



HAL
open science

Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Jorgelindo da Veiga Moreira

► To cite this version:

Jorgelindo da Veiga Moreira. Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Biotechnologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLX015 . tel-02320659

HAL Id: tel-02320659

<https://theses.hal.science/tel-02320659v1>

Submitted on 19 Oct 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.

Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'École Polytechnique

École doctorale n°573 : approches interdisciplinaires, fondements,
applications et innovation (Interfaces)
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 18/04/2019, par

Jorgelindo da Veiga Moreira

Composition du Jury :

François Fages Directeur de Recherche, INRIA Saclay Ile-de-France	Président
Yves Gibon Directeur de Recherche, INRIA Bordeaux-Aquitaine	Rapporteur
Séraphim Papanikolaou Professeur associé, Université d'Athènes	Rapporteur
Tristan Rossignol Chargé de Recherche, INRA-AgroParisTech	Examineur
Rodrigo Ladesma-Amaro Chargé de Recherche, Imperial College	Examineur
Laurent Schwartz Docteur, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris	Directeur de thèse
Sabine Peres Maître de Conférence, Université Paris-Sud	Co-Directrice de thèse
Mario Jolicoeur Professeur, Ecole Polytechnique de Montréal	Invité

Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Ecole Polytechnique

École doctorale n°573 : approches interdisciplinaires, fondements, applications et innovation
(Interfaces)

Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse sera présentée et soutenue à Palaiseau, le 18/04/2019, par Jorgelindo da Veiga Moreira

Composition du Jury :

François Fages Directeur de Recherche, INRIA Saclay Ile-de-France	Président
Yves Gibon Directeur de Recherche, INRIA Bordeaux-Aquitaine	Rapporteur
Séraphim Papanikolaou Professeur associé, Université d'Athènes	Rapporteur
Tristan Rossignol Chargé de Recherche, INRA-AgroParisTech	Examineur
Rodrigo Ladesma-Amaro Chargé de Recherche, Imperial College	Examineur
Laurent Schwartz Docteur, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris	Directeur de thèse
Sabine Peres Maître de Conférence, Université Paris-Sud	Co-Directrice de thèse
Mario Jolicoeur Professeur, Ecole Polytechnique de Montréal	Invité

Résumé

L'objectif de cette thèse est d'étudier et de caractériser les mécanismes impliqués dans la bascule respiro-fermentaire chez des cellules eucaryotes dotées d'un métabolisme mitochondrial. Les cellules eucaryotes ont des besoins différents en oxygène pour la production d'énergie et leur survie dans un environnement donnée. Elles sont qualifiées de type aérobie stricte lorsque la présence d'oxygène leur est nécessaire ou aéro-anaérobie facultatif dans le cas où l'oxygène n'est pas indispensable à la production d'énergie. La levure *Yarrowia lipolytica* a été choisie comme modèle d'étude de par sa particularité d'être un micro-organisme aérobie strict avec une grande capacité d'accumuler de lipides et de production d'acides organiques. Les études expérimentales et analytiques, par l'emploi de méthodes mathématiques de modélisation du métabolisme, ont permis d'identifier des contraintes métaboliques impliquées dans la transition respiro-fermentaire chez cette levure au métabolisme énergétique oxydatif. La production de l'acide citrique par *Y. lipolytica*, déjà rapportée dans la littérature, a été choisi comme un marqueur de cette transition respiro-fermentaire. Nous avons découvert que l'inhibition de la protéine oxydase alternative (AOX), impliquée dans la respiration mitochondriale, par la molécule n-propyl gallate (nPG) permet d'améliorer le rendement de production d'acide citrique par fermentation du glucose dans une culture de *Y. lipolytica*. Ces résultats montrent que la nPG, déjà utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique en tant que conservateur joue sur la bascule respiro-fermentaire par inhibition de la consommation d'oxygène et stimule ainsi la production d'acide citrique. La modélisation du réseau métabolique de *Y. lipolytica*, décrit à l'échelle du genome, par dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) a permis d'identifier l'accumulation des espèces oxydantes dites ROS (Reactive Oxygen Species) comme un levier majeur de la bascule respiro-fermentaire et donc de la production d'acide citrique chez cette levure. De plus, nos résultats préliminaires montrent que l'oxydation des lipides accumulés par *Y. lipolytica* pourrait être à l'origine de la génération des ROS. Cette étude doit être approfondie expérimentalement et constitue un apport important pour l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés : Bascule respiro-fermentaire, Acide citrique, lipides, *Yarrowia lipolytica*, n-propyl gallate, Reactive Oxygen Species, modélisation, dynamic Flux Balance Analysis

Abstract

The main goal of this thesis is to study and characterize mechanisms involved in respiratory to fermentative shift in eukaryotic cells endowed with mitochondrial metabolism. Eukaryotic cells have different oxygen requirements for energy production and survival in a given environment. They are described as strict aerobic when the presence of oxygen is necessary or optional anaerobic in when oxygen is not essential for energy production. The yeast *Yarrowia lipolytica* was chosen as our study model thanks to its particularity since it is a strict aerobic microorganism with a high capacity to accumulate lipids and to produce organic acids. Experimental and analytical studies, using mathematical methods for modeling cell metabolism, allowed us to identify metabolic constraints involved in respiratory to fermentative transition in this yeast showing oxidative energy metabolism. Production of citric acid by *Y. lipolytica*, already reported in the literature, has been chosen as a marker for this in respiratory to fermentative shift. We found that the inhibition of the alternative oxidase protein (AOX) involved in mitochondrial respiration, by adding n-Propyl gallate (nPG) molecule improves the yield of citric acid production by fermentation of glucose in a *Y. lipolytica* culture. These results show that nPG, already used in food and pharmaceutical industry as a preservative, plays on respiratory to fermentative balance by inhibition of oxygen consumption and thus stimulates the production of citric acid. Modeling of the metabolic network of *Y. lipolytica*, described at genome-scale, by dynamic Flux Balance Analysis (FBA) has identified the accumulation of intracellular ROS (Reactive Oxygen Species) species as major levers for respiratory to fermentative shift and therefore the production of citric acid by *Y. lipolytica*. Therefore, our preliminary results show that oxidation of lipids accumulated by *Y. lipolytica* could be involved in generation of ROS species. This study must be experimentally deepened and constitutes an important contribution for the agri-food and pharmaceutical industry.

Key words: Respiratory to fermentative switch, Citric acid, lipids, *Yarrowia lipolytica*, n-Propyl gallate, Reactive Oxygen Species, modeling, dynamic Flux Balance Analysis

Résumé vulgarisé

Quel est le facteur commun entre une levure de bière et un(e) marathonien(ne) ? L'oxygène. La cellule musculaire du marathonien(ne) et la levure de bière font tous deux de la fermentation lorsque l'oxygène devient limitant face à une grande demande énergétique. Le premier produit de l'acide lactique à l'origine des crampes et l'autre produit les quantités d'alcool présentes dans une pinte. Notre travail a permis de comprendre qu'il existe une autre classe de micro-organisme capable de séparer sa production d'énergie de la consommation d'oxygène. C'est le cas des plantes qui doivent faire face à des stress importants mais aussi d'autres micro-organismes telle que *Yarrowia lipolytica*, une levure très particulière. En effet elle devient obèse lorsqu'elle consomme beaucoup de sucre et se met aussi à produire des acides organiques tel que l'acide citrique alors même que la demande énergétique est faible et que l'oxygène est disponible en grande quantité. Nous avons identifié une protéine chez notre levure qui pourrait jouer un rôle important dans l'adaptation de *Y. lipolytica* face à des carences ou différentes formes de stress. Grâce à des algorithmes de modélisation du métabolisme de *Y. lipolytica* nous avons peut-être percé le mystère autour des phénomènes qui obligent les cellules à faire de la fermentation au lieu de respirer. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de défense face à un danger immédiat pour l'intégrité de l'organisme concerné.

Popularised abstract

What is the common factor between brewer's yeast and a marathoner? Oxygen. Muscle cell of the marathoner and the brewer's yeast both ferment when the oxygen becomes limiting in the face of a great energy demand. Muscle cells produce lactic acid causing cramps and yeast cell produce the amounts of alcohol present in a pint. Our work has shown that there is another class of microorganism that can separate its energy production from oxygen consumption. This is the case of plants that have to deal with significant stress but also other microorganisms such as *Yarrowia lipolytica*, a very special yeast. In fact, it becomes obese when it consumes a lot of sugar and also begins to produce organic acids such as citric acid even though the energy demand is low and oxygen is available in large quantities. We have identified a protein in our yeast that could play an important role in the adaptation of *Y. lipolytica* to deficiencies or different forms of stress. Thanks to the modeling algorithms of *Y. lipolytica* metabolism we have perhaps pierced the mystery around the phenomena that force the cells to ferment instead of breathing. It could be a defense mechanism in the face of immediate danger for the integrity of the concerned organism.

« Formez-vous, armez-vous de sciences jusqu'aux dents (...) et arrachez votre patrimoine culturel. »

Cheikh Anta Diop

A mon fils

A Papaï

Remerciements

Je tien tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse, Sabine Peres et Dr. Laurent Schwatz. Laurent, je te remercie énormément pour la confiance que tu as placée en moi, et j'espère que j'ai été à la hauteur. Tu m'as permis d'évoluer dans un cadre idéal pour explorer toutes les facettes de la biologie et au delà. Encore merci pour cette liberté responsable que tu m'as offert au cours de ces quatre années de collaboration. Sabine, je souhaite à tous doctorants de t'avoir comme directrice de thèse. Je te remercie de m'avoir aiguillé dans mes recherches et pour ton soutien dans les moments plus difficiles. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Un grand merci à Mario Jolicoeur pour sa confiance et pour l'accueil au sein de son laboratoire à Polytechnique Montréal.

Je remercie conjointement Amandine Dhaisne et Richard Tallon, mes encadrants en entreprise. Je vous remercie d'avoir fait preuve de patience envers moi et facilité mon intégration au monde de l'entreprise. Vos remarques toujours pertinentes et votre sens de la rigueur m'aidera à coup sûr tout au long de ma carrière. J'en profite aussi pour remercier toutes les équipes au sein de SOREDAB. Mentions particulières pour Mathilde et Alicia pour l'accueil lors de mon arrivée et pour leurs soutiens, Laure, Thomas et Virginie pour l'accompagnement en analyse chimique, toute l'équipe EAB ainsi que Nadine pour l'aide dont j'ai bénéficiée. Un grand merci à Laurence et Nadège pour l'aide en pôle fermenteur. Pour finir je remercie Monsieur François Wolfowski pour sa confiance.

Ma famille... sans vous rien n'aurait été possible. Je te remercie Lyvia pour tes encouragements et pour ton sens du sacrifice. Merci de m'avoir donnée un petit garçon formidable à qui je dédis cette thèse. Merci maman d'avoir toujours été là malgré la distance. Te amo tanto. Cintia obrigado pela encorajemento. Merci pai d'avoir toujours cru en moi. Papaï e Mamaï obrigado nhos foi nha mentor et nunca nka ta esqueci.

Je tiens aussi à remercier Matthieu Jules et Vincent Fromion pour accepté d'intégrer le jury d'évaluation de mon travail à mi-parcours ainsi que les membres du jury de thèse qui ont accépté d'évaluer ce travail.

Communications et publications

Journaux internationaux à comité de lecture

da Veiga Moreira, J., Peres, S., Steyaert, J. M., Bigan, E., Paulevé, L., Nogueira, M. L., & Schwartz, L. (2015). Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 12(1), 10.

Levy Nogueira, M., da Veiga Moreira, J., Baronzio, G. F., Dubois, B., Steyaert, J. M., & Schwartz, L. (2015). Mechanical stress as the common denominator between chronic inflammation, cancer, and Alzheimer's disease. *Frontiers in oncology*, 5, 197.

da Veiga Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Bigan, E., Pérès, S., Paulevé, L., ... & Schwartz, L. (2016). The redox status of cancer cells supports mechanisms behind the Warburg effect. *Metabolites*, 6(4), 33.

Schwartz, L., Seyfried, T., Alfarouk, K. O., da Veiga Moreira, J., & Fais, S. (2017, April). Out of Warburg effect: An effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 43, pp. 134-138). Academic Press.

Schwartz, L., da Veiga Moreira, J., & Jolicœur, M. (2018). Physical forces modulate cell differentiation and proliferation processes. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(2), 738-745.

Schwartz, L., Lafitte, O., & da Veiga Moreira, J. (2018). Toward a Reasoned Classification of Diseases Using Physico-Chemical Based Phenotypes. *Frontiers in physiology*, 9, 94.

da Veiga Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Schwartz, L., Jolicœur, M., & Peres, S. (2019). Metabolic therapies inhibit tumor growth in vivo and in silico. *Scientific reports*, 9(1), 3153.

Conférences internationales

“A model of the impact of the cell volume cycle on intracellular pH regulation” SystemsX.ch, 10/2015 (Lausanne, Suisse)

“Dynamic Characterization of the Carbon Overflow Metabolism in Yeast” International Study Group for Systems Biology, 07/2016 (Jena, Germany)

Communications scientifiques

Peres, S., da Veiga Moreira, J. “Metabolic view of tumor growth: a kinetic model to screen potential therapeutic targets” Computational Systems Biology for Cancer, 05/2018 (Paris, France)

“Optimisation of citrate production by *Yarrowia lipolytica*.” Institut national de la recherche agronomique, 05/18 (Jouy-en-Josas, France)

“Métabolisme et cycle cellulaire” Conservatoire national des arts et métiers, 05/17 (Paris, France)

“The energetic status of cancer cells explains the Warburg effect” Institute of Systems & Synthetic Biology, 04/17 (Evry, France)

SOMMAIRE

Figures	17
Tableaux	18
INTRODUCTION GENERALE	19
Les enjeux industriels du projet	20
La production de citrate chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
Etude de la fermentation chez les cellules animales pour appréhender notre problématique	21
Références	23
BIBLIOGRAPHIE GENERALE	26
Chapitre I	27
Le métabolisme central des cellules	27
I. Cellule : unité structurelle et fonctionnelle	28
II. Le métabolisme cellulaire	31
1. Catabolisme	31
2. Anabolisme	31
III. Les voies du métabolisme central du carbone	32
1. La glycolyse / voie de Embden-Meyerhof-Parnas	33
2. La voie de Entner-Doudoroff	33
3. La voie des pentoses phosphates	33
4. Le cycle de Krebs	35
IV. Le métabolisme central du carbone et la production de la biomasse	36
1. Précurseurs pour la synthèse des polysaccharides	37
2. Précurseurs pour la synthèse des nucléotides	37
3. Précurseurs pour la synthèse des acides aminés	38
4. Précurseurs pour la synthèse des lipides	38
Références	41
Chapitre II	43
La transition respiro-fermentaire chez	43
les cellules eucaryotes	43
I. Le métabolisme énergétique de la chaîne respiratoire	44
1. La chaîne respiratoire « classique » des cellules eucaryotes	44
a. Complexe I	45
b. Complexe II	45
c. Complexe III	46
d. Complexe IV	46

e.	Complexe V.....	47
f.	Autres oxydo-réductases	47
2.	Les étapes limitantes de la phosphorylation oxydative	48
3.	Le rôle potentiel des groupes prosthétiques dans la transition respiro-fermentaire.....	49
II.	Les transitions métaboliques au cours du cycle cellulaire	51
III.	Fermentation où la limitation de la capacité respiratoire mitochondriale des cellules eucaryotes.....	67
1.	Effet Pasteur : la limitation en oxygène.....	67
2.	Effet Warburg : la déficience mitochondriale	68
3.	Effet Crabtree : effet inhibiteur du glucose sur la respiration	69
a.	Hypothèse de la limitation de la capacité respiratoire	70
b.	Hypothèse du « nœud pyruvate »	71
	Références	73
	Chapitre III : Production de citrate chez des micro-organismes aérobie	81
I.	Définition.....	82
II.	Production microbienne de citrate.....	82
1.	La voie de biosynthèse du citrate	82
2.	La production de citrate chez <i>Aspergillus niger</i>	83
III.	Les espèces GRAS/QPS à fort potentiel pour la production de citrate	85
IV.	Le métabolisme du citrate chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	87
1.	Description générale de <i>Yarrowia lipolytica</i>	87
2.	La respiration chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	88
3.	La respiration alternative chez <i>Yarrowia lipolytica</i> et l'overflow de citrate.....	89
4.	Mécanisme général pour expliquer la production de citrate chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	90
V.	Optimisation de la production de citrate.....	91
1.	Les conditions expérimentales favorisant une accumulation de citrate	91
a.	Le pH.....	92
b.	L'aération de la culture.....	92
c.	La source d'azote et oligo-éléments	92
2.	L'influence du ratio Carbone/Azote (C/N) sur la synthèse de citrate.....	93
3.	Co-cultures	94
4.	Approches OGMs et mutagène	94
	Conclusion.....	95
	Références	96
	Chapitre IV	104
	Modélisation du métabolisme.....	104

I. Modéliser un réseau métabolique	105
II. Approches dynamiques de modélisation	106
1. Cinétiques mécanistiques	106
a. La loi d'action de masse	106
b. Equation de Michaelis-Menten.....	107
c. Equation de Hill.....	108
2. Simulations stochastiques	108
III. Modélisation à l'état quasi-stationnaire à base de contraintes	109
1. Stationnarité d'un système métabolique	109
2. Modes élémentaires de flux	110
3. Flux balance analysis	111
4. Geometric Flux Balance Analysis	113
IV. Approches hybrides de modélisation	113
1. Dynamic Flux Balance Analysis	113
2. Macroscopic Bioreaction Model	115
3. Hybrid Cybernetic Modeling	115
V. Modélisation de la production de citrate et lipide chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	116
1. Les réseaux GEM de <i>Yarrowia lipolytica</i>	116
2. Optimisation de la production des lipides par GEM	117
3. Modélisation dynamique de la production de citrate et accumulation de lipides	118
Conclusion	119
Références	120
RESULTATS	128
Chapitre I	129
Alternative oxidase inhibition in <i>Yarrowia lipolytica</i> triggers citrate overproduction	129
Résumé du Chapitre I “Alternative oxidase inhibition in <i>Yarrowia lipolytica</i> triggers citrate overproduction”. Prêt pour soumission à Systems Biology and Applications	130
Abstract	131
I. Introduction	132
1. Microorganism and media composition	135
2. Culture conditions	135
3. Biomass and metabolites analysis	136
III. Results	137
1. Experimentally-determined kinetic parameters.....	137
2. <i>In silico</i> growth prediction.....	137
3. Predicting citrate production upon N-lim.....	138

4. Reduced simulated OxPhos during citrate production and lipid accumulation.....	139
5. Krebs enzymes activity sustain mitochondrial citrate accumulation.....	139
6. Activities of key enzymes of the citrate node.....	140
7. Optimization of citrate synthesis.....	140
IV. Discussion	142
V. Conclusion	143
Tables and Figures	144
Supplementary informations	150
References	151
Chapitre II	156
Modèles cinétiques pour prédire la production de citrate chez <i>Y. lipolytica</i>	156
I. Introduction	157
II. Matériels et méthodes	158
1. Description mathématique d'un système batch.....	158
2. Réduction systématique du GEM de <i>Y. lipolytica</i>	158
3. Construction d'un modèle cinétique macroscopique de <i>Y. lipolytica</i>	159
4. Estimation des paramètres.....	159
III. Résultats et discussion	160
1. Modèle cinétique réduit de <i>Y. lipolytica</i>	160
a. Modélisation de l'accumulation des lipides.....	160
b. Prédiction des marqueurs énergétiques du phénomène d'overflow.....	161
2. Modèle cinétique macroscopique de <i>Y. lipolytica</i>	161
Conclusion	164
Références	165
Données supplémentaires	167
Simulations des concentrations des métabolites intracellulaires	167
Chapitre III	171
The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect	171
Résumé de l'article "The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect" da Veiga Moreira <i>et al.</i> (2016). <i>Metabolites</i>	172
Chapitre IV	187
Metabolic therapies inhibit tumor growth <i>in vivo</i> and <i>in silico</i>	187
Résumé de l'article "Metabolic therapies inhibit tumor growth <i>in vivo</i> and <i>in silico</i>" da Veiga Moreira <i>et al.</i> (2019). <i>Scientific Reports</i>	188
PERSPECTIVES	201
I. Le citrate stimule la différenciation des ostéoblastes	202

Matériels et méthodes	204
Résultats et Discussion	205
Conclusion	206
Références	207
CONCLUSION GENERALE	208
Références	211

Figures

Figure 1: Composition de la membrane cellulaire.	29
Figure 2 : Ma composition massique d'une bactérie.	29
Figure 3 : Les compartiments intracellulaires d'une cellule eucaryotes.	30
Figure 4 : Catabolisme et anabolisme.	32
Figure 5 : Les voies de la dégradation du glucose.	34
Figure 6 : Le cycle de Krebs.	35
Figure 7 : Le métabolisme central du carbone des cellules eucaryotes.	40
Figure 8 : La chaîne respiratoire classique.	48
Figure 9 : La chaîne respiratoire incluant la voie alternative (AOX) et des inhibiteurs spécifiques.	51
Figure 10 : La forme ionique de citrate pour un pH de milieu à 7.	82
Figure 11 : La morphologie de <i>Yarrowia lipolytica</i> dans deux conditions de cultures.	88
Figure 12 : Mécanisme proposé par Martínez-Cárdenas et al., 2018 pour expliquer l'overflow d'éthanol, la synthèse d'antioxydants et l'expression de l'oxydase alternative chez <i>Phaffia</i> <i>rhodozyma</i>	90
Figure 13 : Le réseau métabolique et la matrice de stœchiométrie correspondante.	106
Figure 14 : Représentation schématique de la vitesse d'une réaction métabolique d'après Michaelis-Menten-Henri.	107
Figure 15 : Les modes élémentaires de flux d'un réseau métabolique.	111
Figure 16 : Représentation FBA pour l'optimisation de la production de p2.	112
Figure 17: Caractérisation in silico du phénomène d'overflow chez <i>Y. lipolytica</i>	161
Figure 18 : Prédiction de la production de citrate par un modèle macroscopique du métabolisme de <i>Y. lipolytica</i>	163
Figure 19 : L'effet des sels de citrate sur la synthèse du collagène par les ostéoblastes.	205

Tableaux

Tableau 1 : La composition molaire/nombre d'une bactérie.	30
Tableau 2 : Le bilan de la glycolyse.....	33
Tableau 3 : Le bilan de la voie de Entner-Doudouhoff.	33
Tableau 4 : Le bilan de la voie des pentoses phosphates.	34
Tableau 5 : Le bilan du cycle de Krebs.	36
Tableau 6 : Les précurseurs de la biomasse chez E. coli.	36
Tableau 7 : Le bilan de la synthèse du palmitate.	39
Tableau 8 : Le bilan énergétique des réactions de la chaîne respiratoire.	48
Tableau 9 : Les souches GRAS à fort potentiel pour la production de citrate.	86
Tableau 10 : Comparaison des cinq GEMs de Y. lipolytica	117

INTRODUCTION GENERALE

Les enjeux industriels du projet

L'acide citrique est un acide tricarboxylique (trois fonctions acides) produit par les microorganismes, plantes et animaux. Il joue un rôle central dans le métabolisme de pratiquement tous les organismes vivants mais il est aussi utilisé comme additif alimentaire pour la diversité de ses propriétés fonctionnelles (régulateur d'acidité, chélatant, acidulant, et antioxydant) (Berovic and Legisa, 2007; Sauer *et al.*, 2008; Soccol *et al.*, 2006). Dans l'industrie laitière, l'acide citrique est naturellement présent dans le lait de vache à hauteur de 2 g.L⁻¹ mais sa concentration fluctue selon les périodes de lactation (Garnsworthy *et al.*, 2006). De plus, le citrate est métabolisé par certaines bactéries lactiques en diacétyle, une molécule clef pour l'arôme dit « beurre, crème » particulièrement importante dans la construction du profil sensoriel des produits laitiers (beurre, crème, fromage frais ou affinés) (Levata-Jovanovic and Sandine, 1996; Marilley and Casey, 2004). En accord avec la réglementation, l'acide citrique peut également être ajouté seul [E330] ou complexé sous la forme de sels (sodium [E331], potassium [E332], calcium [E333] et magnésium [E334]) dans diverses technologies fromagères (fromages fondus et fromages à pâtes filées). Dans un contexte où les associations de consommateurs exercent une pression de plus en plus forte pour renoncer aux additifs alimentaires. L'enrichissement naturel en citrate de matières lactières par une production microbienne pourrait constituer une alternative intéressante à l'utilisation des additifs.

La production de citrate chez *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est une levure oléagineuse connue pour sa capacité à accumuler de grandes quantités de lipides mais elle est aussi utilisée pour la production d'acides organiques (principalement l'acide citrique) (Papanikolaou *et al.*, 2009; Beopoulos *et al.*, 2011; Ledesma-Amaro and Nicaud, 2016). L'accumulation de lipides et la production d'acide citrique sont principalement observées lors de la phase stationnaire de croissance des souches de *Yarrowia lipolytica* (Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014). Une carence en azote favorise un arrêt de la production de la biomasse et le surplus de la ressource en carbone est alors métabolisé et accumulé sous forme de lipide (principalement des acides gras) (Papanikolaou *et al.*, 2009). Des études récentes montrent que cette accumulation de lipide observée en début de phase stationnaire est à son tour limitée au détriment d'une production de d'acide citrique en milieu de culture (Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014; Robles-Rodriguez *et al.*, 2017). Alors que

l'accumulation de lipides est assimilée au phénomène l'overflow (Kerkhoven *et al.*, 2016), la production d'acide citrique n'est que partiellement expliquée. **Notre stratégie sera d'utiliser les outils de biologie computationnelle dans l'objectif de proposer un/des modèle(s) métabolique(s) de la levure *Yarrowia lipolytica* capable de prédire la production de citrate et son optimisation *in silico*. Le modèle devrait permettre l'identification des leviers d'optimisation de la production de citrate qui seront ensuite testés et validés expérimentalement.**

Etude de la fermentation chez les cellules animales pour appréhender notre problématique

Notre groupe de travail a développé depuis de nombreuses années une expertise dans le métabolisme des cellules eucaryotes, particulièrement chez les cellules animales. Les derniers travaux se sont portés sur la compréhension de caractère fermentaire des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (Schwartz, 2004; Israël and Schwartz, 2011) et des traitement métaboliques ont été proposées (Guais *et al.*, 2012; Icard *et al.*, 2012). L'équipe a par ailleurs proposé un effet inhibiteur du citrate sur la prolifération des cellules cancéreuses (Icard *et al.*, 2012).

Ces études antérieures à la thèse ont motivé notre démarche de caractériser les principaux leviers impliqués dans les transitions métaboliques, à la fois chez les cellules animales et les levures dans une perspectives d'applications industrielle. Ce travail est présenté en deux parties. Nous présentons d'abord un état de l'art élargi du métabolisme et particulièrement le métabolisme des cellules eucaryotes puis les résultats obtenus sur les différents modèles cellulaires.

Une première revue bibliographique offre une nouvelle perspective dans la compréhension du métabolisme des organismes, à priori, éloignés dans la façon de traiter les ressources énergétiques mais assez proches face aux contraintes thermodynamiques. Les cellules animales ou levures aérobies strictes ou facultatifs semblent trouver un point commun dans la gestion des ressources carbonées en présence d'oxygène. La limitation de la respiration mitochondriale semble être une contrainte majeure dans la synthèse d'énergie et le facteur commun d'une transition métabolique chez les cellules aérobies strictes et facultatifs.

Dans la partie résultat nous introduisons et proposons nos différents articles publiés ou en cours de publication ainsi que des résultats préliminaires. Dans le chapitre I nous exposons sous la forme d'un article, les résultats d'optimisation de la production de citrate à partir des simulations à l'échelle du genome (GEM) du métabolisme de *Y. lipolytica*. Notre modèle a permis de caractériser le rôle important de la respiration alternative (AOX) dans la transition métabolique chez *Y. lipolytica* matérialisée par une accumulation de lipides et la production de citrate. L'inhibition expérimentale de l'AOX a permis de doubler la production de citrate. L'analyse *in silico* de l'équilibre des flux intracellulaires a permis de mettre en évidence un lien potentiel entre la production de citrate et l'accumulation des espèces oxydantes réactives (ROS). Le chapitre II est une tentative de simplification du modèle GEM de *Y. lipolytica* afin de proposer un modèle dynamique de type EDO (équations différentielles ordinaires). Le modèle prédit des variations de métabolites extracellulaires et biomasse assez proches des résultats expérimentaux. Cependant des améliorations doivent être apportés sur les paramètres cinétiques intracellulaires afin d'améliorer les prédictions. Le chapitre III rapporte les résultats publiés portant sur la différence d'état énergétique/redox entre les cellules très prolifératives telles que les cellules cancéreuses et les cellules saines. Les cellules prolifératives possèdent une glycolyse prononcée caractérisées par des ratios rédox $NAD^+/NADH$ et $NADP^+/NADPH$ élevés ainsi qu'une quantité d'ATP plus faibles, probablement dû à un rendement mitochondrial affaibli. Enfin, chapitre IV présente des résultats publiés d'un modèle cinétique de l'évolution d'une tumeur cancéreuse. Ce modèle intègre des voies métaboliques simplifiées du métabolisme des cellules cancéreuses et simule la croissance de la tumeur ainsi que l'effet inhibiteur de molécule qui ciblent spécifiquement des enzymes du métabolisme central du carbone. Les résultats montrent que la voie de synthèse des lipides à partir du citrate est une cible de choix, pour inhiber expérimentalement l'évolution d'une masse cancéreuses implantée chez des souris.

Dans la dernière partie de la thèse nous discutons les résultats obtenus chez les différents modèles cellulaires et présentons des résultats préliminaires d'une application de sels de citrate pour stimuler le métabolisme des ostéoblastes et la formation de la trame osseuse. Ces premiers résultats semblent montrer un effet du sel calcium-citrate sur la synthèse du collagène.

