et un réseau de réactions chimiques complexes dans lequel le produit d'une voie métabolique devient le précurseur de la voie métabolique suivante. On remarque dans ce schéma que l'acétyl-CoA emprunte différentes destinations métaboliques. Il peut être directement incorporé dans les lipides ou transféré vers les mitochondries via la navette carnitine. L'acétyl-CoA est aussi utilisé dans le cycle de l'acide citrique (TCA) pour la production d'énergie. De même, la glycolyse libère du pyruvate qui est converti en acétaldéhyde puis l'acétaldéhyde est converti en acétate qui est ensuite transformé en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est utilisé pour la synthèse du Malonyl-CoA, de l'acétylcarnitine, de l'octanoyl-CoA, acétoacyl-CoA. Dans les mitochondries, l'acétyl-CoA est combiné avec l'oxaloacétate pour former le citrate à six molécules de carbones. Le citrate est oxydé via le cycle TCA ou transporté dans le cytosol pour être le substrat de l'ACL qui régénère l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate par clivage du citrate. L'acétyl-CoA transite par le complexe FAS. Les acides gras résultant du complexe FAS sont acylés en DAGs et convertis ensuite en TAGs par les diacyglycérols (DGA1 et DGA2). Les TAGs (lipides neutres) sont stockés dans les corps lipidiques ou peuvent être hydrolysés en acides gras et glycérol. Les acides gras sont oxydés via la β -oxydation en acétyl-CoA, utilisé par le cycle du citrate tandis que le glycérol rentre dans la voie de la glycolyse.

4. Discussion

Dans ce chapitre nous avons placé les homologues des gènes de la souche E150 de *Y. lipolytica* dans un schéma métabolique conçu pour la souche LS3 de *B. raffinosifermentans* (Fig. 23) et mentionné l'implication probable des différences de gènes observées entre la souche LS3 et la souche E150 de *Y. lipolytica*.

Nous avons remarqué dans nos recherches que la souche LS3 de *B. raffinosifermentans* possède plus de membres des familles de gène MFE, PAT1, POT1, FAT1 et de transporteurs ABC1 que la souche E150 de *Y. lipolytica*. Les membres de la famille des MFE, PAT1 et POT1 sont impliqués dans la β -oxydation (Beopoulos et al., 2009). Leur nombre dans la souche LS3 pourrait être dû à une plus haute spécificité pour la deuxième et la troisième étapes (MFE) ainsi que la quatrième étape de la β -oxydation (assurée par PAT1 et POT1). Le nombre élevé des

membres de la famille FAT1 (Dulermo et al., 2014) dans LS3 suggère aussi une spécialisation dans l'exportation des acides gras des corps lipidiques de cette souche comparativement à la souche E150 de *Y. lipolytica*. La présence des transporteurs ABC1 (Thevenieau et al., 2007) en surnombre dans la souche LS3 traduit une plus grande spécificité pour le transport des alcanes dans cette souche comparativement à la souche E150 de *Y. lipolytica*. D'ailleurs, Middelhoven et al. (1991) ont montré que les espèces du genre *Blastobotrys* peuvent assimiler des n-alcanes. Le nombre élevé des gènes cités jusqu'ici, en comparaison à *Y. lipolytica*, peut-être aussi lié à des mécanismes d'adaptation de la souche LS3 au cours de son évolution en réponse à des stress environnementaux. Les duplications de gènes peuvent avoir lieu lors de processus de réarrangements chromosomiques et des gains lors des transferts horizontaux de gènes (D'Antonio et Ciccarelli, 2011).

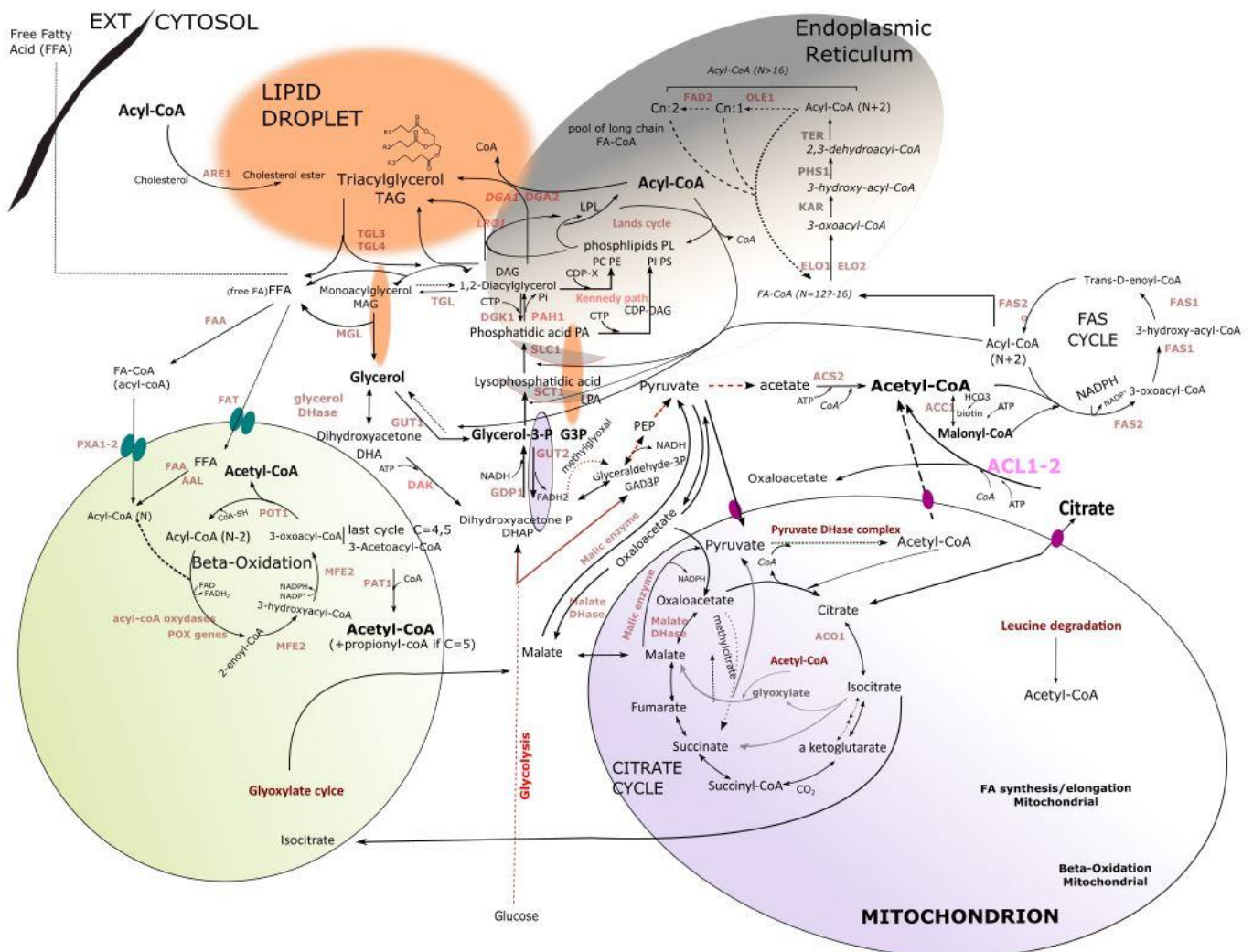


Figure 23 : Schéma métabolique de *B. raffinosifermentans*

Nous avons aussi observé moins de membres de certaines familles de gènes dans LS3 comparativement à la souche E150 de *Y. lipolytica*. C'est le cas des familles des gènes GCY1

et DAK3, impliqués dans le métabolisme du glycérol (Patterson et al., 2018), des gènes ALK1 (Hirakawa et al., 2009) et HDF3 (Iwama et al., 2014), impliqués dans la croissance sur du substrat n-alcane et le gène SPS191 codant pour une réductase active dans le peroxysome. Les membres peu nombreux des familles des gènes GCY1 et DAK3 permettent d'expliquer a priori la faible capacité d'assimilation du glycérol par la souche LS3 dans nos tests. Quant à l'utilisation des substrats n-alcane, la LS3 serait naturellement plus performante que la souche E150 de *Y. lipolytica*.

Par ailleurs, l'absence des gènes ISO1, OAR1, LIP2 et TGL2 peut être liée à des pertes de gènes en réponse à des stress environnementaux.

5. Conclusion

Nos investigations ont prouvé que *B. raffinosifermentans* dispose des voies métaboliques majeures impliquées dans la production de lipides chez *Y. lipolytica*. Elle dispose de gènes qui interviennent en amont du processus de production de lipides (ACC1), lors du stockage des lipides (DGA1, DGA2) et de leur dégradation (POX). Cette levure dispose pour certaines familles multigéniques de moins de gènes que la souche E150 de *Y. lipolytica* laissant transparaître une certaine efficacité du nombre de gènes qu'elle possède. Comparativement à la souche E150 de *Y. lipolytica*, LS3 possède moins de dihydroxyacétones kinases, de glycérol déhydrogénases et de gènes codant le cytochrome P450 catalysant l'assimilation des n-alcane. Elle ne possède pas d'homologues des lipases extracellulaires de *Y. lipolytica*. La LS3 contient néanmoins plus de gènes activateurs, gènes de la β -oxydation, gènes codant des thiolases et des transporteurs, comparée à la souche E150 de *Y. lipolytica*. La présence surnuméraire de gènes peut être due à la nécessité d'adaptation de la souche LS3 à son environnement. Par contre, l'observation de certaines familles de gènes en nombre inférieur à celles de *Y. lipolytica* suggère une activité polyvalente de ces gènes.

Résultats : Chapitre 3

Analyse de la surexpression de DGA1 et DGA2 chez la souche LS3

1. Introduction

L'étude du métabolisme des lipides de nouvelles espèces de levure est faite dans une vision de proposition de nouveaux modèles de production de lipides complémentaires à ceux existants. Dans les chapitres précédents, nous nous sommes intéressés aux conditions adéquates de production de lipides, aux paramètres qui peuvent influencer sur cette production et aux voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des lipides. Dans ce chapitre-ci, nous nous intéressons aux effets de la surexpression de deux gènes natifs, DGA1 et DGA2, intervenant dans la phase finale de conversion des DAGs en TAGs. Pour réaliser notre étude, nous avons utilisé les gènes DGA1 et DGA2 de la souche LS3 de l'espèce *B. raffinosifermentans*. Notre équipe avait au préalable identifié des corps lipidiques et le gène ACL (ATP-citrate Lyase) dans cette levure mais aucun projet de production de lipides n'avait inclus ce microorganisme jusqu'ici. Les exemples de surexpression de la forme native de ces gènes en combinaison sont très peu étudiés dans la littérature. Dans notre étude nous avons mis un accent particulier sur cet aspect. Les manipulations exécutées dans ce chapitre portent sur la production de mutants simples contenant l'un ou l'autre des gènes natifs étudiés (DGA1 ou DGA2) et de mutants doubles capables de surexprimer individuellement ou en combinaison les gènes natifs DGA1 et DGA2, de *B. raffinosifermentans*. Pour réaliser ce test de surexpression, les gènes natifs ont été placés sous le promoteur TEF1, un promoteur fort. Les résultats de ce test permettront d'identifier la contribution individuelle ainsi que l'intervention en synergie ou non de ces deux gènes dans le processus de synthèse et d'accumulation des lipides.

2. Stratégies utilisées

Les souches auxotrophes fournies par le laboratoire de Gotthard KUNZE en Allemagne ont été transformées dans une première étape par des plasmides porteurs de DGA1 ou DGA2 et un marqueur d'auxotrophie, le tryptophane. Après une série de passages sur milieu minimum et milieu riche, de simples mutants capables de surexprimer DGA1 ou DGA2 ont été retenus. Certains de ces mutants ont ensuite été utilisés pour créer des doubles mutants capables de surexprimer DGA1 ou DGA2 puis DGA1 et DGA2 en combinaison.

Actuellement, nous avons au total, cinq simples transformants porteurs de DGA1, deux simples transformants ayant récupéré DGA2, un double transformant possédant deux fois le gène DGA1 et trois double transformants dans lesquels DGA1 et DGA2 sont en combinaison. Nous avons aussi obtenu des transformants qui contiennent DGA1 ou DGA2 et un vecteur vide porteur de l'hygromycine. Certains de ces transformants obtenus ont été analysés sur gel et en PCR pour confirmer la présence des gènes insérés et ceux choisis pour la production de lipides ont subi une PCR quantitative pour identifier le nombre de copies de DGA1 ou DGA2 insérées. Ensuite nous avons exécuté une RT-PCR pour pouvoir analyser le niveau d'expression de DGA1 ou DGA2 dans les mutants retenus et dans la souche contrôle. Nous envisageons de relier le nombre de copies et l'expression de DGA1 et DGA2 à la production de lipides. Nous rédigeons actuellement un article pour étayer ce dernier point. L'idée derrière toutes ces expériences est de proposer un nouveau modèle de levure oléagineuse, alternatif à *Yarrowia lipolytica* pour la production de lipides. L'objectif visé dans ce chapitre est d'évaluer le rôle et la régulation potentielle de DGA1 et DGA2 lors de la production de lipides et ensuite proposer le modèle de levure étudiée comme modèle alternatif à celui de *Y. lipolytica*.

3. Article en préparation

L'article suivant devrait être soumis à FEMS Yeast Research.

Overexpression of native *DGA1* and *DGA2* genes in the oleaginous yeast *Blastobotrys raffinosifermentans*

Daniel Ruben Akiola SANYA¹, Djamila ONESIME¹, Gotthard KUNZE², Cécile NEUVEGLISE*¹, Anne-Marie CRUTZ-LE COQ^{1*}

¹Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

²IPK, Gattersleben, Germany

Abstract

Blastobotrys raffinosifermentans is an ascomycetous yeast with biotechnological applications and recently revealed as an oleaginous yeast, which produces lipids when cultivated under nitrogen limitation. Diacylglycerol acyltransferases are part of the lipid storage pathway responsible for the last step in the synthesis of triacylglycerols accumulated in lipid droplets. Two types of these enzymes are widespread among eukaryotes, with the noticeable exception of the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relatives. After showing that *B. raffinosifermentans* LS3 possesses both of them, we wondered if they could be used to raise or modify the fatty acid content of the cells and tested the consequences of overexpression of *DGA1* and *DGA2* genes, individually or in combination. Several mutants were constructed with diverse copy numbers of PTEF1-*DGA1* or PTEF1-*DGA2* expression cassettes.

Overexpressing *DGA2* (of the DGAT1 type) revealed necessary and sufficient to significantly increase lipid content in LS3, reaching up to 26.5 % of dry cell weight in N-limited glucose medium. Instead, though overexpression of *DGA1* (of the DGAT2 type) led up to 140-fold increase in transcription of the gene, it did not modify lipid content relative to control strain. Transcription studies of these genes over time in the wild type strain revealed a 5-fold increase in *DGA2* expression between 8h and 24h of culture in the N-limited lipogenic medium, while *DGA1* expression was hardly changed.

This survey shed light on the importance of diacylglycerol acyltransferase type 1 family activities in enhancing lipids accumulation and demonstrates the aptitude of *B. raffinosifermentans* to be engineered for lipid production.

Keywords: Oleaginous yeast, Triacylglycerols, lipid production, acyltransferases

INTRODUCTION

Microbial oil has attracted interest in the last decades for its advantages over plant oils in terms of high lipid yield, free seasonal cultivation and scale-up capability. Oleaginous yeasts are convenient organisms that can synthesize and store lipids in high amounts ranging from 20% to over 80% of their dry cell weight (Ratledge 2005; Thevenieau and Nicaud 2013).

Upon imbalance between carbon and nitrogen (Papanikolaou and Aggelis, 2011), synthesized fatty acids are usually sequestered mainly in the form of triacylglycerols (TAGs) in dynamics organelles called lipid bodies.

The last step of TAG biosynthesis involves acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases (DGAT; EC 2.3.1.20) which acylate the *sn*-3 position of diacylglycerol (DAG) (Cases *et al.*, 1998) (Liu *et al.*, 2011). With few exceptions, DGAT are integral membrane proteins and belong to two main families DGAT1 and DGAT2 which are distantly related. DGAT1 belongs to the membrane-bound O-acyltransferases protein family (MBOAT), whereas DGAT2 belongs to the same family as monoacylglycerol acyltransferases and wax ester synthases (Yen *et al.*, 2008). DGAT1 enzymes are localized in the endoplasmic reticulum (ER), and predicted to contain eight to ten transmembrane domains (Cheng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012). DGAT1 sequences in plants, animals or fungi appear to be more conserved than that of DGAT2 (Cao, 2011). DGAT2 enzymes contain two predicted N-terminal transmembrane domains and localize in ER and in lipid bodies (McFie *et al.*, 2011, Jacquier *et al.*, 2011).

DGAT enzymes have an organism-dependent activity with regard to specificity or preference for fatty acid chain length.). DGAT2 and DGAT1 play different physiological roles, differ in their cellular and physiological functions. An important catalyzing effects on TAG biosynthesis is revealed for DGAT2 (Yen *et al.*, 2008). It has been evidenced that DGAT2 enzymes has a higher affinity for their substrates than DGAT1 enzymes (Yen *et al.* 2008). DGA1 of *S. cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* were found to be members of DGAT2 family (Schmidt and Daum 2014;) while DGA2 identified only in *Y. lipolytica* is a member of DGAT1 family (Beopoulos *et al.*, 2012). Oleaginicinity is viewed as the capacity of an organism to direct its metabolism to lipid storage in condition of carbon overflow. Metabolism of oleaginous yeasts may be additionally rewired by metabolic engineering. Most simple modification is overexpression of DGAT to increase the channeling C-flow excess into TAG synthesis. Overexpression of native *DGA1* in *S. cerevisiae* resulted in 150% increase in lipid content when compared to wild-type (Runguphan and Keasling, 2014). Native *DGA1* overexpression in

Rhodotorula toruloides (Zhang et al., 2015) and *Y. lipolytica* (Tai and Stephanopoulos 2013; Xue et al., 2013) achieved large increase in lipid production. Dramatic increase effect in lipid biosynthesis from glucose was also obtained when overexpressing native DGA2 in *Y. lipolytica* (Silverman et al. 2016). In the meantime, the deletion of DGA2 in the aforementioned yeast hampers TAG *de novo* synthesis (Beopoulos et al., 2012) and decrease lipid content to 57% of WT 43% (Zhang et al., 2012). Thus, the combination of DGA1 and DGA2 overexpression in the same mutant should result in the construction of a high lipid-producing yeast. In the wild-type of *Y. lipolytica* where both native DGA1 and DGA2 are overexpressed, Friedlander et al (2016) suggested that DGA2 gene expression become a limiting factor for lipid production only when DGA1 activity is abundant.

Our previous report (Sanya et al., submitted) uncovered the oleaginous trait of *Blastobotrys raffinosifermentans*. It is a haploid, nonpathogenic, osmo- (Yang et al., 2000) and thermo-tolerant (Wartmann et al., 1995) yeast species that can grow on a large variety of carbon and nitrogen sources (Gienow et al., 1990; van der Walt et al., 1990). It displays the ability to accumulate lipids at different temperatures. Interestingly a genetic toolbox with integrative vectors (Xplor®2) is available (Böer et al. 2009a). This paves the way for metabolism engineering in this organism.

In the present study, we assessed *DGA1* and *DGA2* and overexpression individually and in combination in *B.* strains with regard to fatty acids production and focus on the contribution of each gene in the overall lipid production.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media and cultivation

Escherichia coli Mach1™T1 or DH5 α were used for cloning and plasmid propagation. They were grown at 37°C with constant shaking in 5 ml Luria-Bertani medium (10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, and g L⁻¹ NaCl). *E. coli* transformants were grown in LB medium supplemented with 50 μ g mL⁻¹ ampicillin (AppliChem, Germany) or kanamycin (Applichem, Germany) where appropriate. The auxotrophic strain G1212 (*leu2 trp1::ALEU2*) derived from LS3 (Kunze and Kunze, 1994; Steinborn *et al.*, 2007) was used as recipient strain for integrative Xplor2.2-type plasmids. Yeast strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

For routine growth, yeast strains were cultivated for 24 h at 28°C in YPD medium containing 10 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ peptone and 10 g L⁻¹ glucose. YNBG was used to select prototroph strains and consisted of 1.7 g L⁻¹ yeast nitrogen base (without amino acids and ammonium sulfate, Difco), 5 g L⁻¹ NH₄Cl, 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) and 10 g L⁻¹ glucose, in which 16 g L⁻¹ agar were added.

Cultivation in liquid medium was performed under orbital shaking at 160 rpm in a Minitron incubator. Growth was monitored by optical density at 600 nm (OD₆₀₀).

Expression cassettes and plasmids

Expression cassettes were constructed by placing DGA1 or DGA2 genes under the strong *TEF1* promoter from LS3 using plasmid pBS-TEF1-PHO5-SA replicative in *E. coli* (Boër et al., 2009). DGA1 and DGA2 genes were PCR amplified from genomic DNA of strain LS3 using Pyrobest DNA polymerase (TaKaRa) and primers with suitable embedded restriction sites (Table S1). For DGA1 gene, both vector and PCR-amplified fragment were digested with *EcoRI* and *BamHI*. For DGA2 gene, due to the presence of an internal *BamHI* site, the PCR product was cleaved only with *EcoRI* at one end. The vector pBS-TEF1-PHO5-SA was first cleaved at its unique *BamHI* site, blunt-ended with T4 DNA polymerase (New England Biolabs), and then cleaved by *EcoRI*. Pieces of DNA were purified by QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) at each step required to eliminate enzymes or primers and, for vector parts, gel-purified. After ligation of inserts and vectors with T4 DNA ligase (New England Biolabs) and selection of recombinant *E. coli*, desired plasmids were chosen in which the integrity of cloned *DGA1* and *DGA2* genes was checked by sequencing. Thereafter, these expression modules could be cloned into Xplor2-type vectors (Boër et al., 2009) using *ApaI* and *SalI* sites. Plasmid Xplor2.2 with ATRP1 selection marker (tryptophan synthesis) was used for the first-round selection of yeast mutants (Fig. S1). To enable subsequent transformation of prototrophic yeast strains, hygromycin-selectable plasmids were constructed. First, using bordering *EcoRI* sites, the ATRP1 marker was replaced in Xplor 2.2 by a resistance cassette based on the *hph* gene which was originally used in *Y. lipolytica* (Fickers et al., 2003). Resulting plasmid Xplor2-hph was chosen with an orientation of the *hph* gene outward from cloning sites *SalI* and *ApaI* (Fig. S1). Then, the expression modules previously generated for *DGA1* and *DGA2* were separately cloned into Xplor2-hph using the two unique restriction sites *SalI* and *ApaI*.

Construction of yeast recombinant strains

Expressions cassettes P_{TEF1} -*DGA1* and P_{TEF1} -*DGA2* were preferentially targeted into 28S ribosomal DNA sequences of *B. raffinosifermentans* by using *AscI*-digested fragments of Xplor2-type plasmids (Fig. S1) as previously described (Boër et al., 2009). Two series of transformations were carried out, each with chemically competent yeast cells (Terentiev et al., 2004; Dohmen et al., 1991). In a first round, strain G1212 auxotrophic for tryptophan was used as a recipient strain for Xplor2.2 derivative plasmids. Transformants were selected on YNBG plates incubated at 28°C for 2-3 days. Stabilization of yeast transformants was performed with passaging on selective and non-selective (YPD) agar plates as described (Terentiev et al., 2004). Selected mutants were used for a second-round transformation using hygromycin B as the selective pressure (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in YPD). Again, selected transformants were streaked successively three times on selective medium then on non-selective medium. Cells were finally streaked on YNBG plates to testify their prototrophy and the presence of the expected inserted cassette was checked by PCR. The different mutant strains in this study were established from a well-isolated single colony from each streak.

Cultures for lipid production

Cultures were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL YNB C:N 60 medium under continuous shaking at 28°C. YNB C:N 60 was used as a lipogenic medium in which amounts of carbon and nitrogen were adjusted to a ratio C:N of 60 in the buffered YNB-based medium using 1.5 g L⁻¹ NH₄Cl and 30 g L⁻¹ glucose. Inoculation was performed at 0.5 OD₆₀₀ with cells precultivated 24 h in YPD and suspended in YNB C:N 60 in the inoculum. Three incubation times (24, 48 and 72 h) were retained for cells sampling cultivated.