Références

- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., and Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1193–1206.
- Berovic, M., and Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnol Annu Rev* 13, 303–343.
- Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L., and Mottram, T.T. (2006). Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 1604–1612.
- Guais, A., Baronzio, G., Sanders, E., Campion, F., Mainini, C., Fiorentini, G., Montagnani, F., Behzadi, M., Schwartz, L., and Abolhassani, M. (2012). Adding a combination of hydroxycitrate and lipoic acid (METABLOCTM) to chemotherapy improves effectiveness against tumor development: experimental results and case report. *Invest New Drugs* 30, 200–211.
- Icard, P., Poulain, L., and Lincet, H. (2012). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1825, 111–116.
- Israël, M., and Schwartz, L. (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol. Cancer* 10, 70.
- Kerkhoven, E.J., Pomraning, K.R., Baker, S.E., and Nielsen, J. (2016). Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Npj Systems Biology and Applications* 2, 16005.
- Ledesma-Amaro, R., and Nicaud, J.-M. (2016). *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research* 61, 40–50.
- Levata-Jovanovic, M., and Sandine, W.E. (1996). Citrate Utilization and Diacetyl Production by Various Strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*1. *Journal of Dairy Science* 79, 1928–1935.
- Marilley, L., and Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 139–159.
- Ochoa-Estopier, A., and Guillouet, S.E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 170, 35–41.
- Papanikolaou, S., Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Nicaud, J.-M., and Aggelis, G. (2009). Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 1221–1232.
- Robles-Rodriguez, C.E., Bideaux, C., Guillouet, S.E., Gorret, N., Cescut, J., Uribe Larrea, J.-L., Molina-Jouve, C., Roux, G., and Aceves-Lara, C.A. (2017). Dynamic metabolic modeling

of lipid accumulation and citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Computers & Chemical Engineering* 100, 139–152.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., and Branduardi, P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26, 100–108.

Schwartz, L. (2004). *Cancer - Between Glycolysis and Physical Constraint*.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., and Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology* 44, 141–149.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

Chapitre I

Le métabolisme central des cellules

I. Cellule : unité structurale et fonctionnelle

Les cellules sont les unités de base de toute forme de vie sur Terre. Une cellule représente à la fois l'unité fonctionnelle et structurale du vivant (Monod, 1970). Elle est constituée d'une membrane plasmique qui permet une séparation entre le milieu intracellulaire (cytoplasme) et l'environnement de la cellule (Fig. 1). La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique, permettant de maintenir des conditions différentes entre les milieux intracellulaires et extracellulaire. La bicouche lipidique est constituée de phospholipides, des protéines et carbohydrates membranaires qui ont diverses fonctions de signalisation et de transport de solutés. La membrane joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire. Une rupture prolongée de cette membrane conduit le plus souvent à la mort cellulaire. De par sa flexibilité, la membrane permet à la cellule de s'adapter à différents *stimuli*. Cette fonction est assurée conjointement avec les molécules d'eau (H₂O) et les ions. Les molécules d'eau permettent de maintenir un potentiel électrochimique entre l'environnement et l'espace intracellulaire, notamment grâce à la pression osmotique. A titre d'exemple, le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est constitué à 70% de molécules d'eau, en composition massique (Fig. 2) (Kamihira *et al.*, 1987). Les 30% restant regroupent les minéraux, protéines, les polysaccharides, les acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) et les lipides. La prédominance cytoplasmique en molécules de H₂O est encore plus évidente lorsque la masse de tous les composés est convertie en mole ou nombre de chaque constituant de la cellule (Tab. 1). On peut constater que *E. coli* est effectivement majoritairement constituée de molécules d'eau puis les minéraux ioniques et macromolécules. Contrairement aux procaryotes, le cytoplasme des cellules eucaryotes est dense et compartimenté en sous-structures qui remplissent des fonctions spécifiques. On distingue, parmi les principaux compartiments, le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Fig. 3). Le cytoplasme constitue un espace très encombré et organisé. Une telle organisation servirait à maximiser les flux énergétiques issus des conversions métaboliques des différentes sources énergétiques (Acerenza and Graña, 2006).

Les organismes procaryotes (bactéries, archées) et eucaryotes (levures, animaux, plantes) dépendent environ 30% de leur énergie dans l'organisation interne et la maintenance d'un métabolisme intracellulaire fonctionnel (Fernandez-de-Cossio-Diaz and Vazquez, 2018). Cette dépense énergétique est particulièrement nécessaire et vérifiée chez les eucaryotes, pour le maintien des échanges entre les différents compartiments cytosoliques.

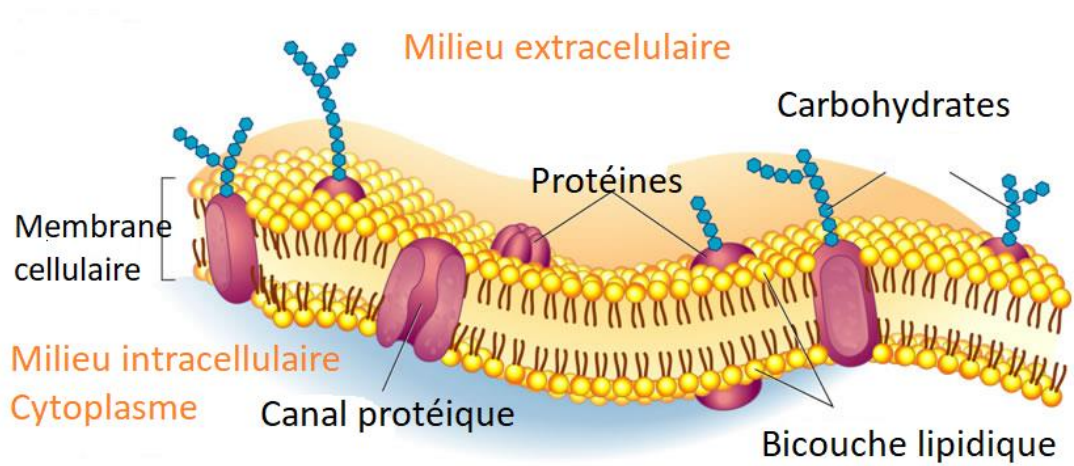


Figure 1: Composition de la membrane cellulaire.
La membrane cellulaire est principalement constituée de phospholipides, protéines de transport et carbohydrates.

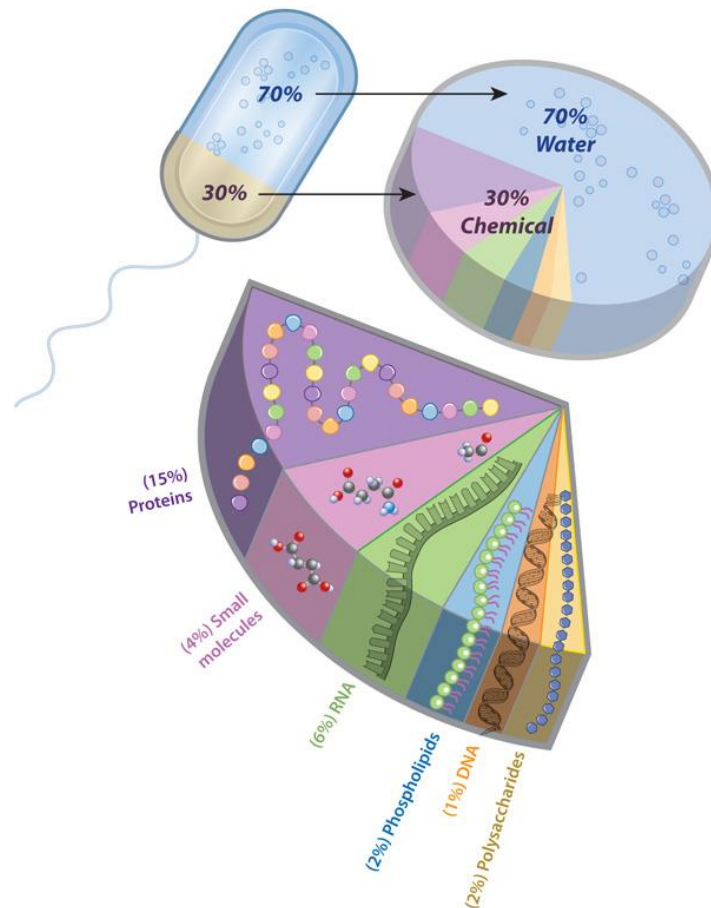


Figure 2 : Ma composition massique d'une bactérie.
(Nature Education®) Une bactérie est constituée en moyenne de 70% d'eau et 30% de macromolécules. Ces macromolécules composent les protéines, lipides, polysaccharides et les nucléotides (ADN, ARN).

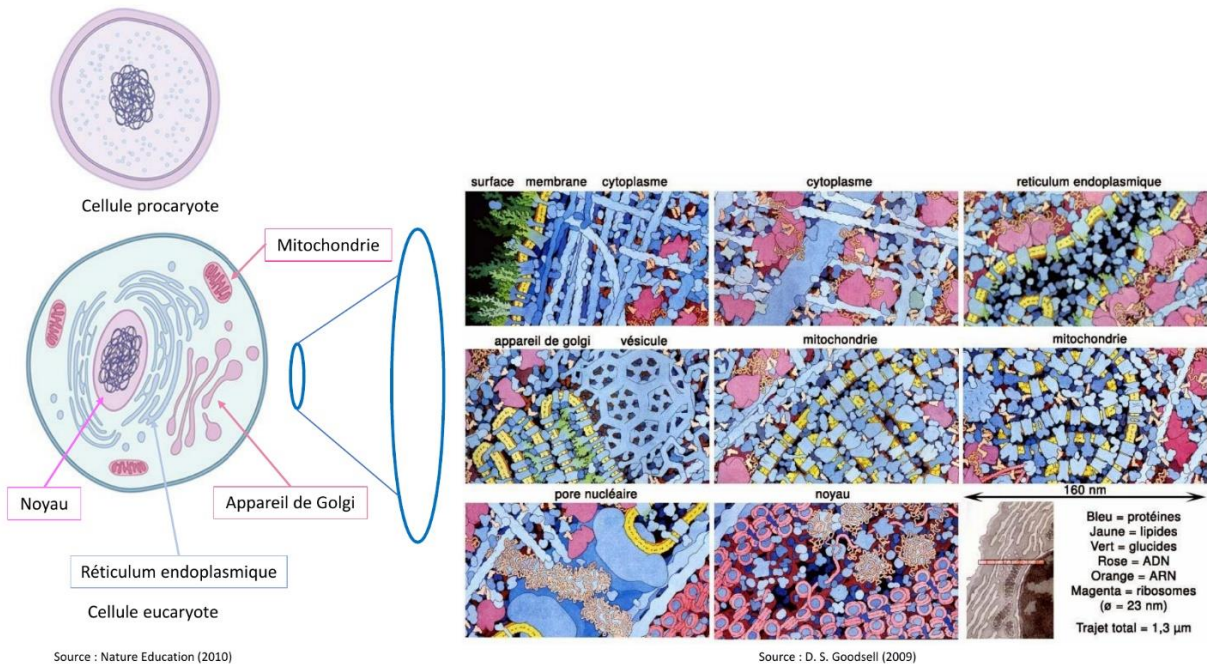


Figure 3 : Les compartiments intracellulaires d'une cellule eucaryotes.

Contrairement aux procaryotes, le cytoplasme des cellules eucaryotes est dense et compartimenté en sous-structures qui remplissent des fonctions spécifiques. On distingue parmi ces compartiments le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Tableau 1 : La composition molaire/nombre d'une bactérie.

(Site internet du Pr. Marc Henry, Université de Strasbourg). Ce tableau donne un aperçu de la composition, en nombre, des principaux constituants de la cellule. Une bactérie principalement constituée d'eau et d'ion.

Matière	P.M. (Da)	Masse (g)	mol	Nombre
Eau	18	70	3,88889	22 240 561 910
Ions	47	1	0,0212766	121 680 875
Acides aminés	110	0,8	0,007273	41 594 287
Lipides	600	2	0,003333	19 061 427
Nucléotides	414	0,8	0,00193237	11 051 224
Protéines	40 000	15	0,000375	2 144 625
ARN	33 500	6	0,0001791	1 024 273
Polysaccharides	1 000 000	3	0,000003	17 157
ADN	2 840 000 000	1	0,0000000035	1
Divers	-	0,4	-	-
Total	3 159 782	100	3,92	22 437 135 779

II. Le métabolisme cellulaire

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques chez un organisme vivant. Une partie du métabolisme est commune à toutes les espèces (procaryotes, eucaryotes et archées) et l'autre est spécifique à chaque espèce. Chez une cellule, le métabolisme se manifeste aussi bien dans le compartiment extracellulaire, dans l'environnement de l'organisme considéré, que dans le compartiment intracellulaire. Le métabolisme est organisé en voies métaboliques, c'est-à-dire un ensemble de réactions de dégradation (catabolisme) ou de synthèse (anabolisme) de molécules participant au fonctionnement de la cellule (Dean and McEntyre, 2004). Ces éléments fondamentaux permettent à la cellule de produire de l'énergie (catabolisme) et de consommer l'énergie (anabolisme) afin de s'adapter à son environnement et d'assurer, entre autres, sa fonction de reproduction (Kaur and Debnath, 2015).

1. Catabolisme

Le catabolisme permet la dégradation des molécules en des composés plus simples, métabolisables par la cellule, pour la production d'énergie (Fig. 4). La voie catabolique la plus communément utilisée par les microorganismes est la voie de dégradation du glucose (Dean et McEntyre, 2004). Elle peut être assurée par les voies de la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, la voie de Entner-Doudoroff ou encore celle des pentoses phosphates. Lorsque l'apport en glucose extracellulaire est limité, les cellules puisent leur énergie dans les réserves polysaccharidiques intracellulaires tels que le glycogène, les lipides ou encore les protéines. Le catabolisme des polysaccharides aboutit à la génération d'intermédiaires de la glycolyse ou de la voie de Entner-Doudoroff. Les lipides sont d'abord dégradés en acides gras par la voie de la lipolyse puis convertis en intermédiaires énergétiques par β -oxydation. Pour ce qui est des protéines, elles sont hydrolysées en acides aminés qui sont à leurs tours dégradés en acides α -cétoniques et groupement amine par transamination ou décarboxylés pour former des groupements amines et des intermédiaires de la glycolyse.

2. Anabolisme

L'anabolisme est le contraire du catabolisme. Il est à la base de la croissance cellulaire puisqu'il l'assure par la construction des macrostructures glucidiques, lipidiques et protéiques (Dean et McEntyre, 2004). Ces structures, souvent complexes, sont synthétisées à partir de molécules plus simples telles que le glucose, communément partagée par les différents organismes (Fig.

4). Les voies d'anabolisme comprennent aussi le métabolisme secondaire permettant la biosynthèse d'autres constituants de la cellule tels que les cétones, esters et alcools. L'ensemble de ces réactions de synthèse constituent donc l'anabolisme et sont consommatrices d'énergies.

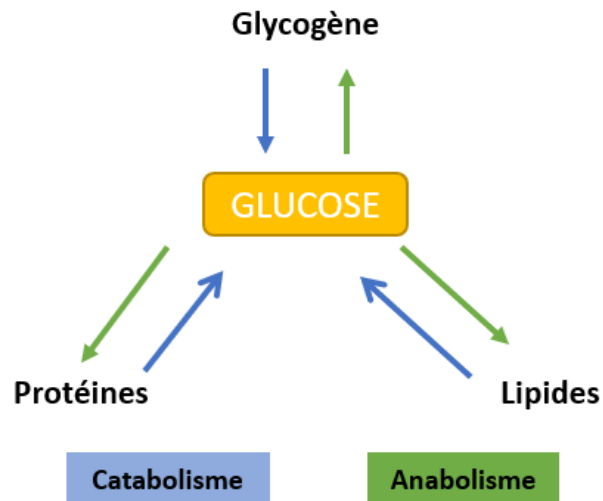


Figure 4 : Catabolisme et anabolisme.

Le métabolisme est partagé entre le catabolisme où la dégradation de molécules pour la production d'énergie et l'anabolisme qui correspond à la consommation d'énergie pour la synthèse des macromolécules.

III. Les voies du métabolisme central du carbone

La chimie nous apprend que les réactions d'oxydation sont toujours couplées à une réduction. Une substance oxydée cède ses électrons et augmente son nombre d'oxydation. Les électrons cédés sont acceptés par une autre substance qui devient réduite (son nombre d'oxydation diminue). Ce mécanisme dit d'oxydo-réduction est bien connu en chimie organique mais est aussi présent dans toute la biochimie cellulaire. Le glucose est la source carbonée préférée des cellules eucaryotes et procaryotes. Il est central dans le métabolisme cellulaire puisqu'il constitue la colonne vertébrale du métabolisme carboné, à laquelle sont branchées la plupart des voies de biosynthèse et de production d'énergie (Fig. 4 et 6). La conversion d'une molécule de glucose en des intermédiaires énergétiques et des précurseurs de la biomasse est basée, elle aussi, sur le principe d'oxydo-réduction (Moussard, 2006).

1. La glycolyse / voie de Embden-Meyerhof-Parnas

La glycolyse est une voie métabolique d'assimilation du glucose et fondamentale à la production d'énergie chez les organismes vivants. Elle est composée d'une série de dix réactions enzymatiques. La première réaction est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate. S'ensuivent neuf réactions permettant de générer deux molécules de pyruvate et deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP), la forme d'énergie universelle et utilisée par tous les organismes vivants (Fig. 5).

Tableau 2 : Le bilan de la glycolyse.

Consommation (mol)	Production (mol)
Glucose + 2 NAD ⁺ + 2 ADP + 2 Pi	→ 2 Pyruvate + 2 (NADH, H ⁺) + 2 ATP + 2 H ₂ O

2. La voie de Entner–Doudoroff

La voie d'Entner–Doudoroff permet aussi la dégradation du glucose en pyruvate. Elle a été mise en évidence en 1952 par Michael Doudoroff and Nathan Entner (Entner and Doudoroff, 1952). Cette voie se distingue de la glycolyse seulement dans la phase d'investissement. En effet une enzyme clé, 2-céto-3-déoxyphosphogluconate (CDPG) aldolase, identifiée chez les procaryotes permet un « by-pass » de la voie haute de la glycolyse par la conversion de la 6-phosphogluconate en glycéraldéhyde-3-phosphate et génère une molécule de pyruvate (Fig. 5). Cependant, cette enzyme a récemment été identifiée chez les cyanobactéries, les algues et les plantes (Chen *et al.*, 2016).

Tableau 3 : Le bilan de la voie de Entner-Doudouroff.

Consommation (mol)	Production (mol)
Glucose + NAD ⁺ + NADP ⁺ ADP + Pi	→ 2 Pyruvate + NADH + NADPH + ATP + H ₂ O

3. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (PPP) est une autre composante du métabolisme central du carbone. Elle est présente chez toutes les cellules et se déroule dans le cytoplasme. La PPP permet de gérer des intermédiaires essentiels à la croissance cellulaire. Elle est directement branchée à la glycolyse au niveau du G6P et permet de générer la coenzyme nicotinamide

adénine dinucléotide phosphate (NADPH) utilisée pour la synthèse des lipides, la production du ribose-5-phosphate (R5P) utilisé dans la synthèse des nucléotides, ainsi que la production de l'érythrose-4-phosphate (E4P), un précurseur pour la synthèse de certains acides aminés (Fig. 5).

Tableau 4 : Le bilan de la voie des pentoses phosphates.

Consommation (mol)	Production (mol)
3 G6P + 6 NADP ⁺ + 3 H ₂ O	→ 2 F6P + G3P + 6 NADPH + 3 CO ₂

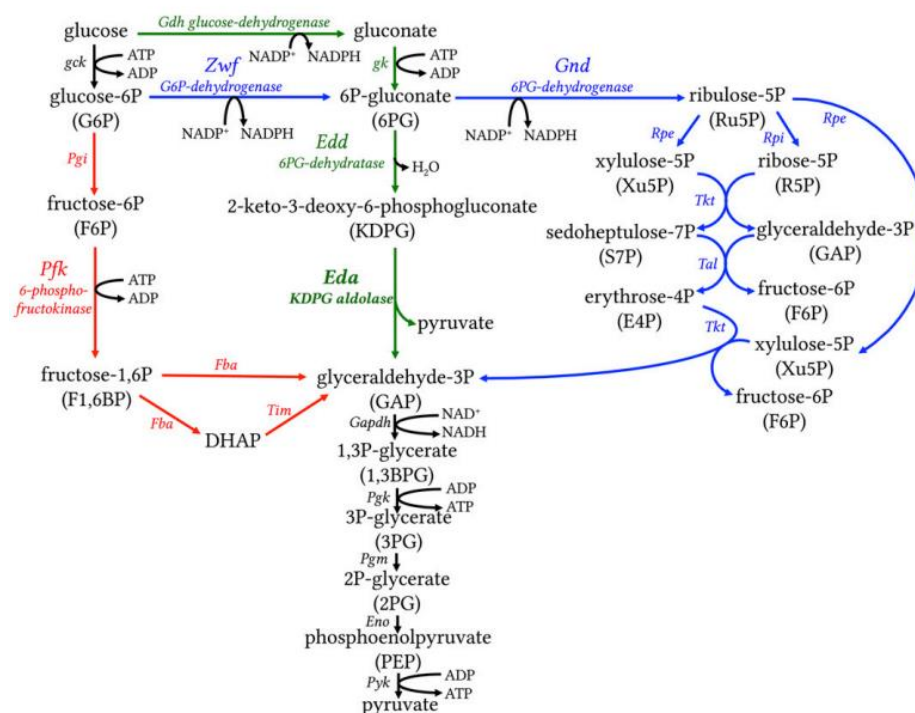


Figure 5 : Les voies de la dégradation du glucose.

La glycolyse/EM (en rouge) est caractérisée par deux phases : une phase dite « d'investissement » et la phase de « remboursement ». Pendant la phase d'investissement, le glucose est converti en glucose-6-phosphate (G6P) → fructose-6-phosphate (F6P) → fructose-1,6-phosphate (F1,6P) → glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) + dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Deux molécules d'ATP sont consommées. La phase de « remboursement » produit quatre molécules d'ATP par la phosphorylation des molécules d'adénosine diphosphate (ADP). La glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) est convertie en 1,3-bisphosphoglycérate (1,3BPG) → 3-phosphoglycérate (3PG) → 2-phosphoglycérate (2PG) → phosphoénolpyruvate (PEP) → pyruvate. La glycolyse fait intervenir deux coenzymes, indispensables à l'oxydation du glucose. Ce couple oxydo-réducteur est représenté par la coenzyme oxydée nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et sa forme réduite NADH. La voie de Entner–Doudoroff (en vert) convertit le glucose en gluconate par le glucose déshydrogénase (GD). Gluconate est à son tour converti en 6-Phosphogluconate (6PG) puis en 2-céto-3-déoxyphosphogluconate (CDPG). CDPG aldolase est l'enzyme clé de la voie ED et catalyse la synthèse du pyruvate. La voie des pentoses phosphate (en bleu). La phase oxydative de la PPP permet la conversion du G6P en R5P et la réduction du NADP⁺ en NADPH. La deuxième phase est non-oxydative et rejoint la voie de la glycolyse par la synthèse du F6P et de la G3P à partir du E4P. (Chen *et al.*, 2016)

4. Le cycle de Krebs

La quatrième voie métabolique essentielle à la production de l'énergie et de la biomasse est le cycle de Krebs. Il a eu lieu chez les procaryotes et dans la mitochondrie des cellules eucaryotes (Fig. 7). Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique permet l'oxydation complète ou partielle du pyruvate sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) et de molécules d'eau. Il donc est directement impliqué dans le processus de respiration chez les cellules eucaryotes. Il est à noter la présence d'un cycle appelé cycle du glyoxylate chez les plantes, les champignons et certaines levures. Cette voie métabolique est dérivée du cycle de Krebs et participe à l'anabolisme des lipides et des glucides. L'enzyme isocitrate lyase catalyse la production du glyoxylate avec la formation d'une molécule de succinate. Le glyoxylate est convertie est malate par la malate synthase et consomme une molécule d'acétyl-CoA.

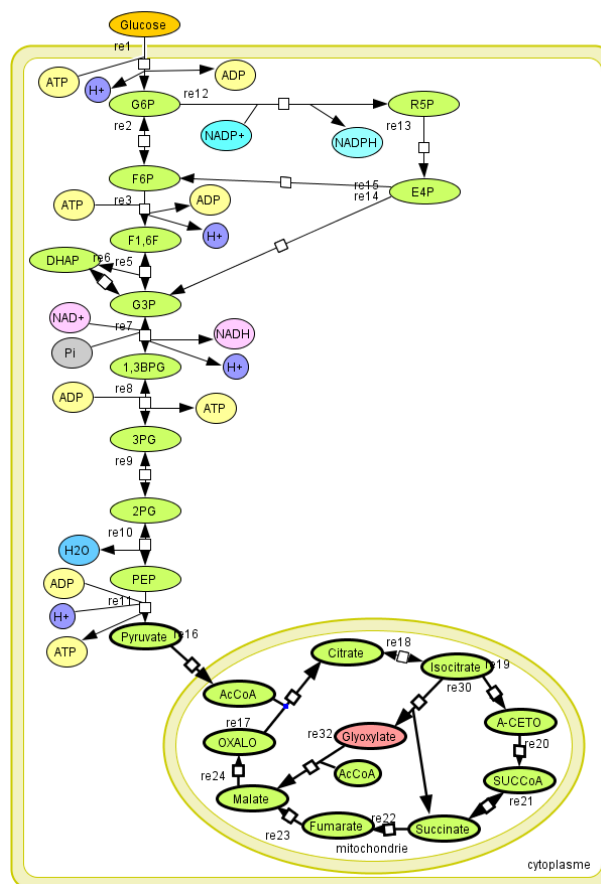


Figure 6 : Le cycle de Krebs.

La première étape du cycle est le transfert d'un groupement acétyle sur une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate. Le citrate est converti en isocitrate par isomérisation. Le cycle de Krebs se poursuit par des étapes d'oxydation et de décarboxylation et libération de molécules de CO_2 . L' α -cétoglutarate (A-CETO) est produit par la décarboxylation de l'isocitrate puis est à son tour décarboxylé en Succinyl-CoA (SUCCoA). SUCCoA est convertit en succinate puis fumarate. Le malate est formé par hydratation du fumarate avant d'être converti en oxaloacétate.

Tableau 5 : Le bilan du cycle de Krebs.

Consommation (mol)	Production (mol)
Pyruvate + 4 NAD ⁺ + ADP + Pi + 2 H ₂ O	→ 4 NADH + ATP + 3 CO ₂

IV. Le métabolisme central du carbone et la production de la biomasse

Le métabolisme central du carbone (MCC) permet de convertir la plupart des ressources carbonées, principalement les sucres, en précurseurs métaboliques pour la synthèse de macromolécules et énergies nécessaires à la production de la biomasse. Des études récentes ont montré l'aspect évolutif du MCC du point de vue de la gestion énergétique par rapport aux ressources disponibles pour la synthèse de la biomasse (Noor *et al.*, 2013). Les auteurs ont appliqué une approche computationnelle pour étudier les principes qui régissent la structure du MCC de *Escherichia coli*. Ils ont montré que les réseaux métaboliques qui composent le MCC (glycolyse, PPP et le cycle de Krebs) sont reliés les uns aux autres de telle façon à minimiser le nombre de réactions possibles entre deux précurseurs de la biomasse. Parmi les douze métabolites clés identifiés dans ces voies métaboliques, sept font partie de la glycolyse, trois métabolites du cycle de Krebs et deux précurseurs appartiennent à la voie des pentoses phosphates (Tab. 5). Tous ces métabolites semblent obéir à cette règle de nombre de réaction minimum entre deux précurseurs, à l'exception de 1,3-biphosphoglycérate (1,3-BPG). Néanmoins la présence de ce métabolite dans la glycolyse est justifiée par son rôle dans la génération nette de la première molécule d'ATP dans la phase de « remboursement » de la glycolyse.

Tableau 6 : Les précurseurs de la biomasse chez *E. coli*.
(Noor *et al.*, 2013)

Métabolites précurseurs	Abréviation	Macromolécules (biomasse)
Glucose-6-phosphate	G6P	Glycogène
Fructose-6-phosphate	F6P	Paroi cellulaire
Ribose-5-phosphate	R5P	Acides aminés, nucléotides
Erythrose-4-phosphate	E4P	Acides aminés
Glyceraldéhyde-3-phosphate	G3P	Lipides

3-Phosphoglycérate	3PG	Acides aminés
Phosphoénolpyruvate	PEP	Acides aminés
Pyruvate	PYR	Acides aminés
Acétyl-CoA	ACoA	Lipides
Alpha-Cétoglutarate	AKG	Acides aminés
Succinyl-CoA	SCoA	Acides aminés, hème
Oxaloacétate	OXA	Acides aminés, nucléotides

1. Précurseurs pour la synthèse des polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères de glucides liés entre eux par des liaisons osidiques. Ils sont classés selon leur structure : les polysaccharides constitués d'un seul type d'unité sont appelés des homopolysaccharides. C'est le cas de la cellulose, le glycogène ou encore de l'amidon qui sont des polymères de glucose. Les hétéropolysaccharides tels que les glycosaminoglycanes et les hémicelluloses sont, quant à eux, composés de plusieurs types d'unités. Les polysaccharides sont aussi classés selon leur fonction biologique. Certains tels que le glycogène, présents dans les cellules animales, levures, et bactéries, ainsi que l'amidon, chez les végétaux, sont des réserves de glucose alors que la cellulose assure une fonction de structure (Moussard, 2006). A titre d'exemple, chez *Escherichia coli*, mais aussi chez certaines levures, le glucose-6-phosphate (G6P) est le principal précurseur pour la synthèse du glycogène alors que le fructose-6-phosphate (F6P) est utilisé pour la synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire composant les peptidoglycanes/muréine (Noor *et al.*, 2013).

2. Précurseurs pour la synthèse des nucléotides

Le principal précurseur métabolique pour la synthèse des bases nucléotidiques et coenzymes énergétiques est le ribose-5-phosphate (R5P) (Fig. 8). Ce métabolite de la voie des pentoses phosphate est à la base des nucléotides nécessaires à la duplication de l'ADN et de la synthèse de l'ARN pendant la division cellulaire. Le R5P permet aussi le maintien d'un pool de coenzymes nécessaires aux réactions d'oxydoréduction (NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, FAD/FADH_2) ou aux transferts de groupements énergétiques (ADP/ATP , AMP/IMP). De même, l'inosine monophosphate (IMP) joue aussi un rôle important dans le métabolisme puisqu'il constitue un carrefour pour la synthèse d'autres nucléotides énergétiques et constitue

une source d'azote pour certaines levures, de par la présence d'un groupement amine (Beopoulos *et al.*, 2009; SGD, 2018).

3. Précurseurs pour la synthèse des acides aminés

Les acides aminés du métabolisme des cellules procaryotes et eucaryotes sont majoritairement synthétisés à partir des métabolites intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs. Les cellules animales, levures et bactéries plantes synthétisent tous les acides aminés, pour lesquels ils ne sont pas auxotrophes, à partir des intermédiaires du MCC (Noor *et al.*, 2010). Les acides aminés essentiels sont apportés par les ressources nutritives. Par exemple, la glutamate déshydrogénase catalyse la conversion du α -cétoglutarate en glutamate et utilise le NH_4^+ comme source pour la fonction amine. Le glutamate est à son tour converti en glutamine par la glutamine synthétase. Une molécule d'ATP est nécessaire pour le transfert d'une autre fonction amine lors de cette réaction.

4. Précurseurs pour la synthèse des lipides

La biosynthèse des lipides chez les procaryotes et les eucaryotes a lieu dans le cytoplasme. Elle utilise le 1,3-biphosphoglycérate et l'acétyl-CoA comme précurseurs principaux et passe d'abord par la synthèse des acides gras à longue chaîne (Fig. 7). L'acétyl-CoA est le précurseur pivot dans la biosynthèse des acides gras. Chez les eucaryotes, une molécule d'acétyl-CoA est transportée de la mitochondrie vers le cytosol par l'intermédiaire du citrate. L'ATP citrate lyase, présente chez les cellules animales et certaines levures oléagineuses notamment, clive une molécule de citrate en oxaloacétate et acétyl-CoA en utilisant de l'énergie issue de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La biosynthèse des acides gras est initiée par la décarboxylation de l'Acétyl-CoA en malonyl-CoA (Cook, 1996). Cette réaction est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé dans l'accumulation des lipides chez les cellules eucaryotes. L'acide gras synthase (FAS) permet ensuite des condensations successives de malonyl-CoA sur les molécules d'acétyl-CoA. Ce complexe enzymatique catalyse, à lui seul, plusieurs réactions intermédiaires jusqu'à la formation de l'acide palmitique (Rock *et al.*, 1996; Salati et Goodridge, 1996). La synthèse des acides gras est demandeuse en énergie sous forme d'ATP et de NADPH. Cet équivalent réduit est principalement fourni par la voie des pentoses

phosphates et, dans une moindre mesure, par la réaction de conversion du malate en pyruvate, catalysée par l'enzyme malique. Le malate est généré à partir de l'oxaloacétate issu du clivage de citrate. Le tableau 6 résume le bilan de la synthèse du palmitate. Les autres acides gras saturés et acides gras insaturés sont synthétisés à partir du palmitate au niveau du réticulum endoplasmique par l'action des acides gras désaturases (Cook, 1996).

Tableau 7 : Le bilan de la synthèse du palmitate.

Consommation (mol)	Production (mol)
8 Acétyl-CoA + 7 ATP + 14 NADPH → Palmitate + 8 CoA + 7 ADP + 7 Pi + 14 NADP ⁺ + 6 H ₂ O	

Dans ce chapitre nous avons décrit le métabolisme central, principalement celui du carbone, de la plupart des cellules vivantes. Les différentes voies métaboliques décrites ici ne sont pas exprimées systématiquement mais font partie d'un cycle cellulaire et métabolique permettant la survie et la reproduction des cellules. La synthèse des composés constituant la biomasse est soumise à la demande métabolique au cours du cycle cellulaire et contrainte par la disponibilité des ressources nutritives.

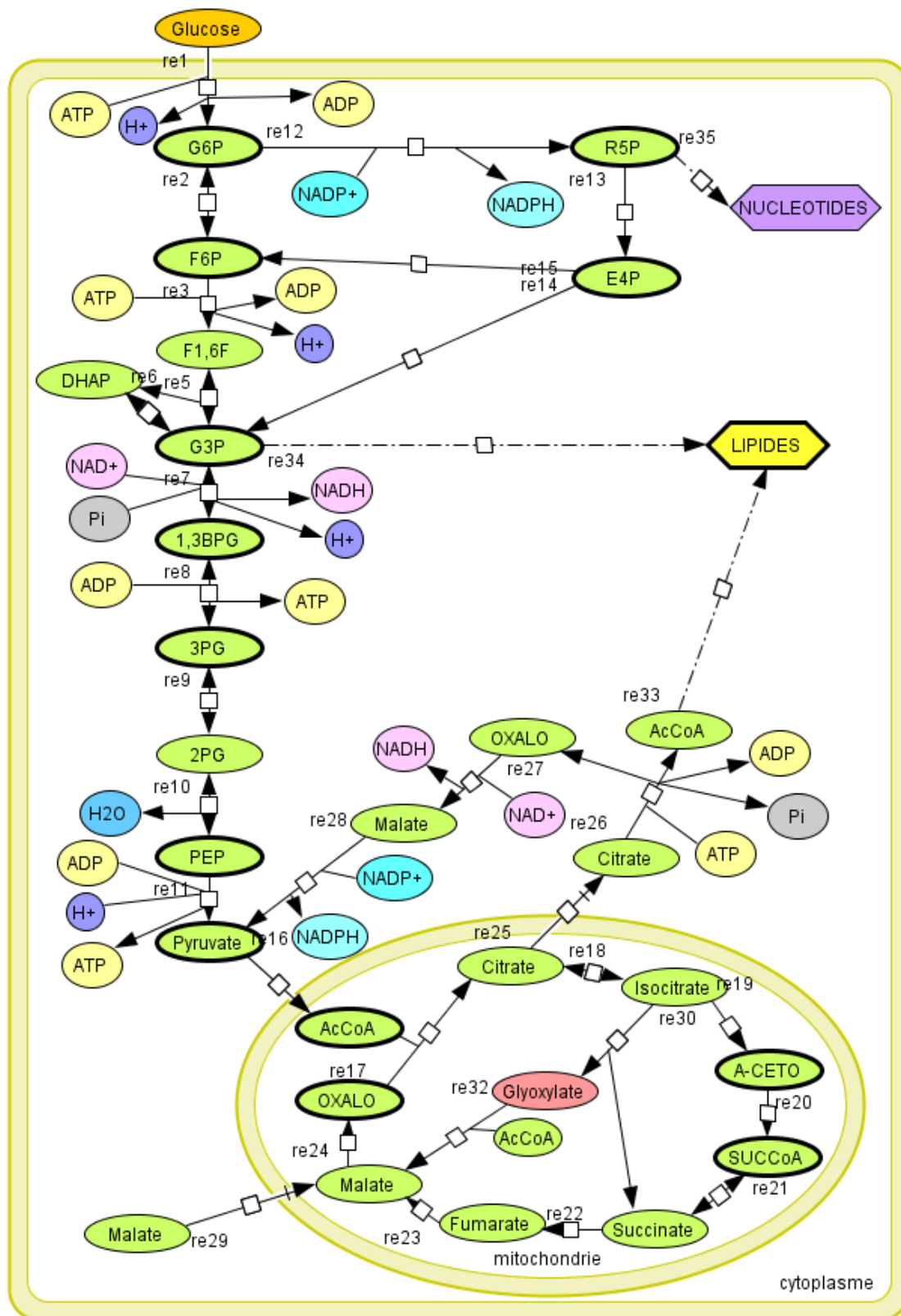


Figure 7 : Le métabolisme central du carbone des cellules eucaryotes.

Références

Acerenza, L., and Graña, M. (2006). On the origins of a crowded cytoplasm. *J. Mol. Evol.* 63, 583–590.

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

Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R., Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., et al. (2016). The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 5441–5446.

Cook, H.W. (1996). Chapter 5 - Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In *New Comprehensive Biochemistry*, D.E. Vance, and J.E. Vance, eds. (Elsevier), pp. 129–152.

Dean, L., and McEntyre, J. (2004). Introduction to Diabetes (National Center for Biotechnology Information (US)).

Entner, N., and Doudoroff, M. (1952). Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas Saccharophil.* *J. Biol. Chem.* 196, 853–862.

Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., and Vazquez, A. (2018). A physical model of cell metabolism. *Sci. Rep.* 8, 8349.

Kamihira, M., Taniguchi, M., and Kobayashi, T. (1987). Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide. *Agric. Biol. Chem.* 51, 407–412.

Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.

Monod, J. (2014). *Le hasard et la nécessité. Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne* (Paris: Points).

Moussard, C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique* (De Boeck Supérieur).

Nelson, U.D.L., and Cox, U.M.M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W. H. Freeman).

Noor, E., Eden, E., Milo, R., and Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Mol. Cell* 39, 809–820.

Noor, E., Flamholz, A., Liebermeister, W., Bar-Even, A., and Milo, R. (2013). A note on the kinetics of enzyme action: A decomposition that highlights thermodynamic effects. *FEBS Lett.* 587, 2772–2777.

Rock, C.O., Jackowski, S., and Cronan, J.E. (1996). Chapter 2 - Lipid metabolism in prokaryotes. In *New Comprehensive Biochemistry*, D.E. Vance, and J.E. Vance, eds. (Elsevier), pp. 35–74.

Salati, L.M., and Goodridge, A.G. (1996). Chapter 4 - Fatty acid synthesis in eukaryotes. In *New Comprehensive Biochemistry*, D.E. Vance, and J.E. Vance, eds. (Elsevier), pp. 101–127.

SGD (2018). *Saccharomyces cerevisiae* de novo biosynthesis of purine nucleotides.

Chapitre II

La transition respiro-fermentaire chez les cellules eucaryotes

Dans le chapitre I nous avons décrit le métabolisme intracellulaire comme étant la résultante d'une balance entre le catabolisme et l'anabolisme. Dans ce chapitre nous verrons que cette dualité s'inscrit dans un programme génétique plus global à travers le cycle cellulaire. Ce cycle cellulaire est aussi un cycle métabolique qui repose sur des transitions entre la fermentation et la respiration cellulaire

I. Le métabolisme énergétique de la chaîne respiratoire

Les mitochondries sont impliquées dans divers processus cellulaires tels que la différenciation et la mort cellulaire (apoptose) ou encore la réponse immunitaire (Mitra *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2015). Cette étude est restreinte au métabolisme mitochondrial et plus précisément à son rôle fondamental dans la production de l'énergie utilisée pour le catabolisme et l'anabolisme. Comme décrit dans le chapitre précédent, les mitochondries constituent les usines énergétiques chez les eucaryotes non-photosynthétiques. Elles mobilisent les enzymes nécessaires au bon fonctionnement du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et sont impliquées dans la gestion de l'équilibre redox. Les mitochondries utilisent l'oxygène pour extraire l'énergie des nutriments trouvés dans l'environnement cellulaire ou stockés sous formes de macromolécules intracellulaires comme le glycogène et résulte en la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) par phosphorylation de l'adenosine diphosphate (ADP). Ce processus est appelé la phosphorylation oxydative et a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

1. La chaîne respiratoire « classique » des cellules eucaryotes

Peter D. Mitchell propose en 1961 la théorie chimiosmotique pour expliquer la synthèse de l'ATP par le mécanisme phosphorylation oxydative. Cette théorie suggère que la production de l'ATP est rendue possible grâce au gradient de protons qui se constitue de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie grâce à une ATPase qui catalyse la réaction (Mitchell, 1961). Les protéines qui constituent cette chaîne respiratoire favorisent la création de ce gradient de protons grâce à l'énergie des couples redox (NAD^+/NADH et FAD/FADH_2) présents dans la matrice mitochondriale et apportée par le catabolisme des ressources carbonées. L'ATPase profite de ce gradient électrochimique aussi appelé force proton-motrice pour la phosphorylation de l'ADP en une molécule d'ATP.

La chaîne respiratoire ou chaîne de transport des électrons des cellules eucaryotes est essentiellement constituée d'enzymes et de co-enzymes impliquées dans le transfert des électrons et la synthèse d'ATP. On peut distinguer quatre complexes protéiques (CI-IV)

constituant la chaîne de transport des électrons et la réduction de l'oxygène et le complexe V qui est l'ATP synthase (Fig. 8) (Schultz and Chan, 2001).

a. Complexe I

Le complexe I de la chaîne respiratoire est une oxydoréductase ou NADH déshydrogénase. Il est situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et largement décrit chez les cellules animales mais absent chez certains eucaryotes dont le plus étudié est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette enzyme récupère deux électrons par molécule de NADH oxydée dans la matrice mitochondriale et pompe quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Les électrons sont transférés du complexe I au couple redox ubiquinone/ubiquinol (Q/QH₂) présent dans la structure lipidique de la membrane interne. Le bilan de la réaction catalysée par le complexe I est donné dans le tableau 1. Comme c'est le cas pour la plupart des réactions impliquant des couples rédox, les électrons sont transférés entre des espèces oxydo-réductrices de potentiel rédox différents. Ce dernier point est important dans le mécanisme de respiration cellulaire mitochondriale puisque l'état rédox du complexe I ou du couple Q/QH₂ peut conditionner le cycle de Krebs à travers l'oxydation du NADH et le turnover du NAD⁺. De plus l'énergie libérée par cette réaction ($\Delta G^\circ = -67,5 \text{ kJ/mol}$) permet de pomper les protons à travers la membrane interne et participe à la genèse du gradient électrochimique ($\Delta\Psi$) (Mazat *et al.*, 2013). Le complexe I est également utilisé comme modèle pour l'étude de la respiration mitochondriale. Elle est la cible d'espèces chimiques très réactives qui jouent le rôle d'inhibiteurs spécifiques du complexe I. Parmi ces molécules on peut citer la roténone ou encore la metformine (Viollet *et al.*, 2012).

b. Complexe II

Le complexe II de la chaîne respiratoire est une succinate déshydrogénase, la même enzyme qui intervient dans une étape du cycle de Krebs et catalyse la conversion du succinate en fumarate (Cecchini, 2003; Lancaster *et al.*, 1999; Mazat *et al.*, 2013). *S. cerevisiae* utilise ce complexe pour sa respiration. Cette enzyme récupère l'électron du succinate et le transfère au couple redox Q/QH₂ (Cecchini, 2003). L'une des spécificités du complexe II par rapport aux autres complexes de la chaîne respiratoire est qu'il est le seul qui ne soit pas électrogénique (Cecchini, 2003). En effet le complexe II n'est pas une pompe à protons et participe donc pas à la création du gradient électrochimique. Le bilan réactionnel est donné dans le tableau 8. Les

inhibiteurs de ce complexe sont des métabolites tels que malonate et l'oxaloacétate (Dervartanian and Veeger, 1964).

c. Complexe III

Le complexe III ou cytochrome *c* réductase est une oxydoréductase. Il est constitué de plusieurs groupement protéiques, notamment chez les cellules eucaryotes où l'on peut identifier la présence d'un cytochrome *c*₁, deux cytochromes et une ferrédoxine. Ces groupements protéiques catalysent, à tour de rôle, le transfert des électrons récupérés de l'ubiquinol au ferricytochrome *c* présent dans la bicouche lipidique de la membrane interne (Fig. 8 et Tab. 8). Le complexe III est électrogénique puisqu'il participe au gradient électrochimique. Deux protons sont consommés par le complexe enzymatique dans la matrice mitochondriale alors que quatre protons sont récupérés dans l'espace intermembranaire. Le principal inhibiteur du complexe III est l'antimycine A. Cette molécule couramment utilisée pour étudier la respiration des cellules eucaryotes et la contribution du complexe III pour la phosphorylation oxydative (Huang *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2011).

d. Complexe IV

Le complexe IV ou cytochrome *c* oxydase est le dernier complexe participant au transfert des électrons. Il catalyse le transfert des électrons de la forme réduite du cytochrome *c* au dioxygène (O₂) qui devient l'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire. Deux molécules d'eau sont formées à travers cette réaction et quatre protons sont pompés vers l'espace intermembranaire. Cette enzyme a été particulièrement étudiée, notamment pour la compréhension des mécanismes permettant à la fois la réduction de l'oxygène en molécules d'eau et le flux des protons à travers la structure protéique. Il a été démontré le rôle pivot des groupes prosthétiques. Ces groupes prosthétiques métalliques forment deux centres redox cuivres (Cu_A et Cu_B) et deux centres hème (hème *a* et hème *a*₃). Cu_B et hème *a*₃ sont physiquement proches et forment un centre bi-nucléaire où se déroule l'oxydation du dioxygène. Cu_A est quant à lui le premier accepteur d'électron du cytochrome *c* alors que l'hème *a* sert d'intermédiaire pour le transfert d'électron entre Cu_A et le centre bi-nucléaire pour la réduction du dioxygène (Schultz and Chan, 2001). Les cyanures sont les principaux inhibiteurs du complexe IV (Tsubaki and Yoshikawa, 1993).

e. Complexe V

Le complexe V de la chaîne respiratoire est l'ATP synthase (F₁F₀-ATPase). Elle se situe dans la membrane mitochondriale interne et utilise le gradient électrochimique pour catalyser la synthèse d'une molécule d'ATP à partir d'ADP et du phosphate inorganique (Pi). Le complexe est constitué de deux domaines protéiques F₀ et F₁ qui agissent comme des turbines pour permettre le flux de proton (Schultz and Chan, 2001). La rotation de ces sous-unités fournit l'énergie nécessaire pour la synthèse d'ATP. Les études expérimentales montrent que trois à quatre protons sont pompés à travers le complexe V pour la synthèse d'une molécule d'ATP (Tomashek et Brusilow, 2000). L'ATP synthase est réversible puisqu'elle peut aussi catalyser l'hydrolyse d'ATP par rotation inverse des sous-unités F₀-F₁ (Boyer, 1993). L'oligomycine est le principal inhibiteur utilisé pour étudier l'activité de l'ATP synthase mitochondriale (Hong et Pedersen, 2008).

f. Autres oxydo-réductases

Il est à souligner l'existence d'autres oxydo-réductases chez certains organismes eucaryotes. Il a été mis en évidence la présence d'oxydases cytosoliques et mitochondriales chez certaines plantes et champignons. La plupart sont des NADH oxydases différentes du complexe I, qui transfèrent leurs électrons au couple Q/QH₂ mais ne contribuent pas au gradient électrochimique (Borecký et Vercesi, 2005). De même, il a été démontré la présence d'oxydases alternatives (AOX) chez les plantes ainsi que chez certaines levures et champignons (Fig. 9). Les AOXs ont la même fonction que le complexe IV puisqu'ils récupèrent les électrons de l'ubiquinol (QH₂) pour réduire les molécules de dioxygène (Sluse et Jarmuszkiewicz, 1998, 2000). Le rôle exact des AOXs est encore débattu mais des études montrent leur contribution à la résistance aux stress oxydatifs chez les plantes et levures (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012; Maxwell *et al.*, 1999). Des inhibiteurs décrits comme spécifiques aux AOXs tels que la n-propylgallate (nPG) et l'acide salicylhydroxamique (SHAM) (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012; Garcia-Neto *et al.*, 2017).

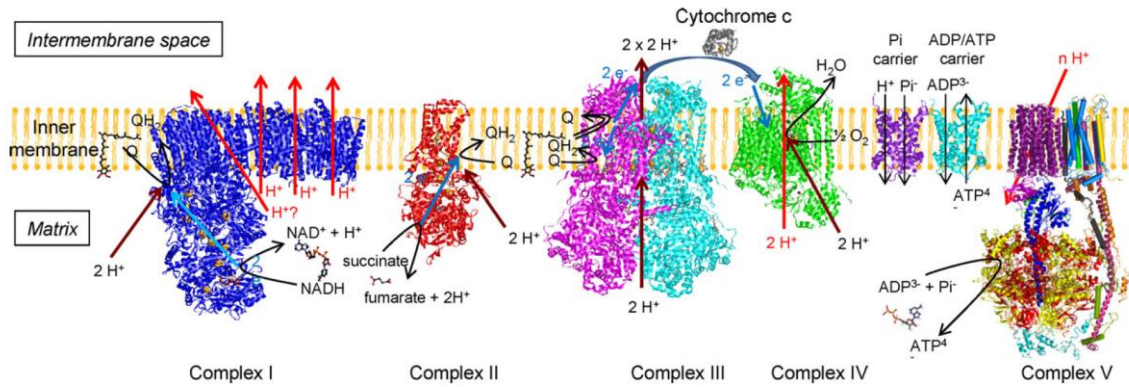


Figure 8 : La chaîne respiratoire classique.
(Mazat *et al.*, 2013)

Tableau 8 : Le bilan énergétique des réactions de la chaîne respiratoire.
(Mazat *et al.*, 2013)

complex	Electron donor	Electron acceptor	Mitochondrial electron donor concentrations ratio	Mitochondrial electron acceptor concentrations ratio	$E_{n,7}$ donor (mV)	$E_{n,7}$ acceptor (mV)	$\Delta G'$ (kJ/mol)
I	NADH/NAD ⁺	Q/QH ₂	0.14 (12% reduced) (11)	0.76 (57% reduced) (10)	-294	56	-67.5
II	Succinate/fumarate	Q/QH ₂	2 (67% reduced)	0.76 (57% reduced) (10)	21	56	-6.9
III	QH ₂ /Q	2 Cytochrome c (ox/red)	1.3 (57% reduced) (10)	1.5 (40% reduced) (10)	56	231	-33.8
IV	2 Cyt. c (red/ox)	1/2 O ₂ /H ₂ O	0.66 (40% reduced) (10)	5.4 10 ⁻⁵ (100% reduced)	231	754	-100.9
I + III + IV	NADH/NAD ⁺	1/2 O ₂ /H ₂ O	0.14 (12% reduced) (11)	5.4 10 ⁻⁵ (100% reduced)	-267	754	-202.2
II + III + IV	Succinate/fumarate	1/2 O ₂ /H ₂ O	2 (67% reduced)	5.4 10 ⁻⁵ (100% reduced)	21	754	-141.6

^a Concentration ratios without reference have been estimated.

2. Les étapes limitantes de la phosphorylation oxydative

Les études expérimentales et mathématiques ont permis de proposer des modèles et expliquer les mécanismes de la respiration mitochondriale. Cependant, il est encore difficile, de nos jours, de proposer un acteur majeur de la respiration et de la production d'énergie de la cellule à travers la phosphorylation oxydative (OxPhos). Cette volonté d'identifier un « contrôleur » majeur de l'OxPhos a débuté dans les années 70-80 (Mazat *et al.*, 2013), notamment grâce aux apports du *Metabolic Control Theory* (MCT) (Heinrich et Rapoport, 1974; Kacser et Burns, 1995; Reder, 1988). Les candidats étaient alors la cytochrome oxydase (complexe IV), l'ATP

synthase (complexe V) et la translocase ATP/ADP mitochondriale puisque leurs inhibitions provoquaient une diminution de l'OxPhos (Bohnensack *et al.*, 1982; Kholodenko, 1984). Par la suite, des travaux sur des mitochondries isolées des cellules de foie ont bien mis en évidence des protéines limitantes de la respiration mais cette limitation dépendait principalement de l'état énergétique de la cellule (Bohnensack *et al.*, 1982). En résumé, dans la phase active de l'OxPhos, l'approvisionnement en protons par l'oxydation du NADH ainsi que le travail des pompes/complexes constituent l'étape limitante. En phase stationnaire de la respiration, la fuite des protons à travers la membrane interne (découplage mitochondrial classique ou induite par des agents chimiques – FCCP ou CCCP) a été proposée comme limitante pour l'OxPhos. Enfin, lorsque la demande énergétique de la cellule se trouve réduite, l'activité de l'ATP translocase devient le facteur limitant l'OxPhos.

Toujours dans un souci de caractérisation du ou des contrôleurs de la respiration mitochondriale, des études plus récentes ont mis en lumière le rôle primordial de l'oxygène et de l'état rédox de la membrane mitochondriale interne (Reynafarje et Ferreira, 2008). Les auteurs ont réalisé une étude globale de la respiration de mitochondries isolées de cellules de rat. Ils ont étudié le flux d'électrons le long de la chaîne respiratoire, la translocation des protons à travers les différents complexes, la consommation en oxygène et la synthèse d'ATP. Les auteurs concluent que la disponibilité en oxygène, combinée au flux d'électrons, est le facteur principal qui rythme la phosphorylation oxydative.

3. Le rôle potentiel des groupes prosthétiques dans la transition respiro-fermentaire

Comme décrit précédemment, les complexes de la chaîne respiratoire se comportent comme de véritables condensateurs biologiques, par analogie avec les circuits électriques. Ils ont la capacité de stocker les électrons récupérés du NADH ou du succinate par l'intermédiaire du FAD. En 1964, le chercheur John Rieske qui étudiait alors l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire a isolé une sous-unité de ce même complexe. Il a mis en évidence la présence d'un agrégat atomique fer-soufre sur cette apoprotéine (Rieske *et al.*, 1964). Cette composante du complexe III est devenue depuis la protéine de Rieske alors que d'autres protéines ont été identifiées et assimilées à la protéine de Rieske en raison de la présence du cluster fer-soufre [Fe-S]. C'est le cas pour les complexes I et II de la chaîne respiratoire (Cecchini, 2003; Sazanov et Hinchliffe, 2006) mais aussi pour l'aconitase (Lauble *et al.*, 1992) qui sont eux aussi constitués d'un ou de plusieurs centres [Fe-S]. La question qui peut se poser est l'impact qu'une

inhibition de ces clusters peut avoir sur la respiration cellulaire. Peu d'études ont été consacrées à cette problématique mais quelques-unes se sont intéressées à la protéine Rieske. Graham et Trumpower (1991) ont réalisé des mutations dans les domaines conservés de la protéine Rieske chez la levure *S. cerevisiae*. Ils ont observé que des mutations dirigées sur des codons d'acides aminés connus pour interagir spécifiquement avec le cluster [2Fe-2S] et présents exclusivement chez les organismes aérobies conduisent à une incapacité de ces mutants à utiliser des sources de carbone non-fermentescibles pour leur croissance (Graham et Trumpower, 1991). Comme décrit plus haut, ce groupe prosthétique qui constitue le cytochrome *bc1* (complexe III) est le premier accepteur d'électrons émis par l'ubiquinol (Q) et participe à la création de la force motrice par transfert de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. D'autres études soulignent l'importance du cluster [2Fe-2S] dans le maintien de la phosphorylation oxydative. Diaz *et al.* ont notamment démontré que l'absence de la protéine Rieske (par inactivation du gène codant cette protéine) dans les fibroblastes provoque une diminution de la synthèse des complexes I et IV et une déficience de l'OxPhos (Diaz *et al.*, 2011). Ces clusters [Fe-S] ne sont pas les seuls groupes prosthétiques à jouer un rôle majeur dans l'activité respiratoire. Les centres rédox cuivre (Cu_A et Cu_B) et hèmes du complexe IV, impliqués dans le transfert d'électrons et réduction de l'oxygène, ont un rôle pivot dans le maintien de l'activité des autres complexes de la chaîne respiratoire (Schäfer *et al.*, 2006). De même, il a été mis en évidence récemment que l'activité du complexe IV est dépendante de la présence de protéines inductrices d'hypoxie chez les levures et les cellules animales (Chen, 2012; Strogolova *et al.*, 2012). De manière intéressante, ces protéines qui font partie de la famille des *Hypoxia-induced Factor* (HIF) ne régulent pas l'expression du complexe IV mais plutôt la formation de supercomplexes ou respirasomes (Lenaz et Genova, 2012; Vartak *et al.*, 2013). Cela permettrait aux cellules de s'adapter à l'utilisation de tel ou tel substrat et ainsi d'optimiser le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire (Lapiente-Brun *et al.*, 2013).

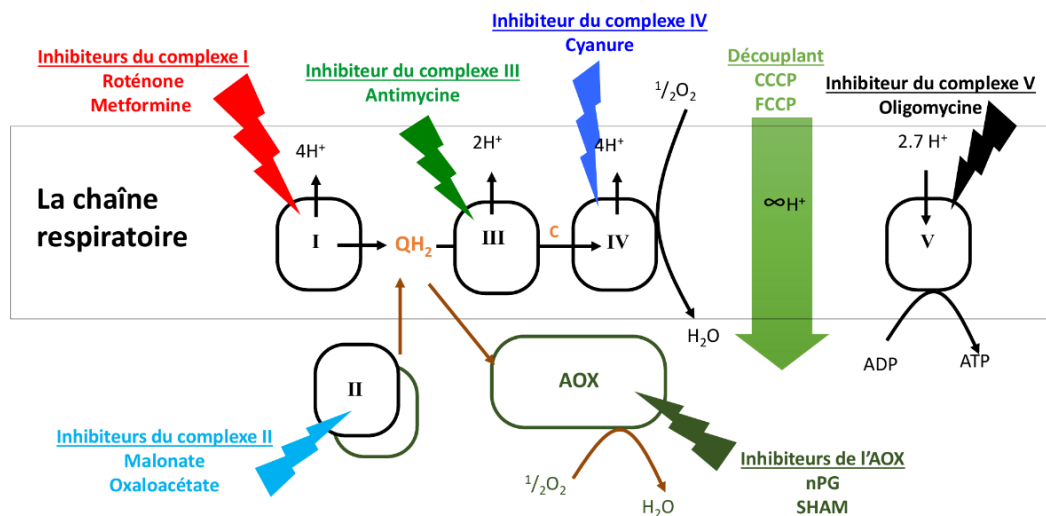


Figure 9 : La chaîne respiratoire incluant la voie alternative (AOX) et des inhibiteurs spécifiques.