Fatty acid analysis methods and fluorescence microscopy

Prior to fatty acid analysis, cells were harvested by centrifugation (5000 rpm, 5min), washed two times with 2 mL deionized water. After washing, cells were resuspended in 2 mL deionized water, stored at -20°C and lyophilized thereafter. Dried cells were weighed before lipids extraction. An appropriate amount of 15 to 20 mg biomass was mixed with 2 mL of 2.5 % (v/v) sulfuric acid in methanol, which contained 5 mg of dodecanoic acid (C12, Sigma-Aldrich) as an internal standard. Tubes were incubated at 80°C for 90 min and fatty acids from lyophilized biomass were converted to their fatty acid methyl esters (FAMES) using the Browse method (Browse, McCourt and Somerville 1986). After transesterification, 1 mL of water was added, and FAMES were extracted via the addition of 1 mL of hexane. The top hydrophobic FAME-

containing hexane phase was quantified by the gas chromatography Varian 430 instrument equipped with a flame ionization detector and a Varian FactorFour vf-23ms column, where the bleed specification at 260°C was 3pA (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm). Fatty acid methyl ester peaks were identified by comparison to commercial fatty acids methyl ester standards (FAME32; Supelco) and quantified using 50 µg of the commercial internal standard C12:0 (Sigma).

For fluorescence microscopy, 100 µL of cells were stained at room temperature by a 15-min incubation with BODIPY[®] 493/503 (Invitrogen) at 1 µg/mL final concentration. Images were acquired using a Zeiss Axio Imager M2 microscope (Zeiss, Le Pecq, France), with a 100× oil immersion objective and the Zeiss fluorescence microscopy filter set 45. AxioVision 4.8 software (Zeiss, Le Pecq, France) was used for observing and recording images of staining cells.

HPLC methods

Residual glucose and external metabolites (organic acids) were analysed using the Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, CA, USA) associated with UV (210 nm) and RI detectors. The column was washed out using 0.01 N H₂SO₄ as the mobile phase at room temperature and flow rate of 0.6 mL min⁻¹. Identification and quantification were performed through comparisons to standards. Before the analysis by HPLC, samples were vortexed and supernatants were diluted 1/10 times.

Preparation of yeast genomic DNA.

Genomic DNA (gDNA) was isolated using Hoffman and Winston phenol:chloroform method (Hoffman and Winston, 1987). After the final step of genomic DNA extraction procedure, DNA pellets were resuspended in 100µl of water, treated with 10 mg/µL RNase (Macherey-Nagel GmbH & Co. kG) and precipitated with ethanol and N-acetate thereafter. Resulting genomic DNA is centrifuged and dried before being resuspended in 40µl of water and quantified with NanoDrop 2000/2000C (Thermo Fisher Scientific Inc) and checked for quality on 0.8% agarose gel.

Extraction of RNA, DNase treatment and reverse transcription

To prepare RNA samples, 1-mL aliquot of cells was harvested by centrifugation at 4,000 rpm for 4 min. The cell pellet was immediately frozen either in liquid nitrogen or dry ice and stored at -80°C. Total RNA was prepared from cell pellets with TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cells were lysed with zirconia beads (diameter 0.5 mm; BioSpec Products,

Bartlesville, OK) by three 60-s mixing sequences at a speed of 6.5 m/s in a Fastprep apparatus (Bio 101). The extracted total RNA was then purified with a Direct-Zol RNA miniprep plus RNA purification kit (Zymoresearch). DNase treatment was performed directly on column with 6U/ul of Dnase I according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The quality of the RNA was analyzed with a 2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano chips according to the manufacturer's instructions. 750 ng of DNase-treated RNA were then converted to cDNA with a SuperScript Vilo cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). cDNA was then diluted 1:3 in RNase-free water for qPCR analysis. Absence of DNA contamination, in RNA samples, was confirmed with non-reverse-transcribed aliquots.

Quantitative PCR

Oligonucleotide primers were designed using LightCycler probe design software (v1.0; Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Quantitative PCR was performed in a LightCycler 1.5 instrument (Roche, Meylan, France) using the LightCycler FastStart DNA (Master^{Plus} SYBR Green I) kit (Roche, Meylan, France), according to the instructions of the manufacturer. The thermocycling program consisted of an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 45 cycles of denaturation (95°C, 10 s), annealing (59°C, 7 s), and extension (72°C, 6 s). Fluorescence was measured (530 nm) at the end of each extension. After real-time PCR, a melting-curve analysis was performed by measuring fluorescence during heating from 65 to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s. The threshold cycle (*CT*) values were determined with LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the *CT* values as a function of the initial concentration log. PCR efficiency (*E*) was then calculated using the following formula: $E=10^{-1/\text{slope}}$.

For gene copy number or cassette copy numbers estimation, we used qPCR approach on serial dilution of genomic DNA. The method involves relative quantification of the gene of interest versus a reference gene known to be single copy. Relative quantity is determined by the $\Delta\Delta C_t$ method, where the calibrator is the G1212*trp*⁺ control strain used as the basis for comparative results. Cycle threshold (*Ct*) of four serial dilutions (1/3, 1/9, 1/27 and 1/81), starting with 60 ng/μl of genomic DNA were used.

For each transformant, DGA2 genomic copy was used as reference gene for DGA1 cassette estimation and DGA1 genomic copy was used as a reference gene for DGA2 cassette

estimation. We assumed for the double transformant strains that the first gene cassette is maintained.

The Pfaffl method (Pfaffl, 2001) was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the TFC1 gene, one of six subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC). This gene was used as internal control since its expression was shown to be stable, independently of the growth conditions and the strain backgrounds (Teste et al., 2009). Three independent replicates, prepared from independent biological samples, were analyzed.

Characterization of *DGA1* and *DGA2* genes of *B. raffinosifermentans*

We characterized DGA1 (ARAD1C08250g) and DGA2 (ARAD1D42460g) genes by using a percent identity and identifying some transmembrane domains and conserved motifs well known for DGAT1 and DGAT2 activities. For the estimation of percent identity, we first looked for the two acyltransferases encoding genes, DGA2 and DGA1, of *B. raffinosifermentans* by performing a BLAST on GRYC (Genome Resources For Yeast Chromosomes) website based on sequence homology with *Yarrowia lipolytica* DGA1 (YALI0E32769g) and DGA2 (YALI0D07986g) genes involved in triacylglycerol synthesis. We looked for the similarity of protein sequence DGA1 and DGA2 gene of *B. raffinosifermentans* by aligning them to the protein sequence of DGA1 and DGA2 gene of *Y. lipolytica* using blastp of GRYC website (<http://gryc.inra.fr>). The two genes were compared to each other later by aligning their respective protein sequences using Protein-Protein BLAST (blastp) from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

Secondly, we identified the transmembrane domain of the two genes based on their protein sequences by using different transmembrane domain (TMD) prediction algorithms (Table S2) (Shen and Chou, 2008; Tsirigos et al., 2015; Jones, 2007; Tusnády and Simon, 2001, Liu and Deber, 1998; Yuan et al., 1998).

DGAT1 proteins sequences of the eukaryotic organisms, *Nicotiana tabacum* (GenBank accession No.:AAF19345.1), *Auxenochlorella protothecoides* (GenBank accession No.: KFM28983.1) and DGAT2 proteins sequences of *Ostreococcus lucimarinus* (GeneBank accession No.: XP_001421075) and *Saccharomyces cerevisiae* (GeneBank accession No.: NP_014888.1) were obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=dgat>) and aligned respectively with DGA1 (ARAD1C08250g), DGA2 (ARAD1D42460g) proteins

sequences of *B. raffinosifermentans* and DGA1 (YALIE32769g), DGA2 (YALIE07986g) of *Yarrowia lipolytica* retrieved on GRYC. Those proteins sequences are chosen as they had been used by Chen et al. (2015) to successfully characterize genes encoding acyl-CoA : diacylglycerol acyltransferases (DGAT). Clustal X was used for homologous sequences alignments with BLOSUM settings for identifying some highly conserved sequences.

Statistical analysis

We conducted each experiment in triplicate. Experimental data were analyzed using One-way ANOVA, and significant differences among groups were determined using Tukey's Honestly Significant Difference test ($P = 0.05$). We performed statistical analyses using SAS (ver. 9.4, SAS Inc., Cary, NC.).

Notation

The following representations have been used throughout the study: X, biomass (g/L); Glc, glucose residual (g/L); AcCitric, citric acid (g/L); AcAcetic, acid acetic (g/L); AcTartric, tartaric acid.

RESULTS

Acyltransferase family of *B. raffinosifermentans* DGA1 and DGA2 gene

To characterize *DGA1* and *DGA2* genes of strain LS3 involved in lipid metabolism, we identified their diacylglycerol acyltransferase family. We performed BLAST search, identified transmembrane domains and achieved multiple sequence alignment on their respective proteins sequences for detecting some eukaryotic recurrent motifs.

First, Blastp performed on GRYC showed 69.56% identity between protein sequence of DGA1 (ARAD1C08250g) of LS3 and protein sequence of DGA2 (YALIE321769g) of *Y. lipolytica* used as a query. For DGA2 (ARAD1D42460g) gene protein sequence of *B. raffinosifermentans* LS3 strain, a percent identity of 42.64 was revealed using protein sequence of *Y. lipolytica* DGA2 gene (YALIE07986g) as a query. Further, we compared the protein sequence of DGA1 and DGA2 gene of *B. raffinosifermentans* between each other with Blastp of NCBI. The result revealed 33.00% identity between the protein sequence of DGA1 and DGA2 gene using DGA1 gene protein sequence of *B. raffinosifermentans* LS3 as query. This protein length has 388 amino acids compared to that of DGA2 that had 516 amino acids. However, the blastn of NCBI

revealed no significant similarity between the nucleotides of the two genes using nucleotides sequences of DGA1 gene as a query.

Second, according to the transmembrane domains software predictions, DGA1 gene protein sequence possessed two to four transmembrane segments while DGA2 protein sequence possessed seven to ten transmembrane segments (Table S1).

Third, the multiple sequence alignment (Fig. 1A) showed that BrDGA1 contained 7 conserved motifs: Motif 1 (GL Block), Motif 2 (KSR Block), Motif3 (PTR Block), Motif4 (QP Block), Motif 5 (LWLFFEFDRFYWWNWNPPFSHP Block), Motif 6 (FQL Block) and Motif 7 (NGQPY Block) that have been found to be the characteristic sequences of most DGAT1s (Cao 2011). We also revealed the pleckstrin homology (PH). For BrDGA2, multiple sequence alignment of amino acids indicated the presence of 7 conserved sequence motifs: Motif 1 (YFP Block), Motif 2 (PH Block), Motif 3 (PR Block), Motif4 (GGE Block), Motif 5 (RGFA Block), Motif 6 (VPPFG Block) and Motif 7 (G Block). We also found the motif, HPHG (Fig. 1B). All these information taking together suggesting that DGA1 and DGA2 gene of *B. raffinosifermentans* were different to each other and also that DGA1 belong to the DGAT2 families while DGA2 belong to DGAT1 families.

To evaluate their potential role in lipid production, we decided to overexpress them in *B. raffinosifermentans* LS3.

Combinations of DGAT expression cassettes in mutant strains of *B. raffinosifermentans*

To investigate the impact of DGAT on lipid biosynthesis in *B. raffinosifermentans*, we decided to construct mutant strains carrying overexpression cassettes for *DGA1* and *DGA2* genes, alone or in combination. For this, we used appropriate plasmids derived from Xplor2 (Alavaro-Benito et al. 2013), which carried one or the other gene under the control of strong constitutive P_{TEF1} promoter as described in Material and Methods. These cassettes were preferentially targeted to an ectopic locus in the genome (rDNA). Mutant strains, which conserved their endogenous DGAT genes, were named after the inserted gene cassette (Table 1). Successive transformations were applied to obtain the desired combinations.

In a first round of transformation (with tryptophan prototrophy as the selective pressure), three strains having integrated a DGA1 cassette (DGA1-04, DGA1-10 and DGA1-13) and two strains having integrated a DGA2 cassette (DGA2-13 and DGA2-22) were selected.

The number of inserted cassettes in each strain was quantified by qPCR using unique *DGA2* endogenous gene as a reference for *DGA1* copy number, while unique *DGA1* endogenous gene was used for *DGA2* copy number (Table 2). Strains were estimated to have received one copy of the expression cassette, except DGA2-22, which likely integrated two copies of the DGA2 cassette and DGA1-13, which integrated a high number of DGA1 cassettes that we could not determine accurately (from 3 to 10 copies).

DGA1-10 and DGA2-22 were used as recipient strains for a second round of transformation (with hygromycin resistance as the selective pressure) in order to insert additional copies of either DGA1 or DGA2 cassette into their genome. Selected double transformants carried the DGA1 cassette only (DGA1-DGA1-2) or both DGA1 and DGA2 cassettes (DGA1-DGA2-10, DGA2-DGA1-4, DGA2-DGA1-7) (Table 2). No transformant of the DGA2-22 mutant for additional copies of the DGA2 cassette could be obtained. Besides, DGA1-10 and DGA2-22 were transformed with an empty cassette (no DGAT gene) with the same hygromycin marker to give DGA1-10-hygr-1 and DGA2-22-hygr-4 strains, respectively.

Estimation of DGA1 integrated cassette by qPCR showed that DGA1-DGA1-2 strain harbored a total cassette copy number of 3 indicating that one supplementary copy was integrated in the second round of transformation. One copy of DGA1 cassette was integrated in both double transformed strains DGA1-DGA2-10 and DGA2-DGA1-7, while 2 copies were integrated in DGA2-DGA1-4 strain.

To further understand the importance of DGA genes we assessed the percent of lipid produced in selected transformants

Lipid production in mutant strains compared to the parental strain

Seven strains with different combinations of DGA1 and DGA2 expression cassettes were cultivated in N-limited glucose medium favorable to lipid synthesis and storage.

Their total lipid/fatty acid content was determined at 24h, 48h and 72h of flask cultures. Results are summarized in Fig.2. DGA1-hyg-01 at 24h and DGA1-10 or DGA1-DGA1-02 mutants at 48h, have a lipid content similar to that of the control strain G1212-trp+. Conversely, the lipid content of the remainder mutant strains is higher than that of the parental strain, irrespective of the time. Following dose-dependent manner, single DGA2 overexpressed mutant strains (DGA2-13) have a higher total lipid content than the single mutant overexpressed DGA1 and double mutant strains. It cells possess about 7.8% increase of total lipids at 24h, 8.3% at 48h or

9.63% at 72h in comparison with the parental strain. This mutant is followed by DGA1-DGA2-10 double mutant in which total lipid is close to 25%. For the latter mutant with overexpressed DGA1 and DGA2 genes, we observed an increase lipid content of 5.77 % at 24h, 7.67 % at 48h and 7.87% at 72h in comparison with the parental strain. Again, in comparison with the parental strain, the total lipid contents of the single mutant DGA2-22 with overexpressed DGA2 is respectively 1.39, 1.17 and 1.17 times higher than the initial total lipid of G1212-trp+ at 24h, 48h and 72h of incubation. Meanwhile, for the single mutant with DGA1-10, the total lipid content is similar to that of the parental strain. For the remainder double mutant strains, the increase in total lipid content ranged from 1.12 to 1.49 times of the initial total lipid reported in the parental strain at 24h.

Fatty acid profiles

Using gas chromatography (GC) to quantify endogenous levels of various fatty acids, we retained four fatty acids species increasing with time (Fig. 3, Table S3) and one known to be observed during oleaginous yeast β -oxidation (C16:1). Our results showed some similarities and differences in the lipid profile by comparing the control strain to the mutant strains.

Fatty acids profile of DGA1-10, DGA1-10-hygr-1 and DGA1-DGA1-2 are similar to that of the control strain regardless the time. Fatty acids profile of DGA1-DGA2-10 and DGA1-DGA2-4 were alike but slightly different to that of the control strain regardless the time. The difference was observed, in DGA1-DGA2-10 and DGA1-DGA2-4 mutants, for C18:1, C16:0 and C16:1 fatty acids species proportion that increased with time and C18:2 fatty acid species that decreased with time compared to the control strain.

Fatty acid profile of DGA2-DGA1-7, DGA2-22, DGA2-22-hygr-4 and DGA2-13 are similar but very different to that of the control strain. The difference was observed in time for C18:1 and C16:0 fatty acids proportion that increased while that of C16:1 decreased compared to the control strain. The lipid profile similarity between DGA2-22 and DGA2-13 was unexpected and suggested that the difference in lipid production may be due to the contribution of the minor fatty acids in their lipid profile. Taking together, these findings suggested that the mutant strains first gene inserted has an obvious effect on the fatty acids profiles fate.

Relative expression levels of DGA1 and DGA2 genes in the different strains

To further understand the regulations mechanisms involving DGA1 and DGA2 genes during lipid production we assessed the expression level of the two aforementioned genes.

Before confirming that DGA1 and DGA2 genes were overexpressed in the mutant strains, we assessed their native expression level in the *B. raffinosifermentans* control strain G1212-trp+ via qRT-PCR at 8h, 24h, 48h and 72h (Fig. 4). Fig. 4A shows that the relative expression level between DGA2 and DGA1 and show that DGA2 expression is higher than that of DGA1. It is 8-fold at 8h and 18-fold at 24 h. Fig. 4B presents the level of expression of the native copy of DGA2 and DGA1 over the time and normalized to the expression level of 8h considered here as the reference. The expression level of DGA2 is 5 times higher at 24 h compared to 8 h. It remains relatively stable at 48 h and thereafter decreases slightly at 72 h. That of DGA1 remains more or less stable over time.

In Fig. 5, DGA2 expression level, in the mutant DGA2-22, was 6.23-fold, 2.73-fold, and 2.24-fold and 2.67 fold that of DGA1, at 8 h, 24 h, 48 h and 72 h, respectively. Moreover, DGA2 expression level within DGA2-22 mutant looked stable between 8 h and 24 h. Interestingly, DGA1 gene expression level in DGA2-22 is lower than of the corresponding gene in the control strain. Then, expression level at 8h was almost thrice that of 24 h, 48 h and 72 h. Moreover the expression level of both DGA1 and DGA2 genes looked stable in time.

To broaden our knowledge on DGA gene expressed by the remainder mutants, we retained 8h and 24h for studying gene expression level. In Fig. 6, the DGA1 expression level of some mutants decreased with time and appear to be stable with other strains (Table 3). The expression level of DGA1 gene at 8 h, in DGA1-10 mutant, was 13-fold and 9-fold that of corresponding gene in the control strain, at 8 h and 24 h, respectively. In DGA1-DGA1-2 mutant, the expression level of DGA1 was 140-fold and 100-fold that of corresponding gene in the control, at 8 h and 24 h, respectively. This result also confirmed that the promotor TEF1 used in this study allows overexpression conditions and was strong. The expression level of DGA1 gene in DGA1-DGA2-10 was 12-fold and 7-fold that of the corresponding gene in the control strain, at 8 h and 24 h, respectively. Knowing that one copy, four copies and one copy of DGA1 cassette (Table 2) were reported for DGA1-10, DGA1-DGA1-10 and DGA1-DGA2-7, respectively, it is understandable that the mutant with more copies of DGA1 cassette will have the highest expression level. DGA1 expression level, in DGA1-DGA2-7 mutant was 40-fold that of the corresponding gene in the control strain regardless the time. The DGA1 expression level of the most lipid producer mutant, DGA2-13, was lower than that of the corresponding gene in the

control strain and its value was stable between 8h and 24h. Here, the presence of one copy of DGA1 in combination with DGA2 gene in a strain with first DGA2 inserted gene, DGA2-DGA1-7, compared to DGA2-13, seems to increase DGA1 expression level.

In contrast, in Fig. 6, DGA2 expression level of the mutant DGA1-10 was lower than that of the corresponding gene in the control strain and varied between 0.80 and 1, at 8 h and 24 h, respectively. The expression level of DGA2 in the mutant DGA1-DGA2-10 was also lower than that of the corresponding gene in the control strain and varied between 0.6 and 0.8, at 8 h and 24 h, respectively. In DGA1-DGA2-10, DGA2 expression level was 4-fold and 2.5-fold that of the corresponding gene in the control strain at 8 h and 24 h, respectively. In the mutant DGA2-DGA1-7, DGA2 gene expression level was 6-fold and 3-fold that of corresponding gene in the control strain at 8 h and 24 h, respectively. Here, the expression level appeared to evolve similarly to that reported with the mutant DGA2-22. In the mutant DGA2-13, DGA2 gene expression level was 2.5-fold that of the corresponding gene in the control strain regardless the time. This expression level, which appeared stable in DGA2-13 mutant, was 3.12-fold that of the DGA1 gene within the same mutant regardless the time. Moreover, the DGA2 expression level did not exceed 6-fold compared to that of DGA1 gene that may reach above 100-fold. Taking together, our findings suggesting that: (1) DGA2 gene expression level was higher in the control strain than DGA1 gene expression level, (2) we were in overexpressing conditions, (3) the addition of DGA1 gene highly increased expression level pool of DGA1 gene than the addition of DGA2 gene, (4) stable expression level in strain with one copy of DGA2 induced higher lipid production, and (5) the first inserted gene of a given strain affected the its level of expression.

Residual glucose, biomass and organic acids production

To examine how carbon fluxes were distributed, we measured biomass, organic acids secreted in the medium and residual glucose. We found that glucose remains in variable amount at 72 hours (Table 4). *B. rafinosifermentens* strains vary greatly in their ability to form citric acid. The production of citric acid varies between 0.23 and 2.94 g/L (Table 4), the highest producer strain being DGA2-22 at 48 h (2.08 g/L) and 72 h (2.16 g/L). Interestingly, the residual glucose amount of this strain at 72 h is higher than that of the other transformant strains, suggesting that more C-flow is available for more citric acid production.

Strains derived from DGA2-22 produced more citric acid at 48 h than strains derived from DGA1-10. Relative to strains with first inserted DGA1 gene, the control strain produces higher amount of citric acid regardless the time. This trend can be extended to strains with first inserted

DGA2 genes except DGA2-22 and DGA2-22-hygr-4 strains at 48 h and 72 h. Indeed, compared to the control strain, citric acid amount increased, at 48 h, in DGA2-22 and DGA2-22-hygr-4, by 1.39-fold and 1.41-fold, respectively while, at 72 h, it increased by 1.09-fold for DGA2-22 and decreased by 1.06-fold for DGA2-22-hygr-4. It is worth noting that strains with DGA1 and DGA2 genes show different profile of citric acid production, raising some questions about the weight of each gene in citric acid production. In the meantime, the most lipid producer strain DGA2-13 (Fig. 2C) displayed an almost equal amount of citric acid at 48 h and 72 h and is the second strain, in which residual glucose amount is lower than biomass produced amount (Table 4), the first one being DGA1-DGA2-10. In DGA1-DGA1-2 transformant where, citric acid production is stable in time course (Table 5) and biomass produced is equal to the amount of the residual glucose, the presence of two DGA1 genes appears to lower citric acid level.

Acetic acid and tartaric acid (Table 5), are the other organic acid produced by *B. raffinosifermentans*. Acetic acid appears to increase with time and its amount greatly varied with each transformant strain.

At 24 h, the citric acid production of the control strain is the highest reported and it is followed by that of DGA1-10 (0.91 g/L) and DGA1-10-hygr-1 (0.93 g/L) transformant strains. Moreover, it appears from all the transformants that citric acid amount of 72h is higher than that of 24h and 48 h, except for DGA2-22-hygr-4 transformant, where it remains unchanged between 48h and 72 h.

Taking together, these data are suggesting that the glucose consumption rates for biomass production is variable among all transformants. Surprisingly, DGA1-DGA2-10 and DGA2-13 strains produced more lipids compare to the control strain and the remainder transformants (Fig. 2C), confirming the relatively high performance of these two strains on glucose consumption for lipid production. Likely, increased glucose utilization is due to increased carbon flux into lipid production. Glucose amount that is not completely exhausted from the media offering further genetic engineering for more lipid production.

To next understand the fate of the excess C-flow conditions in the survey strains we estimated acid organics produced.

In Table 5, DGA1-10 acetic acid production, at 48 h and 72 h, is higher than that of the control strain, DGA1-10-hygr-1 and DGA1-DGA1-2 strains. Thus, this amount increases with time. Nevertheless, this production amount is lower than that of DGA1-DGA2-10, where acetic acid production starts at higher amount at 24h compare to the aforementioned strains. Therefore, DGA2 gene addition to strains with first inserted DGA1 gene seems to slightly raise acetic acid production whereas the addition of DGA1 gene does not. The residual glucose and biomass

amount underpin the important role of DGA2 gene as the amount reported for DGA1-10 was similar to that of DGA1-10-hygr-1 and DGA1-DGA1-2 but different to that of DGA1-DGA2-10. Acetic acid amount varies between 0.59 g/L and 2.87 g/L at 24h, 1.34 g/L and 3.48 g/L at 48 h, 2.87 and 3.89 g/L at 72 h.