II. Les transitions métaboliques au cours du cycle cellulaire

Cette partie a été traitée dans notre revue de Veiga Moreira *et al.* (2015) TBioMed. Nous en résumons ici les points essentiels.

Le cycle cellulaire comprend l'ensemble des mécanismes qui permettent la réplication du matériel génétique et la division d'une cellule en deux cellules identiques. Ce cycle est essentiel à la croissance et à la régénération des organismes eucaryotes. Alma Howard et Stephen Pelc sont les premiers à avoir mis en évidence, dans les années 1950, une fréquence et un « timing » précis de la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire chez les plantes (Howard et Pelc, 1953). Ainsi, ils ont proposé l'existence de quatre périodes dans un cycle cellulaire : la première phase de croissance dite *gap1* (G1), la phase de synthèse de l'ADN (S), la deuxième phase de croissance dite *gap2* et la division cellulaire (mitose). Cette compréhension du cycle cellulaire comme un enchaînement d'événements moléculaires caractérisables, principalement par le marquage de l'ADN, a permis d'identifier des points de régulation génétiques et moléculaires (Nurse, 1990). Ces régulations ont été mises en évidence dans les années 1980 avec l'étude des mutations chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*, et *Schizosaccharomyces pombe*. Paul Nurse et Leland Hartwell ont identifié des gènes pivots dans la régulation du cycle cellulaire chez ces deux levures. La mutation de gènes codant pour des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK) arrêtent le cycle cellulaire à différentes phases (Nurse, 1990; Russell et Nurse,

1987). Ainsi, les interactions, dégradations et inhibitions des cyclines et des CDKs jouent un pivot dans la progression du cycle cellulaire des cellules eucaryotes (Sausville, 2002). Néanmoins, comme décrit précédemment, les ressources métaboliques sont indispensables à la synthèse du matériel génétique, des protéines et des lipides pour la duplication de la masse cellulaire et la division d'une cellule en deux cellules identiques (Jones *et al.*, 2005; Noor *et al.*, 2010). Jones *et al.* ont montré que les cellules animales ont des points de régulations du cycle cellulaire dépendantes de la disponibilité du glucose dans le milieu de culture. Ce point de régulation se trouve en G1/S et régulé par l'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), une protéine kinase impliquée dans le contrôle de la balance énergétique chez les cellules animales. Il a été démontré que l'AMPK inhibe le cycle cellulaire lorsqu'une carence en glucose est induite dans le milieu de culture.



REVIEW

Open Access

Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators



Jorgelindo da Veiga Moreira¹, Sabine Peres², Jean-Marc Steyaert¹, Erwan Bigan¹, Loïc Paulevé^{1,2}, Marcel Levy Nogueira^{1,3} and Laurent Schwartz^{1*}

* Correspondence:
laurent.schwartz@polytechnique.edu
¹Ecole Polytechnique, LIX-UMR
7161, Palaiseau, France
Full list of author information is
available at the end of the article

Abstract

The different phases of the eukaryotic cell cycle are exceptionally well-preserved phenomena. DNA decompaction, RNA and protein synthesis (in late G₁ phase) followed by DNA replication (in S phase) and lipid synthesis (in G₂ phase) occur after resting cells (in G₀) are committed to proliferate. The G₁ phase of the cell cycle is characterized by an increase in the glycolytic metabolism, sustained by high NAD⁺/NADH ratio. A transient cytosolic acidification occurs, probably due to lactic acid synthesis or ATP hydrolysis, followed by cytosolic alkalization. A hyperpolarized transmembrane potential is also observed, as result of sodium/potassium pump (NaK-ATPase) activity. During progression of the cell cycle, the Pentose Phosphate Pathway (PPP) is activated by increased NADP⁺/NADPH ratio, converting glucose 6-phosphate to nucleotide precursors. Then, nucleic acid synthesis and DNA replication occur in S phase. Along with S phase, unpublished results show a cytosolic acidification, probably the result of glutaminolysis occurring during this phase. In G₂ phase there is a decrease in NADPH concentration (used for membrane lipid synthesis) and a cytoplasmic alkalization occurs. Mitochondria hyperfusion matches the cytosolic acidification at late G₁/S transition and then triggers ATP synthesis by oxidative phosphorylation. We hypothesize here that the cytosolic pH may coordinate mitochondrial activity and thus the different redox cycles, which in turn control the cell metabolism.

Keywords: Cell cycle, CCM, REDOX, Intracellular pH, ATP/ADP, NAD(P)⁺/NAD(P)H, HATs, HDACs

Background

For several years now, a number of studies have been conducted, in the field of the bioenergetic origin of life [1]. Bioenergetics consists in converting nutrients such as carbohydrates, lipids, and proteins, into intermediate metabolites as well as energy for cell survival and finally into *de novo* building blocks such as nucleic acids, proteins and lipids for cell proliferation. More broadly, cell metabolism is the sum of all the chemical reactions and dynamic exchanges between a cell and its microenvironment. Eukaryotic cells, at least, exhibit two opposite metabolisms: anabolic reactions, which consist in biomass synthesis and catabolic reactions, leading to the breakdown of macromolecules for energetic use. These two aspects of cell metabolism are managed by biochemical and biophysical oscillators, including reductive and oxidative (redox) couples, the most important ones being Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺/NADH) and Nicotinamide



© 2015 da Veiga Moreira et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP⁺/NADPH), the universal energy carrier, Adenine Triphosphate (ATP/ADP), the transmembrane potential (V_m) and, last but not least, the intracellular pH (pHi) of the cell. The dynamics of these internal biological rhythms are shown to exhibit oscillatory phenotypes in dividing cells [2].

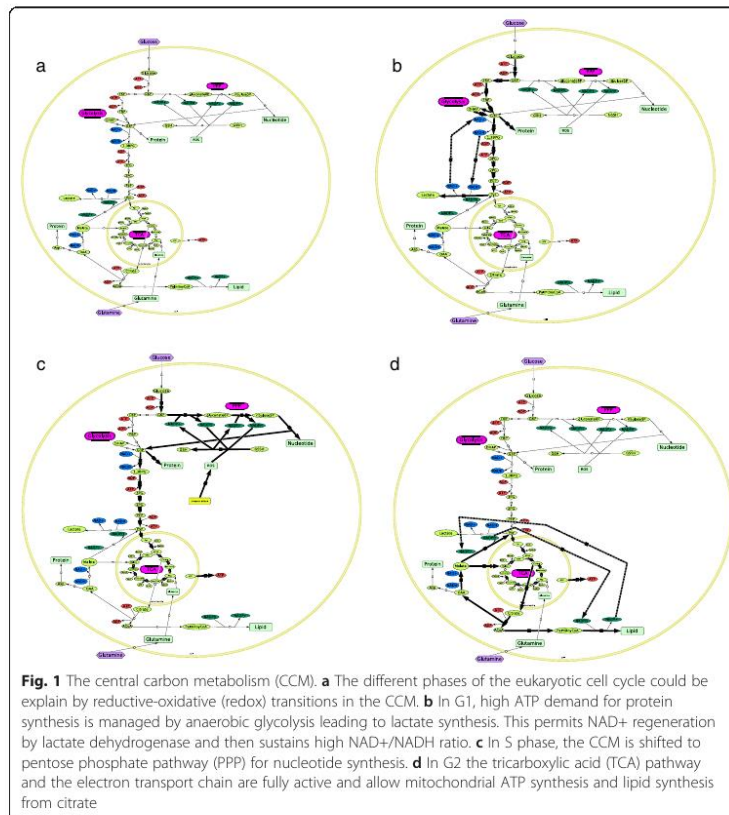
The intriguing metabolic feature of proliferating cells compared with quiescent ones highlights the well-conserved sequential events characterizing the eukaryotic cell cycle. From the point of view of the central carbon metabolism (CCM), (Fig. 1), the quiescent cells (in G₀) have a basal oxidative metabolism, whereas, in proliferating cells, the carbon flux is rewired to biomass synthesis and cell growth [3]. The latter is enhanced by a high glycolytic rate consuming NAD⁺ and ADP species for cytoplasmic glucose conversion into pyruvate, generating NADH and ATP molecules. NADH is oxidized back to NAD⁺ through pyruvate conversion into lactate, termed as the Warburg effect after the German Nobel laureate Otto Warburg, and ATP is used as an energy supplier for RNA and protein synthesis in G₁ of the cell cycle. Glycolysis is then shunted to the pentose phosphate pathway (PPP), generating nucleic acid precursors for DNA replication in the S phase and NADPH reductive species used later on in the cell cycle progression for membrane lipid synthesis in G₂. The G₂ phase is also characterized by full mitochondrial activity, where the citric acid cycle takes place, enabling glucose oxidation and ATP synthesis.

Moreover, current hypothesis support the proton gradient-dependent ATP hydrolysis and synthesis into the cytosol and mitochondria, respectively, as critical events in both transmembrane potential and intracellular pH oscillation during cell cycle. In this study we aim at juxtaposing interesting results confirming the hypothesis of the pivotal role of pHi on mitochondrial activity and the resulting redox oscillations timing the progression of the cell cycle. For that, we first report the redox phenomena involved in central carbon metabolism and how it regulates the metabolic transitions during the cell cycle progression. Secondly, based on literature reports, we highlight intracellular pH role in cell metabolism and its potential involvement in “clocking” transitions during the cell cycle.

Cellular redox transitions in CCM during cell cycle progression

1. The metabolic status of quiescent cells in G₀

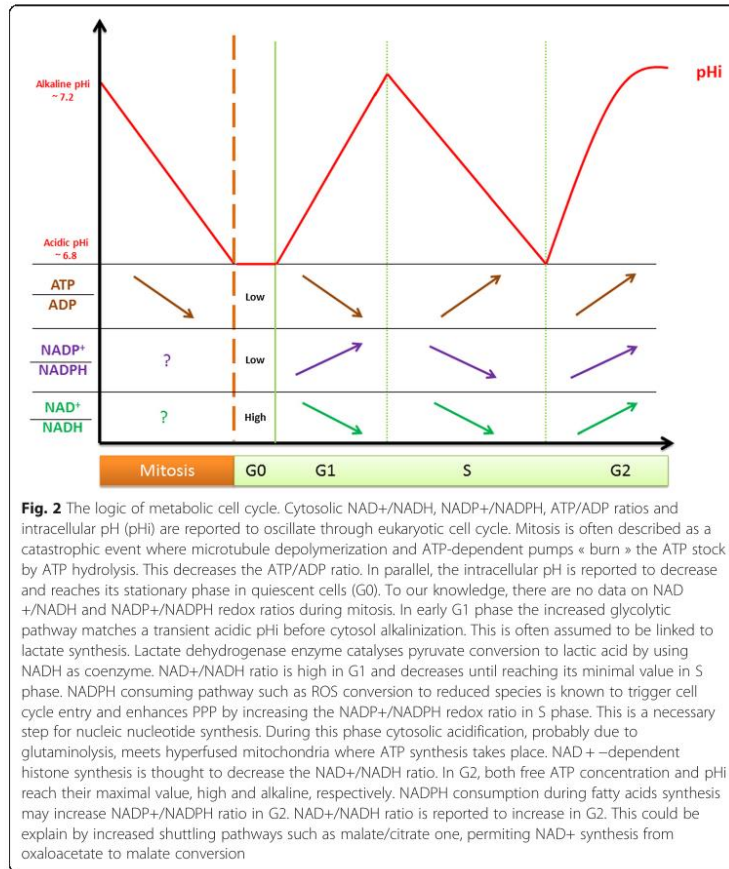
Quiescent cells have a basal oxidative metabolism [3]. They use nutrients such as glucose, protein and fatty acids as main energy supplier to support primary reactions such as amino acids and nucleotide synthesis (see Fig. 1-a) [4]. For that, the glycolytic pathway converts glucose to pyruvate and produces the universal energy transporter in living systems, adenosine triphosphate (ATP). Pyruvate can either be converted into lactate, in the cytosol, or join the tricarboxylic acid (TCA) cycle, taking place in mitochondria. There, ATP is synthesized by oxidative phosphorylation. On the other hand, macromolecules such as proteins and fatty acids are also degraded and join mitochondria for full conversion to ATP, carbon dioxide (CO₂) and water [3]. The electrochemical energies released during these catabolic reactions are captured by electron carrier species such as nicotinamide adenine nucleotide (NAD⁺), converting it to its respective reduced partner (NADH,H⁺). NADH,H⁺ is the electron donor of the mitochondrial electron transport chain (ETC.) during oxidative phosphorylation. It is not clear if NADH



is able to cross the mitochondrial membrane. However, it is reported that specific shuttles such as the malate/citrate shuttle allows mitochondrial NADH regeneration through the TCA cycle [5] (see Fig. 1-a). This basal metabolism allows homeostatic control of high NAD⁺/NADH and low NADP⁺/NADPH redox ratios [6] in resting cells. On the opposite, in proliferating cells, the basal catabolic metabolism is shifted to anabolism and exhibit oscillatory conversion of these redox species for biomass synthesis and cell growth [3] (see Fig. 2).

2. Redox oscillation in dividing cells

2.1. Cell cycle entry into G1 is regulated by the Warburg effect Glycolysis is one of the fundamental pathways of living organisms. It allows the conversion of one molecule of glucose into two pyruvates. During this process, universal energy transporters, such as ATP and NADH, are produced from the oxidative conversion of ADP and NAD⁺, respectively. This pathway is characterized by two phases: the so-called “investment” phase, since it consumes two ATP molecules, and the “payoff” phase, which produces four ATP. The first phase consists in catabolizing one molecule of glucose into two



carbon phosphate derivatives, glyceraldehyde 3-phosphate (G3P). The second one gives two pyruvates that will later play a pivotal role in mitochondria-dependent energy production. In one study, Diaz-Moralli and colleagues (2012) assume that the glycolytic pathway mainly occurs during the first growth phase of the eukaryotic cell cycle (G₁) [7]. Indeed, in G₁ cells grow and synthesize messenger RNA (mRNA) for protein synthesis. Moreover, these studies [8–10] reported the aerobic glycolysis to follow biochemical principles based on “thermodynamic favorability, availability of enzymatic mechanisms and the physicochemical properties of pathway intermediates”, meeting the cells’ energy demands for cell proliferation.

High glycolytic flux in central carbon metabolism (CCM) occurs when quiescent cells are committed to proliferation [3]. High ATP demand for protein synthesis meets high NAD⁺/NADH redox ratio, allowing glycolysis to persist through the fermentative pyruvate to lactate conversion by lactate dehydrogenase enzyme (Fig. 1-b). This

consists in a metabolic switch from oxidative phosphorylation, in quiescent cells, to glycolytic phosphorylation, in non-transformed proliferating cells, entering cell cycle [11, 12]. Calderon-Montano and colleagues [11] highlighted the intracellular pH (pHi) role in regulating glycolytic genes such as phosphofructokinase-1 (PFK-1). Increased pHi such as observed in cancer cells increases biomass (DNA and protein) synthesis. This anabolic metabolism observed in rapidly-proliferating cells results in redox oscillations of cytoplasmic free ATP concentration, as well as the NAD^+/NADH ratio [13, 14] (Fig. 2). It sustains the aerobic glycolysis observed in G1, just as described by Otto Heinrich Warburg in its seminal work on the glycolytic mode of cancer metabolism [15]. Interestingly, recent studies provide explanations of the Warburg effect, from quantitative models of the metabolic shift in cancer cells, which has the same metabolic signature as normal-proliferating cells in G1 phase [16–18]. These are based on analytic rules deciphering the dualistic aspect of proliferating cells metabolism where the abundant resource triggering cell cycle entry favors the glycolytic phenotype, referred as Warburg effect in cancerous tissue. In short, the Warburg effect drives the volumetric growth in G1 by “metabolosomic” biomass synthesis whereas mitochondria activity triggers the surfacic growth.

It is noteworthy that this biphasic growth taking place in proliferating cells is under the control of growth stimuli and redox species oscillation [19, 20]. In mammalian cells, growth factors and their respective receptors are reported to generate ROS and trigger cell cycle entry [7, 21, 22]. Therefore, moderate ROS formation in late G₁ is essential for gene transcription and protein synthesis, by modulating DNA accessibility [7]. In fact, an extensive number of studies support that histone acetylation is a pivotal epigenetic program controlling eukaryotic gene transcription [23–25]. In short, transcriptionally active genes are shown to meet hyperacetylated histones, while the “hypoacetylated histone is associated with transcriptionally repressed genes” [25, 26]. Firstly, it is shown that the cytoplasmic NAD^+/NADH redox ratio optimizes the glycolytic flux (Warburg effect) to ATP and amino acid synthesis. Secondly ATP is used as a supplier of energy for gene transcription and protein synthesis, using these amino acids as building blocks.

2.2. $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio regulates the pentose phosphate pathway In normal proliferating cells, one of the first pathways switched on after aerobic glycolysis, is the pentose phosphate pathway (PPP) (Fig. 1-c). This is the main circuit for DNA precursor synthesis and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) regeneration, a coenzyme used by the cell for lipid synthesis, in G₂, and plays the role of reactive oxygen species (ROS) scavenger in G₁/S transition phase [7, 27–29]. The PPP is characterized by two branches: the oxidative branch, where NADP^+ is reduced to NADPH by the shunt of glycolysis from glucose 6-phosphate (G6P) conversion into ribulose 5-phosphate (R5P) [30], and the non-oxidative branch rewiring the PPP to aerobic glycolysis up to fructose 6-phosphate (F6P) and glyceraldehyde 3-phosphate (G3P).

Interestingly, the PPP has been shown to be regulated by the $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio [27, 31, 32]. Therefore, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzyme, catalyzing the conversion of G6P into 6-phosphogluconolactone, has been shown to have an allosteric activity, modulated by the cytoplasmic $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio [31]. This is in agreement with these studies [27, 32], which assume that the

G6PDH catalytic activity is accelerated by an increased $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio, a result of cellular NADPH consumption by reactive oxygen species (ROS) in S phase.

In this study [29] on changes in the activity of the PPP, the authors showed that NADPH-consuming pathways enhance the pentose phosphate cycle (Fig. 2-c). At least two significant pathways have been identified as major NADPH consuming systems: the glutathione redox cycle (GSH/GSSH) and the lipid synthesis pathway [6, 33, 34]. The reduced glutathione (GSH) is a protective and antioxidant agent that reduce reactive oxygen species (ROS), used in signaling cascades to trigger cell cycle entry (see above) [7], and generates the oxidative species (GSSH). NADPH reduces GSSH and, as a result, they both are converted back to their respective oxidative “partner”, GSH and NADP^+ . In doing so, the glutathione redox cycle enhances the primary pathway using NADP^+ as a coenzyme: the PPP oxidative branch. The second NADPH-consuming pathway is lipid synthesis, which builds fatty acid blocks from acetyl-CoA.

3. Mitochondria and their pivotal role in cell anabolic demand in G_2

Mitochondrial activity is a key in cell metabolism decision-making and cell cycle progression. As it has been extensively reviewed in this study [35], mitochondria are organelles that have been the subject of many controversies. They were first considered as just a “powerhouse” of the eukaryotic cell, before the pioneering studies deciphering their key role in processes such as development, survival, division, and cell death. Regarding cell division, investigations support and highlight the idea of intertwined relationships between machineries governing mitochondrial dynamics and cell cycle metabolism [36, 37]. It has then been demonstrated that energy transitions occurring in the cell cycle are intrinsically linked to mitochondria sensing parameters, such as the intracellular pH (pHi) [38] and ATP/ADP ratio [39–41].

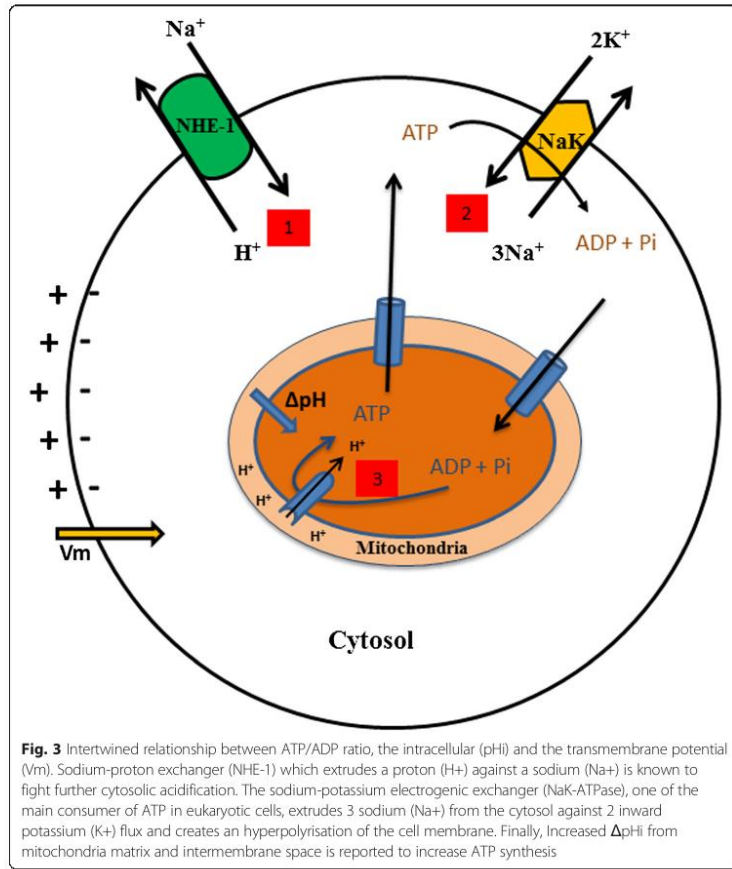
Recent studies highlight the mitochondrial morphogenesis at the G_1/S transition of the cell cycle. It is also shown that at the G_1/S checkpoint, mitochondria form a single giant factory for ATP synthesis [5, 42]. “This energetic boost” is thought to be necessary to increase cyclin E expression in order for the cell to pass the G_1/S checkpoint [41]. As stated above, this event could also be interpreted as a necessary step in cell energy supply for protein, nucleic acid, and membrane lipid synthesis (Fig. 1-d). Interestingly enough, these bodies of works support the idea of cell cycle progression meeting the tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation in S/G_2 phase transition [7]. The TCA or Krebs cycle, which takes place in mitochondria, in conjunction with oxidative phosphorylation, does indeed allow for carbohydrate oxidation to CO_2 , H_2O and TCA intermediate species. This is also the most efficient route for ATP and lipid precursors’ synthesis in the mitochondrial matrix.

The pyruvate accumulated in the cytosol from glycolysis passes through the recently identified specific mitochondrial pyruvate carrier (MPC) and is converted into acetyl-CoA [43–45]. This reaction is catalyzed by pyruvate dehydrogenase with NAD^+ as coenzyme. The first step in the TCA cycle is acetyl-CoA conversion into citrate through dehydration. According to the metabolic state of the cell, citrate can shunt to lipid synthesis or continue the Krebs cycle (Fig. 1-d). For that, key enzymes are regulated by negative feedback loops [46]. This includes citrate synthase, isocitrate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. These enzymes are down-regulated by NADH and

ATP. Also, this half part of the TCA cycle is the main route for glutaminolysis. This consists of a series of biochemical reactions by which the glutamine amino acid is lysed into glutamate and then α -ketoglutarate. From there, there are two possibilities: the oxidative route enables the full Krebs cycle and conversion of α -ketoglutarate into succinyl-CoA [47]. The reductive route is the α -ketoglutarate conversion to isocitrate and then citrate, the precursor of lipid synthesis. It is interesting to note the reported negative regulation of citrate synthase by succinyl-CoA [46]. Also noteworthy here, is that reductive versus oxidative metabolism mutually exclude each other [48]. At the same time, ATP synthesis through the oxidative phosphorylation chain is required for membrane lipid synthesis in the second growth phase (G_2) (see Fig. 1-d) [7].

Oxidative phosphorylation mainly occurs in the internal membrane of the mitochondria in eukaryotic cells. It uses TCA cycle precursors and co-enzymes, such as NADH and $FADH_2$, as electron donors for respiration. Through a cascade of reactions, the ETC. complexes trigger the pumping of protons out of the matrix and enable a pH gradient (ΔpH) required for ATP synthesis (Fig. 3) [49]. In this redox chain, molecular oxygen (O_2) is used as the ultimate electron acceptor and ATP is generated as protons move down its concentration gradient through a well evolutionary-conserved enzyme called ATP synthase, in the inner membrane of mitochondria (reviewed here [49]). This chemiosmotic theory, developed by P. Mitchell [50], explains how NADH and $FADH_2$ oxidation are coupled to ADP phosphorylation into ATP. This is a coupling between oxidation and phosphorylation by a proton gradient across the inner mitochondrial membrane. The oxidative energy from NADH is converted into osmotic energy by proton gradient formation across the membrane, where the intermembrane space is more acidic and the matrix is alkaline. The ΔpH , which is the pH difference between the matrix and the intermembrane space, is generated by enzymatic complexes of the ETC. Five complexes have been identified. Only complexes I, III, IV are proton extruders. Four protons are extruded by complexes I and IV and two protons for complex II. The last complex is the ATP synthase catalyzing ADP phosphorylation into ATP against three protons diffusing back to the mitochondrial matrix.

As stated above, the mitochondrial respiratory chain is mainly fueled by the $NAD^+/NADH$ redox couple. In order for the proliferative cell to maintain high ATP synthesis for cytoskeletal dynamics and membrane lipid synthesis, a symbiotic structure is formed between cytosol and the mitochondria. These are the metabolic shuttles, where one of the most important ones being the malate/citrate shuttle (Fig. 1-d). In fact, while mitochondrial ATP synthesis is high in G_2 , citrate is shuttled out from the Krebs cycle [7, 13]. In the cytosol it is converted into acetyl-CoA and oxaloacetate [3, 51]. As mentioned in the sections above, acetyl-CoA is used as a fatty acid precursor for membrane synthesis and cell growth in G_2 . This well-described pathway consumes NADPH, generated from the malic enzyme and the pentose phosphate pathway [6]. On the other hand, oxaloacetate is converted into malate by consuming NADH and produces NAD^+ . The reverse reaction occurs in mitochondria, where malate, shuttled-in from cytosol, is converted back to oxaloacetate during the Krebs cycle and generates NADH, the first electron donor of ETC. This forms a full cycle in G_2 (Fig. 1-d), where $NAD^+/NADH$ and $NADP^+/NADPH$ redox ratios both increase in order to fulfill lipogenesis.



The last but not least cycling parameter of the metabolic cell cycle is intracellular pH, which has been reported to match mitochondrial activity and described as a potential “internal clock” for cell mitosis [52].

Intracellular pH and ATP/ADP ratio time the metabolic cell cycle

1. ATP concentration oscillations in proliferating cells

In their study, Martin and Müller [53] hypothesized that the eukaryotic cells' common ancestor arose from a symbiotic process between an anaerobic, autotrophic and “strictly hydrogen-dependent *archaebacterium*” and a respiring *eubacterium*, releasing hydrogen “as a waste product of anaerobic heterotrophic metabolism”. This symbiosis between the hydrogen-dependent host and the symbiont, which produce hydrogen, is an attractive hypothesis supporting P. Mitchell's chemiosmotic theory of oxidative phosphorylation-dependent ATP synthesis in mitochondria [49]. In this model, it is assumed that the proton gradient across the internal membrane drives the electron transport through the ETC. As reported above, this is performed by transmembrane

complexes, which pump protons from the matrix to the intermembrane space. Then this gradient triggers ATP synthase activity and ATP synthesis.

Further, studies explain the energy of the cell from [ATP]/[ADP] ratio point of view. Understanding the bioenergetics of a normal dividing cell at the scale of the entire cell cycle may bring some interesting answers to the cancer cell phenotype [7]. Interestingly, independent studies reported the oscillation of the intracellular ATP concentration through the cell cycle [13] and its extensive use in ionic pump activity [54]. Marcussen and colleagues (1992) reported on ATP concentration oscillation along the progression of the cell cycle [13]. They found that the ATP concentration is minimal at the G₁/S phase transition and then progressively reaches its maximum at G₂/Mitosis (Fig. 2). This correlates with the extensive studies by Boonstra and colleagues who reported ATP hydrolysis-dependent Na⁺-K⁺ATPase pump activity during the G₁/S transition cell cycle [54, 55]. This pump is known to be responsible for the electric potential of large populations of cells by extruding three Na⁺ and against the two K⁺ influx. This is confirmed here, where Veech and colleagues [55] showed that intracellular ATP hydrolysis is tightly linked to Na⁺-K⁺ATPase pump activity, responsible for the inherent oscillation of the electrical potential of the cell [56] (Fig. 3). Consequently, ATP/ADP ratio oscillation modulated by ATP synthesis in mitochondria and hydrolysis in the entire cytoplasm, throughout the cell cycle, is also linked to another intracellular oscillator, i.e., intracellular pH (pHi).

2. Intracellular pH oscillates in phase with ATP/ADP ratio

Increasing evidences indicate that the intracellular pH (pHi) homeostasis is correlated with cell metabolism and proliferation [57–60]. Aerts and colleagues (1985) experimentally showed an autonomous pHi cycle within a *Dictyostelium* cell. They managed to demonstrate that modulating pHi controls protein synthesis and DNA replication: optimal protein and DNA synthesis being correlated with an alkaline pHi of 7.4. This is confirmed by other studies showing the pHi-dependent enzyme activity [61–63]. In their studies, Busa et al. [62] showed that pHi oscillations are master regulators in the decision-making of *brine shrimp* embryonic cells to enter dormancy or to continue development: the acidic pHi is linked to dormancy, whereas the alkaline pHi is characteristic of development. In 1983, Christen et al. highlighted the intertwined relationship between intracellular pH, ATP hydrolysis, and mitochondrial respiration [38]. At acidic pH, the cytoplasmic activity of dynein ATPase, which is involved in microtubule dynamics, is inhibited and the internal ATP concentration is high, translating optimal mitochondrial respiration. On the other hand, when pHi is alkaline, the cytoplasmic ATP concentration falls, probably due to impaired mitochondrial respiration and increased dynein ATPase activity [64]. The authors concluded on the cytoplasmic pH control of ATP hydrolysis, inhibited in acidic pHi and enhanced in alkaline pHi, and mitochondrial respiration increased triggered in acidic pHi and inhibited along with an increased alkaline pHi.

3. Intracellular pH times cell cycle entry and cell growth

The intracellular pH change can be explained by several phenomena [65]. The sodium/hydrogen exchanger, Na⁺-H⁺-1 (NHE-1), plays a significant role, especially in pHi alkalization [66] (Fig. 3). Moolenaar and colleagues (1981) set up a series of experiments showing the role of NHE-1 in regulating the pHi. Addition of sodium to a

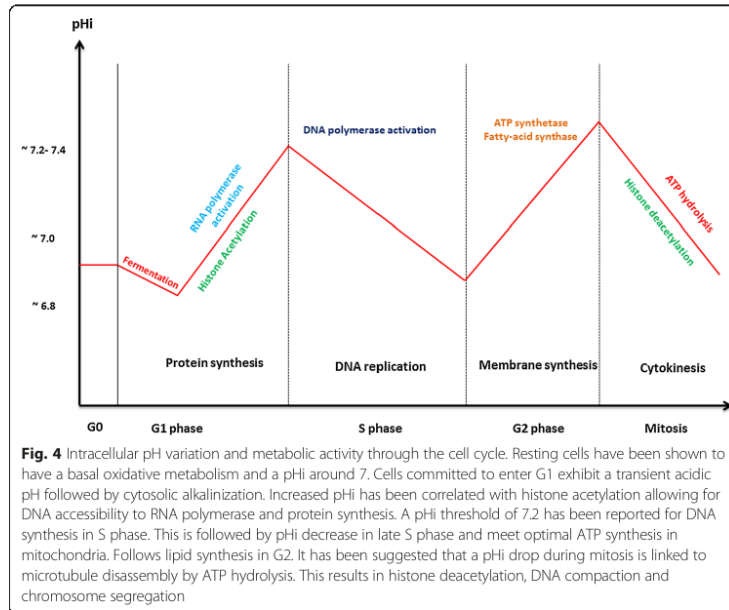
neuroblastoma cell culture medium is followed by Na^+ uptake and H^+ extrusion. In 2000, Reshkin et al. did transfect normal cells by Human Papillomavirus (HPV), and observed that over-expression of NHE-1 is accompanied by cytoplasmic alkalinity which is first event of carcinogenesis. Recent studies confirm the crucial role of NHE-1 in preventing further cytoplasmic acidification [67–71]. More specifically, NHE-1 activity has been shown to be a key regulator of eukaryotic cell cycle entry and cell growth [69, 72, 73]. Moreover, Pouyssegur and colleagues (1985) showed that under growth factor stimulation, the NHE-1 antiporter elevates the cytoplasmic pH of quiescent fibroblasts above a threshold of 7.2, a necessary step for cell cycle entry and DNA synthesis in S phase [63]. Interestingly, some other studies showed a link between the metabolic state of the proliferating cells and histone acetylation [73, 74] (Fig. 4).

Indeed, Histone acetylation plays a pivotal role in regulating gene accessibility to RNA polymerase, for gene transcription [75]. Specific families of enzymes, called Histone Acetyltransferases (HATs) and Histone Deacetylases (HDACs), are responsible for histone acetylation and histone deacetylation, respectively. In this study [73], the authors reported the pivotal role of the NAD^+/NADH ratio on sirtuin (HDACs) activity. The dynamics of histone acetylation has also been shown to be closely linked to pHi [76, 77]. In this study [76], McBrien and colleagues, showed that histone acetylation has the power of regulating the pHi. The acidic pHi is indeed followed by global histone deacetylation and, thus global histone compaction. This is typically the phenotype of a dormant cell such as the one described above. Conversely, the pHi increase towards alkalization is reported to favor global acetylation of histone, similarly to when “resting cells are induced to proliferate”. Altogether, these results suggest the intertwined relationship between the metabolic cell cycle balancing the NAD^+/NADH and ATP/ADP ratios through intracellular pH oscillations.

Conclusion

Proliferating cells must double their biomass (proteins, lipids, and nucleic acids) through the cell cycle in order to generate two daughter cells. For that they use the central carbon metabolism (CCM), universally shared among living systems. The CCM is governed by pivotal metabolic pathways such as glycolysis, the pentose phosphate pathway, and the citric acid cycle. The cell decision-making to enter one of these pathways is coupled to redox transitions following nutrient availability. In the CCM, nutrients, such as glucose and glutamine, are used to generate precursors through redox reactions and to support cell growth. Moreover, experimental studies show that the mitochondrial activity is reduced during early progression in the cell cycle in G_1 [32]. Also, the G_1 phase of the cell cycle is characterized by an anabolic demand in protein synthesis, required for DNA replication in S phase. Synthesis of building blocks, such as amino acids and DNA or pyruvate from carbohydrate pathways is then a necessary step for biomass synthesis and energy supply through mitochondrial activity.

Moreover, one understands that cells decision-making to enter proliferation or stay in dormancy depends on physical, electrical and biochemical parameters. Nutrients and growth hormones availability in the extracellular medium modulates all these three parameters since they provoke osmotic pressure resulting in variation



in bioelectrical parameters of the cell, such as the transmembrane potential, enzyme and cofactors charges and the intracellular (pHi). Perturbing one of these parameters has been reported to change the others. So that, cell metabolism seems to be the result of intertwined state parameter oscillations. In this literature investigation, we deciphered cell cycle progression from cell metabolism or more precisely central carbon metabolism (CCM) point of view. It appeared, first, the intriguing relationship between CCM and cell cycle progression, with the reactive and oxidative (redox) cofactors such as NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ being key regulators. Secondly, as reported, mitochondria seem to be more than just a plant for ATP synthesis. They are at the core of eukaryotic cell metabolism and cell cycle progression. In there, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, branched to glycolysis and to the pentose phosphate pathway, is central in mitochondrial metabolism and has been reported to match mitosis. The TCA is also an adaptive circuit at the crossroads between cytosolic-mitochondrial energy exchanges which are especially enhanced when resting cells are committed to divide. Finally, the progression of the cell cycle exhibits a shifted metabolism, materialized by a shunt from catabolism to anabolism. Transitions are performed by redox potential variation, involving NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ redox couples, and ADP/ATP energetic ratios and the intracellular pH seems to be the master operator of cytosol/mitochondrial flux balances. Understanding the dynamics of these metabolic exchanges will pave the way to therapeutic solutions for metabolic cycle disorders such as cancer.

Abbreviations

DNA: Deoxyribonucleic acid; RNA: Ribonucleic acid; NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diphosphate; CCM: Central carbon metabolism; TCA: Tricarboxylic acid; PPP: Pentose phosphate pathway; CO₂: Carbon dioxide; ETC: Electron transport chain; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; ROS: Reactive oxygen species; F6P: Fructose 6-phosphate; G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSH: Glutathione; GSSH: Mitochondrial pyruvate carrier; FAD: Flavin adenine dinucleotide; NHE-1: Sodium-hydrogen exchanger 1; NaK-ATPase: Sodium-potassium ATPase; HATS: Histone acetyltransferases; HDACs: Histone deacetylase.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LS, JMS and JDM deciphered the key points developed in this review and wrote the manuscript. SP also participated in the description of the central carbon metabolism and designed the relating figures. EB, LP and ML participated in discussing CCM transitions and provided edition and critical review. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to especially thank Khalid Omer Alfarouk for revising this article and for his suggestions. Johannes Boonstra is also gratefully acknowledged for sending us his "not-easy-to-find" articles. Last but not least, we deeply thank "Association Cancer & Métabolisme" and Bertrand Halff.

Author details

¹Ecole Polytechnique, LIX-UMR 7161, Palaiseau, France. ²LRI, Paris-Sud University, CNRS UMR8623 and INRIA Saclay, Paris, France. ³Paris Institute of Translational Neurosciences (IHU-A-ICM), Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France.

Received: 18 February 2015 Accepted: 15 May 2015

Published online: 29 May 2015

References

- Lane N, Martin WF. The origin of membrane bioenergetics. *Cell*. 2012;151(7):1406–16.
- Tyson JJ. Biochemical oscillations. In: *Computer cell Biology*. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 230–60.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008;7(1):11–20.
- Alfarouk KO, Verdusco D, Rauch C, Muddathir AK, Adil HH, Elhassan GO, et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*. 2014;1(12):777–802.
- Uzman A. *Molecular Cell Biology*, Sixth Edition. *Biochem Mol Biol Educ*. 2010;38:60–1.
- Fabregat I, Revilla E, Machado A. The NADPH consumption regulates the NADPH-producing pathways (pentose phosphate cycle and malic enzyme) in rat adipocytes. *Mol Cell Biochem*. 1987;81:77–81.
- Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2013;138(2):255–71.
- Noor E, Eden E, Milo R, Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol Cell*. 2010;39(5):809–20.
- Bar-Even A, Flamholz A, Noor E, Milo R. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat Chem Biol*. 2012;8(6):509–17.
- Fell DA. Evolution of central carbon metabolism. *Mol Cell*. 2010;39(5):663–4.
- Calderon-Montano J, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Salvador J, Robles A, Lopez-Lazaro M. Role of the Intracellular pH in the Metabolic Switch between Oxidative Phosphorylation and Aerobic Glycolysis - Relevance to Cancer. *WebmedCentral CANCER*. 2011;2(3):WMC001716.
- Harguindey S, Arranz JL, Polo Orozco JD, Rauch C, Fais S, Cardone RA, et al. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs—an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. *J Transl Med*. 2013;11:282.
- Marcussen M, Larsen PJ, Anatomy M, Panum T. Cell Cycle-Dependent Regulation of Cellular ATP Concentration, and Depolymerization of the Interphase Microtubular Network Induced by Elevated Cellular ATP Concentration in Whole Fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1996;35(2):94–9.
- Yu FX, Dai RP, Goh SR, Zheng L, Luo Y. Logic of a mammalian metabolic cycle: An oscillated NAD⁺/NADH redox signaling regulates coordinated histone expression and S-phase progression. *Cell Cycle*. 2009;8:773–9.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
- Demetrius LA, Coy J, Tuszynski JA. Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism. *Theor Biol Med Model*. 2010;2–7.
- Davies PC, Demetrius LA, Tuszynski JA. Cancer as a dynamical phase transition. *Theor Biol Med Model*. 2011;8–30.
- Rietman EA, Friesen DE, Hahnfeldt P, Gatenby R, Hlatky L, Tuszynski JA. An integrated multidisciplinary model describing initiation of cancer and the Warburg hypothesis. *Theor Biol Med Model*. 2013;10:39.
- Burhans CW, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1282–93.
- Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol*. 2012;22(11):592–601.
- Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene*. 2007;26(8):1101–9.

22. Sarsour E, Kumar M. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(12):2985–3011.
23. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074–80.
24. Morinobu A, Kanno Y, O'Shea JJ. Discrete roles for histone acetylation in human T helper 1 cell-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40640–6.
25. Choudhury M, Park PH, Jackson D, Shukla SD. Evidence for the role of oxidative stress in the acetylation of histone H3 by ethanol in rat hepatocytes. *Alcohol*. 2010;44:531–40.
26. Smith CL. A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation. *Bioessays*. 2008;30(1):15–24.
27. Fabregat I, Vitorica J, Satrustegui J, Machado A. The pentose phosphate cycle is regulated by NADPH/NADP ratio in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1985;236:110–8.
28. Fabregat I, Revilla E, Machado A. Short-term control of the pentose phosphate cycle by insulin could be modulated by the NADPH/NADP ratio in rat adipocytes and hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;146:920–5.
29. Revilla E, Fabregat I, Santa María C, Machado A. The NADPH-producing pathways (pentose phosphate and malic enzyme) are regulated by the NADPH consumption in rat mammary gland. *Biochem Int*. 1987;14:957–62.
30. Vanamala I, Radhakrishnan S, Reddivari L, Bhat VB, Ptitsyn A. Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach. *Proteome Sci*. 2011;9(1):49.
31. Eggleston LV, Krebs HA. Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem J*. 1974;138:425–35.
32. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol*. 1965;12:88–118.
33. Han CY, Umemoto T, Omer M, Den Hartigh LJ, Chiba T, LeBoeuf R, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *J Biol Chem*. 2012;287:10379–93.
34. Winkler BS, DeSantis N, Solomon F. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. *Exp Eye Res*. 1986;43:829–47.
35. McBride H, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*. 2006;16(14):R551–6.
36. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*. 1966;30:269–97.
37. Scalettar BA, Abney RJ, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8057–61.
38. Christen R, Schackmann RW, Shapirol M. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *J Biol Chem*. 1983;258(9):5392–9.
39. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005;18:283–93.
40. Hardie DG. New roles for the LKB1 → AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17:167–73.
41. Mandal S, Guptan P, Owusu-Ansah E, Banerjee U. Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2005;9(6):843–54.
42. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):11960–5.
43. Herzog S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B, et al. Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science*. 2012;337:93–6.
44. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen YC, et al. A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. *Science*. 2012;337:96–100.
45. Halestrap AP. The mitochondrial pyruvate carrier: Has it been unearthed at last. *Cell Metab*. 2012;16:141–3.
46. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system—A technical review. *NMR Biomed*. 2002;15:435–55.
47. Fendt SM, Bell EL, Keibler MA, Olenchock BA, Mayers JR, Wasylenko TM, et al. Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat Commun*. 2013;4:2236.
48. Israël M. Signaling And Metabolism In Cancer: Endocrine Pancreas Deficiency And Hybrid Anabolism–Catabolism. *Drugs That Undo The Process*. *Cancer Ther*. 2014;10:1–12.
49. Krauss S. Mitochondria: Structure and role in respiration. *Nature Publishing Group, Encyclopedia of Life Sciences* (2001) p. 6.
50. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144–8.
51. Finley LWS, Zhang J, Ye J, Ward PS, Thompson CB. SnapShot: cancer metabolism pathways. *Cell Metab*. 2013;17(3):466–6. e2.
52. Gagliardi LJ, Shain DH. Is intracellular pH a clock for mitosis. *Theor Biol Med Model*. 2013;10(1):8.
53. Martin W, Müller A. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*. 1998;392(6671):37–41.
54. Mummery CL, Boonstra J, Van Der Saag PT, de Laat SW. Modulation of functional and optimal (Na⁺ + K⁺)ATPase activity during the cell cycle of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*. 1981;107:1–9.
55. van Zoelen EJ, Mummery CL, Boonstra J, van der Saag PT, de Laat SW. Membrane regulation of the Na⁺, K⁺ –ATPase during the neuroblastoma cell cycle: correlation with protein lateral mobility. *J Cell Biochem*. 1983;21:77–91.
56. Veech RL, Kashiwaya Y, Gates DN, King MT, Clarke K. The Energetics of Ion Distribution : The Origin of the Resting Electric Potential of Cells. *IUBMB Life*. 2002;54(5):241–52.
57. Aerts RJ, Durston AJ, Moolenaar WH. Cytoplasmic pH and the regulation of the Dictyostelium cell cycle. *Cell*. 1985;43(3 Pt 2):653–7.
58. Busa W, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH*. *Am J Physiol*. 1984;246(4 Pt 2):R409–38.
59. Cohen A, Doveh E, Eick U. Statistical properties of the r(WG(J)) index of agreement. *Psychological Methods*. 2001;6:297–310.

60. Ciapa B, Philippe L. Intracellular and Extracellular pH and Ca Are Bound to Control Mitosis in the Early Sea Urchin Embryo via ERK and MPF Activities. *PLoS One*, vol. 8, 2013.
61. Busa WB, Crowe JH, Matson GB. Intracellular pH and the metabolic status of dormant and developing *Artemia* embryos. *Arch Biochem Biophys*. 1982;216:711–8.
62. Busa WB, Crowe JH. Intracellular pH Regulates Transitions Between Dormancy and Development of Brine Shrimp (*Artemia salina*) Embryos. *Science*. 1983;221:366–8.
63. Hand SC, Carpenter JF. pH-Induced Metabolic Transitions in *Artemia* Embryos Mediated by a Novel Hysteretic Trehalase. *Science*. 1986;232:1535–7.
64. Summers KE, Gibbons IR. Adenosine Triphosphate-Induced Sliding of Tubules in Trypsin-Treated Flagella of Sea-Urchin Sperm. *Proc Natl Acad Sci*. 1971;68(12):3092–6.
65. Boron W. Intracellular pH regulation. *Adv Physiol Educ*. 2004;28(1-4):160–79.
66. Moolenaar WH, Boonstra J, van der Saag PT, de Laat SW. Sodium/proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 1981;256(24):12883–7.
67. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell*. 1989;56(2):271–80.
68. Bianchini L, Pouyssegur J. Molecular structure and regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *J Exp Biol*. 1994;196:337–45.
69. Paris S, Pouyssegur J. Growth Factors Activate the Na⁺/H⁺ Antiporter in Quiescent Fibroblasts by Increasing Its Affinity for Intracellular H⁺. *J Biol Chem*. 1984;259(17):10989–94.
70. Lacroix J, Poët M, Maehrel C, Counillon L. A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. *EMBO Rep*. 2004;5(1):91–6.
71. Counillon L, Pouyssegur J. The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem*. 2000;3(33):1–4.
72. Pouyssegur J, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett*. 1985;190(1):115–9.
73. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009;324(5930):1076–80.
74. Vogelauer M, Krall AS, McBrien MA, Li JY, Kurdistani SK. Stimulation of histone deacetylase activity by metabolites of intermediary metabolism. *J Biol Chem*. 2012;287(38):32006–16.
75. Kurdistani SK, Grunstein M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:276–84.
76. McBrien MA, Behbahan IS, Ferrari R, Su T, Huang TW, Li K, et al. Histone acetylation regulates intracellular pH. *Mol Cell*. 2013;49(2):310–21.
77. Kurdistani SK. Chromatin : a capacitor of acetate for integrated regulation of gene expression and cell physiology. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;26(Figure 1):53–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



III. Fermentation où la limitation de la capacité respiratoire mitochondriale des cellules eucaryotes

Les études sur les facteurs limitants l'oxydation phosphorylative ont mis en évidence le rôle critique des complexes de la chaîne respiratoire (Bohnsack *et al.*, 1982; Lenaz et Genova, 2012; Vartak *et al.*, 2013). Ils permettent notamment de réguler les flux d'électrons et ainsi de s'adapter à la disponibilité des substrats (carbone, oxygène) (Lapiente-Brun *et al.*, 2013; Reynafarje et Ferreira, 2008). La chaîne respiratoire apparaît donc comme étant l'étape limitante dans la transition respiro-fermentaire. Cette hypothèse a été étudiée chez de nombreux organismes aérobies.

1. Effet Pasteur : la limitation en oxygène

L'effet Pasteur a été découvert en 1857 par le chercheur Louis Pasteur alors qu'il effectuait des recherches sur des levures. Il constata que l'oxygénation d'une culture anaérobie de levure induit une diminution de la production d'éthanol. Il en conclut que l'oxygène inhibe partiellement la fermentation alcoolique chez les levures par la « respiration » et améliore par la même occasion la production de la biomasse (Pasteur, 1857). Par la suite, deux théories ont été proposées pour expliquer l'effet Pasteur. Il s'agit des théories de la « localisation » et celle de « l'activation/inactivation ». La première explique l'effet Pasteur par la proximité opérationnelle des enzymes et substrats glycolytiques en anaérobiose qui induiraient une fermentation alcoolique ou lactique. La seconde hypothèse explique une inhibition de la glycolyse aérobie provoquée par une diminution de la disponibilité en « phosphate mitochondrial » (ATP) pour l'activation de l'hexokinase (HK) et de la phosphofructokinase (PFK) (Barker *et al.*, 1964). Cette dernière hypothèse a été abandonnée lorsque des études ont mis en évidence une activité de la HK et de la PFK en condition anaérobie (Barker *et al.*, 1967). L'hypothèse de Pasteur sur la fermentation comme étant la résultante d'une glycolyse anaérobie est encore débattue aujourd'hui. A y regarder de plus près on se rend compte que cette hypothèse a été contestée par les contemporains de Pasteur (Vasquez, 2018). En effet, Adrien Brown a conduit des expérimentations de fermentations sur des cultures de levure en présence ou en absence d'air (Brown, 1875). Il analysa les cultures après 3h de fermentation et s'aperçut que les cultures aérées contenaient plus d'alcool que les cultures non-aérées. Cette

découverte de Brown a été confirmée bien plus tard par deux chimistes, Otto H. Warburg et Herbert G. Crabtree.

2. Effet Warburg : la déficience mitochondriale

En 1925, le biochimiste allemand Otto Heinrich Warburg décrit dans son article référence que les cellules cancéreuses produisent de grandes quantités de lactate en présence de glucose et d'oxygène (Warburg, 1925). Cette observation a permis à Warburg de formuler l'hypothèse d'une déficience mitochondriale chez les cellules cancéreuses. Bien qu'observé dans des cellules cancéreuses animales, cette théorie remet en question l'effet Pasteur et défend un métabolisme glycolytique aérobie expliqué par une limitation mitochondriale de la phosphorylation oxydative (Warburg, 1956). La théorie d'une déficience mitochondriale défendue par Warburg pour expliquer le métabolisme des cellules cancéreuses est remise en question au profit d'explications génétiques (Krebs et Martin, 1981). Krebs propose que le switch métabolique observé chez les cellules cancéreuses ne soit que le symptôme d'une reprogrammation génétique et non la cause du phénotype cancéreux. L'avènement de la génétique et du séquençage a donc marginalisé l'hypothèse métabolique défendue par Warburg. Ainsi, l'effet Warburg est aujourd'hui expliqué par l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la régulation des voies métaboliques du métabolisme central du carbone (Lu *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2011). Hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a), mammalian target of rapamycin (mTOR) et autres protéines kinase sont considérés comme les acteurs majeurs de la régulation du switch OxPhos-glycolyse aérobie. Des études récentes ont montré que l'activation des cellules du système immunitaire (monocytes et mastocytes) conduit une diminution de la phosphorylation oxydative au détriment d'une glycolyse aérobie prononcée (Liu *et al.*, 2012; Rodríguez-Prados *et al.*, 2010). Bien que le mécanisme exact ne soit pas totalement élucidé, des études ont identifié la voie Akt-mTOR-HIF-1a comme pivot dans le switch (Cheng *et al.*, 2014). Des régulations épigénétiques des histones de ces monocytes ont conduit à une suractivation de cette voie de signalisation Akt-mTOR-HIF-1a, une glycolyse prononcée et une diminution de la consommation en oxygène. Ces observations sont plus en accord avec un autre phénomène métabolique introduit par un contemporain de Warburg pour expliquer la transition respiro-fermentaire.

3. Effet Crabtree : effet inhibiteur du glucose sur la respiration

L'effet Crabtree désigne l'inhibition de la respiration cellulaire au détriment d'une glycolyse aérobie prononcée. Il a été mis en décrit en 1929 par le chimiste anglais Herbert Grace Crabtree qui rapporte la manifestation d'un métabolisme glycolytique chez des cellules animales saines infectées par des virus (Crabtree, 1929). Il répond à Warburg et conclut que la fermentation aérobie n'est pas « limitée aux cellules cancéreuses ». Quelques années plus tard, Wilbur Swanson (1948) et De Deken (1966) ont décrit l'effet Crabtree chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et ont assimilé le terme « effet Crabtree » à la transition respiro-fermentaire chez les levures (De Deken, 1966; Swanson et Clifton, 1948). C'est la raison pour laquelle l'effet Crabtree est employé aujourd'hui pour décrire la fermentation chez les levures alors que sa découverte avait été réalisée chez des cellules cancéreuses (Crabtree, 1929). Les études actuelles sur l'effet Crabtree sont souvent apparentées au phénomène d'overflow métabolique observé chez les organismes aérobies facultatifs. Le phénomène d'overflow décrit la transition respiro-fermentaire lorsque la vitesse d'apport des substrats, notamment le glucose, dépasse un seuil critique de flux supporté par la respiration mitochondriale et la phosphorylation oxydative (Moolenaar, 1986; Vasquez, 2018). Les levures ne réagissent pas toutes de la même manière face à un afflux de glucose extracellulaire. Les levures dites Crabtree positives telles que *S. cerevisiae* produisent de l'éthanol dès lors que la concentration en glucose augmente entre 1 et 5 g/L. Pour certaines d'entre elles il faut monter à des concentrations plus élevées, de l'ordre de 20 à 50 g/L pour observer la production d'éthanol (Ratledge, 1991). A l'opposé, les levures Crabtree négatives telles que *Candida utilis* et la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* n'empruntent pas la voie de la fermentation alcoolique ou lactique et le glucose est oxydé par la respiration mitochondriale (Hagman *et al.*, 2013; Nicaud, 2012; Pfeiffer *et al.*, 2014; van Urk *et al.*, 1989). Les mécanismes mis en jeu dans l'effet Crabtree ou overflow métabolique ne sont pas clairement décrits mais des hypothèses sont émises. Les mécanismes couramment proposés pour expliquer cet overflow métabolique sont une limitation au niveau de la chaîne respiratoire et une diminution et/ou inhibition de la pyruvate déshydrogénase sous l'effet du glucose. Ces hypothèses ont été largement décrites et discutées dans la thèse de Jean-Roch Mouret notamment (Mouret, 2006). Exposons ici quelques points et nous nous permettons de proposer une autre synthèse.

a. Hypothèse de la limitation de la capacité respiratoire

L'hypothèse d'une limitation de la capacité respiratoire chez les micro-organismes Crabtree positifs a été formulée pour la première fois par Rieger *et al.* (1983). Dans leurs expériences, les auteurs ont réalisé des chémostats de la levure *S. cerevisiae* sur deux substrats carbonés (glucose et éthanol) à différents ratios (Rieger *et al.*, 1983). Dans le premier cas où le glucose est la seule source de carbone, le métabolisme de la levure est « purement oxydatif », dans trois conditions de concentration en glucose (5, 10 et 30 g/L), pour un taux de dilution maximum/critique (D_c) inférieur ou égal à $0,3 \text{ h}^{-1}$. Le phénotype fermentaire est observé dans les trois conditions pour un taux de dilution au-delà de $0,3 \text{ h}^{-1}$. Les auteurs observent que la consommation en oxygène (qO_2) est saturée à $8,1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ même lorsque le taux de dilution est supérieur à $0,3 \text{ h}^{-1}$. Rieger *et al.*, (1983) expliquent cela par une limitation de la capacité respiratoire chez *S. cerevisiae*. Dans l'autre cas, les auteurs ont cherché à déterminer cette capacité respiratoire dans deux autres chémostats en mélangeant le glucose et l'éthanol dans deux proportions (15 et 15 g/L en glucose et éthanol respectivement, pour la condition A, et 15 et 5 g/L en glucose et éthanol, respectivement, pour la condition B). Ils observent un taux de dilution plus important dans la condition B où l'éthanol est totalement consommé ($D_{cA} = 0,23 \text{ h}^{-1}$ et $D_{cB} = 0,27 \text{ h}^{-1}$). La consommation en oxygène est saturée à $8,1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans les deux conditions, comme observé dans le premier cas où le glucose était la seule source en carbone. Cependant, cette saturation est atteinte pour des taux de dilution critiques plus faibles ($0,3 \text{ h}^{-1}$ dans le premier chémostat comparé à $0,23 \text{ h}^{-1}$ et $D_{cB} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ dans les conditions A et B, respectivement). La transition respiro-fermentaire a donc lieu à des taux de dilution d'autant plus faibles que la concentration en éthanol est importante. De même, le phénotype fermentaire est observé dans les deux conditions A et B pour des taux de dilution au-delà des $0,23 \text{ h}^{-1}$ et $0,27 \text{ h}^{-1}$, respectivement. Ces travaux, ainsi que ceux de Käppli (1987), supportent l'hypothèse d'une limitation de la capacité respiratoire (OxPhos) chez les levures Crabtree positives (Käppli, 1987).

Néanmoins, cette hypothèse est remise en cause par des études réalisées sur des mitochondries isolées de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*, Crabtree positives et négatives, respectivement (Mouret, 2006; van Urk *et al.*, 1989). Dans cette dernière étude, van Urk *et al.* (1989) constatent qu'il n'y a pas de différence dans la capacité respiratoire des mitochondries isolées chez les deux micro-organismes. Ils observent aussi une accumulation de pyruvate

extracellulaire dans les cultures de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*, en excès de glucose et concluent que la limitation se produit au niveau du catabolisme du pyruvate.

b. Hypothèse du « nœud pyruvate »

L'hypothèse d'un « nœud pyruvate » pour expliquer l'effet Crabtree a été supportée par des études sur les enzymes qui participent au catabolisme du pyruvate. C'est le cas pour le pyruvate déshydrogénase (PDH) qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA et la pyruvate décarboxylase (PDC) pour la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde chez *S. cerevisiae* (Van Urk *et al.*, 1990) ainsi que la pyruvate carboxylase (PC) catalysant la conversion du pyruvate en oxaloacétate (Walker *et al.*, 1991). D'autres enzymes participent aussi au catabolisme du pyruvate (Mouret, 2006; van Urk *et al.*, 1989). La voie préférentielle pour le catabolisme du pyruvate, particulièrement chez les microorganismes Crabtree négatifs, est la PDH. Lorsque la PDH est saturée du fait d'une saturation par rapport à l'affinité de l'enzyme pour le pyruvate, la PDC intervient et se constitue en voie de *by-pass* pour la synthèse d'acétyl-CoA via l'acétaldéhyde (Mouret, 2006; Pronk *et al.*, 1996). L'acétyl-CoA est utilisé comme précurseur pour la synthèse des lipides et permet ainsi un maintien de la croissance.

La pyruvate carboxylase cytosolique peut aussi intervenir comme *by-pass* de la PDH en alimentant le cycle de Krebs en oxaloacétate (Walker *et al.*, 1991). L'avantage de cette voie est qu'elle permet un *turn-over* du NADH cytosolique grâce à la conversion de l'oxaloacétate en malate, réaction catalysée par la malate déshydrogénase. Le malate est importé dans la mitochondrie (cf Fig. 1, Chap. I) via l'échangeur membranaire malate/citrate et converti en oxaloacétate par la même enzyme. Il existe des incertitudes dans la littérature concernant la PC puisqu'elle est souvent présentée comme mitochondriale. Cela permettrait de convertir directement le pyruvate en l'oxaloacétate mitochondrial.