Acetic acid profile of DGA2-22 and DGA2-22-hygr-4 evolves similarly at 48 h and 72 h but is different to acetic acid production profile of other strains. At 24h, acetic acid production of DGA2-22 is 4.19-fold that of DGA2-22-hygr-4, suggesting an impact, on turning the former strain into a double transformant strain, on acetic acid amount. In the meantime, the acetic production of DGA2-13 strain, starting with high amount at 24 h compared to all strains with first inserted DGA2 gene, remains unchanged until 72 h. The acetic acid production of this strain, with one copy of DGA2, is higher than that of the control strain, DGA2-22 and DGA2-22-hygr-4 strains. Interestingly, its residual glucose amount is lower than biomass amount (Fig. 4A) on contrary to DGA2-22 and DGA2-22-hygr-4. We can then state that strain with one copy of DGA2 gene produces better amount of acetic acid and use consume glucose than strain with two copies of DGA2 gene. Taking together, these findings suggest that gene copies number affects acetic acid production. However, the acetic acid production of DGA1-DGA2-10 is higher than that of DGA2-DGA1-4 and DGA2-DGA1-7, illustrating that acetic acid production is affected by the strain genetic background. In the meantime, the production of strains with first inserted DGA1 gene was higher than that of the control strain. Therefore, the type of gene or gene combination affects acetic acid production.

In Table 5, all strains, including the control strain reused the tartaric acid produced at 72 h. It appeared that the control strain consumed the tartaric acid provided by the media instead of producing it. Tartaric acid amount ranged between 0.11 g/L and 4.16 g/L at 24h, 0.07 g/L and 2.50 g/L at 48 h, 0.03 g/L and 1.69 g/L at 72 h, suggesting a decrease level with time. This amount is 16.64-fold, 23.75-fold and 49.44-fold that of the control strain, at 24 h, 48 h and 72 h, respectively. Yet, tartaric acid amount of DGA2-13 strains, started very high at 24 h compared to other strains, and remained high after reutilization at 72 h. Relative to DGA1-10, the addition of DGA1 gene does not improve tartaric acid production but that of DGA2 gene does. On the other hand, the addition of DGA1 gene to strains with first inserted DGA2 gene also improves tartaric acid production but less than in the case of DGA1 gene addition. Furthermore, DGA2-13 with one known-copy of DGA2 shows the highest amount of tartaric acid produced regardless the time. Taking together these findings raise up the importance of the gene copy number in tartaric acid production.

DISCUSSION

In this report we analyzed the lipid production of a new oleaginous yeast overexpressing DGA1 and DGA2 genes involving in triacylglycerol formation. We clearly showed that DGA1 gene belongs to DGAT2 family and DGA2 was a member of DGAT1 family. In addition, these two genes possessed variable numbers of transmembrane domains.

The level of lipid produced by the control strain that is found lower than 20% leaves some spaces for metabolic engineering. In contrast, the addition of DGA1 gene significantly affected the overall expression level in *B. raffinosifermentans* strains but the lipid production capacity was not correlated with DGA1 expression level. Moreover, the lipid production of strains derived from DGA1-10 was lower than that of strains derived from DGA2-22, suggesting the important role of DGA2 gene in lipid accumulation compared to DGA1 gene. The increase of DGA1 expression level at least by 100-fold compared to the control strain confirmed the strongest activity of the TEF1 promotor used.

The lipid production amount of the highest producer strain DGA2-13 compared to that of DGA2-22 having two copies of DGA2 gene was presumably linked to the position of DGA2 gene within the *B. raffinosifermentans* rDNA units. *B. raffinosifermentans* rDNA cluster is composed of some 40 units of 7653 bp length (Steinborn et al., 2005).

The increased expression level of DGA2 gene leads to the increased biosynthesis of lipids. An up-regulation of DGA2 enzyme is then report compare to down-regulation identified with DGA1 gene. Friedlander et al. (2016) discovered that the overexpression of DGA2 gene increased lipid content by nearly 65% compared to control strain NS125 of *Yarrowia lipolytica*, only when DGA1 gene is overexpressed. This result suggested that the important action of DGA2 gene is consistent to what we found in our report. These authors also revealed that native DGA2 function is not limiting for TAG formation in *Yarrowia lipolytica* NS18 wild-type but may become a limiting factor once DGA1 activity is abundant. Our results showed that DGA2 gene improved lipid production in combination with DGA1 gene, but the production was similar in strain where only one copy of DGA2 gene was overexpressed. Overexpression of DGA2 and DGA1 caused a significant increase in lipid production in mutant strains, suggesting these genes could be regulated at transcription level. In addition, DGA2 gene appeared to have the major lipid synthesise role in *B. raffinosifermentans*. This is not consistent with the result found with *Yarrowia lipolytica* where DGA1 gene assumed the major TAG synthesis activity (Haïli et al., 2016).

While lipid content appeared to vary greatly among mutants, overall fatty acid profiles have been shown to be quite consistent under all conditions. As shown in the results, the major fatty acid of all tested strains were oleic acid, palmitic acid and linoleic acid. Minor fatty acids were stearic acid (C18:0) and palmitoleic acid (C16:1).

In our report, all transformant strains produced organic acids such as citric acid, acetic acid and tartaric acid with variable level. *Y. lipolytica* is also known to secrete succinic, acetic and citric acids (Chatzifragkou et al., 2011). The accumulation of citric acid is significantly affected by nitrogen deprivation conditions via the C/N ratio because citric acid production starts upon nitrogen consumption (Morgunov et al., 2013, Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014). Therefore, it may compete with lipid synthesis and explain why strains, DA1-DGA2-10 and DGA2-13, with lower citric acid can produce high amount of lipids compare to their respective DGA background strain. Furthermore, CA production is positively correlated with sugar concentration (Kubicek and Karaffa, 2001; Karasu et al., 2009). These findings are consistent with our results as strains with high residual glucose have a lower lipid production. Besides, citric acid is proved to hamper lipid accumulation (Sagnak et al. 2018).

We found in this report that acetic acid is affected by the overexpressed genes. In general, acetic acid is produced in yeast by the oxidation of acetaldehyde, an intermediate product that is converted to acetate by aldehyde dehydrogenase and subsequently activated to acetyl-CoA by acetyl-CoA synthase (Freer, 2002). We also report that tartaric acid production is lower than citric acid and acetic acid. This means that the C-flow channeling in the Kennedy pathway for lipid production is used essentially for citric acid and acetic acid and less for tartaric acid production. Besides, tartaric acid is consumed at 72 h for another purpose.

CONCLUSION

The results presented in this paper illustrate the importance of diacylglycerol acyltransferase type 1 in *B. raffinosifermentans* lipid production. It also paved the way for engineering this yeast to efficiently use glucose for the production of lipids and organic acids.

Availability of data and materials

All data gathered for this study are inserted in this article and its supplementary information files.

Acknowledgements and Funding

DS found financial support from the Islamic Development Bank group.

Competing interests: None declared

Acknowledgement

We thank A. Chamas for help with the yeast transformation protocol.

References

Álvaro-Benito M, Fernández-Lobato M, Baronian K, Kunze G. 2013. Assessment of *Schwanniomyces occidentalis* as a host for protein production using the wide-range Xplor®2 expression platform. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4443–4456.

Arous, F., Azabou, S., Triantaphyllidou, I.E. et al. 2016. Newly isolated yeasts from Tunisian microhabitats: lipid accumulation and fatty acid composition. *Eng Life Sci*, 2:1-11.

Beopoulos, A., Haddouche, R., Kabran, P., Dulermo, T., Chardot, T., Nicaud, J.-M. 2012. Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1523–37.

Böer, E., Bode, R., Mock, H. P., Piontek, M., & Kunze, G. (2009). Atan1p—An extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: Molecular cloning of the ATAN1 gene and characterization of the recombinant enzyme. *Yeast*, 26(6), 323–337.

Böer, E., Piontek, M., Kunze, G. 2009a. Xplor 2- an optimized transformation/expression system for recombinant protein production in the yeast *Arxula adenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:583-594.

Bomareddy, R.R., Sabra, W., Maheshwari, G., Zeng, A.P. 2015. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microb. Cell Fact.* 14, 36.

Browse, J., McCourt, P.J., Somerville, C.R. 1986. Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem*, 152:141–5.

Cao, H. 2011. Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms, *BMC Res. Notes* 4, 249.

Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W. et al. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 13018–13023.

Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., Foresti M.L. 2017. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production, *FEMS Yeast Research*, Volume 17, Issue 8

- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S. 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36:1097–108.
- Chen, C.-X., Sun, Z., Cao, H.-S., Fang, F.-L., Ouyang, L.-L., Zhou, Z.-G. 2015. Identification and characterization of three genes encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase DGAT from the microalga *Myrmecia incisa* Reisingl. *Algal Res.*, 12:280–8.
- Chen, J.E., Smith, A.G. 2012. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae, *J. Biotechnol.*, 162:28–39.
- Cheng, D., Meegalla, R.L., He, B., Cromley, D.A., Billheimer, J.T., Young, P.R. 2001. Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem J.* Nov 1; 359(Pt3):707-14.PMID:11672446.
- Chen, Z., Liu, P., Liu, Y., Tang, H., Chen, Y. et al. 2014. Identification and characterization of a type-2 diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) from *Rhodospiridium diobovatum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106:1127–1137.
- Ferguson, K.M., Lemmon, M.A., Schlessinger, J., Sigler, P.B. 1995. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain, *Cell* 15, 1037–1046.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C. 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biores. Technol.*, 114, pp. 443-449.
- Freer, S. 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2002) 18: 271. <https://doi.org/10.1023/A:1014927129259>
- Friedlander J, Tsakraklides V, Kamineni A, Greenhagen EH et al. 2016. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol Biofuels* 9:77.
- Gajdoš, P., Ledesma-Amaro, R., Nicaud, J.-M., Čertík, M., Rossignol, T. 2016. Overexpression of diacylglycerol acyltransferase in *Yarrowia lipolytica* affects lipid body size, number and distribution, *FEMS Yeast Research*, 6, fow062, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow062>
- Giersberg, M., Degelmann, A., Bode, R., Piontek, M., Kunze, G. 2012. Production of a thermostable alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* in three different yeast species using the Xplor®2 transformation/expression platform. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1385–1396.
- Häili, N., Louap, J., Canonge, M., Jagic, F., Louis-Mondésir, C., Chardot, T., Briozzo, P., 2016. Expression of soluble forms of yeast diacylglycerol acyltransferase 2 that integrate a broad range of saturated fatty acids in triacylglycerols. *PLoS One* 11, e0165431.
- Han, G., Gable, K., Kohlwein, S., Beaudoin, F., Napier, J. and Dunn, T.M. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J. Biol. Chem.* 277, 35440–35449.
- Harlet, P., Use of Synthetic Esters for Biodegradable Lubricants, Proc. Conf. on Microbiology in the Oil Industry and Lubricants, Sopron, Hungary, September 10–12, 1991, edited by A. Zakar, Hungarian Chemical Society, Budapest, pp. 79–99.

- Hoffman, C.S., Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.
- Hofmann, K. 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 111–112.
- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggion, F., Schneider, R. 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* Jul 15; 124(Pt14):2424-37.
- Karasu Yalcin S, Bozdemir M, Ozbas Z. 2009. A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media. *Indian J Biotechnol*, 8:408–17.
- Karasu Yalcin, S., Bozdemir, M., Ozbas, Z. 2010. Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol*, 27:1374-82.
- Klabunde, J., Kunze, G., Gellissen, G., Hollenberg, C. P. 2003. Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element, *FEMS Yeast Research*, Volume 4, Issue 2, pp 185–193.
- Kohlwein, S.D. 2010. Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. *J Biol Chem* 285: 15663–15667.
- Kubicek C, Karaffa L. 2001. Organic acids. *Basic Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 305–15.
- Kunze, G., Kunze, I. 1994. Characterization of *Arxula adenivorans* strains from different habitats. *Antonie van Leeuwenhoek* 65: 607–614.
- Kurtzmann, C.P., Robnett, J. C. 2007. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhammiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Res* 7: 141–151.
- Liu, Q., Siloto, R.M., Snyder, C.L., Weselake, R.J. 2011. Functional and Topological Analysis of Yeast Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 2, an Endoplasmic Reticulum Enzyme Essential for Triacylglycerol Biosynthesis. *J Biol Chem*, 286:13115-13126.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method *Methods* 25 402 8.
- McFie P J, Banman S L, Kary S, Stone S J. Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* Aug 12; 286(32):28235-46. doi:10.1074/jbc.M111.256008 PMID: 21680734.
- Morgunov, I., Kamzolova, S., Lunina, J. 2013. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:7387-97.

- Ochoa-Estopier, A., Guillouet, S. 2014. D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*, 170:35–41.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J.T., and Sturley, S.L. 2002. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 8877–8881.
- Oh, C.S., Toke, D.A., Mandala, S. and Martin, C.E. 1997. ELO2 and ELO3, homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* 272, 17376–17384.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I. 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol.* 92, 737–744.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113 pp. 1052-1073.
- Peters, C., Tsirigos, K.D., Shu, N. and Elofsson, A. (2016) Improved topology prediction using the terminal hydrophobic helices rule. *Bioinformatics*, 32, 1158–1162
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans.*30:1047 – 50.
- Ratledge, C. Single cell oils for the 21th century Ratledge C Single Cell Oils Champaign AOCS Press 2005 1 20.
- Rösel, H., Kunze, G. 1995. Cloning and characterization of a *TEF* gene for elongation factor 1 alpha from the yeast *Arxula adenivorans* *Curr Genet* 28 360 6.
- Rosler, H., Rieck, C., Delong, T., Hoja, U. and Schweizer, E. 2003. Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-longchain fatty acid synthesis. *J. Mol. Gen. Genomics.* 269, 290– 298.
- Schneiter, R., Tatzer, V., Gogg, G., Leitner, E. and Kohlwein, S.D. 2000. Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 delta (9) to C16:1 delta (11) fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182, 3655–3660.
- Shen, H. and Chou, J.J. (2008) MemBrain: improving the accuracy of predicting transmembrane helices. *PLoS ONE*, 3, e2399.
- Silverman, A.M., Qiao, K., Xu, P., Stephanopoulos, G. 2016. Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (8), 3781–3798.
- Sorger, D., Daum, G. 2002. Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *J. Bacteriol.*, 184, pp. 519-524.
- Souza, K.S.T., Schwan, R.F., Dias, D.R. 2014. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *J Microbiol Biotechnol* 24(4),497-506.

- Steinborn, G., Gellissen G., Kunze, G. 2007. A novel vector element providing multicopy vector integration in *Arxula adenivorans*. FEMS YEAST RES 7(7):1197–1205.
- Steinborn, G., Gellissen, G., Kunze, G., 2005. Assessment of *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*-derived rDNA-targeting elements for the design of *Arxula adenivorans* expression vectors. FEMS Yeast Res. 5, 1047–1054.
- Stone, S.J., Levin, M.C., Farese, Jr. R.V. 2006. Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase-2, J. Biol. Chem, 280: 40273–40282.
- Tai, M., Stephanopoulos, G. 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. Metab Eng 15:1–9.
- Teste, M.A., Duquenne, M., François, J.M., Parrou, J.L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Mol. Biol. 2009; 10:99.
- Thevenieau F Nicaud J-M Microorganisms as sources of oils OCL 2013 20 D603.
- Wältermann M, Steinbüchel A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. J Bacteriol 2005;187:3607–3619.
- Wartmann, T., Kunze, G. 2000. Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adenivorans*. Appl. Microbiol. Biotechnol.54, 619–624.
- Xue, Z., Sharpe, P.L., Hong, et al.. 2013. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. Nat Biotechnol 31(8):734 740
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., Farese, R.V.Jr. 2008. J. Lipid Res.,49, 2283–2301.
- Zhang, H., Damude, H.G., Yadav, N.S. 2012. Three diacylglycerol acyltransferases contribute to oil biosynthesis and normal growth in *Yarrowia lipolytica*. Yeast 29:25–38.

Table.1. List of plasmids and strains

Plasmids	Features	Source/references
pBS-TEF1-PHO5-SA		Böer et al. (2009)
Xplor2.2	Xplor2 with ATRP1 selection marker module	Alavaro-Benito et al. (2013)
Xplor2-hph-pTEF1-DGA1-ARE14		This study
Xplor2-hph-pTEF1-DGA2-ARE15		This study
Xplor2-hph-pTEF1-ARE12		This study
Strains		
LS3		
G1212	[aleu2 ALEU2::atrp1]	Steinborn et al. (2007)
DGA1-10	G1212.rDNA::pTEF1-DGA1	This study
DGA1-10-hygr-1	G1212.rDNA::pTEF1-DGA1-hph-hygr	This study
DGA1-10-DGA1-2	G1212.rDNA::pTEF1-DGA1-hph-DGA1	This study
DGA1-10-DGA2-10	G1212.rDNA::pTEF1-DGA1-hph-DGA2	This study
DGA2-22-DGA1-4	G1212.rDNA::pTEF1-DGA2-hph-DGA1	This study
DGA2-22-DGA1-7	G1212.rDNA::pTEF1-DGA2-hph-DGA1	This study
DGA2-22	G1212.rDNA::pTEF1-DGA2	This study
DGA2-22-hygr-4	G1212.rDNA::pTEF1-DGA2-hph-hygr	This study
DGA2-13	G1212.rDNA::pTEF1-DGA2	This study

Table. 2. Randomly selected transformants and copy number estimation of DGA1 and/or DGA2 cassettes inserted into G1212-trp+ control strain.

Transformants	Fold change		^a DGA1 cassette copy number	Fold change		DGA2 cassette copy number
	(DGA1 vs. DGA2)	DGA1 vs. TFC1		(DGA2 vs. DGA1)	DGA2 vs. TFC1	
DGA1-4	1.83 ± 0.14	2.31 ± 0.28	1	n.d	1.26 ± 0.12	n.d
DGA1-10	2.37 ± 0.11	2.00 ± 0.11	1	n.d	0.84 ± 0.03	n.d
DGA1-DGA1-2	4.74 ± 0.41	7.24 ± 0.99	3 to 4	n.d	n.d	n.d
DGA1-DGA2-10	0.75 ± 0.20	2.09 ± 0.38	1	1.41 ± 0.35	2.83 ± 0.25	1
DGA1-13	7.76 ± 4.28	4.36 ± 1.90	2 to 3	n.d	0.59 ± 0.10	n.d
DGA2-13	n.d	1.51 ± 0.28	n.d	2.50 ± 0.13	1.69 ± 0.24	1
DGA2-22	n.d	0.75 ± 0.08	n.d	3.26 ± 0.30	2.43 ± 0.23	2
DGA2-DGA1-4	0.78 ± 0.19	0.99 ± 0.18	2	1.34 ± 0.34	1.34 ± 0.44	2
DGA2-DGA1-7	0.83 ± 0.07	0.84 ± 0.11	2	1.22 ± 0.10	1.01 ± 0.07	2

^aCassette copy number is estimated with regards to endogenous copy number for mutant with single DGA gene. For mutant with double DGA genes, we assumed that the original cassette number are maintained. We applied the ratio $(DGA1 \text{ vs } DGA2) = (E_{DGA1})^{\Delta Ct(DGA1G1212-DGA1\text{Transformant})} / (E_{DGA2})^{\Delta Ct(DGA2G1212-DGA2\text{Transformant})}$ and $(DGA2 \text{ vs } DGA1) = (E_{DGA2})^{\Delta Ct(DGA2G1212-DGA2\text{Transformant})} / (E_{DGA1})^{\Delta Ct(DGA1G1212-DGA1\text{Transformant})}$ for each ΔCt calculated per dilution. Means and standard deviation of the four ratio values are performed. n.d: non determined.

Table. 3. Gene expression level of DGA1 and DGA2 in simple or double mutant at 8 h and 24 h

	DGA1-10	DGA1-DGA1-2	DGA1-DGA2-10	DGA2-13	DGA2-22	DGA2-DGA1-7	G1212-trp+
	(n = 3)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)
DGA1-8h	13 ± 2.01 ^c	147 ± 8.11 ^a	12.3 ± 1.71 ^c	0.794 ± 0.06 ^c	0.787 ± 0.03 ^c	41.4 ± 5.85 ^b	1 ± 0 ^c
DGA1-24h	9.21 ± 3.15 ^b	105 ± 24.2 ^a	7.23 ± 0.32 ^b	0.814 ± 0.08 ^b	0.77 ± 0.25 ^b	43 ± 5.73 ^b	1 ± 0 ^b
DGA2-8h	0.749 ± 0.22 ^c	0.687 ± 0.10 ^c	4.28 ± 0.32 ^{ab}	2.51 ± 0.193 ^{bc}	4.9 ± 0.97 ^a	5.88 ± 0.46 ^a	1 ± 0 ^c
DGA2-24h	1.04 ± 0.10 ^{bc}	0.943 ± 0.20 ^c	2.44 ± 0.156 ^{ab}	2.52 ± 0.54 ^a	2.1 ± 0.17 ^{ac}	2.84 ± 0.47 ^a	1 ± 0 ^c

Values are means ± SEM.

Means in a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) as analysed by one-way ANOVA and the TUKEY test.

n = number of repetition

Table. 4. Residual glucose and biomass produced in shake-flask experiments in media supplemented with 30 g/L initial glucose concentration

	Time	G1212-trp+	DGA1-10	DGA1-10-hygr-1	DGA1-DGA1-2	DGA1-DGA2-10	DGA2-DGA1-4	DGA2-DGA1-7	DGA2-22-hygr-4	DGA2-22	DGA2-13
Glc (g/L)	24h	19.3 ± 0.30 ^{ac}	18.6 ± 0.67 ^{bc}	19.3 ± 0.69 ^{ac}	18.6 ± 0.33 ^{bc}	18.1 ± 0.05 ^{bc}	21.2 ± 0.26 ^a	20.3 ± 0.64 ^{ab}	21.5 ± 0.46 ^a	19.5 ± 0.28 ^{ac}	17.7 ± 0.05 ^c
	48h	13.7 ± 0.22 ^{ab}	12.9 ± 0.84 ^{ab}	13.1 ± 0.69 ^{ab}	13.1 ± 0.99 ^{ab}	10.3 ± 1.01 ^b	14.3 ± 0.55 ^{ab}	13 ± 0.83 ^{ab}	15.5 ± 0.39 ^a	13.1 ± 0.92 ^{ab}	11.3 ± 1.25 ^b
	72h	10.7 ± 0.39 ^a	8.96 ± 1.11 ^a	9.1 ± 1.07 ^a	8.69 ± 0.87 ^a	5.44 ± 1.12 ^a	9.07 ± 1.02 ^a	8.52 ± 1.38 ^a	10.7 ± 0.97 ^a	9.52 ± 1.16 ^a	5.88 ± 1.24 ^a
X (g/L)	24h	4.6 ± 0.04	4.09 ± 0.05	4.55 ± 0.43	4.51 ± 0.41	4.05 ± 0.31	2.6 ± 0.06	3.2 ± 0.95	4.99 ± 1.38	3.95 ± 0.47	5.6 ± 1.67
	48h	6.58 ± 0.14	6.79 ± 0.56	7.24 ± 0.57	7.44 ± 0.28	7.43 ± 0.55	5.82 ± 0.36	6.48 ± 0.51	6.78 ± 0.62	6.7 ± 0.32	7.53 ± 0.41
	72h	7.41 ± 0.16	8.78 ± 0.47	8.21 ± 0.62	8.66 ± 0.54	8.52 ± 0.67	7.36 ± 0.68	7.7 ± 0.54	6.9 ± 0.75	7.69 ± 0.63	8.68 ± 0.77

Values are means ± SEM.

Means in a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) as analysed by one-way ANOVA and the TUKEY test.

Table. 5. Extracellular organic acids biosynthesis during growth of *B. raffinosifermentans* strains on nitrogen-limited glucose-based media. Strains were cultivated as described in the Material and methods section at 28°C, using YNB with 30g L⁻¹ of glucose under shake flask conditions. The error bars represent the standard deviation between three independent replicates.

		G1212-trp+	DGA1-10	DGA1-10-hygr-1	DGA1-DGA1-2	DGA1-DGA2-10	DGA2-DGA1-4	DGA2-DGA1-7	DGA2-22-hygr-4	DGA2-22	DGA2-13
24h	AcCitric	0.99 ± 0.02 ^a	0.91 ± 0.09 ^a	0.93 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.02 ^{ab}	0.67 ± 0.06 ^{ab}	0.34 ± 0.03 ^b	0.42 ± 0.10 ^b	0.44 ± 0.03 ^b	0.87 ± 0.13 ^a	0.72 ± 0.13 ^{ab}
	AcAcetic	1.51 ± 0.03 ^{ab}	1.82 ± 0.54 ^{ab}	2.03 ± 0.48 ^{ab}	1.83 ± 0.50 ^{ab}	2.75 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.20 ^{ab}	1.72 ± 0.60 ^{ab}	0.59 ± 0.08 ^b	2.48 ± 0.15 ^a	2.87 ± 0.32 ^a
	AcTartric	0.25 ± 0.01 ^b	0.86 ± 0.49 ^b	0.74 ± 0.48 ^b	0.99 ± 0.70 ^b	3.28 ± 0.98 ^{ab}	2 ± 0.19 ^{ab}	2.68 ± 0.73 ^{ab}	0.772 ± 0.28 ^b	1.83 ± 0.44 ^{ab}	4.16 ± 1.1 ^a
48h	AcCitric	1.49 ± 0.03 ^{ab}	1.59 ± 0.07 ^{ab}	1.4 ± 0.05 ^{ab}	0.796 ± 0.14 ^b	0.84 ± 0.29 ^b	1.67 ± 0.11 ^{ab}	1.57 ± 0.16 ^{ab}	2.11 ± 0.07 ^a	2.08 ± 0.31 ^a	1.37 ± 0.45 ^{ab}
	AcAcetic	2.38 ± 0.08	3.36 ± 0.54	3.1 ± 0.84	2.68 ± 0.77	3.21 ± 0.51	2.59 ± 0.06	3.3 ± 0.65	3.03 ± 0.38	3.39 ± 0.75	3.48 ± 1.27
	AcTartric	0.10 ± 0.01 ^d	0.54 ± 0.36 ^{bcd}	0.44 ± 0.36 ^{cd}	0.55 ± 0.48 ^{bcd}	2.16 ± 0.56 ^{ab}	1.4 ± 0.06 ^{ad}	1.94 ± 0.15 ^{ac}	0.90 ± 0.34 ^{ad}	1.29 ± 0.24 ^{ad}	2.5 ± 0.40 ^a
72h	AcCitric	1.99 ± 0.06	1.96 ± 0.23	1.73 ± 0.06	0.98 ± 0.2	1.35 ± 0.39	1.69 ± 0.28	1.86 ± 0.40	1.87 ± 0.32	2.16 ± 0.45	1.53 ± 0.47
	AcAcetic	3.08 ± 0.09	3.74 ± 0.28	3.52 ± 0.62	2.96 ± 0.78	3.89 ± 0.37	2.88 ± 0.90	3.77 ± 1.3	2.87 ± 1.14	3.13 ± 1.2	3.3 ± 1.38
	AcTartric	0.02 ± 0.01 ^c	0.31 ± 0.24 ^{ac}	0.22 ± 0.22 ^{bc}	0.31 ± 0.31 ^{ac}	1.62 ± 0.56 ^{ab}	0.95 ± 0.09 ^{ac}	1.37 ± 0.22 ^{ac}	0.55 ± 0.29 ^{ac}	0.97 ± 0.15 ^{ac}	1.69 ± 0.36 ^a

Values are means ± SD, n = 3 per treatment group.

Means in a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) as analysed by one-way ANOVA followed by the Tukey test.

A

```
DGA2 : -----MATAIAIATVTEG-----LGLDKVLSKDQSGLSKVTPFRFNT : 36
YLDGA2 : -----MEVR-----RRKIDVLKAQKNGYESGPPSRQS : 27
ApDGAT1 : -----MSKEFVSEWGRITGSGSKRSSSPFNPLEATIESLKQENQRLKEIISERTSQGATQSGYLNKYRPHATASLWAHTWEPRFVVVVRTGHLSSYRNEEGVQFHPRGQLDLEGTSVVAEGLKRRAFHTFQIVDSAGATLLRLSSDS : 141
NtdGAT1 : -----MVIMELPES---VETTTTTTSGIEN---INSDINHsvr-----RRRGSNGFEAASAINSSDANMSedr : 58
```

Motif 1

```
DGA2 : NVQFPQFCSPSPQSRSSSPISASSSSELELKVHKPRSPSSSKH-----KPHYREIVRSTASLRSRDFARTKPPSYSCFRNLAAMI : 120
YLDGA2 : -SQPSSRASSRTFNKHSSTLSGLTMKVQKKEAGF--FANSKTP-----FLHIREVETCCSTSLRSRDYDGSN--PSFKCFRNIGMI : 106
ApDGAT1 : PSEARAWMDALERAGCRRRSGGEEELARRDSSSTVNTVGGEDSEAESSGGAGAAAVSGKHIGYTSDTSDVQSRPPRRPFGNGGGGGHGGHHQGSARESGEGQPKRKREAMKPSAELHTATKYSIMSSEFVLLS---NÇNMVNNTLLI : 288
NtdGAT1 : -RDVCGSGAGLETVNERSKSVGESDVIKEDDRNDNVANGEESKS-----TETTTTP-----FKFAYRASAEARRIKESPLSSDAIFKQ---SHACLNLQVV : 149
```

Motif 2

```
DGA2 : AIAVSNRLLLELYCNYG----VFHTINIMGSAHDVRLTMALIASVPFHLEVALAIBRIAVLTMPSKSTAHNR-----SKHLWGLEFAVHALNAAAVVAISSYTVYSRVWSEAVCTLCECFIVVCFVVSVALT : 248
YLDGA2 : ILIVGNRIAFENYLYG----ISNPFDFKTIPTSEWQLSGLLIVVAYAHILMAYATBSAKLLEFLS-----SKHHYMAVGLPHTMNTLSSLSLSYVYYLNEFVACTIVEFVAVIISLKLASYALT : 226
ApDGAT1 : VLAAPNRLLILENLLKGLRFNP-VTFARRA-TPQNNPLFLCWPTLLALCLALGIDRIALAAALRREQARDAAAAKKGEGRSAGGGGKSAVGAGAAEWLILANVANTSAMAVPSAVVHYTDSEVLEPCFALTAVAVIWMVAVSYAHC : 437
NtdGAT1 : VLIAVNSRLIIEINIMRYGLLIRAGFWFSSKSR---DWPELLMCLSLQILPLAFAFIVEKLAQQRHLETA-----VVTPHITITTAALLYFVIVLGLCDSAFLEVIILMLVACIVWMKIVSYAHT : 266
```

Motif 3

Motif 4

```
DGA2 : NEDLRDAAIEG-----LETTDELLSKLFPFNLLLSNIVYEWVAPTIYQPIYERWPLHRRWGFIFSR-----LLEIMGSMVLWFFSTQLANEHESSSLGHFEQ--FNVVKISECLLKLASVS : 360
YLDGA2 : NSDLRKAABAQKLDKTQDDNEKESTSSSSSSDDETLADIDVIFAYYAQLPQCNVLSNLIYEWFAPTIYQFVYEKTERIRPKHVIRN-----LFEIVSLCMLICFLIFQVAYEIMQSCIALFFQPKIDYANISERLMLKIASVS : 368
ApDGAT1 : NDLRCARRAHELDRDGERGSG-----LFAHGDPPLRYPENLTLGNMAYBLAVPTICVLTYSRSTRFRIRWLLRHGGIKGGFVATMIVTLTMMFIEQYIEPTIHNSIQEMTMM--DWPRMVERLLKLSLFN : 565
NtdGAT1 : NEDMRQLAKSTDKDE-----TSDGD-----ESTDVSFKSAIYEMVAPETICVQLSYEHTPCIRKGVVARQ-----FIKLVIFITGLMGFIEQYINEIVQNSQHPKLG--NLLYAIERVLKLSVEN : 373
```

Motif 5

Motif 6

Motif 7

```
DGA2 : MATWILGFCEIQSEFLNLAELVRFGRDFYQD----WNAAGSVGYFRKWNFEVHNYFLRFYIEMIKRGYSQRTASVTVFFTSALHEVAVGVETQSLIGVAFVGMAAQIPIVIAVTSFLEKMG-ETGATIGNCFWLSFFIG-QEMG : 503
YLDGA2 : MMVWLIGFYAFFCNGNLIAELTCFGNRDFYQD----WNSKSTGQYWTIWNKEVNCYFRHEVNVPLHARGMSRFNASVVFESAVIHELIVGIEETHNIGPFFGMMSCVPLIMATENIQHINSLSLFLGNCFFWTFBFG-QPTC : 512
ApDGAT1 : LYLWLLFYTLLEDLWLNIVAEITGFGDRDFYKARWGWEWNAITVGEYFRINMEVHSRMLREVMFEQVRHKIPKFTAGLIVFVSAVEHEILVALELHMVKGFVAFVGLMACVPLMLITEKIKQRF--ESDRIGNAIFRMSECFILGQELS : 713
NtdGAT1 : LYLWLLCFYCFEHLWLNILAEILCFGDRDFYKD----WNAKNTDDEYFRMWNMEVHNYFLRFYIEMIKRGYSQRTASVTVFFTSALHEVAVGVETQSLIGVAFVGMAAQIPIVIAVTSFLEKMG-ETGATIGNCFWLSFFIG-QEMG : 516
```

```
DGA2 : VILLYFAWNMKHQ--- : 516
YLDGA2 : AFLYLAYNYKQNG-- : 526
ApDGAT1 : IMLYHDWRKEHGA-- : 727
NtdGAT1 : VILLYHDVMNRKSSAR : 532
```

B



Fig. 1. Sequence alignment of DGAT proteins. (A): DGA2, *Blastobotrys raffinosifermentans* DGA2 (this study); YLDGA2, *Yarrowia lipolytica* DGA2; ApDGAT1, *Auxenochlorella protothecoides* DGAT1 (GenBank accession No.:KFM28983.1); NtDGAT1, *Nicotiana tabacum* DGAT1 (GenBank accession No.:AAF19345.1); DGA1, *Blastobotrys raffinosifermentans* DGA1 (this study); YLDGA1, *Yarrowia lipolytica* DGA1; ScDGAT2, *Saccharomyces cerevisiae* DGAT2 (GenBank accession No.:NP_014888.1), OLDGAT2, *Ostreococcus lucimarinus* DGAT2 (GenBank accession No.:XP_001421075). Commonly conserved motifs are under the black lines. Highly conserved functional motif for DGAT2 family member is in red coloured box.

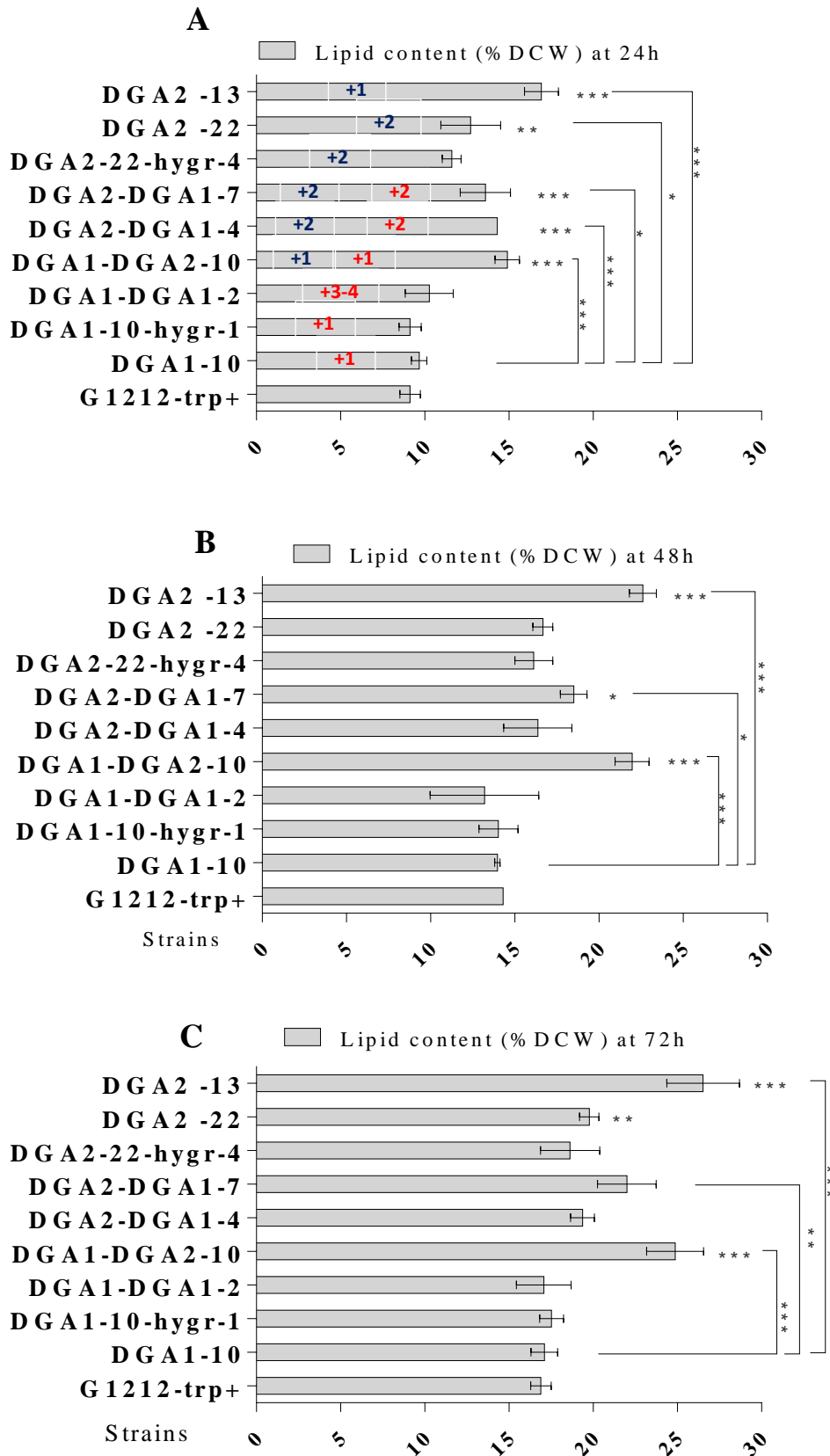


Fig. 2. Total lipid contents using a 30 g/L glucose-containing medium in shaken flasks condition at 28°C. Lipid content in percent at 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C). DGA1-hygr: DGA1-10 transformed with empty vector harboring hygromycin resistance. Significant

difference between mutants was showed in brace. DGA2 cassette copy number are in blue and DGA1 in red.

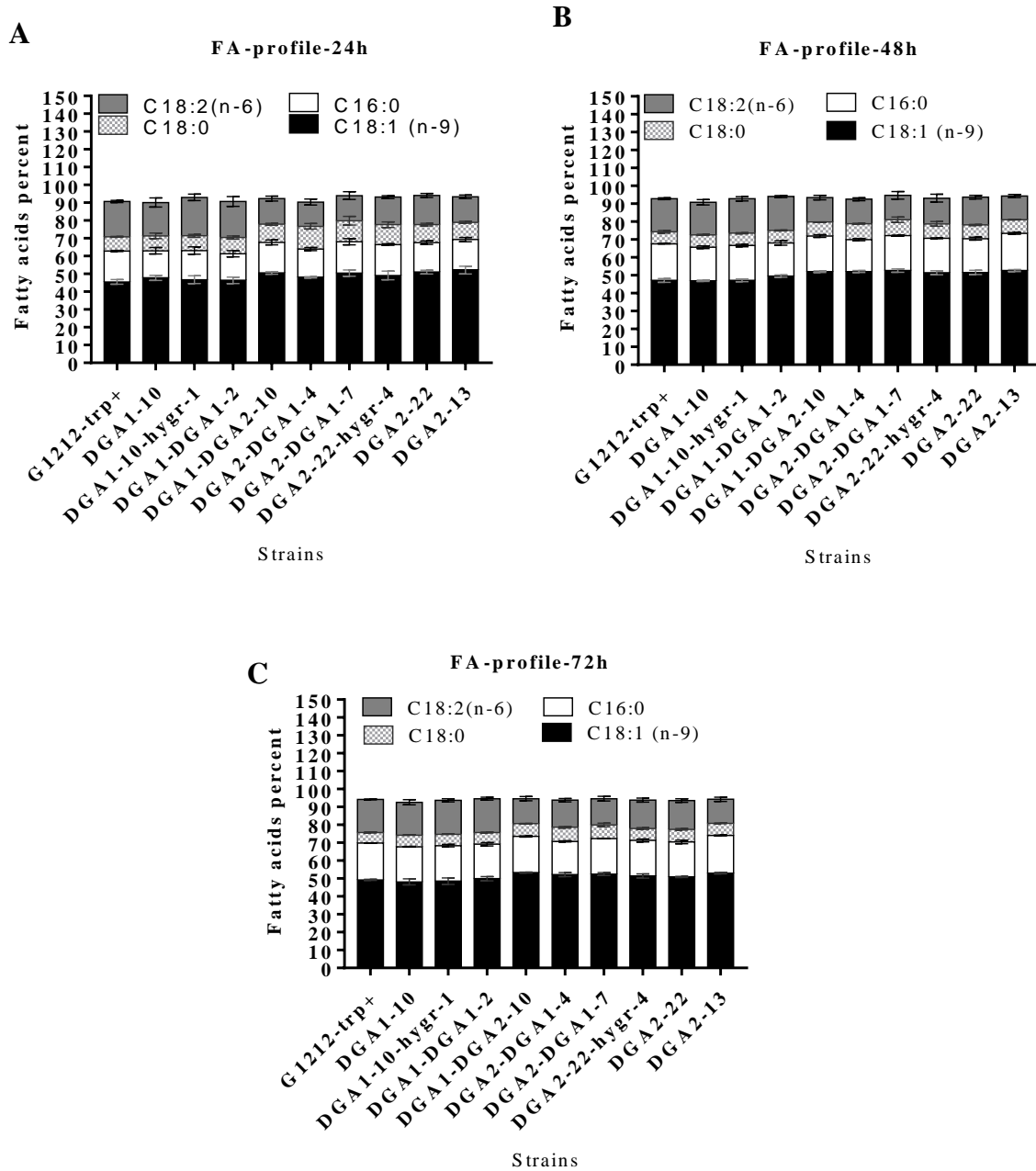


Fig. 3. Fatty acid species in the lipid profile measured by GC. Strains were grown in low-nitrogen medium with glucose as the sole carbon source. Fatty acids profile at 24h (A), 48 h (B) and 72 h (C). C16:0 palmitic acid; C18:0 stearic acid; C18:1 oleic acid; C18:2 linoleic acid.

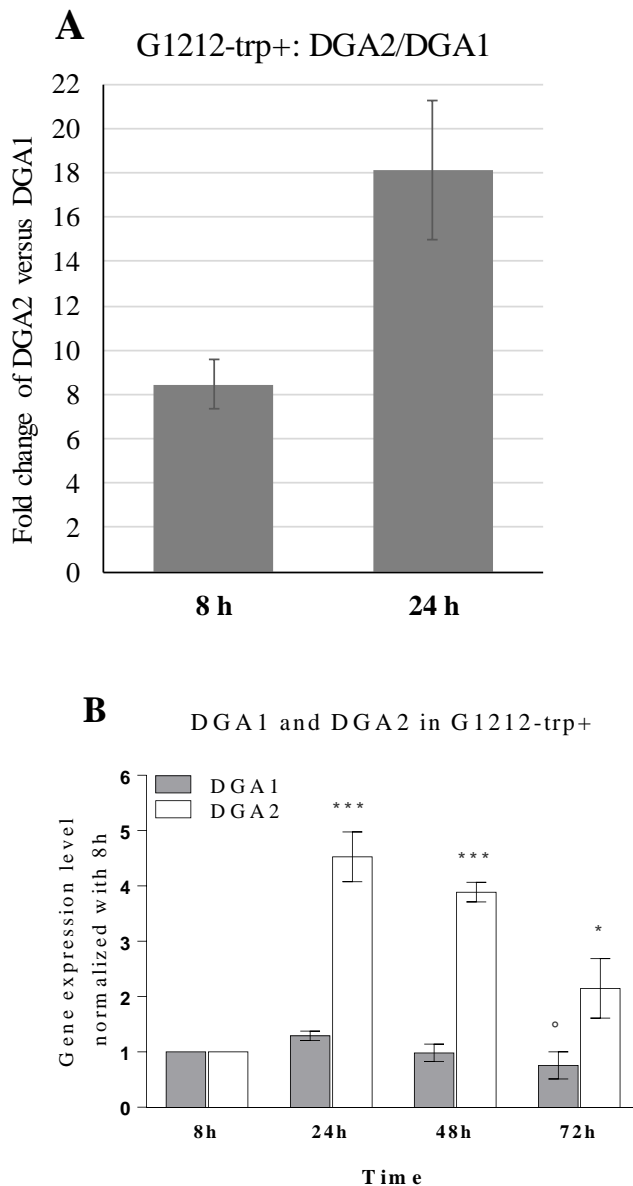


Fig. 4. qRT-PCR analysis of two DGA overexpression. (A) Fold change involving DGA1 and DGA2 gene performed at 8h and 24h in the parental strain, (B) Expression level of DGA1 or DGA2 normalized per hour in the parental strain G1212. Results were based on three biological replicates and error bars indicate standard deviation. DGA1 and DGA2 expression level occurring in the same strain were separated graphically except for the DGA2-22 and the control strain. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$. ° statistical difference between 24 h and 72 h.

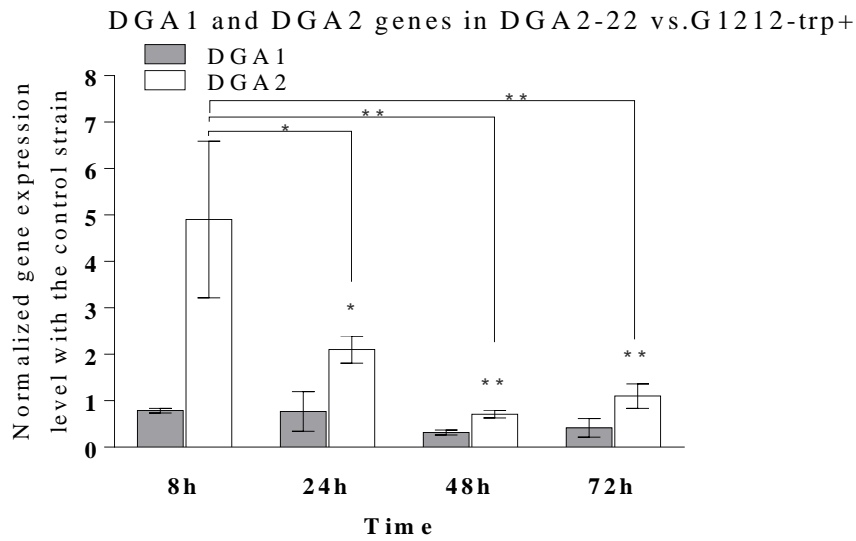


Fig. 5. Expression level of DGA1 and DGA2 normalized with the parental strain at each time in the mutant DGA2-22.

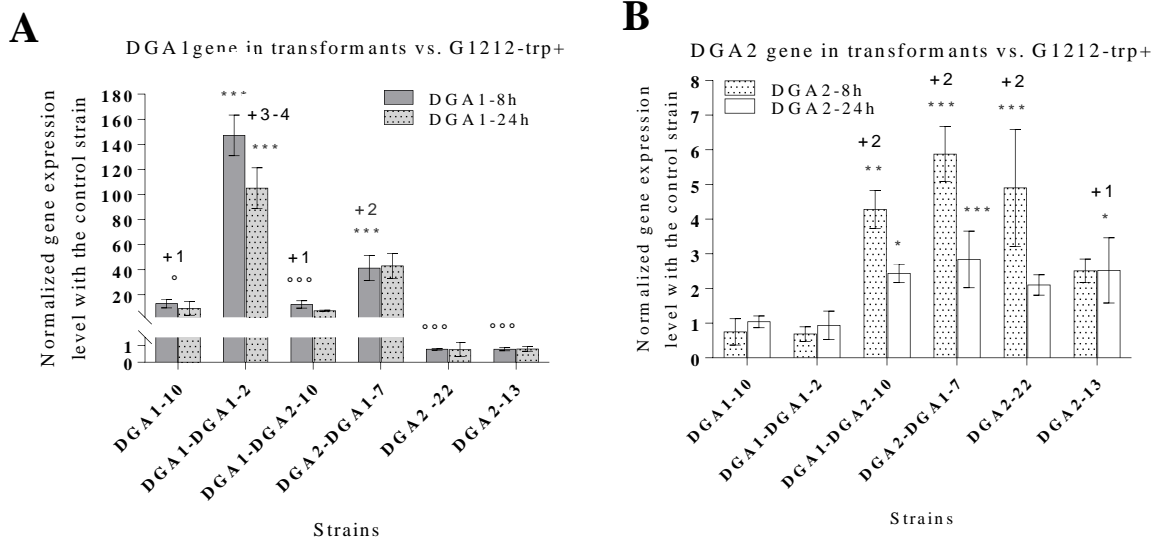


Fig. 6. Expression level of DGA1 and DGA2 normalized with the parental strain at each time in all mutants of this study. (A) Expression level of DGA1 normalized with the parental strain and (B) Expression level of DGA2 normalized with the parental strains. The gene cassette number is indicated above each histogram.

Table. S1. Transmembrane domains prediction results for DGA1 and DGA2 genes of *B. raffinosifermantens*.