L'hypothèse du « nœud pyruvate » peut en effet expliquer l'accumulation du pyruvate et autres intermédiaires du cycle de Krebs observée chez les levures Crabtree positives. Il est cependant intéressant de constater que ces accumulations sont aussi reportées chez les levures Crabtree négatives (Van Urk *et al.*, 1990). L'étude de l'effet Crabtree ne devrait donc pas être limitée à la fermentation alcoolique ou lactique.

En résumé de cette partie, nous avons exposé que l'effet Pasteur est une inhibition de la fermentation chez les levures par le dioxygène. A l'opposé, l'effet Crabtree se définit par une inhibition de la respiration au profit de la fermentation par saturation du glucose chez les

levures. Enfin l'effet Warburg décrit une fermentation importante chez les cellules cancéreuses au détriment de la respiration, même en présence de dioxygène.

En conclusion, nous proposons que les effets Pasteur, Crabtree et Warburg puissent être réunis sous le terme plus général d'overflow métabolique, observé aussi bien chez les microorganismes anaérobies que chez les aérobies strictes, à l'origine de la transition respiro-fermentaire (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014; Kerkhoven *et al.*, 2016; Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018; Vasquez, 2018).

Références

Barker, J., Khan, M. a. A., and Solomos, T. (1964). Mechanism of the Pasteur Effect. *Nature* 201, 1126–1127.

Barker, J., Khan, M.A.A., and Solomos, T. (1967). Studies in the Respiratory and Carbohydrate Metabolism of Plant Tissues XXI. The Mechanism of the Pasteur Effect in Peas. *The New Phytologist* 66, 577–596.

Bohensack, R., Küster, U., and Letko, G. (1982). Rate-controlling steps of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. A synoptic approach of model and experiment. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 271–280.

Borecký, J., and Vercesi, A.E. (2005). Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and Stress. *Bioscience Reports* 25, 271–286.

Boyer, P.D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 215–250.

Brown (1875). Oxygen requirements. *Appl Environ Microbiol* 56, 3785–3792.

Cecchini, G. (2003). Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 77–109.

Chen, D., Roda, J.M., Marsh, C.B., Eubank, T.D., and Friedman, A. (2012). Hypoxia inducible factors-mediated inhibition of cancer by GM-CSF: a mathematical model. *Bull. Math. Biol.* 74, 2752–2777.

Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R.A., Shephardson, K.M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Martens, J.H.A., Rao, N.A., Aghajani-refah, A., et al. (2014). mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345, 1250684.

Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23, 536–545.

De Deken, R.H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156.

Dervartanian, D.V., and Veeger, C. (1964). Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects 92, 233–247.

Diaz, F., Kotarsky, H., Fellman, V., and Moraes, C.T. (2011). Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 16, 197–204.

Garcia-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A.J., and Alberto Luévano-Martínez, L. (2017). High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces Hansenii*. *PLoS One* 12.

Graham, L.A., and Trumpower, B.L. (1991). Mutational analysis of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of *Saccharomyces cerevisiae*. III. Import, protease processing, and assembly into the cytochrome bc₁ complex of iron-sulfur protein lacking the iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* 266, 22485–22492.

Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2012). During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 353–362.

Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., and Piskur, J. (2013). Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. *PLOS ONE* 8, e68734.

Heinrich, R., and Rapoport, T.A. (1974). A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* 42, 89–95.

Hong, S., and Pedersen, P.L. (2008). ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 590–641, Table of Contents.

Howard, A. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity Suppl* 6, 261–273.

Huang, L.-S., Cobessi, D., Tung, E.Y., and Berry, E.A. (2005). Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc₁ complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* 351, 573–597.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* 18, 283–293.

Kacser, H., and Burns, J.A. (1995). The control of flux. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 341–366.

Käppli, O. (1987). Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. In *Advances in Microbial Physiology*, A.H. Rose, and D.W. Tempest, eds. (Academic Press), pp. 181–209.

Kerkhoven, E.J., Pomraning, K.R., Baker, S.E., and Nielsen, J. (2016). Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Npj Systems Biology and Applications* 2, 16005.

Kholodenko, B.N. (1984). Control of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Theor. Biol.* 107, 179–188.

Krebs, H., and Martin, A. (1981). *Reminiscences and Reflections* (Oxford : New York: Oxford University Press).

Lancaster, C.R., Kröger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999). Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* 402, 377–385.

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., et al. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science* 340, 1567–1570.

Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Stout, C.D. (1992). Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* 31, 2735–2748.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2012). Supramolecular Organisation of the Mitochondrial Respiratory Chain: A New Challenge for the Mechanism and Control of Oxidative Phosphorylation. In *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Nuclear-Encoded Genes, Enzyme Regulation, and Pathophysiology*, B. Kadenbach, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 107–144.

Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., et al. (2012). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates

glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1672–1682.

Lu, H., Forbes, R.A., and Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 23111–23115.

Ma, X., Jin, M., Cai, Y., Xia, H., Long, K., Liu, J., Yu, Q., and Yuan, J. (2011). Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy. *Chem Biol* 18, 1474–1481.

Martínez-Cárdenas, A., Chávez-Cabrera, C., Vasquez-Bahena, J.M., and Flores-Cotera, L.B. (2018). A common mechanism explains the induction of aerobic fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*. *Microbial Cell Factories* 17, 53.

Maxwell, D.P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8271–8276.

Mazat, J.-P., Ransac, S., Heiske, M., Devin, A., and Rigoulet, M. (2013). Mitochondrial energetic metabolism—some general principles. *IUBMB Life* 65, 171–179.

Mitchell, P. (1961). Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *Biological Reviews* 41, 445–501.

Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *PNAS* 106, 11960–11965.

Moolenaar, W.H. (1986). Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 363–376.

Mouret, J.-R. (2006). Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes.

Nicaud, J.-M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29, 409–418.

Noor, E., Eden, E., Milo, R., and Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell* 39, 809–820.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503–508.

Ochoa-Estopier, A., and Guillouet, S.E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 170, 35–41.

Pasteur, L. (1857). *Mémoire sur la Fermentation appelée Lactique*.

Pfeiffer, A., Jaeckel, M., Lewerenz, J., Noack, R., Pouya, A., Schacht, T., Hoffmann, C., Winter, J., Schweiger, S., Schäfer, M.K.E., et al. (2014). Mitochondrial function and energy metabolism in neuronal HT22 cells resistant to oxidative stress. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2147–2158.

Pronk, J.T., Yde Steensma, H., and Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633.

Ratledge, C. (1991). Yeast physiology — a micro-synopsis. *Bioprocess Engineering* 6, 195–203.

Reder, C. (1988). Metabolic control theory: a structural approach. *J. Theor. Biol.* 135, 175–201.

Reynafarje, B.D., and Ferreira, J. (2008). Oxidative phosphorylation: kinetic and thermodynamic correlation between electron flow, proton translocation, oxygen consumption and ATP synthesis under close to in vivo concentrations of oxygen. *Int J Med Sci* 5, 143–151.

Rieger, M., KÄPpeli, O., and Fiechter, A. (1983). The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology* 129, 653–661.

Rieske, J.S., MacLennan, D.H., and Coleman, R. (1964). Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15, 338–344.

Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P.G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010). Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 185, 605–614.

Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49, 559–567.

Sausville, E.A. (2002). Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in Molecular Medicine* 8, S32–S37.

Sazanov, L.A., and Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311, 1430–1436.

Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. (2006). Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 281, 15370–15375.

Schultz, B.E., and Chan, S.I. (2001). Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30, 23–65.

Sluse, F.E., and Jarmuszkiewicz, W. (1998). Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 733–747.

Sluse, F.E., and Jarmuszkiewicz, W. (2000). Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 259–268.

Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R.A. (2012). Rcf1 and Rcf2, Members of the Hypoxia-Induced Gene 1 Protein Family, Are Critical Components of the Mitochondrial Cytochrome bc₁-Cytochrome c Oxidase Supercomplex. *Molecular and Cellular Biology* 32, 1363–1373.

Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., et al. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4129–4134.

Swanson, W.H., and Clifton, C.E. (1948). Growth and Assimilation in Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 56, 115.

Tomashek, J.J., and Brusilow, W.S. (2000). Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 493–500.

- Tsubaki, M., and Yoshikawa, S. (1993). Fourier-transform infrared study of cyanide binding to the Fea3-CuB binuclear site of bovine heart cytochrome c oxidase: implication of the redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry* 32, 164–173.
- van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.P. (1989). Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2399–2406.
- Van Urk, H., Voll, W.S.L., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1990). Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56, 281–287.
- Vartak, R., Porras, C.A.-M., and Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4, 582–590.
- Vasquez (2018). *Overflow Metabolism - 1st Edition*.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci.* 122, 253–270.
- Walker, M.E., Val, D.L., Rohde, M., Devenish, R.J., and Wallace, J.C. (1991). Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1210–1217.
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research* 9, 148–163.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Weinberg, S.E., Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2015). Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* 42, 406–417.

Chapitre III : Production de citrate chez des micro-organismes aérobie

I. Définition

L'acide citrique ou acide 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylique, est un acide tricarboxylique composé de trois fonctions acides, chacune caractérisée par son pKa (3,13 – 4,73 – 6,40) (Fig. 10) (Papagianni, 2007). La forme totalement déprotonée (pH > 6,40) est ainsi appelé citrate. Cet acide organique est produit par les microorganismes, plantes et animaux. Il est particulièrement accumulé dans les plantes, notamment le citron, d'où le citrate tient son nom. En termes d'application, le citrate est très utilisé en industrie agro-alimentaire en tant qu'additif alimentaire mais aussi en médecine, en raison ses propriétés fonctionnelles (régulateur d'acidité, chélatant, acidulant, et antioxydant) (Berovic and Legisa, 2007; Halabe Bucay, 2007; Icard *et al.*, 2012; Sauer *et al.*, 2008; Shanbrom, 2002; Soccol *et al.*, 2006). Sa synthèse industrielle est majoritairement réalisée par fermentation microbienne. La moisissure *Aspergillus niger* est presque exclusivement employée (Anastassiadis *et al.*, 2008; Show *et al.*, 2015).

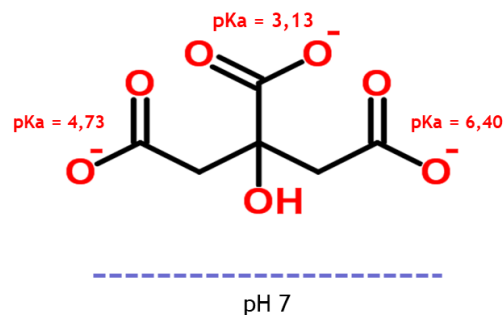


Figure 10 : La forme ionique de citrate pour un pH de milieu à 7.
Les trois fonctions acides sont présentées par leurs pKa respectifs.

II. Production microbienne de citrate

1. La voie de biosynthèse du citrate

La biosynthèse de l'acide citrique a été caractérisée chez divers microorganismes. Cette biosynthèse se déroule majoritairement au niveau du cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. Elle a lieu aussi bien chez les procaryotes (bactéries) que chez les eucaryotes (moisissures et levures), chez les microorganismes aérobies et anaérobies (Smeets, 1983; Vandenberghe *et al.*, 1999). Bien que cette synthèse soit possible chez des bactéries, les résultats de recherche ont démontré une meilleure productivité chez les organismes tels que les levures et les moisissures

telles que l'espèce *Aspergillus niger* (Yalcin *et al.*, 2010). Cette production et accumulation améliorée de citrate est souvent associées à l'activité mitochondriale (Papanikolaou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Ainsi, le citrate mitochondrial se situe au carrefour entre deux voies de signalisations énergétiques. Il s'agit de signaux cataboliques (oxydation complète de glucose, triglycérides et protéines) et signaux anaboliques (synthèse des lipides pour la croissance microbienne). Dans le cycle de Krebs le citrate est obtenu par la condensation de l'oxaloacétate avec l'acétyl-CoA. La dégradation de citrate dans le cycle de Krebs (catabolisme) pour la production des monnaies énergétiques (NADH, ATP) ou son flux de la mitochondrie vers le cytoplasme (anabolisme) pour la synthèse des acides gras, cholestérol et autres chaînes carbonées va dépendre des besoins de la cellule, en interaction avec son milieu.

Ce travail va essentiellement se focaliser sur la compréhension de cette « fuite anabolique » du citrate et plus particulièrement sur la capacité qu'ont certaines souches à accumuler le citrate dans le milieu de culture au détriment d'une accumulation de lipides issus de la lipogenèse (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014).

2. La production de citrate chez *Aspergillus niger*

Comme vu précédemment, l'accumulation de citrate chez les microorganismes est souvent reportée comme étant la résultante d'une « bascule métabolique » entre la voie d'oxydation catabolique et la synthèse anabolique (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014). Bien que des synthèses d'acide citrique aient été reportées chez certains organismes procaryotes anaérobies comme *Bacillus licheniformis*, *Arthrobacter paraffinens* et certaines espèces du genre *Corynebacterium*, ce « switch métabolique », à l'origine d'une accumulation importante de citrate, se produit aussi chez les microorganismes aérobies stricts (Anastassiadis *et al.*, 2008; Vandenberghe *et al.*, 1999). Ainsi, les organismes eucaryotes se sont imposés en principaux producteurs d'acide citrique et sont, de loin, les plus utilisés en industrie (Anastassiadis *et al.*, 2008; Angumeenal and Venkappayya, 2013). Parmi ces micro-organismes, la moisissure *Aspergillus niger* ainsi que certaines levures sont les plus prometteurs (Max *et al.*, 2010).

La moisissure *Aspergillus niger* est l'organisme le plus utilisé pour la production de citrate à grande échelle et a fait l'objet de nombreux brevets (Anastassiadis *et al.*, 2008). Cette moisissure a été identifiée pour la première fois en 1913 pour sa capacité à produire de grandes quantités de citrate. Cela a fait l'objet d'un brevet (Zahorski, 1913). James N. Currie a largement

contribué à populariser la production microbienne de citrate et en particulier chez *A. niger* (Currie, 1917). Ses travaux ont pu mettre en évidence un pH extracellulaire (pHe) optimal (2,5 - 3,5) pour la surproduction de citrate chez *A. niger*. La première exploitation industrielle a eu lieu dans les années 1920 par l'entreprise Pfizer qui avait alors engagé James Currie comme chimiste alimentaire. Depuis, d'autres sociétés telles que La Citrique belge et Clean SRL se sont positionnées sur ce marché. Le rendement théorique de la production de citrate chez *A. niger* est de 112g pour 100g de sucrose/saccharose consommé. Cependant, 70% du rendement théorique a été obtenu dans les conditions expérimentales (Max *et al.*, 2010). D'autres espèces du genre *Aspergillus* ont également été utilisées pour une production de citrate (Angumeenal and Venkappayya, 2013). Parmi ces espèces on retrouve *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fonsecaeus*, *Aspergillus luchensis*, *Aspergillus phoenicus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus saitoi*, et *Aspergillus flavus*. En dépit d'une longue et fructueuse histoire de la production d'acide citrique par diverses souches appartenant à diverses espèces du genre *Aspergillus*, il n'y a toujours pas d'explication claire du processus biochimique à la base d'une surproduction de citrate. Néanmoins, des études récentes chez *Aspergillus niger* ont révélé qu'il y a trois phénomènes métaboliques centraux qui prédisposent les cellules à l'accumulation de citrate dans le milieu (Legisa et Mattey, 2007). Les mécanismes à la base de ce phénotype particulier seraient :

- Une absorption rapide de glucose par diffusion simple
- Un flux métabolique « sans restriction » à travers la glycolyse
- Un découplage entre la réoxydation du NADH et la production d'ATP

Des régulations enzymatiques sont aussi impliquées dans la production de citrate (Papagianni, 2007). La cinétique de certaines enzymes du cycle de Krebs telles que la citrate synthase et l'isocitrate déshydrogénase peuvent expliquer l'accumulation de citrate chez *A. niger*. Ces enzymes sont inhibées par intermédiaires du cycle du Krebs comme le α -cétoglutarate et le citrate (Papagianni, 2007; Roehr *et al.*, 2008).

Il est important de souligner que les connaissances actuelles sur la biochimie de la production de citrate chez les microorganismes sont largement basées sur l'utilisation d'*A. niger*. Cependant, la solution recherchée dans la perspective d'une application dans l'industrie alimentaire impliquant l'incorporation du microorganisme, par exemple, se doit d'impliquer un microorganisme GRAS (Generally Recognized As Safe, pour les Etats-Unis) ou QPS (Qualified Presumption of Safety, en Europe). Or, l'usage de moisissures présente de nombreux

désavantages pour une incorporation dans des produits laitiers (couleur) et développement non-optimal sur matrice laitière.

Les souches de levures sont une bonne alternative aux moisissures. Ainsi elles seraient plus adaptées pour une application industrielle, en industrielle, puisque certaines espèces font déjà partie de la flore naturelle de certains produits laitiers (Barth et Gaillardin, 1996; Fickers *et al.*, 2005). Celles qui ont le plus grand potentiel pour la synthèse du citrate font aussi partie des espèces les mieux étudiées mais aussi brevetées (Anastassiadis *et al.*, 2008).

III. Les espèces GRAS/QPS à fort potentiel pour la production de citrate

Dans cette partie, nous limitons notre recherche à l'étude des microorganismes eucaryotes, aérobies, qui soit autorisés pour une consommation alimentaire. Des revues plus exhaustives portant sur les microorganismes producteurs de citrate sont répertoriées (Anastassiadis *et al.*, 2008; Max *et al.*, 2010).

La littérature scientifique a identifié certaines espèces du genre *Candida* comme étant les plus prometteuses pour une production de citrate à l'échelle industrielle (Tab. 9). De nombreuses études ont permis de caractériser des souches de plusieurs espèces du genre *Candida* avec des rendements en citrate proches des souches *Aspergillus*. Parmi ces espèces on retrouve : *Candida (Yarrowia) lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Candida intermedia*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Candida catenulata*, *Candida parapsilosis*, *Pichia anomala* et quelques espèces du genre *Rhodotorula* (Grewal et Kalra, 1995; Roehr *et al.*, 2008; Yalcin *et al.*, 2010).

L'espèce la plus prometteuse est *Y. lipolytica*, une levure non-conventionnelle et couramment utilisée en industrie pour ses propriétés catalytiques, notamment sa capacité de métaboliser les triglycérides et les acides gras (Barth et Gaillardin, 1996; Beopoulos *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2014; Ledesma-Amaro et Nicaud, 2016; Nicaud, 2012). Cette dernière montre aussi des propriétés très intéressantes pour l'accumulation de citrate à partir de différentes sources carbonées (Antonucci *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2002; Rymowicz *et al.*, 2006; Sil *et al.*, 2013). Ainsi, Papanikolaou *et al.* (2002) ont rapporté un rendement important de production de citrate (43%) à partir de glycérol et de glucose (Papanikolaou *et al.*, 2002). La souche utilisée dans cette étude est *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 et elle a permis une accumulation de 35 g/L de

citrate. L'optimisation des conditions expérimentales a permis aux auteurs d'obtenir une accumulation de citrate sans la synthèse de lipides. Il est aussi à noter que les auteurs ont obtenu des rendements de production de citrate de 85 % sur glucose, avec la souche sauvage *Y. lipolytica* W29 (Papanikolaou *et al.*, 2009). A notre connaissance, le meilleur rendement de production de citrate a été obtenu avec la souche *Y. lipolytica* 187/132. En effet Kamzolova *et al.* (2005) ont obtenu une concentration nette en acide citrique de 135 g/L à partir d'huile de colza (Kamzolova *et al.*, 2005). Plus récemment, ces auteurs ont obtenus des rendement de de production de citrate de 70 à 75 % sur glucose, avec la souche *Yarrowia lipolytica* VKM Y-2373 (Kamzolova et Morgunov, 2017). Un résumé plus exhaustif des travaux sur la production de citrate par *Y. lipolytica* est proposé dans le tableau 9.

Parmi les espèces du genre *Candida* mentionnées ci-dessus pour leur capacité à accumuler le citrate, deux sont retenues dans la catégorie GRAS. C'est le cas de l'espèce *Candida oleophila* et *Candida tropicalis* (Bourdichon *et al.*, 2012). Notamment la souche *Candida oleophila* ATCC 20177 a permis d'obtenir une concentration de 50 g/L en batch et jusqu'à 80 g/L en fed-batch (Anastassiadis *et al.*, 2002). La même souche utilisée dans une autre a démontré une sécrétion d'acide citrique importante via un transporteur membranaire spécifique dépendante du pH extracellulaire (Anastassiadis et Rehm, 2005). Une concentration en citrate de 57,8 g/L a été obtenue pour une culture continue à un pH de 5. Jusqu'à 150 g/L de citrate ont été obtenus avec la souche *Candida oleophila* ATCC 20177 en contrôlant le pH du milieu, la température et l'aération.

Tableau 9 : Les souches GRAS à fort potentiel pour la production de citrate.

Souches	Substrat	Conc Citrate (g/L)	Rendement g/g (%)	Référence
<i>Y. lipolytica</i> LGAM S(7)1	Glycérol Glucose	35	42-44	Papanikolaou (2002)
<i>Y. lipolytica</i> NRRL YB-423	Glycérol	21,6	54	Levinson (2007)
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	Glucose	10	27,1	Sil (2013)

<i>Y. lipolytica</i> W29	Glucose	5	18,6	Sil (2013)
<i>Y. lipolytica</i> 187/1	Huile de colza	135	155	Kamzolova (2005)
<i>C. oleophila</i> ATCC 20177	Glucose	167	23	Anastassiadis (2005)
<i>Y. lipolytica</i> W29	Glucose	49	85	Papanikolaou (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i> VKM Y-2373	Glucose	80-85	70-75	Kamzolova (2017)

IV. Le métabolisme du citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

1. Description générale de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est une levure oléagineuse qui appartient à la famille des hémiascomycète (Barth et Gaillardin, 1996, 1997). Elle a eu différentes appellations, *Candida*, *Endomycopsis* ou encore *Saccharomycopsis lipolytica* avant que le nom *Yarrowia* ne lui soit attribué par van der Walt et von Arx (van der Walt et von Arx, 1980) en hommage à David Yarrow (Yarrow, 1972) qui l'a isolée en 1970 (Nicaud, 2012). Les souches de *Yarrowia lipolytica* sont généralement isolées dans l'environnement ou des produits alimentaires. C'est le cas pour les souches isolées dans les milieux hypersalins ou milieux riches en lipides (Beopoulos *et al.*, 2010; Thevenieau *et al.*, 2009). Le nom d'espèce *lipolytica* a d'ailleurs été attribué à cette levure en référence à sa capacité à dégrader des quantités importantes de lipides (Nicaud, 2012; Papanikolaou et Aggelis, 2010). En industrie, les souches sont isolées des produits laitiers tels que les fromages et yaourts mais aussi sur des saucisses (Barth et Gaillardin, 1996; Fickers *et al.*, 2005).

Y. lipolytica présente un fort potentiel sur le plan industriel par sa capacité à dégrader divers substrats carbonés (glucose, glycérol et des alcools) (Fickers *et al.*, 2005; Papanikolaou *et al.*, 2006a) pour la production de lipides et acides organiques et protéines (Nicaud, 2012; Papanikolaou et Aggelis, 2010; Papanikolaou *et al.*, 2006b). Cette levure aérobique stricte est considérée comme étant non-pathogène et la plupart des souches ne peuvent se développer dans des conditions de température supérieure à 32 °C (Nicaud, 2012). Elle a été classée GRAS

(Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food et Drug Administration) américaine pour la production de citrate (Barth et Gaillardin, 1996; Fickers *et al.*, 2005).

Trois souches sauvages de la levure *Y. lipolytica* sont reportées dans la littérature. Il s'agit des souches isolées par des équipes française (W29), allemande (H222) et américaine (CBS6124-2). Elles peuvent présenter un polymorphisme en fonction des conditions de culture et de variabilité génétique. Elles ont une forme arrondie caractéristique de la plupart des levures mais peuvent subir des transitions morphologiques et emprunter des formes mycéliales caractérisées par la formation d'hyphes (Fig. 11) (Barth et Gaillardin, 1997; Nicaud, 2012; Papanikolaou et Aggelis, 2010). La souche E150 issue du croisement entre les souches W29 et H222 a été totalement séquencée dans le cadre du projet Génolevures (Dujon *et al.*, 2004). La connaissance du génome de *Y. lipolytica* a contribué à faire de cette levure non-conventionnelle un modèle d'étude des variations morphologiques mais aussi de la respiration cellulaire (Brandt *et al.*, 2005).

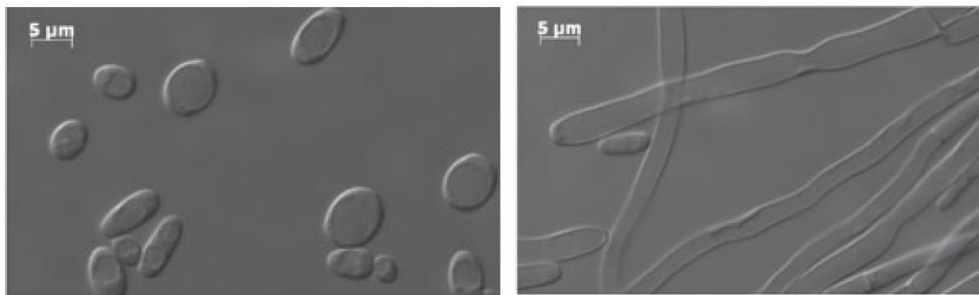


Figure 11 : La morphologie de *Yarrowia lipolytica* dans deux conditions de cultures. (A) forme levure classique lors d'une croissance sur le milieu YNB (Yeast Nitrogen Base). (B) forme filamentaire après ajout d'un sérum (Nicaud, 2012).

2. La respiration chez *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est aérobic stricte et présente une chaîne de transfert des électrons proche des cellules animales (Brandt *et al.*, 2005; Nicaud, 2012). Elle a donc été proposée comme modèle pour l'étude du rôle du complexe I de la chaîne respiratoire et l'apparition de certaines pathologies humaines (Brandt *et al.*, 2005; Kerschler *et al.*, 2004). La chaîne respiratoire de *Y. lipolytica* est semblable à celle présentée dans le chapitre 2, avec la présence des cinq complexes (I-V). Cependant, il existe quelques différences, notamment par la présence de complexes rédox « alternatifs » proches de ceux présents chez les plantes et les champignons (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012; Joseph-Horne *et al.*, 2001; Saisho *et al.*, 1997). Deux oxydo-réductases alternatives sont présentes chez *Y. lipolytica*. Il s'agit d'une NADH déshydrogénase (NDH2e) présente sur

la surface externe de la membrane mitochondriale et d'une oxydase alternative (AOX) présente sur la surface interne (Kerscher, 2000; Kerscher et al., 2002a). La spécificité de ces deux oxydo-réductases est qu'elles ne participent pas à la création de la force proton-motrice (Guerrero-Castillo *et al.*, 2011, 2012; Joseph-Horne *et al.*, 2000). Des études ont montré que les protéines NDH2e et AOX interagissent avec différents complexes de la chaîne respiratoire, en fonction des conditions de culture et de la phase de croissance. En phase de croissance, NDH2e formerait un supercomplexe avec les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Guerrero-Castillo et al., 2009). En phase stationnaire, NDH2e et AOX forment un complexe dissocié des autres complexes et de la chaîne classique de transfert des électrons. Ce mécanisme d'association/dissociation ou couplage/découplage de la NDH2e à la chaîne respiratoire a été proposé comme un mécanisme de défense, aussi présent chez les plantes, face à un stress. Il a été reporté que le découplage de la respiration chez *Y. lipolytica* limite la production d'espèces oxydantes telles que les ROS (Reactive Oxygen Species) (Guerrero-Castillo et al., 2012). Cette réponse antioxydante par la respiration alternative a été mise en évidence chez d'autres levures aérobies strictes (Guerrero-Castillo et al., 2011). Elle a été proposée comme un mécanisme plus global qui maintiendrait la respiration mitochondriale par l'intermédiaire de l'AOX et participe aussi à la fermentation aérobique en phase stationnaire (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018). Par ailleurs, il a été mis en évidence des sites de régulations chez l'AOX par des nucléotides et acides organiques chez les plantes (Hoefnagel *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1993) et potentiellement chez *Y. lipolytica* (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012; Luévano-Martínez *et al.*, 2010).

3. La respiration alternative chez *Yarrowia lipolytica* et l'overflow de citrate

Une étude récente sur l'activité respiratoire chez *Phaffia rhodozyma*, a mis en évidence un mécanisme commun entre l'activité de l'AOX et le phénomène d'overflow métabolique caractérisé par production d'éthanol chez cette levure (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018). *P. rhodozyma* est connue pour sa capacité à accumuler de l'astaxanthine, un antioxydant de la famille des caroténoïdes, en condition de stress afin de protéger la cellule contre les ROS. Le mécanisme global de production des ROS, de l'astaxanthine et de l'AOX est synthétisé dans la figure 12. Ce mécanisme est-il transposable à *Y. lipolytica* pour expliquer la production de citrate ?