Prediction program	^a Gene	^b TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9	TMD10
TOPCONS	DGA1	29-49	156-176								
	DGA2	111-131	153-173	194-214	226-246	275-295	305-325	356-376	433-453	455-475	490-510
MEMSAT3	DGA1	12-36	39-63	305-329							
	DGA2	117-139	157-181	195-219	222-245	306-329	358-380	430-449	452-474	488-507	
HMMTOP	DGA1	17-40	125-144	157-176							
	DGA2	120-137	162-179	202-219	232-250	281-298	313-332	363-382	439-456	463-480	497-516
TMFinder	DGA1	16-38	44-54	128-139							
	DGA2	116-134	157-177	197-218	306 - 326	357-383	433 - 446	456-470	488 - 511		
SVM-TM	DGA1	22-53	127-141	162-176							
	DGA2	160-174	197-215	312-326	356-379	433-447	454-470	489-509			
MemBrain	DGA1	18-55	163-173	189-209	305-315						
	DGA2	114-130	154-182	196-220	222-240	280-291	310-330	353-376	432-458	460-476	488-509

^aThe protein sequence of DGA1 and DGA2 genes retrieved from GRYC website are used

^bNumbers denoted amino acid positions.

Table. S2. Oligonucleotides employed for DGA cloning, overexpression and quantitative RT-PCR.

Primers nucleotide sequence for 5' to 3' annealing temperature (°C)

DNA Cloning		Target	Sequence
Genomic DNA	LS3-DGA1fw	DGA1	atgaatTCATGGTTCGGTTCGCTCC
	LS3-DGA1rv	DGA1	atggatcCATTACTCTACAAACGTAAGCtc
	LS3-DGA2fw	DGA2	atgaatTCGTCATGGCTACCGCTACCGC
	LS3-DGA2rv	DGA2	atcctagGCTACTGGTGCTTCATATTC
Quantitative RT-PCR			
	TFC1-ARAD1C43868g-Fw	TFC1	CTCCACCCAGGTTCTCTCAC
	TFC1-ARAD1C43868g-Rv	TFC1	ATAGAGAACCTTGCTAGGATAAGGATCA
	DGA1-ARAD1C08250g-Fw	DGA1	GGTGAAGACCTGGACCCTGA
	DGA1-ARAD1C08250g-Rv	DGA1	CTCCAGGCAGGATGTCCA
	DGA2-ARAD1D42460g-Fw	DGA2	CAAATCGACCGCACACAACCA
	DGA2-ARAD1D42460g-Rv	DGA2	CCTTGGAACACGCTTACAGTA

*Bam*HI (GGATCC), *Eco*RI (GAATTC) and *Avr*II (CCTAGG) restriction sites are underlined; the sequences corresponding to the genomic positions indicated are given in bold type

Table. S3. Percent of DCW contents of fatty methyl esters (FAMES) derived from lipids produced by *Arxula adenivorans* LS3 strains, G1212-trp+ and mutant strains. Abbreviations: C16:1, palmitoleic acid; C16:0, palmitic acid; C18:2, linoleic acid; C18:1 oleic acid; C18:0, stearic acid.

		G1212-trp+	DGA1-10	DGA1-10-hygr-1	DGA1-DGA1-2	DGA1-DGA2-10	DGA2-DGA1-4	DGA2-DGA1-7	DGA2-22	DGA2-22-hygr-4	DGA2-13
C18:1	24h	45.50 ± 0.74 ^c	47.80 ± 0.83 ^{ac}	46.70 ± 1.28 ^{bc}	46.40 ± 1.02 ^{bc}	50.50 ± 0.42 ^{ab}	48.00 ± 0.23 ^{ac}	50.50 ± 1.00 ^{ab}	51.00 ± 0.61 ^{ab}	49.10 ± 1.39 ^{ac}	52.10 ± 1.24 ^a
	48h	47.20 ± 0.62 ^c	46.90 ± 0.23 ^c	47.20 ± 0.42 ^c	49.60 ± 0.37 ^b	52.00 ± 0.25 ^a	52.10 ± 0.31 ^a	52.70 ± 0.54 ^a	51.60 ± 0.66 ^{ab}	51.50 ± 0.64 ^{ab}	52.60 ± 0.33 ^a
	72h	49.20 ± 0.18 ^{ce}	48.10 ± 0.99 ^e	48.50 ± 1.05 ^{de}	49.90 ± 0.68 ^{bce}	53.30 ± 0.13 ^a	52.20 ± 0.66 ^{ac}	52.50 ± 0.47 ^{ab}	50.90 ± 0.18 ^{abe}	51.40 ± 0.72 ^{acd}	53.00 ± 0.23 ^{ab}
C16:0	24h	17.30 ± 0.18	15.20 ± 1.06	16.40 ± 1.19	15.00 ± 1.01	17.20 ± 0.80	15.90 ± 0.50	17.60 ± 0.99	16.50 ± 0.59	17.4 ± 0.27	17.10 ± 0.70
	48h	20.40 ± 0.05 ^{ab}	18.70 ± 0.43 ^{bcd}	19.50 ± 0.39 ^{ad}	18.40 ± 0.72 ^{cd}	19.90 ± 0.45 ^{ac}	17.80 ± 0.34 ^d	19.50 ± 0.20 ^{ad}	18.90 ± 0.49 ^{ad}	19.20 ± 0.15 ^{ad}	20.80 ± 0.27 ^a
	72h	20.60 ± 0.07 ^{ab}	19.60 ± 0.11 ^{ac}	19.80 ± 0.39 ^{ac}	19.20 ± 0.55 ^{bc}	20.20 ± 0.17 ^{ab}	18.50 ± 0.18 ^c	19.80 ± 0.07 ^{ac}	19.50 ± 0.55 ^{ac}	19.90 ± 0.47 ^{ac}	21.10 ± 0.14 ^a
C18:0	24h	7.94 ± 0.142 ^c	8.38 ± 0.89 ^{bc}	8.27 ± 0.49 ^{bc}	9.07 ± 0.49 ^{bc}	10.10 ± 0.324 ^{ac}	12.80 ± 0.89 ^a	11.80 ± 1.41 ^{ab}	10.20 ± 0.40 ^{ac}	11.10 ± 0.89 ^{ac}	9.72 ± 0.33 ^{ac}
	48h	6.67 ± 0.43 ^b	6.94 ± 0.17 ^{ab}	6.87 ± 0.21 ^{ab}	7.07 ± 0.13 ^{ab}	7.82 ± 0.03 ^{ab}	8.88 ± 0.17 ^a	8.88 ± 0.86 ^a	7.67 ± 0.17 ^{ab}	8.03 ± 0.78 ^{ab}	7.61 ± 0.10 ^{ab}
	72h	5.93 ± 0.21 ^c	6.53 ± 0.03 ^{bc}	6.37 ± 0.05 ^{bc}	6.49 ± 0.15 ^{bc}	7.14 ± 0.05 ^{ac}	7.89 ± 0.24 ^a	7.66 ± 0.60 ^{ab}	7.06 ± 0.29 ^{ac}	6.62 ± 0.30 ^{ac}	6.74 ± 0.10 ^{ac}
C18:2	24h	19.90 ± 0.37 ^{ab}	18.80 ± 1.47 ^{ac}	21.60 ± 1.06 ^a	20.30 ± 1.57 ^{ab}	14.50 ± 0.80 ^{cd}	13.60 ± 0.97 ^d	14.10 ± 1.28 ^{cd}	16.40 ± 0.64 ^{bcd}	15.50 ± 0.46 ^{bcd}	14.30 ± 0.55 ^{cd}
	48h	18.50 ± 0.28 ^a	18.20 ± 0.86 ^a	19.20 ± 0.67 ^a	18.90 ± 0.32 ^a	13.70 ± 0.71 ^b	13.70 ± 0.47 ^b	13.60 ± 1.22 ^b	15.50 ± 0.56 ^{ab}	14.40 ± 1.27 ^b	13.30 ± 0.50 ^b
	72h	18.50 ± 0.13 ^{ab}	18.40 ± 0.82 ^{ab}	19.00 ± 0.49 ^a	18.90 ± 0.47 ^{ab}	13.90 ± 0.70 ^c	15.10 ± 0.56 ^c	14.70 ± 0.77 ^c	16.10 ± 0.60 ^{ac}	15.90 ± 0.65 ^{bc}	13.40 ± 0.67 ^c
C16:1	24h	0.81 ± 0.14 ^{ab}	0.94 ± 0.04 ^a	0.60 ± 0.03 ^{bc}	0.56 ± 0.04 ^{bc}	0.49 ± 0.02 ^c	0.44 ± 0.03 ^c	0.47 ± 0.04 ^c	0.49 ± 0.04 ^c	0.48 ± 0.04 ^c	0.83 ± 0.06 ^{ab}
	48h	0.91 ± 0.01	0.90 ± 0.09	0.85 ± 0.03	0.77 ± 0.00	0.72 ± 0.02	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.07	0.83 ± 0.06	0.81 ± 0.04	0.76 ± 0.08
	72h	0.98 ± 0.00 ^a	0.88 ± 0.09 ^{ab}	0.91 ± 0.02 ^{ab}	0.87 ± 0.00 ^{ab}	0.80 ± 0.03 ^{ab}	0.76 ± 0.05 ^{ab}	0.79 ± 0.02 ^{ab}	0.84 ± 0.02 ^{ab}	0.92 ± 0.08 ^{ab}	0.73 ± 0.05 ^b

Values are means ± SD, n = 3 per treatment group.

Means in a row without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) as analysed by one-way ANOVA followed by the Tukey test.

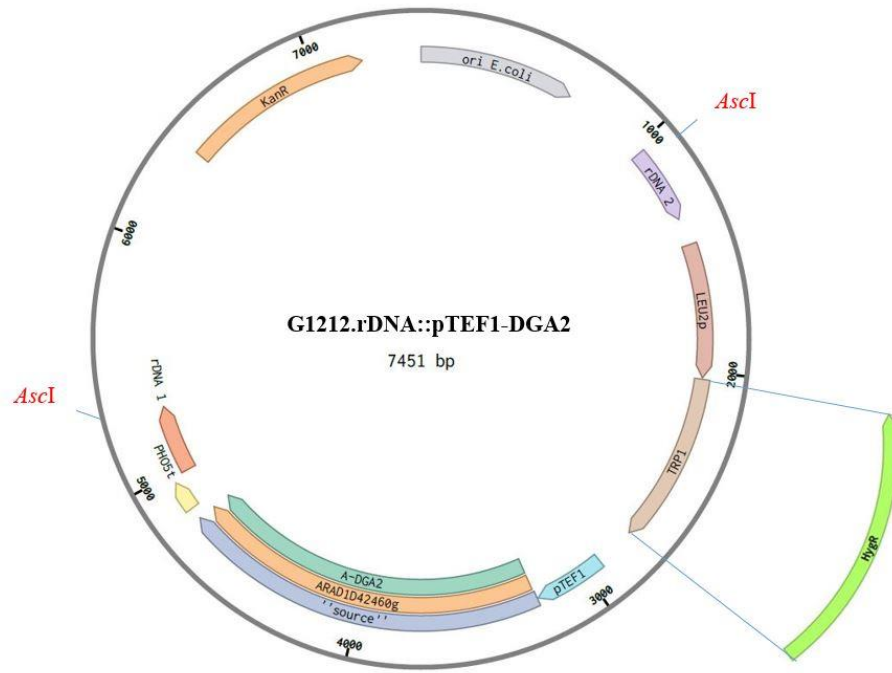


Figure. S1. Plasmid card with hygromycin orientation.

4. Synthèse des résultats

Nous avons montré que le gène DGA1 fait partie de la famille des DGAT2 tandis que DGA2 fait partie des DGAT1.

Le niveau d'expression de DGA2 dans le contrôle G1212-trp+ est plus élevé que celui de DGA1. L'addition du gène DGA1 accroît le niveau d'expression de DGA1 contrairement à celle de DGA2 où le niveau d'expression reste presque inchangé. Donc DGA1 ne semble pas réguler l'expression de DGA2.

L'insertion des cassettes DGA1 augmente fortement le niveau d'expression de DGA1 (>140 fois chez DGA1-DGA1-2) alors que l'insertion des cassettes DGA2 fait varier peu le niveau d'expression (maximum 6 fois dans DGA2-DGA1-7). Ceci peut être dû au fait que DGA2 est naturellement plus fortement exprimé que DGA1.

Par ailleurs, l'impact de DGA2 sur la production totale de lipides est plus important que celui de DGA1. En effet, les souches dérivées de DGA2-22 produisent plus de lipides que celles dérivées de DGA1-10.

Le taux de conversion du glucose en lipides est variable suivant les mutants obtenus. Toutefois, DGA1-DGA2-10 et DGA2-13 semblent mieux utiliser le glucose que le reste des mutants de nos tests. Notons aussi que ces deux souches présentent la production de lipides la plus élevée parmi toutes nos souches étudiées à 24h, 48h et 72h. Ces informations suggèrent que le glucose consommé est majoritairement utilisé pour produire des lipides. Outre la production de lipides, le flux de carbone est aussi utilisé dans la synthèse d'acides organiques dont l'acide citrique, l'acide acétique et l'acide tartrique. Néanmoins, l'acide organique le plus produit est l'acide acétique, bien que sa production soit très variable selon les souches analysées. Nous avons aussi remarqué que le nombre de copies de gènes récupérés par une souche influe sur sa production d'acide organique. Par exemple, la souche DGA2-13, avec une copie de DGA2, produit plus d'acide tartrique que le reste des mutants utilisés dans l'ensemble de nos tests.

Discussion générale

Discussion générale

Les organismes modèles utilisés jusqu'ici dans l'étude des caractères oléagineux chez les levures appartiennent aux ascomycètes et basidiomycètes. Les groupes d'espèces oléagineuses étudiées ces dernières années peuvent être divisés en espèces pour lesquelles des outils génétiques très avancés ont été développés (*Y. lipolytica*) et en espèces nouvelles en cours d'étude comme celle étudiée dans le cadre de ma thèse (espèces du genre *Blastobotrys*). La plupart des tests réalisés au cours de ma thèse et regroupés en trois chapitres dans ce manuscrit ont permis de montrer que les souches de levures étudiées disposent d'un potentiel naturel supérieur à celui de *Y. lipolytica* pour l'utilisation de certains substrats. Néanmoins, nous n'avons pu trouver une température à laquelle on obtient uniquement des formes levures ou les formes hyphes (dimorphisme) comme dans le cas de *Y. lipolytica*. Le chapitre 1, a exploré l'utilisation de diverses sources de carbone et a montré la contribution importante du glucose, du cellobiose et de l'acide oléique dans la lipogénèse comparativement aux autres sources de carbones testées. Le chapitre 2 nous a fait découvrir la similarité entre les voies métaboliques de production de lipides de *Y. lipolytica* et celles de *B. raffinosifermantens*. Le chapitre 3, en revanche, montre la contribution efficace du gène DGA2 de la famille des DGAT1 à la production de lipides contrairement au gène DGA1 de la famille des DGAT2. Nous aborderons au cours de cette discussion huit points clés mis en lumière lors de nos différents tests.

Différence de croissance de LS3 et CBS8244^T

L'évolution de la biomasse de LS3 et CBS8244^T révèle un comportement différent de ces deux souches en fonction de la température d'incubation retenue. En effet, LS3 présente une température optimum à 37°C et la biomasse de CBS8244^T à 28°C et 37°C est supérieure à celle de LS3 à 42 et 45°C.

Effet de la température sur les acides gras majoritaires du profil lipidique

La proportion d'acide gras produite par une levure oléagineuse varie en fonction des sources de carbones du milieu de culture, de l'environnement et de la base génétique de cette levure. Le profil lipidique de nos tests varie selon la souche de levure, la température et le temps d'incubation. La fluctuation de la teneur en acide gras C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 évoque une activité d'élongases et de désaturases faisant intervenir des gènes du métabolisme des lipides. Des élongases (ELO1 et ELO2) et désaturases (OLE1/ Δ 9 et FAD2/ Δ 12) ont été trouvées dans le génome de la LS3 de *B. raffinosifermantens*.

Il est connu que l'acide gras C18:0 est séquentiellement désaturé en C18:1 puis C18:2. Et, cette activité est réalisée par les désaturases $\Delta 9$ (Martin et al., 2006) et $\Delta 12$ (Bucek et al., 2014 ; Silverman et al., 2016). Dans nos tests, de 28°C à 45°C, à 72 h, les proportions de C18:1 et C16:0 dans les souches LS3 et CBS8244^T décroissent alors que celles de C18:2 et C18:0 croissent. Ces informations suggèrent donc que certaines enzymes ont probablement une activité température-dépendante. Si on a plus de C18:2 et moins de C18:1, cela suggère que la $\Delta 12$ est plus active à 45°C qu'à 28°C. De même, si on a plus de C18:0, cela peut signifier que l'elongase ELO1 est plus active à 45°C ou bien que la $\Delta 9$ est moins active à 45°C qu'à 28°C. Dans un premier temps, nous pourrions quantifier les niveaux de transcrits de ces différents gènes aux différentes températures pour valider nos hypothèses.

Par ailleurs, nos tests ont révélé une proportion prédominante de C18:1(n-9). Tan et al. (2011) rapportent que les levures oléagineuses produisent naturellement des quantités substantielles de cet acide gras. Ainsi, l'acide gras majoritaire du profil lipidique de *Y. lipolytica* reporté par Silverman et al. (2016) sur du glucose est C18:1 (48,8%). D'autre part, la proportion très variable des différentes espèces d'acide gras dans le profil lipidique de LS3 et CBS8244^T en phase exponentielle à 4h30 (avec une prédominance de C18:2 à 42 et 45°C chez LS3) et le pourcentage total de lipides inférieur à 10%, suggèrent que les acides gras produits sont probablement orientés vers la constitution de la bicouche phospholipidique des souches étudiées. Silverman et al. (2016) concluaient que les modifications notées dans les profils d'acides gras sont plus étroitement liées aux activités des désaturases ou enzymes agissant directement sur les acides gras qu'aux activités des acyltransférases.

Dans le profil lipidique de la LS3 à 72h, nous avons remarqué qu'il y a plus de C18:1 et moins de C18:2 à 28°C qu'à 42 et 45°C. Cette tendance est probablement liée au fait que la désaturase OLE1 ($\Delta 9$ désaturase) est plus active à 28°C qu'à 42 et 45°C alors que la désaturase FAD2 ($\Delta 12$ désaturase) est plus active à 42 et 45°C qu'à 28°C. Le fait qu'à 37°C, 42°C et 45°C à 72h puis 42 et 45°C à 24h qu'on ait plus de C18:2 qu'à 28°C chez nos deux souches, peut être dû à une meilleure interaction entre le cytochrome b5 et la désaturase $\Delta 12$ entraînant une meilleure activité de cette dernière. En effet, le cytochrome b5 est requis dans le transport d'électron au cours des réactions de désaturation (Certik et Shimizu, 1999). Et, Uemura (2012) a démontré qu'une meilleure interaction entre le cytochrome b5 et la désaturase $\Delta 12$ à 30°C qu'à 20°C permet d'accroître l'activité de la désaturase $\Delta 12$. Par ailleurs, la plus grande proportion de C16:0 identifiée dans le chapitre 1 est due à l'activité du complexe FAS qui synthétise en abondance les acides gras C16:0 (Schuster et al., 1995).

Les rendements en lipides de LS3 à 28°C et 37°C à 24h, et ceux de CBS8244^T à 42 et 45°C doublent à 72 h, suggérant une progression de l'accumulation de lipides de 24 h à 72h ainsi que la présence de deux phases d'accumulation, probablement la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. Dans cette logique, Hardman et al. (2017) ont montré chez *Y. lipolytica* une augmentation des TAGs au fur et mesure que les cellules évoluent vers la phase stationnaire.

Les meilleures sources de carbone de nos tests

Nos travaux ont montré que les meilleures sources de carbone pour produire des lipides sont le glucose et le cellobiose. Gong et al. (2012) ont rapporté que l'assimilation du cellobiose par la souche AS 2.1560 de *L. starkeyi* génère plus de biomasse et de lipides comparé à l'utilisation du glucose ou du xylose à la même concentration. Au contraire, la souche ATCC 58680 de cette même espèce produit plus de lipide sur du glucose que sur du xylose (Rahman et al., 2017). Les souches LS3 et CBS8244^T de nos travaux sont aussi capables de valoriser le xylose, ce qui est intéressant car le xylose est un substrat peu coûteux qui peut être rentable à grande échelle.

Nous avons aussi noté que LS3 et CBS8244^T n'arrivent pas à utiliser correctement le glycérol. La production de lipides générée est en dessous de 20%. Nos tests montrent que les levures du genre *Blastobotrys* préfèrent le glucose au glycérol. Le contraire est rapporté chez *Y. lipolytica* (Mori et al., 2013) qui dispose de six transporteurs de glycérol pour faciliter l'absorption du glycérol contre un transporteur d'hexose pour l'absorption du glucose (Palma et al., 2007). L'utilisation du glycérol pour produire des lipides est un critère très important car le glycérol est un substrat industriel peu onéreux.

Le choix du substrat est aussi important pour la production de lipides en termes d'inhibition de certaines molécules de dégradation des lipides. Fickers et al. (2005) ont rapporté que la présence du glucose ou du glycérol diminue la production de lipases chez *Y. lipolytica*.

L'utilisation naturelle du glucose ou du xylose est certes intéressante dans des conditions de laboratoire mais le glucose est très coûteux lorsqu'on se place dans des conditions de fermenteurs. Le type de ratio carbone/azote le plus profitable doit donc être recherché pour des productions à grande échelle de lipides. Les tests qui utilisent des hydrolysats lignocellulosiques sont donc à envisager. Cette stratégie est aussi à utiliser intelligemment du fait du coût des prétraitements des lignocelluloses avant leur exploitation, les levures éprouvent une difficulté significative à dégrader la cellulose.

Influence du ratio molaire C:N sur la production de lipides

Nos tests ont révélé l'influence du ratio molaire C:N sur la production de lipides. En effet, un ratio C:N de 9 donne 10% de lipides alors qu'un ratio C:N de 60 donne un pourcentage de lipides d'au moins 30. Il a été démontré que l'induction de l'accumulation des lipides se fait à un ratio molaire C:N supérieur à 20 (Papanikolaou et Aggelis, 2011). Dans le cas de *R. toruloides* Y4, un ratio molaire C:N de 14,2 induit une quantité de lipides inférieure à un ratio molaire C:N de 28,3 (Wu et al., 2011). Chez *Y. lipolytica*, le ratio C:N molaire optimal pour une meilleure production de lipides à partir du glucose est de 35. Néanmoins, la valeur de 30% identifiée dans nos tests dans du glucose à un ratio de C:N de 60 est légèrement supérieure à celle de la souche parentale JMY3501 de *Y. lipolytica*. En fait cette souche avait produit 25% de lipides dans sa biomasse sèche (Lazar et al., 2014) avec un ratio C:N 60.

D'autre part, nous avons observé que les pourcentages de lipides de la LS3 de *B. raffinosifermantens* enregistré sur glucose et substrat hydrophobe (acide oléique) sont plus élevés que ceux de la souche W29 de *Y. lipolytica*. Cela suggère un potentiel naturel élevé d'utilisation d'une diversité de substrat par la souche LS3 comparativement à la souche W29 de *Y. lipolytica*.

La souche G1212 et la LS3 présentent des caractéristiques physiologiques différentes

Nos différents tests faits avec la souche G1212 ont révélé que cette souche produit moins de lipides que la souche LS3 et présente une petite taille de cellule comparativement à cette dernière. Etant donné que cette souche est issue de LS3, on se demande si les types de mutations que G1212 aurait subi n'ont pas eu d'effet sur sa performance en production de lipides. Ce qui est certain, c'est que LS3 présente de grosses cellules et produit plus de lipides. Evidemment, la corrélation entre taille de cellules et production de lipides reste à démontrer. L'autre différence faite entre LS3 et les mutants issus de G1212 est que LS3 reconsume l'acide citrique produit alors que les mutants, de façon générale, ne reconsumment pas cet acide organique.

Dimorphisme dépendant du substrat

La transition de la forme levure à la forme hyphe n'a pas été clairement mise en évidence dans du YNB glucose 3% suggérant que ce milieu n'est pas favorable au changement de forme des levures du genre *Blastobotrys*. Le mécanisme moléculaire à la base de cette transition de forme n'est pas très bien compris, même chez *Y. lipolytica*, néanmoins, Liang et al. (2017) ont rapporté que la voie métabolique impliquant le complexe TORC1–Sch9 réprime l'apparition d'hyphe lorsque *Y. lipolytica* est en présence d'un excès de glycérol puis la forme levure réapparaît

lorsque le glycérol est épuisé du milieu de culture. De même, ce complexe ne régule pas la transition de forme lorsque *Y. lipolytica* est cultivée sur du glycérol. En fait, chez *Y. lipolytica*, l'inhibition de TORC1 et la perte de Sch9 induisent une hyperfilamentation (Liang et al., 2017). La forme hyphe est aussi présente lorsque les cellules de *Y. lipolytica* pré-cultivée dans du YNB-glycérol sont reprises dans du YNB-glucose. Herrera et Sentandreu (2002) ont aussi rapporté chez cette levure, un allongement cellulaire et une présence de la forme hyphe ou pseudo-hyphe cultivée sur du glucose.