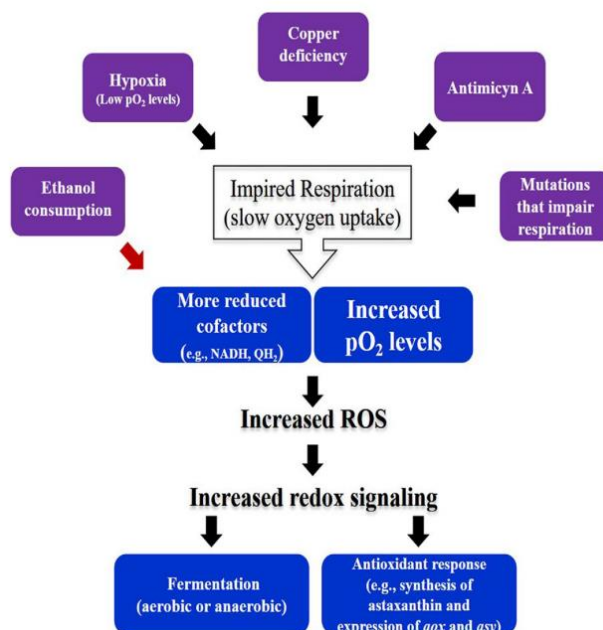


Figure 12 : Mécanisme proposé par Martínez-Cárdenas *et al.*, 2018 pour expliquer l’overflow d’éthanol, la synthèse d’antioxydants et l’expression de l’oxydase alternative chez *Phaffia rhodozyma*. Une perturbation de la respiration mitochondriale par mutation, hypoxie, déficience en cuivre ou ajout d’inhibiteur (Antimycine A) et l’accumulation d’espèces réduites (NADH et QH₂) favorisent une augmentation de ROS. Ainsi la fermentation aérobie ou anaérobie ainsi que la synthèse de l’antioxydant astaxanthine et l’expression de l’AOX seraient des stratégies pour limiter l’accumulation des ROS.

4. Mécanisme général pour expliquer la production de citrate chez *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est connue pour sa capacité à accumuler de grandes quantités de lipides et acide citrique en phase stationnaire de croissance (Papanikolaou *et al.*, 2006b; Ratledge et Wynn, 2002; Rattray *et al.*, 1975). L’explication donnée pour ces accumulations successives de lipides puis citrate est la diminution de l’AMP intracellulaire (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014; Papanikolaou *et al.*, 2006a; Ratledge et Wynn, 2002). L’AMP est un activateur de l’aconitase, une enzyme du cycle de Krebs responsable de l’oxydation du citrate en isocitrate. Lors d’une carence en azote, en début de phase stationnaire, l’AMP devient une source en azote pour la cellule. L’AMP est clivée en IMP et NH₃ sous l’action de l’AMP désaminase (Ratledge et Wynn, 2002). L’aconitase est alors inhibée et provoque une accumulation de citrate dans la mitochondrie. Le citrate mitochondrial accumulé est transporté dans le cytosol puis clivé à son tour par l’ATP citrate lyase en oxaloacétate et acétyl-CoA, un précurseur pour la synthèse des lipides. La plupart du temps, l’accumulation de lipides est limitée (mécanisme non-identifié) et le surplus de citrate est excrété dans le milieu de culture.

Comme expliqué plus haut, la NADH dehydrogenase de type II (NDH2e) et l'oxydase alternative (AOX) limiteraient la production des ROS (reactive oxygen species) lors de la phase stationnaire de croissance (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012). Les auteurs ont utilisé des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (antimycine A, roténone, cyanure (KCN)), un agent découplant (CCCP) et un inhibiteur de l'AOX (n-propylgallate (nPG)) pour étudier la respiration en phases de croissance et stationnaire chez *Y. lipolytica*. La consommation en oxygène (J_{O_2}) est principalement inhibée par le cyanure en phase exponentielle de croissance lorsqu'un apport important en ATP est requis. Inversement, la J_{O_2} est plus inhibée par la nPG en phase stationnaire, ce qui met en évidence l'activation de l'AOX en phase stationnaire. La question qui se pose est le rôle potentiel joué par la respiration alternative dans la production de citrate chez *Y. lipolytica*. Très peu d'études récentes sont répertoriées concernant l'activité respiratoire et la production de citrate chez *Y. lipolytica*. Le seul article identifié date de 1979 par Akimenko *et al.*, disponible sous forme d'abstract (Akimenko *et al.*, 1979). Les auteurs ont étudié la relation entre la respiration résistante au cyanure (NDH2e-AOX) et la production de citrate chez différentes souches de l'espèce *Candida (Yarrowia) lipolytica*. La production de citrate est reportée comme étant inversement proportionnelle à la respiration résistante au cyanure. La surproduction de citrate serait observée lors de l'inhibition complète de la respiration par le cyanure. D'autres études plus récentes ont permis d'identifier la fonction principale de la respiration alternative chez *Y. lipolytica*. Medentsev *et al.* (2002) ont utilisé le FCCP (un agent découplant de la phosphorylation oxydative) en combinaison avec le cyanure pour inhiber la respiration mitochondriale. Le système NDH2e-AOX aurait pour fonction la récupération du surplus d'électrons qui traversent la chaîne respiratoire et limiter la production des ROS.

V. Optimisation de la production de citrate

1. Les conditions expérimentales favorisant une accumulation de citrate

La maîtrise des conditions expérimentales de fermentation est très importante en industrie, particulièrement en biosynthèse d'acides organiques. De nombreuses études ont reporté une optimisation de la production de citrate via le contrôle de certains paramètres environnementaux (Gonçalves *et al.*, 2014; Kubicek *et al.*, 1980; Moeller *et al.*, 2007a). Les facteurs influençant la production de citrate sont principalement les sources en carbone, azote, le phosphate, le pH, l'oxygène, les oligo-éléments (ex : fer) et la morphologie du microorganisme (Max *et al.*, 2010).

Les sources en carbone les plus utilisées sont les polysaccharides tel que le saccharose et particulièrement chez l'*A. niger* et *Y. lipolytica* (Mattey, 1992). Les organismes possédant une sécrétion d'enzymes hydrolytiques (invertases, lipases) permettent une assimilation rapide des monosaccharides (galactose, glucose, fructose) ou lipides (glycérol, acide gras) et un rendement important en citrate.

a. Le pH

Le pH du milieu est aussi un facteur important dans l'optimisation de la croissance des souches et pour la synthèse de citrate (Moeller *et al.*, 2007b). La consommation d'ammonium par les cellules en phase de croissance favorise la libération de protons et l'acidification du milieu de culture (Max *et al.*, 2010). La régulation du pH est parfois nécessaire à la croissance et à la production de citrate chez certains organismes. C'est par exemple le cas pour *Y. lipolytica* qui présente un pH optimum de 6 pour la croissance et la production de citrate (Moeller *et al.*, 2007b).

b. L'aération de la culture

L'aération (CO_2/O_2) du milieu de culture est un paramètre important pour la synthèse de citrate. Le CO_2 dissous est une source importante pour le pyruvate carboxylase qui catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate, un précurseur de citrate dans le cycle de l'acide citrique. Le dioxygène (O_2) dissous joue un rôle sur la respiration mitochondriale et donc sur la capacité des cellules à générer des « monnaies énergétiques » telles que l'ATP ou le citrate (Kubicek *et al.*, 1980). Les auteurs ont montré qu'une augmentation de l' O_2 dissous en milieu de culture permet d'optimiser la production de citrate. Jusqu'à environ 80 g/L de citrate a été produit pour des cultures de *A. niger* lorsqu'une agitation de 1650 rpm était appliquée, comparée à une production de 50 g/L sous une agitation de 600 rpm (Kubicek *et al.*, 1980).

c. La source d'azote et oligo-éléments

La source en azote (N) joue aussi un rôle important dans la synthèse de citrate. Le contrôle de la disponibilité en azote dans le milieu de fermentation permet la maîtrise de la croissance des souches jusqu'à la phase de production d'acides organiques ou lipides (Klasson *et al.*, 1989; Socol *et al.*, 2006). Rane *et al.* (1996) ont rapporté que la meilleure source en azote pour la production de citrate chez la levure *Y. lipolytica* est le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) alors que d'autres espèces telles que *Candida paratropicalis* préfèrent l'extrait de levure (Rane et

Sims, 1996). D'autres études montrent que la biosynthèse de citrate et son accumulation dans le milieu de fermentation démarrent lors d'une carence en azote dans le milieu de culture (McKay *et al.*, 1994). Cela a été confirmé par Anastassiadis *et al.* (2002) qui ont montré que le NH_4Cl_2 est le substrat limitant pour la synthèse de citrate. Ils ont aussi démontré, pour la première fois, que la limitation en azote intracellulaire est à l'origine d'une accumulation d'ions ammonium (NH_4^+) issue de la protéolyse, d'une augmentation d'ATP et de la production de citrate extracellulaire (Anastassiadis *et al.*, 2002). Cependant, des études plus récentes utilisent le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et l'extrait de levure pour la production de citrate chez *Y. lipolytica* (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014; Papanikolaou *et al.*, 2013).

Les oligoéléments tels que Zn, Mn, Fe et Cu conditionnent certaines réactions enzymatiques et peuvent influencer la production de citrate (Shu et Johnson, 1948).

Enfin, la morphologie de l'espèce en fermentation joue un rôle important sur l'optimisation de la production de citrate via le contrôle des facteurs tels que la disponibilité en source carbonée, le pH ou l'agitation du milieu (Papagianni, 2004; Papagianni *et al.*, 1999).

2. L'influence du ratio Carbone/Azote (C/N) sur la synthèse de citrate

Le contrôle des ressources nutritionnelles chez les micro-organismes dans un procédé de production à grande échelle est un enjeu majeur pour l'industrie. Dans une précédente étude, nous avons proposé une synthèse sur la synchronisation entre la division des cellules eucaryotes et les événements métaboliques (da Veiga Moreira *et al.*, 2015). Cette synchronisation est souvent la résultante d'un management interne des ressources énergétiques du milieu de production. Chez les organismes autotrophes comme chez les hétérotrophes, les principales ressources sont de nature carbonée et souvent complémentées par de l'azote. Cette disponibilité en nutriments va avoir pour conséquence aux microorganismes d'adapter leur croissance. En ce sens, des études récentes ont pu démontrer que des limitations en carbone ou en azote induisent des carences intracellulaires et l'inhibition des voies métaboliques essentielles pour la croissance. Ces observations ont fait l'objet de modèles mathématico-informatiques de prédiction de la distribution des ressources pendant la croissance d'un microorganisme (Goelzer *et al.*, 2015). Plus proche de notre problématique, une étude récente a formalisé un procédé de contrôle des ratios C/N chez la levure *Yarrowia lipolytica* (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014). Des ratios caractéristiques pour l'accumulation de lipides et pour la synthèse de citrate ont été

reportés. Ochoa-Estopier *et al.* (2014) ont développé un système D-stat, permettant une croissance linéaire de ce ratio, et ont obtenu une accumulation de lipides au détriment d'acide citrique, naturellement présent en plus grande quantité. Une investigation plus approfondie du transcriptome a révélé l'importance de trois enzymes pivots dans la transition énergétique chez la souche *Y. lipolytica* W29. Il s'agit de l'ATP citrate lyase, acetyl-CoA carboxylase et l'enzyme malique. Ces enzymes sont au carrefour entre les voies permettant une oxydation complète des sources en carbone (oxydation phosphorylative) et la fermentation (accumulation de citrate). Comme rapporté plus haut, cette bascule est souvent le résultat d'une variation énergétique intracellulaire, contrôlée par des ratios redox et donc à l'origine de cet «overflow» métabolique favorisant une accumulation de citrate (Wang *et al.*, 2015).

3. Co-cultures

Des co-cultures ont été réalisées pour améliorer le rendement de production de citrate. Une récente étude a permis d'obtenir un rendement de 55,6% en citrate dans une co-culture de la souche *Y. lipolytica* SWJ-1b et *Trichoderma reesei* (Liu *et al.*, 2014). L'action combinée de *Trichoderma reesei* et *Y. lipolytica* SWJ-1b ont permis la dégradation de la cellulose par la sécrétion de la cellulase et la synthèse du citrate, respectivement. Une autre étude, semblable à la précédente, a reporté la caractérisation d'une souche et la mise en place d'une condition environnementale optimale pour la synthèse du citrate en grande quantité, couplée à la sécrétion des lipases (Sil *et al.*, 2013). Cette souche *Y. lipolytica* IMUFRJ 5068 garantit un rendement de 91% à partir d'un milieu de culture classique riche en glucose.

Nous allons maintenant aborder la présentation d'autres méthodes couramment employées pour optimiser la production de citrate. Il s'agit, la plupart du temps, de techniques de mutagenèse ou par intervention génétique.

4. Approches OGMs et mutagène

Face à l'explosion mondiale des demandes pour l'acide citrique, des méthodes faisant intervenir des organismes génétiquement modifiés (OGM) évolués par agents mutagènes ont été employées afin d'augmenter la biosynthèse de citrate. Les organismes utilisés sont de la même famille que ceux cités plus haut. Ainsi, Wojtatowicz *et al.* (1991) ont obtenu un rendement en

citrate de 93% en utilisant une souche *Yarrowia lipolytica* ayant subi des irradiations aux rayons ultra-violet (UV). Plus récemment, Rymowicz *et al.* (2006) ont utilisé une souche *Y. lipolytica* génétiquement modifiée afin d'augmenter la production de citrate. Cette souche (*Y. lipolytica* 1.31) qui a été modifiée au niveau du gène permettant l'assimilation d'acétate a permis un rendement en citrate de 62% à partir du glycérol (Rymowicz *et al.*, 2006).

Conclusion

Près de 99% de la production mondiale de citrate est d'origine microbienne. La moisissure *Aspergillus niger* est le support principal de la production de citrate destinée à l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. D'autres microorganismes tel que la levure *Yarrowia lipolytica* présentent une alternative à fort potentiel puisqu'elle permet une production de citrate en quantité industrielle et reconnue GRAS et QPS. La convergence entre une augmentation de la demande mondiale pour les métabolites d'intérêt et le développement des méthodes d'analyse métabolomique ont favorisé l'apparition des approches mathématico-informatiques de modélisation du métabolisme. Ces méthodes ont été appliquées à la modélisation de la production de citrate chez l'*Aspergillus niger* mais aussi chez *Yarrowia lipolytica*.

Références

- Akimenko, V.K., Finogenova, T.V., Ermakova, I.T., and Shishkanova, N.V. (1979). [Respiratory cyanide resistance in *Candida lipolytica* and the supersynthesis of citric acids]. *Mikrobiologiya* 48, 632–638.
- Anastassiadis, S., and Rehm, H.-J. (2005). Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Electron. J. Biotechnol.* 8, 146–161.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., and Wandrey, C. (2002). Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 81–87.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V., and Finogenova, T.V. (2008). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 107–123.
- Angumeenal, A.R., and Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 367–370.
- Antonucci, S., Bravi, M., Bubbico, R., Di Michele, A., and Verdone, N. (2001). Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 189–195.
- Barth, G., and Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 313–388.
- Barth, G., and Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 219–237.
- Beopoulos, A., Desfougeres, T., Sabirova, J., Zinjarde, S., Neuvéglise, C., and Nicaud, J.-M. (2010). The Hydrocarbon-Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, K.N. Timmis, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 2111–2121.
- Berovic, M., and Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13, 303–343.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., et al. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97.

Brandt, U., Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Galkin, A., Dröse, S., Zwicker, K., and Kerscher, S. (2005). Structure-function relationships in mitochondrial complex I of the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 840–844.

Currie, J.N. (1917). The Citric Acid Fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* 31, 15–37.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of citric acid when used as a technological additive (acidity regulator) for all animal species. *EFSA J.* 13.

Fickers, P., Fudalej, F., Dall, M.T.L., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P., and Nicaud, J.M. (2005). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 264–274.

Goelzer, A., Muntel, J., Chubukov, V., Jules, M., Prestel, E., Nölker, R., Mariadassou, M., Aymerich, S., Hecker, M., Noirot, P., et al. (2015). Quantitative prediction of genome-wide resource allocation in bacteria. *Metab. Eng.* 32, 232–243.

Gonçalves, F. a. G., Colen, G., and Takahashi, J.A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry.

Grewal, H.S., and Kalra, K.L. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnol. Adv.* 13, 209–234.

Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 75–85.

Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L.A., Zepeda-Bastida, A., and Uribe-Carvajal, S. (2011). Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 323–331.

Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2012). During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 353–362.

Halabe Bucay, A. (2007). The biological significance of cancer: Mitochondria as a cause of cancer and the inhibition of glycolysis with citrate as a cancer treatment. *Med. Hypotheses* 69, 826–828.

Hoefnagel, M.H., Millar, A.H., Wiskich, J.T., and Day, D.A. (1995). Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 394–400.

Icard, P., Poulain, L., and Lincet, H. (2012). Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1825, 111–116.

Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P.M., Hollomon, D., and Sessions, R.B. (2000). New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett.* 481, 141–146.

Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., and Wood, P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1504, 179–195.

Kamzolova, S.V., and Morgunov, I.G. (2017). Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 243, 433–440.

Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G., Aurich, A., Perevoznikova, O.A., Shishkanova, N.V., Stottmeister, U., and Finogenova, T.V. (2005). Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 113–122.

Kerscher, S.J. (2000). Diversity and origin of alternative NADH: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1459, 274–283.

Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., Zickermann, V., and Brandt, U. (2002). *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1555, 83–91.

Kerscher, S., Grgic, L., Garofano, A., and Brandt, U. (2004). Application of the yeast *Yarrowia lipolytica* as a model to analyse human pathogenic mutations in mitochondrial complex I

(NADH: ubiquinone oxidoreductase). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1659, 197–205.

Klasson, T.K., Clausen, E.C., and Gaddy, J.L. (1989). Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20, 491–509.

Kubicek, C.P., Zehentgruber, O., El-Kalak, H., and Röhr, M. (1980). Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 101–115.

Ledesma-Amaro, R., and Nicaud, J.-M. (2016). *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 61, 40–50.

Legisa, M., and Matthey, M. (2007). Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 29, 181–190.

Liu, X., Lv, J., Zhang, T., and Deng, Y. (2014). Direct Conversion of Pretreated Straw Cellulose into Citric Acid by Co-cultures of *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b and Immobilized *Trichoderma reesei* Mycelium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 501–509.

Luévano-Martínez, L.A., Moyano, E., de Lacoba, M.G., Rial, E., and Uribe-Carvajal, S. (2010). Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 81–88.

Martínez-Cárdenas, A., Chávez-Cabrera, C., Vasquez-Bahena, J.M., and Flores-Cotera, L.B. (2018). A common mechanism explains the induction of aerobic fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*. *Microb. Cell Factories* 17, 53.

Matthey, M. (1992). The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 87–132.

Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., and Domínguez, J.M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Braz. J. Microbiol.* 41, 862–875.

McKay, I.A., Maddox, I.S., and Brooks, J.D. (1994). High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 73–78.

Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., and Day, D.A. (1993). Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 329, 259–262.

- Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A., and Bley, T. (2007a). Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.* 7, 504–511.
- Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A., and Bley, T. (2007b). Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.* 7, 504–511.
- Nicaud, J.-M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29, 409–418.
- Ochoa-Estopier, A., and Guillouet, S.E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 170, 35–41.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 189–259.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25, 244–263.
- Papagianni, M., Matthey, M., and Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 710–717.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 639–654.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., and Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.* 92, 737–744.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., and Aggelis, G. (2006a). Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 52, 134–142.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., and Aggelis, G. (2006b). Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* 52, 134–142.
- Papanikolaou, S., Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Nicaud, J.-M., and Aggelis, G. (2009). Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 1221–1232.

- Papanikolaou, S., Beopoulos, A., Koletti, A., Thevenieau, F., Koutinas, A.A., Nicaud, J.-M., and Aggelis, G. (2013). Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 168, 303–314.
- Rane, K.D., and Sims, K.A. (1996). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity. *Biotechnol. Lett.* 18, 1139–1144.
- Ratledge, C., and Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51, 1–51.
- Ratray, J.B., Schibeci, A., and Kidby, D.K. (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39, 197–231.
- Roehr, M., Kubicek, C.P., and Komínek, J. (2008). Citric Acid. In *Biotechnology Set*, (Wiley-Blackwell), pp. 307–345.
- Rymowicz, W., Rywińska, A., Żarowska, B., and Juszczak, P. (2006). Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.* 60, 391–394.
- Sabra, W., Bommareddy, R.R., Maheshwari, G., Papanikolaou, S., and Zeng, A.-P. (2017). Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microb. Cell Factories* 16, 78.
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A., and Nakazono, M. (1997). Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 35, 585–596.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., and Branduardi, P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26, 100–108.
- Shanbrom, E. (2002). Use of citric acid as antimicrobial agent or enhancer or as anticancer agent.
- Show, P.L., Oladele, K.O., Siew, Q.Y., Zakry, F.A.A., Lan, J.C.-W., and Ling, T.C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Front. Life Sci.* 8, 271–283.
- Shu, P., and Johnson, M.J. (1948). The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation 1. *J. Bacteriol.* 56, 577–585.

Sil, J., Das, S., Oliveira, R.G., Amaral, P.F.F., and Coelho, M.A.Z. (2013). Screening Six Potential *Yarrowia lipolytica* Strains for Best Lipid, Citric Acid, Biosurfactant and Lipase Production. 5.

Smeets, F. (1983). Microbial production of citric acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 86–87.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., and Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 141–149.

Thevenieau, F., Nicaud, J.-M., and Gaillardin, C. (2009). Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, (Springer, Dordrecht), pp. 589–613.

Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A., and Lebeault, J.-M. (1999). Microbial production of citric acid. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 42, 263–276.

da Veiga Moreira, J., Peres, S., Steyaert, J.-M., Bigan, E., Paulevé, L., Nogueira, M.L., and Schwartz, L. (2015). Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theor. Biol. Med. Model.* 12, 10.

van der Walt, J.P., and von Arx, J.A. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46, 517–521.

Wang, L., Zhang, J., Cao, Z., Wang, Y., Gao, Q., Zhang, J., and Wang, D. (2015). Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Factories* 14, 7.

Yalcin, S.K., Bozdemir, M.T., and Ozbas, Z.Y. (2010). Citric acid production by yeasts: Fermentation conditions, process optimization and strain improvement. 9.

Yarrow, D. (1972). Four new combinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38, 357–360.

Zahorski, B. (1913). Method of producing citric acid.

Chapitre IV

Modélisation du métabolisme

I. Modéliser un réseau métabolique

L'accumulation des connaissances du métabolisme d'organismes modèles chez les bactéries, levures ou les cellules animales a permis des descriptions schématiques des réseaux de réactions respectifs (Christensen et Nielsen, 2000). Ces réseaux de réactions, toutes catalysées par des enzymes, décrivent des voies réactionnelles transformant des substrats en produits (Andersen *et al.*, 2008). La modélisation d'un réseau métabolique peut se faire de plusieurs façons : différentes formulations mathématiques, à différentes échelles et en fonction des objectifs (Christensen et Nielsen, 2000; Francke *et al.*, 2005; Costanzo *et al.*, 2010). Elle peut être réalisée dans un cadre théorique, pour identifier des propriétés émergentes d'un réseau métabolique (Mazurie *et al.*, 2010), ou alors être appliquée à des problématiques industrielles telles que l'amélioration d'une lignée cellulaire ou d'un bioprocédé de production (Mahadevan *et al.*, 2005; Almquist *et al.*, 2014; Ghorbaniaghdam *et al.*, 2014; Robitaille *et al.*, 2015).

Deux approches majeures de modélisation sont appliquées en biologie des systèmes. Il s'agit de l'approche statique permettant d'étudier la variation des flux métaboliques pour un système considéré à l'équilibre ou quasi-stationnaire et basée sur des contraintes (CBM) et l'approche dynamique qui offre une description cinétique des réactions enzymatiques qui permettent de décrire tant l'effet de perturbations de l'environnement cellulaire que les états quasi-stationnaires (Machado *et al.*, 2012). Le développement de modèles dynamiques ou cinétiques pour modéliser le métabolisme de cellules demande une description mathématique plus détaillée des liens réactionnels entre les composantes du réseau (Soh *et al.*, 2012). Les modèles cinétiques utilisent des données quantitatives pour relier l'expression des flux et la concentration des métabolites et proposent une résolution d'un système d'équations différentielles ordinaires (EDO) (Almquist *et al.*, 2014). Si on prend l'exemple d'une culture de micro-organisme dans un bioréacteur opéré en mode cuvée (batch), pour un volume V constant de culture, et un métabolisme tel que présenté dans la figure 1, cela revient à formuler le système d'équations mathématiques suivant :

$$\frac{dC}{dt} = S_c \cdot v(c, u, p) \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dm}{dt} = S_m \cdot v(m, u, p) - \mu \cdot m \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3)$$

Ainsi S_C représente la matrice de stœchiométrie des substrats et produits extracellulaires c_i , S_m étant la matrice de stœchiométrie des métabolites intracellulaires m_i . Les vitesses des réactions v_i vont dépendre des variables d'état du vecteur $u(t)$ et de p , les paramètres cinétiques du système. Enfin, μ et X sont respectivement le taux de croissance spécifique et la biomasse produite.

Les équations cinétiques les plus couramment utilisées pour décrire l'activité enzymatique sont la loi d'action de masse (AM) et l'équation de Michaelis-Menten (MM). Les cinétiques appliquées sont, la plupart du temps, mécanistiques ou stochastiques (Kim *et al.*, 2018).

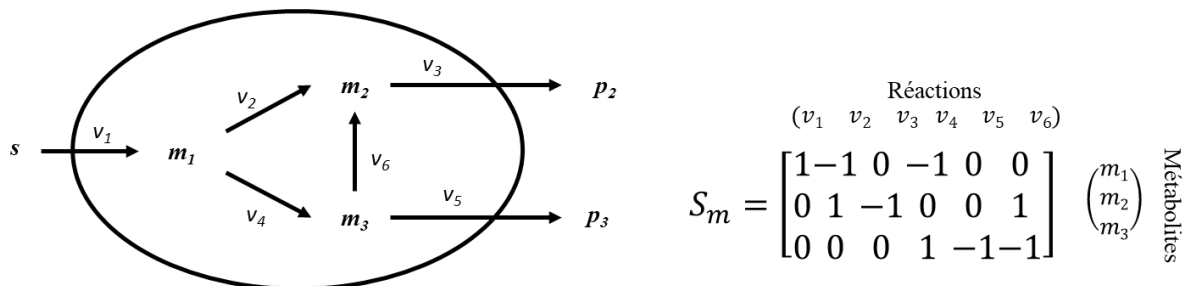


Figure 13 : Le réseau métabolique et la matrice de stœchiométrie correspondante.

S_m représente la matrice de stœchiométrie du réseau métabolique, avec v_i étant les vitesses des réactions et m_i les métabolites intracellulaires. S et p_i sont le substrat et les produits.

II. Approches dynamiques de modélisation

1. Cinétiques mécanistiques

Les équations cinétiques mécanistiques les plus couramment utilisées pour décrire les activités enzymatiques dans un réseau métabolique sont la loi d'action de masse (AM) et la cinétique de Michaelis-Menten (MM).

a. La loi d'action de masse

La loi d'action de masse traduit une constante entre la vitesse d'une réaction et la concentration du substrat de la réaction. La vitesse de la réaction v_i pour une réaction est de la forme :

$$v_i = k \cdot m_i \quad (4)$$

Dans cette cinétique enzymatique, k est une constante et m_i la concentration en substrat. Les concentrations ainsi que les constantes cinétiques doivent être déterminées expérimentalement ou retrouvées dans des bases de données telles que BRENDA (Schomburg *et al.*, 2017) ou SABIO-RK (Rojas *et al.*, 2007).

b. Equation de Michaelis-Menten

La cinétique enzymatique proposée par Michaelis-Menten-Henri est l'archétype d'équation permettant de décrire la vitesse de réaction d'une enzyme sur un substrat.

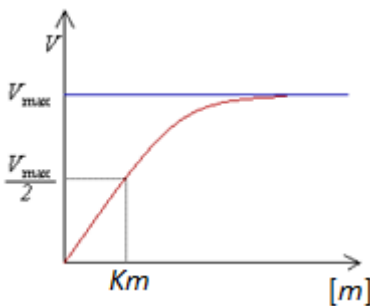


Figure 14 : Représentation schématique de la vitesse d'une réaction métabolique d'après Michaelis-Menten-Henri.

- $[m]$: concentration en substrat
- v_i : vitesse de la réaction en quasi-équilibre
- V_{max} : vitesse maximale de la réaction. Elle peut aussi être décomposée en concentration enzymatique E et la capacité catalytique intrinsèque de l'enzyme.
- K_m : constante de Michaelis-Menten, dite constante d'affinité d'une enzyme pour un substrat, est assimilée à la concentration en substrat m pour laquelle la vitesse v_i a atteint la moitié de la vitesse maximale ($V_{max}/2$).



$$v_i = V_{max} \cdot \frac{m_i}{K_m + m_i} \quad (6)$$

Cette représentation mathématique, obtenue en posant les bilans de masse sur les différents composants de la réaction enzymatique en (5) et en résolvant en posant des conditions quasi-stationnaires. Elle permet de relier la vitesse de la réaction v_i à la concentration du substrat m et des constantes enzymatiques V_{max} et K_m (Cornish-Bowden, 2013; Cornish-Bowden *et al.*, 2014). Cette équation est valide pour une enzyme saturée par le substrat ($m_i \lll K_m$), pour une réaction irréversible. Elle a été généralisée aux réactions réversibles (Noor *et al.*, 2013) et appliquée à l'étude de nombreux réseaux métaboliques (Cloutier *et al.*, 2007; Smallbone *et al.*, 2011; Stanford *et al.*, 2013). Les constantes cinétiques peuvent être déterminées expérimentalement mais sont aussi répertoriées dans les bases de données citées plus haut ou encore dans des bases de données de modèles telles que BiGG (King *et al.*, 2016), BioModels (Li *et al.*, 2010) et JWS Online (Peters *et al.*, 2017).

c. Equation de Hill

L'équation de Hill a été proposée en 1910 par le physiologiste Archibald Hill pour décrire l'interaction entre une molécule et son ligand protéique. Ce dernier l'a d'abord formulée dans le cadre de l'étude de la fixation du dioxygène par l'hémoglobine (Hill, 1910). Elle a ensuite permis de décrire l'activité des enzymes allostériques en biologie (Monod *et al.*, 1965). La fixation d'un activateur ou d'un inhibiteur à leurs sites respectifs ainsi module l'activité enzymatique donnée par les équations de Hill suivantes :

$$\text{Activation} \quad (6) \quad v_i = \mu_{max} \cdot \frac{S^n}{m_i^n + k_a^n}$$

$$\text{Inhibition} \quad (7) \quad v_i = \mu_{max} \cdot \frac{k_i^n}{m_i^n + k_i^n}$$

Dans les deux cas, m_i correspond à la concentration en substrat i , μ_{max_i} est la vitesse maximale de réaction, k_a et k_i sont les constantes d'activation et d'inhibition, respectivement reliées au substrat. Le n représente le coefficient de Hill ou la coopérativité de l'enzyme pour les régulateurs. Dans le cas de l'activation, l'équation de Hill correspond à celle proposée par Michaelis-Menten pour $n = 1$ (Kim *et al.*, 2018). Elle a aussi été décrite plus tard par Jacques Monod au niveau macroscopique (Monod *et al.*, 1965). Cette approche a de nombreux cas d'application, notamment pour la modélisation du métabolisme des bactéries (Alam *et al.*, 2010), ainsi que pour les cellules eucaryotes telles que les levures (Bailey *et al.*, 1986; Galazzo et Bailey, 1990; Klipp, 2007), cellules végétales (Cloutier *et al.*, 2007) et des cellules animales (Robitaille *et al.*, 2015).