Optimisation des conditions de culture

La production de lipides de la souche LS3 est maximale à 37°C sur du substrat glucose et cette souche a également un optimale de température de croissance à 37°C. La capacité de croissance de LS3 et CBS8244^T à 45°C présenterait un avantage lors de l'utilisation de ces souches en industrie dans des fermenteurs. Par ailleurs, l'optimisation des conditions de culture ou d'accumulation de lipides est importante car les paramètres tels que la température, le pH, la source de carbone, l'aération peuvent drastiquement la production totale de lipide et la croissance de la levure oléagineuse analysée. Elle permet aussi de définir le substrat adéquat pour la production à grande échelle. Nous avons aussi reporté des temps adéquats pour une accumulation maximale de lipides. Le temps de culture est aussi un paramètre important qui affecte le plus souvent le coût des ingrédients utilisés dans les bioréacteurs et interagit avec la croissance de la levure étudiée. En effet, on peut recourir à plus de solution acide ou base pour réguler des pH dans des fermentations plus longues ou plus de consommation d'énergies électriques pour l'aération selon que la souche oléagineuse accumule une grande quantité de lipides sur une courte période ou sur une période plus longue.

Composition des acides gras similaire à celui des huiles végétales

Le profile lipidique des espèces du genre *Blastobotrys* montre un acide gras prédominant, l'acide oléique (C18:1), suivi de l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique C18:2. La prédominance du C18:1 est aussi remarqué dans l'huile de soja (Liu et Zhao, 2007), l'huile de palme et de colza (Sitepu et al., 2014). Ceci indique que l'huile, des espèces du genre *Blastobotrys*, produites en condition de limitation d'azote peut-être une source, alternative, de matière première pour l'industrie des biocarburants.

Effet du promoteur TEF et contribution des diacylglycérols à la production de lipides

L'utilisation du promoteur TEF dans nos tests offre d'excellentes conditions pour interpréter le niveau d'expression des gènes DGA1 et DGA2. Il a permis d'observer la différence

d'expression lorsqu'on compare DGA2 à DGA1. En fait, l'addition de DGA1 induit un niveau d'expression plus élevé que celle de DGA2. Evidemment, ce niveau d'expression n'est pas positivement corrélé avec la proportion totale de lipides produite contrairement à l'effet de l'addition de DGA2. Il convient de mentionner que le substrat glucose utilisé est adéquat pour observer l'activité de TEF1 et que le niveau d'expression faible de DGA2 par rapport à DGA1 est dû au faible niveau d'expression de ce gène dans la souche contrôle G1212. De plus, Silverman et al. (2016), ont identifié dans le cas de *Y. lipolytica* cultivée, sur du substrats glucose, que la souche qui produit le plus de lipides en comparaison au contrôle utilisé, est celle dans laquelle DGA2 a été surexprimé. Le promoteur TEF a été aussi utilisé pour la surexpression de DGA1 dans *Y. lipolytica* (Tai et Stephanopoulos, 2013). Dans cette levure, trois acyltransférases convertissent les DAG en TAG. Ce sont DGA1, DGA2 et PDAT. L'effet assez faible de DGA1 sur la production des lipides peut résulter du fait que ce gène, rapporté dans le cas de *Y. lipolytica*, agisse, en principe, sur la production des TAG de concert avec la lipase TGL3 (Athenstaedt et al., 2006).

Dans *Y. lipolytica*, la contribution, des diacylglycérol acyltransférases (DGA), acyl-CoA carboxylase (ACC), désaturase $\Delta 9$ et ACL, à la production de lipides est listée par ordre d'importance comme suit : DGA, ACC, désaturase $\Delta 9$ et ACL (Tai, 2012).

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Notre étude vise à identifier les bases génétiques du métabolisme des lipides des levures du genre *Blastobotrys*, afin de les proposer comme modèle alternatif à *Y. lipolytica* pour la production de lipides. Les travaux exécutés ont permis de confirmer les traits oléagineux des espèces étudiées et dans une certaine mesure de comprendre la contribution de deux diacylglycérol acyltransférases à la biosynthèse des lipides neutres.

Les transformations génétiques de souches effectuées avec succès dans nos études nous ont permis d'orienter le métabolisme vers plus de production de lipides, grâce à une diacylglycerol acyltransférase. Cependant, en ayant en mémoire que la production globale des lipides résulte d'un équilibre entre les processus de synthèse, d'accumulation et de dégradation, un voile reste à lever sur la contribution des triglycérides lipases et de la β -oxydation comme voie compétitive. En effet, nous n'avons effectué aucun test dans cette direction.

Néanmoins, dans nos travaux, la surexpression de DGA1 et DGA2 donne une augmentation de production de lipides supérieure à 20% par rapport à la souche contrôle, mais avec une valeur qui reste en dessous de 30% de la biomasse sèche. Nous ne pouvons affirmer cependant, que l'activité de ces gènes est une étape limitante pour la production de lipides, car aucune disruption de ces gènes n'est réalisée. Nous pouvons envisager de surexprimer l'ACL responsable de la libération de l'acétyl-CoA et du NADPH indispensables à la synthèse des lipides. Nous pouvons aussi envisager de surexprimer d'autres gènes, ACS2 et ACC1 qui travaillent en amont de la voie de synthèse des lipides, SLC1, SCT1, LRO1 pour pouvoir apprécier leur contribution dans la production de lipides. Ces tests doivent aussi s'intéresser à la disruption des lipases et à l'activité de Mig1p, Mag2p. L'étude du niveau d'expression induit par le promoteur TEF1 doit être faite en prélude à ces différents tests. De même, nous pouvons envisager des tests permettant d'apprécier le taux de conversion des DAGs en TAGs au travers par exemple d'une analyse en chromatographie à couche mince (TLC).

Les tests sur l'effet de l'aération et du pH n'ont pas été entrepris dans nos travaux. Ces paramètres influencent l'accumulation de lipides par les levures oléagineuses. Il serait donc opportun de mettre en place dans futur proche ces genres de tests.

Le passage des tests en flasque aux tests dans un fermenteur ou bioréacteur est important lorsque la production de lipides à grande échelle est visée. Dans la production de biocarburant les souches de levures oléagineuses recherchées sont celles capables d'utiliser des substrats peu

couteux dont la biomasse lignocellulosique. Nous devons donc envisager des tests sur des substrats lignocellulosiques et penser à des stratégies pouvant réduire le coût d'extraction des lipides à l'échelle industrielle.

Le caractère thermotolérant, l'utilisation d'une gamme variée de substrats et la capacité à utiliser naturellement le xylose font des levures du genre *Blastobotrys* des organismes d'intérêt biotechnologique prometteur. Elles peuvent être utilisées comme des modèles alternatifs à *Y. lipolytica* dans la recherche et la production de composés à propriétés uniques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adrio, J.L. 2017. Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 114(9):1915-1920.
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G. 2011. Oily yeasts as oleaginous factories. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Vol. 90, No. 4, pp. 1219-1227, ISSN 0175-7598.
- Agmon, N., Mitchell, L. A., Cai, Y., Ikushima, S., Chuang, J., Zheng, A., et al. 2015. Yeast golden gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units. *ACS Synth. Biol.* 4, 853–859. doi: 10.1021/sb500372z
- Ahmad, A.L., Sithamparam, K., and Ismail, S. 2003. Extraction of Residual Oil from Palm Oil Mill Effluent (POME) Using Organic Solvent, *AJSTD*, 20, 385.
- Ahmad, F.B., Zhang, Z., Doherty, W.O.S., O’Hara, I.M., 2015. A multi-criteria analysis approach for ranking and selection of microorganisms for the production of oils for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 190, 264–273. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.083.
- Al-Feel, W., Chirala, S.S., Wakil, S.J. 1992. Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:4534–8.
- Alvaro-Benito, M., Fernández-Lobato, M., Baronian, K., Kunze, G. 2012. Assessment of *Schwanniomyces occidentalis* as a host for protein production using the wide-range Xplor2 expression platform. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4443–4456. doi:10.1007/s00253-012-4527-9.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., De Lucia, M., Leonardi, A., Rossi, M., 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb. Cell Fact.* 9, 73.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., De Lucia, M., Leonardi, A., Rossi, M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories.* Vol. 23, No. 9, pp. 73, ISSN 1475-2859.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol* 99(8):3051–3056. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.045.
- Ansari, F.A., Shriwastav, A., Gupta, S.K., Rawat, I., Guldhe, A., Bux, F. 2015. Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: a step closer to the biorefinery. *Bioresour Technol* 179:559–564.
- Anschau, A., Xavier, M. C. A., Hernalsteens, S., and Franco, T. T. 2014. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*, *Bioresour. Technol.*, 157, 214e222.
- Arous, F., Frikha, F., Triantaphyllidou, I., Aggelis, G., Nasri, M., Mechichi, T., 2016. Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *J. Clean. Prod.* 133, 899e909. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.040](http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.040).
- Athenstaedt, K., Daum, G. 1999. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *European Journal of Biochemistry* 266, 1-16.
- Athenstaedt, K., Daum, G. 2003. YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278 : 23317 – 23323.
- Athenstaedt, K., Daum, G. 2005. Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem* 280 : 37301 – 37309.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D., Daum, G. 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:6441–6448

- Babau, M., Cescut, J., Allouche, Y., Lombaert-Valot, I., Fillaudeau, L., Uribelarrea, J.-L., Molina-Jouve, C. 2013. Towards a Microbial Production of Fatty Acids as Precursors of Biokerosene from Glucose and Xylose. *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. d’IFP Energies Nouv.* 68, 899–911. doi:10.2516/ogst/2013148.
- Bailey, R., Madden, K.T., Trueheart, J. 2006. Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent Application WO 2006/102342 A2.
- Bailey, R.B., Madden KT, Trueheart J, et al. 2008. Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. International Patent Application WO 2008/042338 A2.
- Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S. 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 84, No. 5, pp. 847-865, ISSN 0175-7598.
- Barth, G., Gaillardin, C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 219–237.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I.-E., Mizerakis, P., Aggelis, G., 2016. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *J. Biotechnol.* 234, 116-126.
- 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*. Vol. 74, No. 24, pp. 7779-7789, ISSN 0099-2240.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M. 2012. Yeast: a new oil producer? *Dossier Lipochimie* 19, 22–28.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.-M. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* 48: 375-387.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M. 2009b. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91 (6):692-696.
- Beopoulos, A., Verbeke, J., Bordes, F., Guicherd, M., Bressy, M., Marty, A., Nicaud, J.-M. 2014. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiol Biotechnol.* 98:251–62. DOI 10.1007/s00253-013-5295-x
- Bhatti, H.N., Khera, R.A. 2012. Biological transformations of steroidal compounds: a review, *Steroids* 77, 267–1290, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.07.018>.
- Bialecka-Florjanczyk, E., Krzyczkowska, J., Stolarzewicz, I., Kapturowska, A. 2012. Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *J Mol Catal B Enzym* 74:241–5.
- Biernacki, M., Marzec, M., Roick, T., Patz, R., Baronian, K., Bode, R., Kunze, G. 2017. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) accumulation in *Arxula adenivorans* by stabilization of production. *Microb. Cell. Fact.* 16: 144. doi 10.1186/s12934-017-0751-4.
- Binns, D., T. Januszewski, Y. Chen, J. Hill, Markin V. S. et al. 2006. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J. Cell Biol.* 173: 719 – 731.
- Biochembayern, 2013. Structure of lipids retrieved from <https://biochembayern.wordpress.com/2013/04/14/structure-of-lipids/>.
- Bischoff, F., Chamas, A., Litwińska, K., Matthes, F., Böer, E., Kunze, G. 2017. Applications of *Blastobotrys (Arxula) adenivorans* in Biotechnology. In: Satyanarayana T., Kunze G. (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore.
- Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otoupal, P., Alper, H.S. 2014. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nat Commun* 5:3131. doi: 10.1038/ncomms413.

- Blum, T., Briesemeister, S., Kohlbacher, O. 2009. MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinformatics*, 10:274 doi:10.1186/1471-2105-10-274.
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M.J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I. 2003. The Swiss-Prot knowledge base and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* 31(1):365 – 70.
- Böer, E., Breuer, F.S., Weniger, M., Denter, S., Piontek, M., Kunze, G. 2011. Large-scale production of tannase using the yeast *Arxula adenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 105 – 114.
- Böer, E., Gellisen, G., Kunze, G. 2005. *Arxula adenivorans* In : (Ed. Gellisen, G.) Production of recombinant proteins. Novel and Eukaryotic Expression Systems. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Böer, E., Piontek, M., Kunze, G. 2009. Xplor(R) 2-an optimized transformation/expression system for recombinant protein production in the yeast *Arxula adenivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84:583–94.
- Böer, E., Steinborn, G., Florschütz, K., Körner, M., Gellisen, G., Kunze, G. 2009a. *Arxula adenivorans* (*Blastobotrys adenivorans*) — a dimorphic yeast of great biotechnological potential. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) Yeast biotechnology — diversity and application. Springer, The Netherlands, pp 453 – 468.
- Böer, E., Steinborn, G., Matros, A., Mock, H.P., Gellisen, G., Kunze, G. 2007b. Production of interleukin-6 in *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, and *Saccharomyces cerevisiae* applying the wide range vector (CoMed™) system to simultaneous comparative assessment. *FEMS Yeast Res* 7:1181 – 1187.
- Bordes, F., Tarquis, L., Nicaud, J.-M., Marty, A. 2011. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *J Biotechnol* 156:117–24.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiéz, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, E.P. 2012 Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 5956-61.
- Boulton, C.A., Ratledge, C. 1981. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *J General Microbiol.* 127:169–76.
- Buček, A., Matoušková, P., Sychrová, H., Pichová, I., Hrušková-Heidingsfeldová, O. 2014. $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids. *PLoS ONE* 9:e93322. doi:10.1371/journal.pone.0093322
- Bui, D.M., Kunze, I., Förster, S., Wartmann, T., Horstmann, C., Manteuffel, R., Kunze, G. 1996. Cloning and expression of an *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 610–619.
- Büttner, R., Bode, R., Birnbaum, D. 1991. Comparative study of external and internal β -glucosidases and glucoamylase of *Arxula adenivorans*. *J Basic Microbiol* 31:423—428
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M., Mulinacci, N. 2007. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Can J Microbiol.* 53 (8):1024–31.
- Caldo, K. M. P., Greer, M. S., Chen, G., Lemieux, M. J., and Weselake, R. J. 2015. Purification and properties of recombinant *Brassica napus* diacylglycerol acyltransferase 1. *FEBS Lett.* 589, 773–778.

- Cao, X., Lv, Y.-B., Chen, J., Imanaka, T., Wei, L.-J., and Hua, Q. 2016. Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction. *Biotechnol. Biofuels* 9:214. doi: 10.1186/s13068-016-0626-7.
- Carrasco, S., Merida, I. 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* 32: 27–36.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., et al. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13018–23.
- Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., Foresti, M.L. 2017. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Res* 17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>.
- Certik, M., Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng*, 87:1-14.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., et al. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36, 1097–1108. doi: 10.1016/j.energy.2010.11.040.
- Chesworth, J.M., Stuchbury, T., Scaife, J.R. 1998. Fatty Acids and Lipids. In: *An Introduction to Agricultural Biochemistry*. Springer, Dordrecht.
- Chi, Z., Zheng, Y., Ma, J., and Chen, S. 2011. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 9542–9550. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.04.124.
- Choi, J.Y., Stuke, J., Hwang, S.Y., Martin, C.E. 1996. Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.* 271, 3581–3589.
- Chou, K.C., Shen, H.B. 2010. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: EukmPloc 2.0. *PLoS One* 5(4), e9931.
- Choudhary, V., Jacquier, N., Schneider, R. (2011). The topology of the triacylglycerol synthesizing enzyme Lro1 indicates that neutral lipids can be produced within the luminal compartment of the endoplasmic reticulum: Implications for the biogenesis of lipid droplets. *Commun. Integr. Biol.* 4, 781–784.
- Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C. 2012. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Arch Biol Technol* 55:29-46.
- Coleman, R.A., Mashek, D.G. 2011. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev*, 111:6359–86.
- Connerth, M., T. Czabany, A. Wagner, G. Zellnig, E. Leitner et al. 2010. Oleate inhibits steryl ester synthesis and causes liposensitivity in yeast. *J. Biol. Chem.* 285: 26832 – 26841.
- Couderc, R., Baratti, J. 1980. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44: 2279-89.
- Csank, C., Costanzo, M.C., Hirschman, J., Hodges, P., Kranz, J.E., Mangan, M., O'Neill, K.E., Robertson, L.S., Skrzypek, M.S., Brooks, J., Garrels, J.I. 2002. Three yeast proteome databases: YPD, PombePD, and CalPD (MycoPathPD). *Method Enzymol.* 350.
- Curran, B.P.G., Khalawan, S.A., Chatterjee, M.T. 2000. Dioctyl phthalate increases the percentage of unsaturated fatty acids with a concomitant decrease in cellular heat shock sensitivity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 146, (10) 2679.

- Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G. 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1771: 299–309.
- Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E., Daum, G. 2008. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283:17065-17074.
- D’Antonio, M., Ciccarelli, F.D. 2011. Modification of gene duplicability during the evolution of protein interaction network. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002029.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., et al. 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:6487–92.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., Dickson, R. 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14, 1471-1510.
- De Angelis, L., Rinaldi, T., Cirigliano, A., Bello, C., Reverberi, M., Amaretti, A., Montanari, A., Santomartino, R., Raimondi, S., Gonzalez, A., Bianchi, M.M. 2016. Functional roles of the fatty acid desaturases encoded by KIOLE1, FAD2 and FAD3 in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 162:1435–1445. doi:10.1099/mic0.000315
- de Mendoza, D. 2014. Temperature sensing by membranes. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 101–116.
- De, K. S., Stanton, L. H., Slaby, T., Durot, M., Holmes, V. F., Patel, K. G., et al. 2014. Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction. *ACS Synth. Biol.* 3, 97–106. doi: 10.1021/sb4001992.
- Debelyy, M. O., H. W. Platta, D. Saf fi an, A. Hensel, S. Thoms et al., 2011 Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *J. Biol. Chem.* 286: 28223 – 28234.
- Den Haan, R., Van Zyl, W.H. 2001. Differential expression of the *Trichoderma reesei* beta-xylanase II (*xyn2*) gene in the xylose- fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(4): 521 – 527. <https://doi.org/10.1007/s002530100790>
- Dey, P., Maiti, M.K. 2013. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1357–1368. doi:10.1111/jam.12133.
- Dittrich, F., Zajonc, D., Hühne, K., Hoja, U., Ekici, A., Greiner, E., Klein, H., Hofmann, J., Bessoule, J.J., Sperling, P. and Schweizer, E. 1998. Fatty acid elongation in yeast. Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation defective mutants. *Eur. J. Biochem.* 252, 477–485.
- 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., and Nicaud, J.-M. 2011. Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 13, 482–491. doi: 10.1016/j.ymben.2011.05.002.
- Dulermo, T., Nicaud, J.-M. 2011. Involvement of the G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic engineering*. Vol. 40, No. 4, pp. 483-488, ISSN 1096-7176.
- Dulermo, T., Treton, B., Beopoulos, A., Kabran Gnankon, A.P., Haddouche, R., Nicaud, J.M. 2013. Characterization of the two intracellular lipases of *Yarrowia lipolytica* encoded by TGL3 and TGL4 genes: new insights into the role of intracellular lipases and lipid body organisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1486–1495.
- El-Fadaly, H., El-Ahmady El-Naggar, N., and Marwan, E.-S. M. 2009. Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Res. J. Microbiol.* 4, 301–313. doi: 10.3923/jm.2009.301.313

- Elliott, B., Fitcher, B. 1993. Stress resistance of yeast cells is largely independent of cell cycle phase. *Yeast* 9, 33-42.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*. 1811(11):637-47.
- Fahy, E., S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, et al. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46: 839–862.
- Fakas, S., Konstantinou, C., and Carman, G.M. 2011. DGK1-encoded diacylglycerol kinase activity is required for phospholipid synthesis during growth resumption from stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 286, 1464–1474.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., and Aggelis, G. (2009b). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioener.* 33, 573–580. doi: 10.1016/j.biombioe.2008.09.006
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J.D., Kim, N., Kang, J. 2011. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102 (3), 2695–2701.
- Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N., 2006. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels* 20, 1727–1737. doi:10.1021/ef060097w
- Fickers, P., Destain, J., Thonart, P. 2005. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 27: 1751- 1754.
- Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J.M. 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 29(6):632–644
- Fillet, S., Gibert, J., Suárez, B., Lara, A., Ronchel, C., and Adrio, J. L. 2015. Fatty alcohols production by oleaginous yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 1463–1472. doi: 10.1007/s10295-015-1674-x
- Findley, K., Rodriguez-Carres, M., Metin, B., Kroiss, J., Fonseca, A., Vilgalys, R., Heitman, J. 2009. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. *Eukaryotic Cell*. Vol. 8, No. 3, pp. 353-361, ISSN 1535-9786
- Franklin, S., Decker, S.M., Wee, J. 2011. Fuel and chemical production from oleaginous yeast. Google Patents.
- Freitas, C., Parreira, T.M., Roseiro, J., Reis, A., Da Silva, T.L., 2014. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Bioresour. Technol.* 158, 355–359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.071>.
- Friedlander, J., Tsakraklides, V., Kamineni, A., Greenhagen, E.H., Consiglio, A.L., MacEwen, K., Crabtree, D. V., Afshar, J., Nugent, R.L., Hamilton, M.A., Joe Shaw, A., South, C.R., Stephanopoulos, G., Brevnova, E.E. 2016. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol. Biofuels* 9, 77. doi:10.1186/s13068-016-0492-3.
- Fu, G.-Y., Lu, Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Zhao, S.-F., Jiang, H., et al. 2016. Cloning and characterization of a pyruvate carboxylase gene from *Penicillium rubens* and overexpression of the gene in the yeast *Yarrowia lipolytica* for enhanced citric acid production. *Mar. Biotechnol.* 18, 1–14. doi: 10.1007/s10126-015-9665-5
- Gajdoš, P., Nicaud, J.-M., Rossignol, T., Čertík, M. 2015. *Single cell oil production on molasses by Yarrowia lipolytica strains overexpressing DGA2 in multicopy.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 1–10.

- Gao, C., Yang, X., Wang, H., Rivero, C. P., Li, C., Cui, Z., et al. 2016. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 179. doi: 10.1186/s13068-016-0597-8
- Gao, D., Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., and Chen, S. 2013. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* 133, 315–321. doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.132
- Gao, S., Tong, Y., Wen, Z., Zhu, L., Ge, M., Chen, D., et al. 2016. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1085–1093. doi: 10.1007/s10295-016-1789-8.
- Gao, S., Tong, Y., Zhu, L., Ge, M., Zhang, Y., Chen, D., et al. 2017. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. *Metab. Eng.* 41, 192–201. doi: 10.1016/j.ymben.2017.04.004
- Garay, L.A., Boundy-Mills, K.L., German, J.B. 2014. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 62 (13), 2709–2727.
- Garcia, E.E., Aguedo, M., Gomes, N., et al. 2009. Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Catal B* 57:22–6.
- Garcia-Fernandez, M., Tabary, N., Chai, F et al. 2016. New multifunctional pharmaceutical excipient in tablet formulation based on citric acid-cyclodextrin polymer. *Int J Pharm*; 511:913-20.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T. Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Mol. Biol. Cell* 11,4241 – 4257.
- Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tzagou, V., Komaitis, M., and Aggelis, G. 2002. Production of gamma-linolenic acid by *Cunninghamella echinulate* cultivated on glucose and orange peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 303–307. doi: 10.1007/s00253-001-0910-7
- Geysens, S.C.J., Verweken, W. 2011. Yeast strains producing mammalian-like complex N-glycans. International Patent Application WO 2011/061629 A2.
- Gienow, U., Kunze, G., Schauer, F., Bode, R., Hofemeister, J. 1990. The yeast genus *Trichosporon* spec. LS3; molecular characterization of genomic complexity. *Zentralbl Mikrobiol*, 145:3 – 12.
- Giersberg, M., Degelmann, A., Bode, R., Piontek, M., Kunze, G. 2012. Production of a thermostable alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* in three different yeast species using the Xplor®2 transformation/expression platform. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1385-1396.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R., Hitchcock, H.L., 1994. Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 21,293-303.
- Gonçalves, F.A.G., Colen, G., Takahashi, J.A. 2014. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The scientific World Journal.* 13, 476207.
- Gong, Y., Zhang, J., Guo, X., Wan, X., Liang, Z. et al. 2013. Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Lett* 587:481–487.
- Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., Zhao, Z.K. 2012. Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production, *Bioresour. Technol.* 117:20–24.
- Goñi, F.M., Alonso, A. 1999. Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog. Lipid Res.* 38, 1–48.

- Granger, L.-M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 1151–1156. doi:10.1002/bit.260421004.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P.W.M., Wyss, M. 2014. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40 (3):187-206.
- Grum-Grzhimaylo, O.A., Debets, A.J., Bilanenko, E.N. 2016. The diversity of microfungi in peatlands originated from the White Sea. *Mycologia*;108:233–254.
- Gujjari, P., Suh, S.-O., Coumes, K., Zhou, J. 2011. Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginousus* sp. nov. *Mycologia*,103:1110–8.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., Buzzini, P. 2014. Changes in lipids composition and fluidity of yeast plasma membrane as response to cold. In: Buzzini P, Margesin R (eds) Cold-adapted yeasts biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance. Springer, New York, pp 225–242.
- Guo, H., Madzak, C., Du, G., and Zhou, J. 2016. Mutagenesis of conserved active site residues of dihydrolipoamide succinyltransferase enhances the accumulation of α -ketoglutarate in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 649–659. doi: 10.1007/s00253-015-6995-1
- Hahn, T., Tag, K., Riedel, Uhlig, S., Baronian, K., Gellisen, G., Kunze, G. 2006. A novel estrogen sensor based on recombinant *Arxula adeninivrans* cells. *Biosens Bioelectron* 21 (11): 2078-85.
- Hall, J., Hetrick, M., French, T., Hernandez, R., Donaldson, J., Mondala, A., Holmes, W., 2011. Oil production by a consortium of oleaginous microorganisms grown on primary effluent wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 54e60.
- Ham H.J., Rho H.J., Shin S.K., Yoon H.J. 2010. The TGL2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an active acylglycerol lipase located in the mitochondria, *J. Biol. Chem.* 285, 3005–3013.
- Ham, K.S., Rhee, J.S. 1998. Property characterization and lipid compositional analysis of lipid granules isolated from an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *J Food Sci Nutr* 3:211 – 215.
- Han, G., Gable, K., Kohlwein, S., Beaudoin, F., Napier, J. and Dunn, T.M. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J. Biol. Chem.* 277, 35440–35449.
- Han, G.S., W.I. Wu, Carman, G.M. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 281:9210–9218. doi:10.1074/jbc.M600425200.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-80.
- Hardman, D., McFalls, D., Fakas, S. 2017. Characterization of phosphatidic acid phosphatase activity in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and its role in lipid biosynthesis. *Yeast* 2017; 34:83-91.
- Harwood, J.L., 2010. The AOCS lipid Library [WWW Document]. *Plant Fat. acid Synth.* URL http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/fa_biosynth/index.htm
- Hassan, M., Blanc, P.J., Pareilleux, A. Goma, G. 1994. Production of single-cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World J Microbiol Biotechnol.* 10: 534. <https://doi.org/10.1007/BF00367661>.
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Shah, A.A., Hasan, F. 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 15(2), 147 – 172.
- He, J., Yang, Z., Hu, B., Ji, X., Wei, Y., Lin, L., Zhang, Q. 2015. Correlation of unsaturated fatty acids with the cold adaptation of *Rhodotorula glutinis*. *Yeast* 32:683–690. doi:10.1002/yea.3095

- Henry, S.A., Kohlwein, S.D., and Carman, G.M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190,317–349.
- Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. 2014. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci.* 5, 64–72.
- Hofmann, K. 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implication of Wnt signalling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 111-112.
- Hoffman, C.S., Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57(2-3):267-72.
- Holkenbrink, C., Dam, M.I., Kildegaard, K.R., Beder, J., Dahlin, J., Doménech, D., Borodina, I. 2018. EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol J.* <https://doi.org/10.1002/biot.201700543>.
- Holthuis, J.C., Menon, A.K. 2014. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510, 48–57.
- Hou, Y., Learmonth, R.P. and Watson, K. 1991. Intrinsic and induced resistance to oxidative and heat stress is dependent on mitochondrial function. *Proc Aust Soc Biochem and Mol Biol* 23, SP52.
- Hu, C., Wu, S., Wang, Q., Jin, G., Shen, H., Zhao, Z.K. 2011. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnol. Biofuels* 4, 25-32.
- Huang, L., Zhang, B., Gao, B., Sun, G., 2011. Application of fishmeal wastewater as a potential low-cost medium for lipid production by *Lipomyces starkeyi* HL. *Environ. Technol.* 32, 1975e1981.
- Huang, X., Liu, J., Dickson, R. C. 2012. Down-Regulating Sphingolipid Synthesis Increases Yeast Lifespan. *PLoS Genet.* 8(2), e1002493.
- Hussain, M.S., Gambill, L., Smith, S., Blenner, M.A. 2016. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol.* 5:213–23.
- Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., Takagi, M. 2000. The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* 16, 1077–1087. doi:10.1002/1097-0061(20000915)16:12<1077::AID-YEA601>E3.0.CO;2-K.
- Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Petrović, M., Beluhan, S., Šantek, B. 2017. Effect of carbon and nitrogen source concentrations on the growth and lipid accumulation of yeast *Trichosporon oleaginosum* in continuous and batch culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 1620-1629. doi:10.1002/jctb.5156.
- Iwama, R., Kobayashi, S., Ohta, A., Horiuchi, H., Fukuda, R. 2014. Fatty aldehyde dehydrogenase multigene family involved in the assimilation of n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* 289, 33275– 33286.
- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., Schneider, R. 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 124, 2424–2437.
- Jakočiūnas, T., Rajkumar, A. S., Zhang, J., Arsovska, D., Rodriguez, A., Jendresen, C. B., et al. 2015. CasEMBLR: Cas9-facilitated multiloci genomic integration of in vivo assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* 4, 1226–1234. doi: 10.1021/acssynbio.5b00007.
- Jankowska, D.A., Faulwasser, K., Trautwein-Schult, A., et al. 2013a. *Arxula adenivorans* recombinant adenine deaminase and its application in the production of food with low purine content. *J Mol Microbiol Biotechnol* 115: 1134 – 1146.

- Jankowska, D.A., Trautwein-Schult, A., Cordes, A., Hoferichter, P., Klein, C, Bode, R., Baronian, K., Kunze, G. 2013b. *Arxula adenivorans* xanthine oxidoreductase and its application in the production of food with low purine content. *J Appl Microbiol* , 115:796–807.
- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., Goldberg, M.A. 2001. MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 21,6161–6169.
- Jiru, T.M., Groenewald, M., Pohl, C., Steyn, N., Kiggundu, N., Abbate, D. 2018. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *Chemistry Central Journal* (2018) 12: 91. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0457-7>
- Johnson, E.A., Echavarri-Erasun, C. 2011. Yeast Biotechnology, in *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Elsevier B.V., Eds: Kurtzman, P.C., Fell, J.W., Boekhout, T.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J Microbiol Biotechnol* 8(4):382–384. doi:10.1007/bf01198749.
- Jost, B., Holz, M., Aurich, A., Barth, G., Bley, T., & Müller, R. A. 2015. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1675–1686.
- Juanssilfero, A.B., Kahar, P., Amza, R.L., Miyamoto, N., Otsuka, H., Matsumoto, H., Kihira, C., Thontowi, A., Yopi, Ogino, C., Prasetya, B., Kondo, A. 2017. Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, *J. Biosci. Bioeng.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.020>.
- Juanssilfero, A.B., Kahar, P., Amza, R.L., Miyamoto, N., Otsuka, H., Matsumoto, H., Kihira, C., Thontowi, A., Yopi, Ogino, C., Prasetya, B., Kondo, A. 2018. Selection of oleaginous yeasts capable of high accumulation during challenges from inhibitory chemical compounds. *Biochemical Engineering Journal*. 137:182-191.
- Kaiser, C., Uhlig, S., Gerlach, T., Korner, M., Simon, K., Kunath, K., Florschütz, K., Baronian, K., Kunze, G. 2010. Evaluation and validation of a novel *Arxula adenivorans* estrogen screen (nAES) assay and its application in analysis of wastewater, seawater, brackish water and urine. *Sci Total Environ*, 408:6017–6026.
- Kajiwara, S. 2002. Molecular cloning and characterization of the delta9 fatty acid desaturase gene and its promoter region from *Saccharomyces kluyveri*. *FEMS Yeast Res* 2:333–339. doi:10.1016/S1567-1356(02)00088-0
- Kaur, P., Lingner, A., Singh, B., Böer, E., Polajeva, J., Steinborn, G., Bode, R., Gellissen, G., Kunze, G. 2007. APH01 from the yeast *Arxula adenivorans* encodes an acid phosphatase of broad substrate specificity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:45 – 55
- 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 Systems Biology and Applications*, 2, [16005]. DOI: 10.1038/npjbsa.2016.5.
- Kitcha, S., Cheirsilp, B. 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*, 9:274–82.
- Klug, L., Daum, G. 2014. Yeast lipid metabolism at a glance, *FEMS Yeast Research*, Volume 14, Issue 3, Pages 369–388, <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>.
- Knoll, A., Bartsch, S., Husemann, B., Engel, P., Schroer, K., Ribeiro, B., Stöckmann, C., Seletzky, J., Büchs, J. 2007. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J Biotechnol* 132:167 – 179

- Kohlwein, S.D. 2010. Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. *J Biol Chem* 285(21):15663–15667. doi:10.1074/jbc. R110.118356.
- Kunze, G., Gaillardin, C., Czernicka, M., Durrens, P., Martin, T., Böer, E., Gabaldón, T., Cruz, J.A., Talla, E., Mark, C., Goffeau, A., Barbe, V., Baret, P., Boranian, K. et al. 2014. The complete genome of *Blastobotrys (Arxula) adenivorans* LS3-a yeast of biotechnological interest. *Biotechnol Biofuels* 7:66. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-66>.
- Kurat, C.F., K. Natter, J. Petschnigg, H. Wolinski, K. Scheuringer, H. Scholz, R. Zimmermann, R. Leber, R. Zechner, S.D. Kohlwein, Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 491–500.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 2007. Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Res*, 7:141 – 151.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 2011. *The yeasts, a taxonomic study*, vol 3, 5th edn. Amsterdam, Elsevier.
- Lazar, Z., Dulermo, T., Neuveglise, C., Crutz-Le Coq, A.M., Nicaud, J.M. 2014. Hexokinase-A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng.* 26C:89–99. doi:10.1016/j.ymben.2014.09.008.
- Leblond, Y., Mouz, N., Marty, A., Uribelarrea, J.-L. 2012. Method for producing lipase, transformed *Yarrowia lipolytica* cell capable of producing said lipase and their uses. United States Patent Application US 2012/0003716 A1.
- Ledesma-Amaro, R., Dulermo, R., Niehus, X., Nicaud, J.M. 2016. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. *Metab Eng* 38:38–46.
- Lee, J. J., Chen, L., Cao, B., Chen, W. N. 2016. Engineering *Rhodospiridium toruloides* with a membrane transporter facilitates production and separation of carotenoids and lipids in a bi-phasic culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 869–877. doi: 10.1007/s00253-015-7102-3
- Lee, Y.Y., Prashant, L., Torget, R.W. 1999. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol* 65, 93-115.
- Leiva-Candia, D.E., Pinzi, S., Redel-Macías, M.D., Koutinas, A., Webb, C., Dorado, M.P. 2014. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel.* 123:33–42
- Li, Y., Dietrich, M., Schmid, R.D., et al. 2008. Identification and functional expression of a $\Delta 9$ -fatty acid desaturase from *Psychrobacter urativorans* in *Escherichia coli*. *Lipids* 43:207-213.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 312-317.
- Li, Z.J., Qiao, K., Liu, N., Stephanopoulos, G. 2017. Engineering *Yarrowia lipolytica* for poly-3-hydroxybutyrate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 44 (4-5), 605-612.
- Liang, S.H., Wu, H., Wang, R.R., Wang, Q., Shu, T., Gao, X.D. 2017. The TORC1-Sch9-Rim15 signaling pathway represses yeast-to-hypha transition in response to glycerol availability in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Mol. Microbiol.* 104:553–567.
- Liu, L., Markham, K., Blazeck, J., Zhou, N., Leon, D., Otopal, P., Alper, H.S. 2015. Surveying the lipogenesis landscape in *Yarrowia lipolytica* through understanding the function of a Mga2p regulatory protein mutant. *Metabol Eng* 31:102–111. doi:10.1016/j.ymben.2015.07.004.
- Liu, B., Zhao, Z.K. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775–780.

- Liu, H.-H., Madzak, C., Sun, M.-L., Ren, L.-J., Song, P., Huang, H., et al. 2017. Engineering *Yarrowia lipolytica* for arachidonic acid production through rapid assembly of metabolic pathway. *Biochem. Eng. J.* 119, 52–58. doi: 10.1016/j.bej. 2016.12.004.
- Liu, Q., Siloto, R.M., Lehner, R., Stone, S.J., Weselake, R.J. 2012. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog Lipid Res* 51: 3502377.
- Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., Zhang, J., 2015. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour. Technol.* 180, 32–39.
- Liu, Y., Yap, S. A., Koh, C. M. J., and Ji, L. 2016. Developing a set of strong intronic promoters for robust metabolic engineering in oleaginous *Rhodotorula (Rhodosporidium)* yeast species. *Microb. Cell Fact.* 15, 200. doi: 10.1186/s12934- 016-0600-x.
- Liu, Y.B., Koh, C.M.J., Sun, L.H., Hlaing, M.M., Du, M.G., Peng, N., Ji, L.H. 2013. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene RtGPD1 and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:719–29.
- Lopes, M., Gomes, N., Goncalves, C., Coelho, M.A.Z., Mota, M., Belo, I. 2008. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. *Lett Appl Microbiol* 46(2):255–260.
- Lorenz, E., Runge, D., Marbà-Ardébol, A.-M., Schmach, M., Stahl, U., Senz, M. 2017. Systematic development of a txo stage fed-batch process for lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Biotechnology J Biotechnol.* 2017 Mar 20;246:4-15. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.02.010
- Lu, S.F., Tolstorukov, I.I., Anamart, S., Kaneko, Y., Harashima, S. 2000. Cloning, sequencing and functional analysis of H-OLE1 gene encoding delta9-fatty acid desaturase in *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:499–509
- Luo, Y.S., Nicaud, J.-M., Van Veldhoven, P.P., Chardot, T. 2002. The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica* : characterization of Aox2 p, *Arch. Biochem. Biophys.* 407, 32–38.
- Luo, Y.S., Wang, H.J., Gopalan, K.V., Srivastava, D.K., Nicaud, J.M., Chardot, T. 2000. Purification and characterization of the recombinant form of Acyl CoA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 1–8.
- Ma, D.K., Li, Z., Lu, A.Y., Sun, F., Chen, S., Rothe, M., Menzel, R., Horvitz, H.R. 2015. Acyl-CoA Dehydrogenase Drives Heat Adaptation by Sequestering Fatty Acids. *Cell*; 161:1152-63; PMID:25981666; <http://dx.doi.org/10.1016>.
- Madzak, C. 2018. Engineering *Yarrowia lipolytica* for use in biotechnological applications : a review of major achievements and recent innovations. *Molecular Biotechnology*, 60 (8), 621-635. DOI : 10.1007/s12033-018-0093-4
- Magdouli, S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. 2014. Heterotrophic microorganisms: a promising source for biodiesel production. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 44 (4), 416–453.
- Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G. 2010. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresour. Technol.* 101, 2351–2358. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.024.
- Mannazzu, I., Landolfo, S., Lopes da Silva, T., Buzzini, P. 2015. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for nonconventional yeasts of biotechnological interest. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 1665–1673.
- Markgraf, D.F., Klemm, R.W., Junker, M., Hannibal-Bach, H.K., Ejsing, C.S., Rapoport, T.A. 2014. An ER protein functionally couples neutral lipid metabolism on lipid droplets to membrane lipid synthesis in the ER. *Cell Rep.* 6, 44–55.

- Martin, C.E., Oh, C.S., Jiang, Y. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 271-285.
- Martinez, P., Morros, A. 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front. Biosci.* 1, d103—117.
- Martins, F.F., Ferreira, T.F., Azevedo, D.A., Alice, M., Coelho, Z. 2012. Evaluation of crude oil degradation by *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Eng. Trans.* 27, 223–228. doi:10.3303/CET1227038.
- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C. N. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb. Cell Fact.* 13:12.
- Matsui, T., Otsuka, K., and Sato, S. 2011. Microbial oil production from carbohydrates using *Sporobolomyces carnicolor* strain O33. *Ann. Microbiol.* 62, 861–864. doi: 10.1007/s13213-011-0316-4.
- Matthäus, F., Ketelhot, M., Gatter, M., Barth, G. 2014. Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microb* 80(5):1660–1669.
- McElroy, F., Stewart, H. 1967. The lipids of *Lipomyces lipofer*. *Can J Biochem*, 45:171–8.
- McWilliams, A. 2017. Global Markets for Oleochemical Fatty Acids. Market Research Reports. Wellesley, MA: BCC Research LLC.
- Meesapyodsuk, D., Chen, Y., Ng, S.H., Chen, J., Qiu, X. 2015. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* to produce ricinoleic acid, a hydroxyl fatty acid of industrial importance. *J Lipid Res* 56:2102–2109. doi:10.1194/jlr.M060954
- Meesters, P.A., Eggink, G. 1996. Isolation and characterization of a delta-9 fatty acid desaturase gene from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CBS 570. *Yeast* 12:723–730.
- Meesters, P., Huijberts, G., Eggink, G. 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:575-579.
- Meng, X., Xian, M., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Yang, J., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energy* 34, 1–5. doi:10.1016/j.renene.2008.04.014.
- Michelsen, K., Yuan, H., Schwappach, B. 2005. Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep*, 6:717–22.
- Michely, S., Gaillardin, C., Nicaud, J.-M., Neuvéglise, C. 2013. Comparative Physiology of Oleaginous Species from the *Yarrowia* Clade. *PLoS ONE* 8(5): e63356. doi:10.1371/journal.pone.0063356.
- Michely, S. 2014. Dynamique des génomes et évolution du métabolisme lipidique chez les levures du clade *Yarrowia*. Thèse de doctorat Science de la vie et santé Paris, AgroParisTech. <http://www.theses.fr/2014AGPT0021>.
- Micolonghi, C., Ottaviano, D., Di Silvio, E., Damato, G., Heipieper, H.J., Bianchi, M.M. 2012. A dual signaling pathway for the hypoxic expression of lipid genes, dependent on the glucose sensor Rag4, is revealed by the analysis of the KIMGA2 gene in *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 158:1734–1744. doi:10.1099/mic.0.059402-0
- Middelhoven, W.J., Coenen, A., Kraakman, B., Sollewijn Gelpke, M.D. 1992. Degradation of some phenols and hydroxybenzoates by the imperfect ascomycetous yeasts *Candida parapsilosis* and *Arxula adeninivorans*: evidence for an operative gentisate pathway. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62:181 – 187.
- Middelhoven, W.J., de Jonge, I.M., Winter, M. 1991. *Arxula adeninivorans*, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 129–137.
- Middelhoven, W.J., Hoogkamer-Te Niet, M.V., Kreger-Van Rij, N.J.W. 1984. *Trichosporon adeninovorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-

- alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 50:369 – 378.
- Middelhoven, W.J., van Doesburg, W. 2007. Utilization of hexamethylenetetramine (urotropine) by bacteria and yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* 91(2):191–196
- Misra, A., Khan, K., Niranjana, A., Nath, P., and Sane, V. A. 2013. Overexpression of JcDGAT1 from *Jatropha curcas* increases seed oil levels and alters oil quality in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 96, 37–45.
- Mlickova K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T, et al. 2004. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 70:3918–24.
- Moreira, M.T., Feijoo, G, Lema, J.M. 2003. Fungal bioreactors: applications to white-rot fungi. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2:247-259.
- Mori, K., Iwama, R., Kobayashi, S., Horiuchi, H., Fukuda, R., Ohta, A. 2013. Transcriptional repression by glycerol of genes involved in the assimilation of n-alkanes and fatty acids in yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 13: 233–240.
- Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D.B., Cicek, N. 2015. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresour. Technol.* 185, 49–55.
- Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y., Harashima, S. 2002. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm* 271:707–713
- Nakagawa, Y., Sugioka, S., Kaneko, Y., and Harashima, S. 2001. O2R, a novel regulatory element mediating Rox1p-independent O₂ and unsaturated fatty acid repression of OLE1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 183, 745–751.
- Nielsen, J. 2009. Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. *FEBS Lett* 583: 3905–3913.
- Ochoa-Estopier, A. 2012. Analyses systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel: application aux bascules du métabolisme lipidique chez *Yarrowia lipolytica*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., Syldatk, C. 2016. Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology* 7: 1539.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J.T., Sturley, S.L. 2002. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* 277(11):8877–8881. doi:10.1074/jbc.M111646200.
- Oelkers, P., Tinkelenberg, A., Erdeniz, N., Cromley, D., Billheimer, J.T., Sturley, S.L. 2000. A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J Biol Chem*, 275:15609–12.
- Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T., Iefuji, H. 2012. Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101: 359–68.
- Oh, C.S., Martin, C.E. 2006. *Candida albicans* Spt23p controls the expression of the Ole1p 9 fatty acid desaturase and regulates unsaturated fatty acid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 281, 7030-7039.
- Oh, C.S., Toke, D.A., Mandala, S., Martin, C.E. 1997. ELO2 and ELO3, homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* 272, 17376–17384.

- Olstorpe, M., Schnürer, J., Passoth V. 2009. Screening of yeast strains for phytase activity, *FEMS Yeast Research*, Volume 9, Pages 478–488, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00493.x>
- Opekarová, M., Tanner, W. 2003. Specific lipid requirements of membrane protein-a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* 1610:11-12.
- Palma, M., Goffeau, A., Spencer-Martins, I., Baret, P.V. 2007. A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 241–248.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I. 2001 Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*.80:215–24.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:308–312.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. 2006. “Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*,” *Current Microbiology*, vol. 52, no. 2, pp. 134–142.
- Parks, L.W., Casey, W.M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 95-116.
- Pascual, F., Carman, G.M. 2013. Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831: 514–522.
- Paselk, R.A. 2006. Fat Metabolism. *Introductory Biochemistry*. Retrieved from <http://users.humboldt.edu/rpaselk/C438.S07/C438Notes/C438nLec35.htm>.
- Passoth, V. 2017. Lipids of Yeasts and Filamentous Fungi and Their Importance for Biotechnology. In: Sibirny A. (eds) *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Springer, Cham
- Pastinen, O., Nyyssölä, A., Pihlajaniemi, V., Sipponen, M.H. 2017. Fractionation process for the protective isolation of ergosterol and trehalose from microbial biomass. *Process Biochem* 58:217 – 223.
- Patterson, K., Yu, J., Landberg, J., Chang, I., Shavarebi, F., Bilanchone, V., Sandmeyer, S. 2018. Functional genomics for oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 48, 184-196.
- Pereira, L, Silva, S., Ribeiro, B., Henriques, M., Azeredo, J. 2015. Influence of glucose concentration on the structure and quality of biofilms formed by *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res* 15:fov043. doi:10.1093/femsyr/fov043.
- Ploier, B., Petrovic, U., Daum, G. 2014. Lipid metabolism and Lipidomics. in *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. 1 Aufl., Springer, S. 169-215.
- Poirier, Y., Antonenkov, V., Glumoff, T., Hiltunen, J. 2006. Peroxisomal β -oxidation – a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1413 e 1426.
- Prelich, G. 2012. Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841–854. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.136911>.
- Pscheidt, B., Glieder, A., 2008. Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microbial Cell Factories*, 7:25.
- Pu, J., C. W. Ha, S. Zhang, J. P. Jung, W. K. Huh et al. 2011. Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell* 2: 487 – 496.
- Puig-Castellví, F., Bedia, C., Alfonso, I., Piña, B., Tauler, R. 2018. Lipidomic Patterns Linked to Thermal Acclimation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 2018, 17, 2034–2044

- Qiao, K., Imama Abidi, S.H., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N., Ajikumar, P.K., Stephanopoulos, G. 2015. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng* 29: 56 – 65. doi:10.1016/j.ymben.2015.02.00.
- Qiao, K., Wasylenko, T.M., Zhou, K., Xu, P., Stephanopoulos, G. 2017. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism. *Nat. Biotechnol.* 35, 173-177. doi:10.1038/nbt.3763
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.-P., Wei, D. 2017. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technol.* 245:1507–1519.
- Rahman, S., Arbter, P., Popovic, M., Bajpai, R., Subramaniam, R. 2017. Microbial lipid production from lignocellulosic hydrolyzates: effect of carbohydrate mixtures and acid-hydrolysis byproducts on cell growth and lipid production by *Lipomyces starkeyi*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 1980–1989.
- Rajakumar, K., Greenspan, S.L., Thomas, S.B., Holick, M.F. 2007. Solar ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am. J. Public Health* 97, 1746-1754.
- Rajakumari, S., Daum, G. 2010. Multiple functions as lipase, steryl ester hydrolase, phospholipase, and acyltransferase of Tgl4p from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285: 15769 – 15776.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans,* 30:1047–50.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807–15. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.017.
- Ratledge, C., Wynn, J.P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.* 51, 1–51.
- Rauter, M., Schwarz, M., Becker, K., Baronian, K., Bode, R., Kunze, G., Vorbrodt, H.M. 2013. Synthesis of benzyl β -D-galactopyranoside by transgalactosylation using a β -galactosidase produced by the over expression of the *Kluyveromyces lactis* LAC4 gene in *Arxula adeninivorans*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 108:72-76.
- Razavi, B.S., Liu, S., Kuzyakov, Y. 2017. Hot experience for cold-adapted microorganisms: Temperature sensitivity of soil enzymes. *Soil Biol. Biochem,* 105, 236 – 243.
- Riekhof, W.R., Wu, J., Jones, J.L., Voelker, D.R. 2007. Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282:28344–28352
- Romero, A.M., Jordá T., Rozès N., Martínez-Pastor, M.T., Puig S. 2018. Regulation of yeast fatty acid desaturase in response to iron deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids,* p 657-668.
- Ronda, C., Maury, J., Jakočiūnas, T., Jacobsen, S. A. B., Germann, S. M., Harrison, S. J., et al. 2015. CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact* 14, 97. doi: 10.1186/s12934-015-0288-3
- Rösel, H., Kunze, G. 1995. Cloning and characterisation of a TEF gene for elongation factor 1a from the yeast *Arxula adeninivorans*. *Curr Genet* 28: 360 – 366.
- Rösel, H., Kunze, G. 1996. Identification of a group-I intron within the 25S rDNA from the yeast *Arxula adeninivorans*. *Yeast* 12: 1201 – 1208.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A. 2011. Getting lipids for Biodiesel Production from Oleaginous fungi, *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN:978-953-307-712-0, In Tech.

- Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., et al. 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *Microb Ecol*, 69:363–72.
- Rossler, H., Rieck, C., DeLong, T., Hoja, U. and Schweizer, E. 2003. Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-longchain fatty acid synthesis. *J. Mol. Gen. Genomics*. 269, 290– 298.
- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R. 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* 178:477 – 483. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0478-3>
- Russell, N.J. 2008. Membrane components and cold sensing. In: Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C. (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Berlin, pp 177–190.
- Rustan, A.C., Drevon, C.A. 2005. *Fatty acids: structures and properties*, John Wiley & Sons, Ltd. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0003894>.
- Ryan, O.W., Skerker, J.M., Maurer, M.J., Li, X., Tsai, J.C., Poddar, S., Lee, M.E., DeLoache, W., Dueber, J.E., Arkin, A.P., Cate, J.H.D. 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *Elife*, e03703.
- Ryckaert, S., Lerondel, G. 2011. Methods and compositions for displaying a polypeptide on a yeast cell surface. International Patent Application WO 2011/089527 A1.
- Rywinska, A., Juszczak, P., Wojtatowicz, M., et al. 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy* 48:148–66.4
- Sagnak, R., Cochot, S., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.-M., Guillouet, S.E. 2018. Modulation of the glycerol phosphate availability led to concomitant reduction in the citric acid excretion and increase in lipid content and yield in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 265:40 – 45
- Saha, S., Enugutti, B., Rajakumari, S., Rajasekharan, R. 2006. Cytosolic Triacylglycerol Biosynthetic Pathway in Oilseeds. *Molecular Cloning and Expression of Peanut Cytosolic Diacylglycerol Acyltransferase*. *Plant Physiology* 141: 153321543.
- Salunke, D., Manglekar, R., Gadre, R., Nene, S., and Harsulkar, A. M. 2015. Production of polyunsaturated fatty acids in recombinant *Lipomyces starkeyi* through submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1407–1414. doi: 10.1007/s00449-015-1382-y
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A. and Lindquist, S. 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 11, 2357-2364.
- Sandager, L., Gustavsson, M.H., Staahl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H., and Stymne, S. 2002. Storage lipid synthesis is non- essential in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 6478–6482.
- Sangwallek, J., Kaneko, Y., Tsukamoto, T., Marui, M., Sugiyama, M., Ono, H., Bamba, T., Fukusaki, E., Harashima, S. 2014. Cloning and functional analysis of HpFAD2 and HpFAD3 genes encoding Δ 12- and Δ 15-fatty acid desaturases in *Hansenula polymorpha*. *Gene* 533:110–118. doi:10.1016/j.gene.2013.09.115.
- Sano, K., Fukuhara, H., Nakamura, Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol Lett* 21: 33–38.
- Santomartino, R., Riego-Ruiz, L., Bianchi, M.M. 2017. Three, two, one yeast fatty acid desaturases: regulation and function. *World J Microbiol Biotechnol*, 33:89. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2257-y>.
- Satyanarayana, T., Kunze, G. 2010. *Gatersleben, Germany (Eds.) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* 746 pages ISBN: 1402082916

- Saxena, V., Sharma, C. D., Bhagat, S. D., Saini, V. S., Adhikari, D. K. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*, J. Am Oil Chem. Soc 75, 501-505.
- Schneiter, R., Hitomi, M., Ivessa, A. S., Fasch, E.-V., Kohlwein, S. D., Tartakoff, A. M. 1996. A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 7161–7172.
- Schneiter, R., Tatzer, V., Gogg, G., Leitner, E. and Kohlwein, S.D. (2000) Elo1p-dependent carboxy-terminal elongation of C14:1 delta (9) to C16:1 delta (11) fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 182, 3655–3660.
- Schuster, H., Rautenstrauss, B., Mittag, M., Stratmann, D., Schweizer, E. 1995. Substrate and product binding sites of yeast fatty acid synthase: stoichiometry and binding kinetics of wild-type and in vitro mutated enzymes. *Eur. J. Biochem.* 228, 417-424.
- Schwartz, C., Shabbir-Hussain, M., Frogue, K., Blenner, M., and Wheeldon, I. 2017. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* 6, 402–409. doi: 10.1021/acssynbio.6b00285.
- Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q., Hong, S.-P. 2013. Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 79:7360–7370
- Seo, Y., Hwan, Han, S., Han, J.I., 2014. Economic biodiesel production using algal residue as substrate of lipid producing yeast *Cryptococcus curvatus*. *Renew. Energy* 69, 473e478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.062>.
- Sha, Q. 2013. A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Master's thesis, pp 1–29.
- Shao, Z., Zhao, H., and Zhao, H. 2009. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res.* 37, e16. doi: 10.1093/nar/gkn991
- Sharpe, P.L., Ye, R.W., Zhu, Q.Q. 2008. Carotenoid production in a recombinant oleaginous yeast. International Patent Application WO 2008/073367 A1.
- Shen, H., Heacock, P.N., Clancey, C.J., Dowhan, W. 1996. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *J Biol Chem* 271:789–795.
- Shi, S., Liang, Y., Zhang, M. M., Ang, E. L., and Zhao, H. 2016. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 33, 19–27. doi: 10.1016/j.ymben.2015.10.011.
- Shmeeda, H., Kaspler, P., Shleyer, J., Honen, R., Horowitz, M., and Barenholz, Y. 2002. Heat acclimation in rats: modulation via lipid polyunsaturation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R389–R399.
- Shrader, J., Etschmann, M.M.W., Sell, D., Hilmer, J.-M., Rabenhorst, J. 2004. “Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects”, *Biotechnology letters*, vol. 26, no. 6, pp. 463-472.
- Silverman, A.M., Qiao, K., Xu, P., Stephanopoulos, G. 2016. Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (8), 3781–3798.
- Singh, G., Jawed, A., Paul, D., Bandyopadhyay, K. K., Kumari, A., & Haque, S. (2016). Concomitant Production of Lipids and Carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under Osmotic Stress Using Response Surface Methodology. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1686. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01686>.

- Sinigaglia, M., Gardini, F., Guerzoni, M.E. 1993. Relationship between thermal behaviour, fermentation performance and fatty acid composition in two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:593-5988.
- Sitepu, I., Ignatia, L., Franz, A., Wong, D., Faulina, S., Tsui, M., et al. 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J Microbiol Methods*, 91:321–8.
- Sitepu, I.R., Jin, M., Fernandez, J.E., da Costa Sousa, L., Balan, V., Boundy-Mills, K.L. 2014. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(17):7645–7657.
- Sitepu, I.R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., Bruce, German, J., Gillies, L.A., et al. 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeasts species. *Bioresour. Technol.*,144:360–9.
- Souza, C.M., Pichler, H. 2007. Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771:442-454.
- Spanova, M., Zweytick, D., Lohner, K., Klug, L., Leitner, E., Hermetter, A., Daum, G. 2012. Influence of squalene on lipid particle/droplet and membrane organization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 4:647–653. doi:10.1016/j.bbaliip.2012.01.015.
- Steels, E.L., Learmonth, R.P., Watson, K. 1994. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*; 140: 569–76.
- Steinborn, G., Wartmann, T., Gellissen, G., Kunze, G. 2007. Construction of an *Arxula adenivorans* host-vector system based on *trp1* complementation. *J. Biotechnol.* 127:392–401.
- Stöckmann, C., Palmen, T.G., Schroer, K., Kunze, G., Gellissen, G., and Büchs, J. 2014. Definition of culture conditions for *Arxula adenivorans*, a rational basis for studying heterologous gene expression in this dimorphic yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 965-976.
- Stressler, T., Eisele, T., Rost, J., Haunschild, E. M., Kuhn, A., and Fischer, L. 2013. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mortierella alpina* using submerge and solid state fermentation. *Chem. Ingenieur Tech.* 85, 318–322. doi: 10.1002/cite.201200094
- Strijbis, K., van Roermund, C.W., van den Burg, J., van den Berg, M., Hardy, G.P., Wanders, R.J., Distel, B. 2010. Contribution of carnitine acetyltransferase to intracellular acetyl unit transport in *Candida albicans*. *J.Biol. Chem.* 285, 24335-24346.
- Sun, M.-L., Madzak, C., Liu, H.-H., Song, P., Ren, L.-J., Huang, H., et al. 2017. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production. *Biochem. Eng. J.* 117, 172–180. doi: 10.1016/j.bej.2016.10.014.
- Sutanto, S., Zullaikah, S., Tran-Nguyen, P.L., Ismadji, S., Ju, Y.-H. 2018. *Lipomyces starkeyi*: Its current status as a potential oil producer. *Fuel Processing Technology*, 177:39-55.
- Suutari, M., Liukkonen, K., Laakso, S. 1990. Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol* 136, 1469–1474.
- Tai, M., Stephanopoulos, G. 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng*, 15:1-9.
- Tang, X., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Garre, V., Song, Y., Ratledge, C. 2015. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicacy of strain WJ11. *PLoS ONE* 10:e0128396. doi: 10.1371/journal.pone.0128396.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.* 58, 100-110.

- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771: 255-270.
- Thevenieau, F. 2006. Metabolic engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of long-chain dicarboxylic acids from renewable oil feedstock, PhD thesis. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Nthangeni, B., Mauersberger, S., Marchal, R., Nicaud, J.-M. 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization. *Fungal Genet Biol* 44 : 531 – 542.
- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA. Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* 2002;156:481–94.
- Toke, D., Martin, C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 18413–18422.
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillaumon, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 127–136.
- Uemura, H. 2012. Synthesis and Production of Unsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Yeast: Current State and Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4105-1>.
- Van der Walt, J.P. 1992. The Lipomycetaceae, a model family for phylogenetic studies. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol. 62, No. 4, pp. 247-250, ISSN 0003-6072.
- Van der Walt, J.P., Smith, M.T., Yamada, Y. 1990. *Arxula* gen. nov. (Candidaceae), a new anamorphic, arthroconidial yeast genus. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 57:59 – 61
- Veiga, M.P., Arrondo, J.L., Goñi, F.M. and Alonso, A. 1999. Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophys J.* 76, 342–350.
- Viñarta, S. C., Angelicola, M. V., Barros, J. M., Fernández, P. M., Mac Cormak, W., Aybar, M. J., et al. 2016. Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation. *J. Basic Microbiol.* 56, 1360–1368. doi: 10.1002/jobm.201600099.
- Walker, G.M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, England.
- Walther, T.C., Farese, R.V. Jr. 2009. The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791:459–466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.10.009>.
- Wang, C.W. 2015. Lipid droplet dynamics in budding yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 2677. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1903-5>
- Wang, C.W., Miao, Y.H., Chang, Y.S. 2014. A sterol-enriched vacuolar microdomain mediates stationary phase lipophagy in budding yeast. *J Cell Biol* 206(3):357–366. doi:10.1083/jcb.201404115.
- Wang, G., Xiong, X., Ghogare, R., Wang, P., Meng, Y., and Chen, S. (2016a). Exploring fatty alcohol-producing capability of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 107. doi: 10.1186/s13068-016-0512-3
- 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 Express.* 7(1):30. doi: 10.1186/s13568-017-0329-x.
- Wang, W., Wei, H., Knoshaug, E., Wychen, S., Xu, Q., Himmel, M. E., et al. 2016b. Fatty alcohol production in *Lipomyces starkeyi* and *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 227. doi: 10.1186/s13068-016-0647-2

- Wang, Y., Lin, X., Zhang, S., Sun, W., Ma, S., and Zhao, Z. K. 2016c. Cloning and evaluation of different constitutive promoters in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Yeast* 33, 99–106. doi: 10.1002/yea.3145
- Wang, Z., Zhang, H. Zao, L., Song, Y. 2016d. Identification and Characterization of Diacylglycerol Acyltransferase in Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 12 (4): 230.240.DOI: 10.3844/ajbbbsp.2016.230.240
- Wartmann, T., Krüger, A., Adler, K., Bui, M.D., Kunze, I., Kunze, G. 1995. Temperature dependent dimorphism of the yeast *Arxula adeninivorans* LS3. *Antonie Van Leeuwenhoek* 68:215 – 223
- Wartmann, T., Kunze, G. 2000. Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Appl Microbiol Technol* 54: 619–624.
- Wartmann, T., Kunze, G. 2000. Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:619–624.
- Wartmann, T., Kunze, G. 2003. Temperature-Dependent Dimorphism of the Non-Conventional Yeast *Arxula adeninivorans*. In: Wolf K., Breunig K., Barth G. (eds) *Non-Conventional Yeasts in Genetics, Biochemistry and Biotechnology*. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wartmann, T., Stephan, U.W., Bube, I., Böer, E., Melzer, M., Manteuffel, R., Stoltenburg, R., Guengerich, L., Gellissen, G., Kunze, G. 2002. Post-translational modifications of the AFET3 gene product – a component of the iron transport system in budding cells and mycelia of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Yeast* 19, 849–8620.
- Wei, L.J., Kwak, S., Liu, J.J., Lane, S., Hua, Q., Kweon, D.H., Jin, Y.S. 2018. Improved squalene production through increasing lipid contents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. PMID 29573412 DOI: 10.1002/bit.26595
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Kraemer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., et al. 2013. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev. Cell* 24, 384–399.
- Wolinski, H., Kolb, D., Hermann, S., Koning, R.I., and Kohlwein, S.D. 2011. A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast. *J. Cell Sci.* 124, 3894–3904.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., Zhao, Z.K. 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour Technol.* 102:1803 – 7.
- Xavier, M.C.A., Coradini, A.L.V., Deckmann, A.C., Franco, T.T. 2017. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochem. Eng. J.* 118, 11-19.
- Xie, D., Jackson, E. N., and Zhu, Q. 2015. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* : from fundamental research to commercial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1599–1610. doi: 10.1007/s00253-014-6318-y.
- Xin, M., Yang, J. et al.2009. "Biodiesel production from oleaginous microorganisms." *Renewable energ.* 34: 1-5.
- Xu, P., Qiao, K., Ahn, W. S., and Stephanopoulos, G. 2016. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10848–10853. doi: 10.1073/pnas.1607295113
- Xu, P., Qiao, K., Stephanopoulos, G. 2017. Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1521-1530. Doi:10.1002/bit.26285.
- Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., Damude, H. G., Rupert, R. A., Seip, J. E., Wang, J., Pollak, D. W., Bostick, M. W., Bosak, M. D., Macool, D. J., Hollerbach, D. H.,

- Zhang, H., Arcilla, D. M., Bledsoe, S. A., Croker, K., McCord, E. F., Tyreus, B. D., Jackson, E. N., Zhu, Q. 2013. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat Biotechnol.* 31, 734-40.
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F., Zhao, Z.K., 2014. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochem. Eng. J.* 91, 86–91.
- Yang, X., Nambou, K., Wei, L., and Hua, Q. 2016. Heterologous production of α -farnesene in metabolically engineered strains of *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 216, 1040–1048. doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.028.
- Yang, X.X., Wartmann, T., Stoltenburg, R., and Kunze, G. (2000). Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 77, 303-311.
- Yazawa, H., Kumagai, H., Yazawa, H.U. 2012. Characterization of triglyceride lipase genes of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 : 981–991.
- Yen, C.L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., Farese, R.V. 2008. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research* 49: 228322301.
- Yu, A.Q., Shi, T.L., Zhang, B. et al. 2012. Transcriptional regulation of desaturase genes in *Pichia pastoris* GS115. *Lipids*, 47:1099–108.
- Yu, C., Kennedy, N.J., Chang, C.C., Rothblatt, J.A. 1996. Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase. *J Biol Chem* 271:24157–24163.
- Yu, C.S., Chen, Y.C., Lu, C.H., Hwang, J.K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 64:643-651.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., Chen, S. 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*. Vol. 102, No. 10, pp. 6134-6140, ISSN 0960-8524
- Zanghellini, J., Natter, K., Jungreuthmayer, C., Thalhammer, A., Kurat, C.F., Gogg-Fassolter, G., Kohlwein, S.D., von Grünberg, H.-H. 2008. Quantitative modeling of triacylglycerol homeostasis in yeast—metabolic requirement for lipolysis to promote membrane lipid synthesis and cellular growth. *FEBS J* 275:5552–5563
- Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Yu, L., Gao, D., Chen, S. 2013. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* 128, 385–391. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.079
- 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. doi: 10.1007/s10529-013-1302-7.
- Zhang, J., Fang, X., Zhu, X.-L., Li, Y., Xu, H.-P., Zhao, X.-D. 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenergy* 35, 1906-1911. Doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.024.
- Zhang, L., Zhang, H., Song, Y. 2018. Identification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of Agriculture and food chemistry* 66(3),674-681.DOI:10.1021/acs.jafc.7b04295.
- Zhang, M., Yu, Q., Xiao, C., Zhang, K., Zhang, D., Zhang, B., Li, M. 2018. Disruption of *SPT23* results in increased heat sensitivity due to plasma membrane damage in *Pichia pastoris*, *FEMS Yeast Research*, Volume 18, Issue 3, foy015, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy015>.

- Zhang, S., Ito, M., Skerker, J.M., Arkin, A.P., Rao, C.V. 2016. Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 for lipid overproduction during high-density fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21):9393-9405. doi: 10.1007/s00253-016-7815-y.
- Zhang, Y., Adams, I.P., Ratledge, C. 2007. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Over-expression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology* 153, 2013-2025.
- Zhang, Y., Wang, Y., Yao, M., Liu, H., Zhou, X., Xiao, W., et al. 2017. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol. Lett.* 39, 1033–1039. doi: 10.1007/s10529-017-2331-4.
- Zhao, C.-H., Zhang, T., Li, M., and Chi, Z.-M. 2010. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochem.* 45, 1121–1126. doi: 10.1016/j.procbio.2010. 04.002
- Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Song, Y. 2015. ¹³C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresour. Technol.* 197, 23–29. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.035
- Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., Zhao, Z.K. 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 405-412.
- Zhao, X., Peng, F., Du, W., Liu, C., Liu, D. 2012. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 993-1004.
- Zhu, Q., Jackson, E.N. 2015. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 36, 65-72.
- Zhu, Q., Xue, Z., Yadav, N., Damude, H. et al. 2010. Metabolic engineering of an oleaginous yeast for the production of omega-3 fatty acids, in: Cohen Z., Ratledge C. (Eds.), *Single Cell Oil*, 2nd Edn., ACOS Press, Urbana, IL, pp. 51–73.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G. 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 101–120.

Titre : Biologie intégrative du métabolisme lipidique chez les levures du genre *Blastobotrys*

Mots clés : levure, génomique comparée, transcriptome, biolipides, biomasse lignocellulosique, métabolisme

Résumé :

Les levures oléagineuses ascomycètes font partie des productrices de lipides les plus connus de notre époque. Elles peuvent produire des lipides, des molécules chimiques dérivées et des acides organiques à partir de sucres simples ou complexes. Nous avons choisi les levures du genre *Blastobotrys* afin de définir un nouvel organisme modèle pour la production d'acides gras et de lipides, car ces levures sont capables de synthétiser et de stocker naturellement 15 à 25% de lipides dans leur biomasse sèche à partir de glucose et xylose, soit plus que *Yarrowia lipolytica* dans les mêmes conditions. La plupart des études d'ingénierie métabolique connues ont utilisé les levures du genre *Blastobotrys* dans une logique de production de molécules différentes des lipides. Nous avons caractérisé les traits oléagineux de deux souches appartenant à deux espèces du genre *Blastobotrys*, en utilisant comme substrats du glucose, xylose, glycérol, fructose, cellobiose, saccharose, galactose avec un rapport C/N de 60. La plus forte production de lipides vient du cellobiose (35%) et du glucose (32%).

Ensuite, afin de mieux comprendre le métabolisme des lipides des levures du genre *Blastobotrys*, nous avons

exploré l'effet de la température sur leur physiologie, production de lipides et le profil lipidique en utilisant un milieu YNB contenant 30 g/L de glucose. Nous n'avons pas trouvé de différence marquée de transition de formes entre les formes hyphes et les levures en milieu YNB sous l'effet de quatre températures (28°C, 37°C, 42°C, 45°C), mais la production des lipides est favorisée à 28°C et le C18:1 est l'acide gras le plus abondant dans le profil lipidique. Nous avons transformé avec succès l'espèce *B. raffinosifermentans* grâce au système Xplor2. Nous avons pu augmenter l'accumulation de lipides en sur-exprimant deux diacylglycérol acyltransférase endogènes, DGA1 et DGA2. Le niveau d'expression élevé de DGA1 dans nos mutants n'est pas corrélé à une production élevée de lipides alors que celui de DGA2 l'est. Notre meilleure souche, dérivée de la souche parentale G1212, a produit 26,5% de lipides à partir de 30 g/L de glucose en culture en flasque. Ce travail représente l'une des premières ingénieries métaboliques de souches de *Blastobotrys* pour la production de lipides. Ce sont donc des levures oléagineuses comme *Y. lipolytica* avec un potentiel biotechnologique avéré.

Titre : Integrative biology of the lipid métabolism in yeasts of genus *Blastobotrys*

Mots clés : yeast, comparative genomics, transcriptome, biolipides, lignocellulosic biomass, metabolism

Abstract:

Ascomycetous oleaginous yeasts are among the highest known producers of lipids of our era that may supply lipids compounds, derived chemicals and organic acids from simple or complex carbon sources. We chose oleaginous yeasts species of *Blastobotrys* genus for defining a new model organism for fatty acid production and lipids, because these oleaginous yeasts natively produce higher lipids rate than *Yarrowia lipolytica* in the same conditions and can metabolize glucose and xylose. Most of the metabolic engineering studies on these yeast species focused on other molecules compounds than lipids. We characterized the oleaginous traits of two strains belonging to two different species of genus *Blastobotrys*, using glucose, xylose, glycerol, fructose, cellobiose, sucrose, galactose, starch and oleic acid as substrates with a C/N ratio of 60. We found the higher lipid production (35%) on cellobiose and glucose (32%).

Next, in order to further understand the lipid metabolism in *Blastobotrys*, we explored the effect of temperature on cell

physiology, lipid production and lipid profile using YNB medium with 30 g/L glucose. No markedly transition were found from the hyphae to budding form or reversely on YNB medium under four temperatures (28°C, 37°C, 42°C, 45°C). The lipids production is favored at 28°C and C18:1 is the most abundant fatty acid in the lipid profile. We successfully transformed the yeast species *B. raffinosifermentans* using the Xplor2 system. We increased lipid accumulation by over-expressing two native diacylglycerol acyltransferase genes, DGA1 and DGA2. Our best strain, derived from the parental strain G1212, produced 26.5 g/L lipid from 30g/L glucose in shake-flask experiments. This strain also produced citric acid like *Y. lipolytica*. We didn't find significant overall elevated expression in lipid synthesis pathway for DGA1 gene when lipid production was favored on contrary to DGA2 gene. This work represents one of the first metabolic engineering of *B. adenivorans* for lipid production.