2. Simulations stochastiques

Les approches stochastiques, bien que moins répondues que les simulations mécanistiques, pour simuler les interactions entre un substrat et une enzyme, sont principalement appliquées à des réseaux métaboliques ou génétiques de petites tailles (Eldar et Elowitz, 2010; Raj et van Oudenaarden, 2008). De plus, les simulations stochastiques prennent en compte les changements soudains qui peuvent se produire dans une culture cellulaire (ex : carences en nutriments, pH, température ou encore l'état rédox du milieu) (Bowsher et Swain, 2014). Ces variations sont prises en compte dans la « mise à jour » de la cinétique enzymatique définie par une probabilité de rencontre entre l'enzyme et son substrat. Différentes formulations sont proposées pour la construction et simulation les modèles stochastiques. La méthode la plus

répondue pour formuler ces modèles stochastiques est Chemical Master Equation (CME) (Gillespie, 1976; Ullah et Wolkenhauer, 2010). Cette méthode statistique prédit la concentration de chaque molécule au cours du temps (Gillespie, 2007). Ce sont des EDO couplés qui évoluent dans le temps par une fonction de probabilité $P(x, t | x_0, t_0)$ où x désigne une molécule et sa condition initiale (x_0) et t étant le temps d'intégration, avec t_0 correspondant au temps initial. Un exemple classique d'utilisation des CMEs pour décrire des régulations stochastiques est le système de l'opéron *Lac* chez *Escherichia coli* (Choi *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, le métabolisme du lactose dépend de l'inhibition du gène *lacI* par le lactose mais la consommation du lactose dépend elle aussi de la transcription, aléatoire, du gène *lacY* qui code pour la perméase. Cependant l'application de ces algorithmes de simulation stochastique pour décrire la cinétique d'un réseau biochimique métabolique se limite à des cas de régulation génétique, des voies de signalisation et réseaux métaboliques de petites tailles (Voliotis *et al.*, 2016).

III. Modélisation à l'état quasi-stationnaire à base de contraintes

1. Stationnarité d'un système métabolique

L'hypothèse de stationnarité appliquée pour l'analyse d'un réseau métabolique tel que celui de la figure 13 implique que la concentration des métabolites intracellulaires $[m_i]$ reste constante : la vitesse de consommation est équilibrée par la vitesse de production (Schuster et Hilgetag, 1994; Schuster *et al.*, 2002). Cette hypothèse de stationnarité permet de simplifier l'équation (2) qui devient (6) puis (7) si l'on considère le terme μm négligeable à l'état stationnaire.

$$\frac{dm}{dt} = S_m \cdot v(m, u, p) - \mu \cdot m = 0 \quad (8)$$

$$S_m \cdot v = 0 \quad (9)$$

$$v > 0, \forall i \in \text{réaction irréversible} \quad (10)$$

Ainsi, cette hypothèse permet de s'affranchir des constantes enzymatiques telles que les K_m et les V_{max} et les flux ne dépendent plus que de la stœchiométrie du réseau. Néanmoins, l'espace de solutions de l'équation (7) est sous déterminée puisqu'en général il y a plus de réactions n_v qu'il n'y a de métabolites n_m dans un réseau métabolique. Cet espace forme un cône convexe

polyédrique pour l'ensemble des réactions irréversibles v (8) à l'état stationnaire (7). Des approches de modélisation basées sur des contraintes (CBM) sont appliquées pour pallier à cette difficulté. La CBM permet une analyse du réseau basée sur la connaissance de certains flux déterminés expérimentalement (Maertens et Vanrolleghem, 2010). Différentes méthodes CBM sont appliquées pour la résolution de l'équation (7), parmi lesquelles on peut citer Elementary Flux Modes (EFM), Metabolic Flux Balance (MFA), Flux Balance Analysis (FBA) et d'autres approches dérivées et présentées dans les sections suivantes.

2. Modes élémentaires de flux

Les modes élémentaires de flux ou Elementary Flux Modes (EFM) ont été proposés comme un concept mathématique formel pour l'analyse, à l'état stationnaire, de réactions biochimiques dans un réseau métabolique (Schuster et Hilgetag, 1994). Ils représentent l'ensemble des voies métaboliques minimales à l'état stationnaire et forment l'ensemble des vecteurs générateurs du cône convexe polyédrique (Fig. 15). Les EFM constituent des voies minimales conduisant à la synthèse des produits finaux à partir des substrats (Fig. 15). Si l'on considère le réseau métabolique de la figure 13, trois EFM peuvent être identifiées *EFM 1* (v_1, v_2, v_3), *EFM 2* (v_1, v_4, v_6, v_3) et *EFM 3* (v_1, v_4, v_5). La « minimalité » de chaque EFM est liée à la létalité de la suppression de l'une des réactions impliquées dans le phénotype étudié ; par exemple, la synthèse de la biomasse, la synthèse d'ATP ou la maintenance (Schuster *et al.*, 2002). La décomposition des réseaux métaboliques en modes élémentaires de flux permet donc de répertorier toutes les voies métaboliques minimalement « admissibles » à ce même réseau. Enfin, les EFM permettent aussi l'identification d'un ensemble de coupures minimales, ou « minimal cut sets », de réactions permettant l'inhibition de la production d'un produit final (Klamt et Gilles, 2004). Les outils de calcul des EFM sont *METATOOL* (Pfeiffer *et al.*, 1999), *efmtool* (Terzer et Stelling, 2008), *CellnetAnalyzer* (Klamt *et al.*, 2007), *Scrumpy* (Poolman, 2006) ou encore *SATefmtool* (Peres *et al.*, 2014) et *SMTtool* (Mortero *et al.*, 2016). Cependant, avec les outils actuels, l'étude des EFM n'est possible que sur des réseaux de taille limitée. Il n'est donc pas encore possible, à notre connaissance, d'analyser des EFM sur des réseaux métaboliques décrits à l'échelle du génome pour des raisons de résolution.

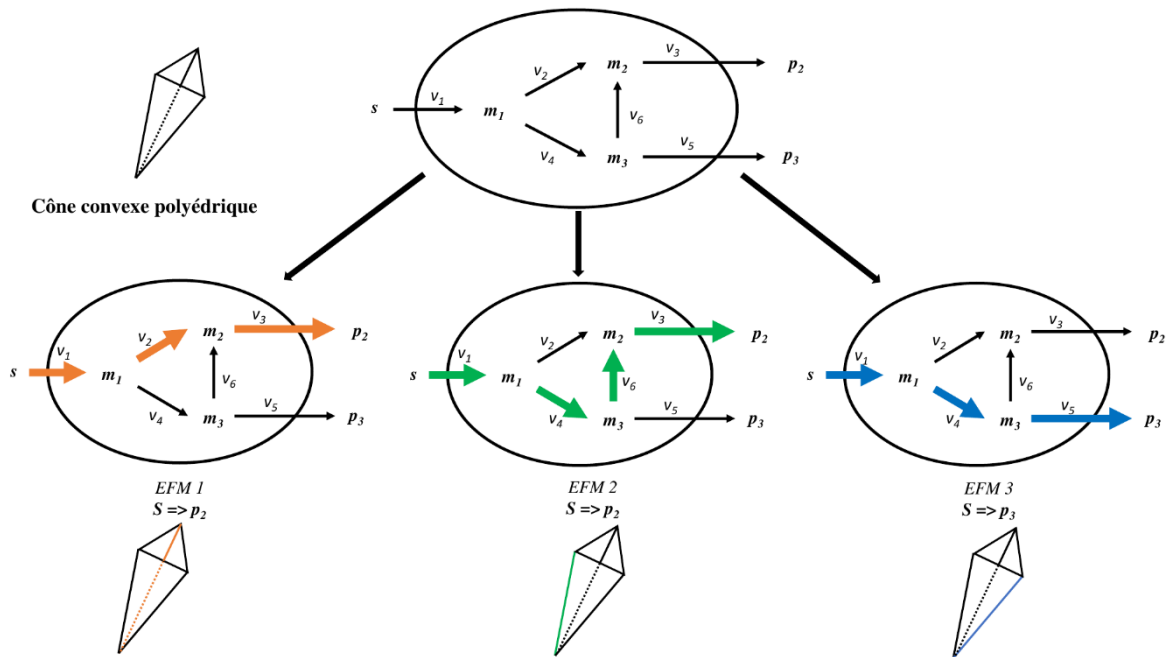


Figure 15 : Les modes élémentaires de flux d'un réseau métabolique. Trois EFMs sont identifiés dans le réseau métabolique de la figure 1. *EFM 1* et *2* permettent la production de p_2 alors que *EFM 3* produit p_3 .

3. Flux balance analysis

La méthode de Flux balance analysis (FBA) est une autre méthode mathématique d'analyse des réseaux métaboliques. Cette analyse est axée sur l'optimisation linéaire des flux métaboliques et réponds toujours à la définition d'une « fonction objectif » telle que la production de la biomasse ou encore la maintenance (utilisation de l'énergie pour le maintien des paramètres physiologiques) (Varma et Palsson, 1994). L'analyse et l'optimisation des flux présuppose un système à l'état stationnaire où chaque réaction justifie $S_m v = 0$. Par FBA nous pouvons calculer des flux, v , en intégrant des contraintes imposées aux bornes inférieures (lb : lower bound) et supérieures (ub : upper bound) de chaque réaction (Orth *et al.*, 2010). FBA minimise ou maximise la « fonction objectif » Z par programmation linéaire (LP), telle que :

$$\begin{aligned} \max/\min Z &= c^T v \\ \text{tel que} & \\ S_m \cdot v &= 0 \\ lb < v < ub \end{aligned} \quad (11)$$

Dans ce système, c désigne la « fonction objectif » et les flux v sont contraints par l'intervalle lb/ub . Si l'on considère le réseau métabolique de la figure 1 dont la « fonction objectif » est l'optimisation du flux v_3 pour la production de p_2 , la solution est un flux optimal v_x et dépend des contraintes de flux (Fig. 3).

FBA a été appliqué chez les bactéries (Feist *et al.*, 2007 ; Schellenberger *et al.*, 2011), les levures (Famili *et al.*, 2003 ; Noira *et al.*, 2012 ; Pan *et al.*, 2012) et même sur le réseau métabolique humain (Ma *et al.*, 2007 ; Duarte *et al.*, 2007). L'outil le plus couramment utilisé pour appliquer FBA aux réseaux métaboliques est COBRA (COntstraint-Based Reconstruction and Analysis), un algorithme de reconstruction et analyse basé sur des contraintes (Schellenberger *et al.*, 2011). COBRA Toolbox est disponible gratuitement sur MATLAB® et peut être utilisé pour l'analyse des réseaux métaboliques construits sous format SBML (Systems Biology Markup Language) ou EXCEL®. Ces outils de modélisation ont permis d'explorer l'analyse des voies métaboliques sous différentes hypothèses mathématiques et biologiques et ont permis l'apparition de méthodes dérivées de FBA (Lewis *et al.*, 2012). Ces outils ont notamment été utilisés en ingénierie métabolique pour l'identification de gènes cibles (Segrè *et al.*, 2002). Segrè *et al.* ont proposé l'algorithme MOMA (Minimization Of Metabolic Adjustment) pour prédire des perturbations dans les voies métaboliques telles que des délétions de gènes.

Il faut cependant souligner certaines limites dans l'application de l'approche FBA. En effet, il existe des risques d'introduction de « cycles futiles » dans l'optimisation linéaire afin de satisfaire l'optimisation de la « fonction objectif ». Cela conduit souvent à une multitude de solutions optimales bien qu'une seule est proposée, de manière aléatoire, par le logiciel d'optimisation (Schuetz *et al.*, 2007). Les auteurs ont reporté cela dans l'étude de l'effet de changements de « fonctions objectifs » dans la prédiction des flux optimaux chez *Escherichia coli*. Les auteurs ont démontré qu'une « fonction objectif » ne peut prédire l'optimalité des flux dans différentes conditions expérimentales. Afin de palier à ces limites que présentent FBA, une autre méthode dérivée a été proposée. Il s'agit de geometric Flux Balance Analysis.

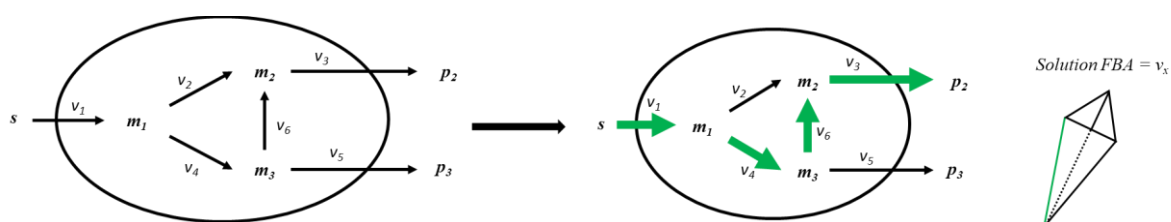


Figure 16 : Représentation FBA pour l'optimisation de la production de p_2 .

4. Geometric Flux Balance Analysis

La méthode geometric Flux Balance Analysis (gFBA) a été proposée comme une alternative à FBA classique puisqu'elle permet de réduire l'ensemble des solutions optimales en une seule solution qui soit représentative de l'ensemble (Smallbone et Simeonidis, 2009). Cette solution unique est le barycentre du cône convexe. Cette méthode a été appliquée à l'étude des flux pour le modèle métabolique standard de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'implémentation de gFBA au GEM de *S. cerevisiae* (1266 réactions) a permis d'obtenir un ensemble unique de 288 flux/réactions enzymatiques minimaux impliqués dans l'optimisation de la biomasse (Smallbone et Simeonidis, 2009). La solution obtenue est reproductible avec les différents solvers compatibles avec COBRA et dépend seulement des contraintes fixées pour la croissance. L'algorithme de gFBA a aussi été utilisé pour la réduction d'un GEM et sa transcription en un modèle cinétique (Stanford *et al.*, 2013). Les auteurs ont appliqué gFBA à la réduction du modèle consensus (v4.0) de *S. cerevisiae*. Le modèle réduit résultant a permis de prédire la variation des flux et concentrations obtenus expérimentalement. Geometric FBA est donc une méthode intéressante pour la réduction des réseaux métaboliques et ainsi proposer des modèles cinétiques représentatifs du GEM (Smallbone et Simeonidis, 2009).

IV. Approches hybrides de modélisation

Nous avons vu que la méthode FBA est limitée à une analyse qualitative des réseaux métaboliques (Schuetz *et al.*, 2007). Ainsi, la grande nécessité de "programmer" des réseaux métaboliques capables d'apporter une meilleure compréhension des phénomènes de changement de régime/switch métabolique a conduit à l'introduction d'approches hybrides/semi-dynamiques basées sur la stœchiométrie. Ces approches ont été largement discutées dans (Kim *et al.*, 2009).

1. Dynamic Flux Balance Analysis

La méthode dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) a été proposé pour étudier la dynamique de la production de la biomasse comme « fonction objectif » et caractériser les changements de régime, notamment dans la consommation des substrats et production des métabolites extracellulaires (Mahadevan *et al.*, 2002; Varma et Palsson, 1994b). La méthode dFBA

applique FBA et optimise la production de la biomasse à chaque intervalle de temps dt et résolue par programmation linéaire :

$$\begin{aligned}
 & \max \quad v_{\text{Biomasse}} \\
 & \text{tel que} \\
 & S_m \cdot v = 0 \\
 & lb < v < ub
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

Elle prend aussi en compte la variation des concentrations en substrats et produits du réseau métabolique « mis à jour » à chaque intervalle dt , tel que :

$$\begin{aligned}
 C(t + dt) &= S_c \cdot v(t) \cdot dt \\
 X(t + dt) &= \mu(t) \cdot dt
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

Elle a été appliquée avec succès dans l'étude de la croissance des micro-organismes et la production des métabolites intermédiaires du métabolisme central du carbone (Mahadevan *et al.*, 2002; Varma et Palsson, 1994b). Dans ces deux modèles, les auteurs ont démontré la capacité de l'algorithme de dFBA à prédire la croissance de la bactérie *Escherichia coli* dans un milieu riche en glucose, comme seule source de carbone, et la sécrétion d'acétate dans des systèmes batch et fed-batch. De plus, cette approche a aussi permis de démontrer une propriété émergente chez *E. coli*. En effet, le modèle a pu mettre en évidence un lien entre la saturation dans l'utilisation du dioxygène, dans un système continu (chemostat), et la sécrétion (overflow) puis re-consommation d'acétate, telle qu'observée expérimentalement (Varma et Palsson, 1994b). Par ailleurs, l'étude de la sensibilité des paramètres de ce même modèle a mis en relief l'importance du ratio P/O (phosphate/oxygène) dans l'activité de la chaîne respiratoire et son influence dans la redistribution des flux et la sécrétion des métabolites intermédiaires. Une étude plus approfondie du métabolisme de *E. coli* a permis de comprendre le phénomène de diauxie observé pendant sa croissance en batch (Mahadevan *et al.*, 2002). Les auteurs ont mis en évidence une valeur maximale de flux d'utilisation du dioxygène chez ($V_{\max O_2} = 15$ mmol/gDW/h). Cette saturation dans l'assimilation du dioxygène a constitué une contrainte supplémentaire pour la consommation du glucose ($V_{\max \text{glucose}} = 10$ mmol/gDW/h) chez *E. coli*.

Dynamic FBA a aussi été utilisé pour étudier la production d'éthanol dans une co-culture de *Saccharomyces cerevisiae* et *Scheffersomyces stipitis* (Hanly et Henson, 2013). Les simulations ont démontré la capacité de *S. cerevisiae* à produire de l'éthanol en utilisant seulement le

glucose comme substrat alors que *S. stipitis* peut aussi utiliser la xylose comme substrat. Cette approche est aussi capable de prédire le phénomène d'overflow chez les eucaryotes. Elle a permis de caractériser l'overflow chez *S. cerevisiae* (Jouhten *et al.*, 2012) et aussi chez la levure *Yarrowia lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015). Dynamic FBA présente aussi des limites, notamment pour prédire la production de métabolites secondaires puisqu'il a d'abord été proposé pour l'optimisation de la biomasse (Mahadevan *et al.*, 2002).

2. Macroscopic Bioreaction Model

La méthode Macroscopic Bioreaction Model (MBM) est une approche de modélisation hybride qui prédit la variation de concentrations des métabolites (substrats, produits) extracellulaires et de la biomasse basée sur l'identification des EFMs (Provost et Bastin, 2004). Elle a été proposée par pour l'étude du métabolisme du Chinese Hamster Ovary cells (CHO) (Provost *et al.*, 2006). MBM permet la sélection des EFMs par l'intégration des données métabolomiques extracellulaires. Ainsi le métabolisme du CHO est réduit à trois phases. La phase I est une phase de croissance et production de la biomasse. Phase II : la phase dite de transition où s'opère une consommation en lactate et alanine lorsque le glucose est totalement consommé. Phase III : phase de mort cellulaire. Les EFMs présents dans chaque phase sont considérés comme des macro-réactions enzymatiques et sont décrits par une cinétique michaelienne. La variation des espèces extracellulaires est ainsi simulée au cours du temps.

3. Hybrid Cybernetic Modeling

Une autre approche dérivée de MBM a été proposée. Il s'agit de Hybrid Cybernetic Model (HCM) (Song *et al.*, 2009). HCM a introduit le terme de « cybernetic enzyme » pour décrire les pseudo-enzymes catalysant chaque EFM. A la différence de MBM, l'approche HCM intègre des termes de régulations compétitives dans la cinétique enzymatiques (Song *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010). Cette approche a été, entre autres, utilisée pour prédire la production de citrate et l'accumulation de lipides chez *Yarrowia lipolytica* (Robles-Rodriguez *et al.*, 2017).

En conclusion de cette partie, il est notable que les méthodes statiques et hybrides de modélisation proposées pour l'étude de réseaux métaboliques à l'état quasi-stationnaire présentent des limitations. Cela est particulièrement vrai dans le cadre de l'industrie biotechnologique où les objectifs principaux dans la maîtrise de procédés de production est la réduction des coûts et l'optimisation du rendement pour un composé d'intérêt. Il est donc nécessaire de proposer une description dynamique du métabolisme des cellules afin de

comprendre les phénomènes biologiques (variations de cinétiques enzymatiques, de concentrations en métabolites et de l'état physiologique des cellules) soumis à des variations environnementales (Wiechert et Noack, 2011). En ce sens, des méthodes de réduction systématiques de réseaux métaboliques à l'échelle du génome ont été proposées. Ces méthodes ont été expérimentées sur le GEM de *S. cerevisiae* et un modèle dynamique réduit de cette levure a été proposé (Stanford *et al.*, 2013).

V. Modélisation de la production de citrate et lipide chez *Yarrowia lipolytica*

Comme cela a été détaillé dans le chapitre III et de par ses activités catalytiques très riches, la levure *Yarrowia lipolytica* présente de nombreux avantages pour l'industrie biotechnologique (Anastassiadis *et al.*, 2008). Son métabolisme est étudié expérimentalement depuis de nombreuses années et des méthodes de contrôle de la production de molécules d'intérêt ont été mis au point (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014). Notamment grâce aux descriptions mathématiques de son métabolisme et des modèles simplifiés développés (Papanikolaou et Aggelis, 2003).

Le séquençage du génome de *Y. lipolytica* a permis l'apparition de réseaux métaboliques à l'échelle du génome (Tab. 10). Ces réseaux ont été appliqués pour décrire la production de citrate et l'optimisation de l'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015). Ainsi, une synthèse des modèles de *Y. lipolytica* utilisés pour prédire une production de citrate et accumulation des lipides sera présentée dans cette partie, en distinguant les modèles construits par des approches statiques, hybrides et dynamiques.

1. Les réseaux GEM de *Yarrowia lipolytica*

A ce jour, il existe cinq représentations du réseau métabolique de *Y. lipolytica*. Le dernier en date est *iYali647* (Mishra *et al.*, 2018). Sa construction est basée sur un précédent modèle, également pour *Y. lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015). La cohérence du réseau a été pré-étudiée par FBA puis validée par des données expérimentales.

Le modèle *iNL895* a été le premier réseau métabolique à l'échelle du génome (GEM) de *Y. lipolytica* proposé (Loira *et al.*, 2012). Ce modèle est basé sur l'ancien modèle consensus de *Saccharomyces cerevisiae*, auquel a été ajouté le réseau lipidique. Le modèle *iYL619_PCP* est

paru la même année. Il a été validé *in silico*, par FBA, et expérimentalement en étudiant la croissance sur glucose et milieu minéral (Pan et Hua, 2012). Ce dernier GEM a été mis à jour par la même équipe est devenu *iYL_2.0* puis utilisé pour l'optimisation de l'accumulation du triacylglycérol (Wei *et al.*, 2017). De même pour le modèle *iMK735* développé pour étudier les conditions d'optimisation de la production de lipides chez *Y. lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015). Ce modèle a été validé avec dynamic FBA sur un milieu minéral avec glucose ou glycérol comme seule source en carbone. Le modèle *iYali4* a été construit à partir du réseau consensus de *S. cerevisiae* (Aung *et al.*, 2013) et de *iNL895* et *iYL619_PCP*. Le modèle a été appliqué à l'étude du métabolisme des acides aminés dans le phénomène d'overflow, plus spécifiquement l'accumulation des lipides lorsqu'une carence en azote est induite (Kerkhoven *et al.*, 2016). En résumé, parmi les GEMs listés, seul *iMK735* a été appliqué à des problématiques de modélisation et d'optimisation. Les autres GEMs ont été utilisés afin d'identifier des gènes cibles pour l'ingénierie métabolique.

Tableau 10 : Comparaison des cinq GEMs de *Y. lipolytica* (Mishra *et al.*, 2018)

Characteristics	<i>iNL895</i>	<i>iYL619</i>	<i>iMK735</i>	<i>iYALI4</i>	<i>iYLI647</i>
Genes assigned	899	596	646	901	647
Total Reactions	2002	1142	1382	1985	1347
Total Metabolic Reactions	-	780	895	1162	917
Cytosol	-	650	623	-	643
Mitochondria	-	130	159	-	147
Peroxisome	-	-	92	-	89
Endoplasmic reticulum	-	-	5	-	3
Golgi Body	-	-	7	-	6
Vacuoles	-	-	3	-	3
Nuclear	-	-	12	-	12
Extracellular	-	-	5	-	5
Inter-compartment transport	-	236	236	594	306
Exchange Reactions	168	126	125	151	123
Gene associated reactions	1193	800	800	1256	835
Metabolites	1587	849	1145	1683	1119

2. Optimisation de la production des lipides par GEM

Le modèle *iMK735* a été utilisé pour identifier des leviers d'optimisation de la production de lipides chez *Y. lipolytica*. Ce modèle a été validé *in silico* par FBA puis par dFBA dans un milieu minéral défini (Kavšček *et al.*, 2015). Les flux de consommation et de production ont

été déterminés expérimentalement avec la souche sauvage *Y. lipolytica* H222. Le flux de production de citrate a été fixé comme une contrainte du système pour optimiser l'accumulation de lipides en fed-batch et sous une limitation en azote. Les auteurs ont pu simuler par dFBA la variation des métabolites extracellulaires. La production de la biomasse est fidèle aux données expérimentales obtenues en batch ainsi que la production des lipides et citrate, qui sont du même ordre de grandeur. Cependant les simulations ne transcrivent pas totalement le switch et l'overflow qui se produit lors de la carence en azote à 12h de culture. Cela est probablement dû à l'absence de régulations ou de contraintes supplémentaires. De plus, grâce au modèle, les auteurs ont identifié un flux optimal de consommation de glucose (0,152 mmol/gDCW/h) qui favorise l'accumulation de lipides au détriment de la production de citrate. Ce flux a été expérimenté en fed-batch. Il a été rapporté qu'une limitation du flux d'apport du glucose élimine la production de citrate et améliore le rendement d'accumulation de lipides totaux. Ce résultat montre que la production de citrate est un phénomène d'overflow lorsque l'accumulation des espèces lipidiques est saturée. Enfin, ces études ont pu démontrer que la diminution de l'aération du milieu et une réduction de l'oxygène de 50% à 1%, par rapport à la saturation avec l'air, induisent une maximisation de l'accumulation des lipides, sans production de citrate.

3. Modélisation dynamique de la production de citrate et accumulation de lipides

Très peu de modèles cinétiques de *Yarrowia lipolytica* sont répertoriés dans la littérature. Parmi les premiers modèles, Papanikolaou *et al.* (2003) ont développé un modèle non-structuré du métabolisme de *Y. lipolytica*. Ce modèle considère les flux de consommation des substrats, la production de la biomasse et d'accumulation/dégradation des lipides. Le modèle a pu identifier les conditions qui favorisent une production importante de la biomasse ainsi que l'accumulation de lipides en présence d'acide stérique (Papanikolaou et Aggelis, 2003). Un autre modèle dynamique a été préposé, pour simuler à la fois l'accumulation de lipides et la production de citrate (Papanikolaou et al., 2006a). Le modèle a permis de prédire une production de citrate sur un milieu limité en azote avec le glucose comme seule source en carbone. Les lipides sont accumulés et maximisés en présence de glucose et stéarine comme co-substrats alors que la production de citrate est limitée dans cette condition.

Le modèle dynamique du métabolisme de *Y. lipolytica* le plus récent a été proposé par Robles-Rodriguez *et al.* (2017). Les auteurs proposent des méthodes hybrides de modélisation du métabolisme de *Y. lipolytica* et prédisent une accumulation de lipides et une production de

citrate *in silico* (Robles-Rodriguez *et al.*, 2017). Ce modèle macroscopique comprend un réseau composé de 52 réactions biochimiques et prédit la consommation du glucose (source en carbone C) et de l'ammonium (source en azote N) et la production et accumulation de citrate et lipides, respectivement. Les méthodes de modélisation utilisées sont basées sur les méthodes Hybrid Cybernetic Modeling (HCM) et Macroscopic Bioreaction Modeling (MBM). Les auteurs ont aussi proposé une autre méthode, Fuzzy MBM, qui est un hybride de MBM et de HCM puisque la transition des phases est assurée par l'influence du ratio de consommation N/C. Les trois approches ont prédit des variations de production de citrate et d'accumulation de lipides du même ordre de grandeur que les données expérimentales. On remarque cependant des limites dans les prédictions, notamment en phase stationnaire de croissance, où une sélection « tranchée » des modes élémentaires par HCM ou MBM pourrait expliquer les écarts entre les concentrations simulées et les données expérimentales.

Conclusion

Le moteur macroscopique majeur du métabolisme des cellules est la différence de potentiel électro-chimique entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire. Le métabolisme cellulaire est organisé en réseaux d'interactions et réactions de transformation/conversion de composés assurées par des enzymes. La formulation d'un certain nombre de lois mathématiques appliquées à l'activité catalytique des enzymes a fait émerger des approches analytiques de modélisation de ces réseaux métaboliques. L'analyse de l'évolution des systèmes/réseaux métaboliques soumis à des variations externes peut être réalisée de manière dynamique ou statique. L'approche dynamique permet de suivre, en temps réel, les cinétiques enzymatiques ainsi que leurs conséquences sur l'évolution des composés/métabolites qui constituent le réseau. L'approche statique, quant à elle, rend compte de l'équilibre des flux en intégrant une hypothèse sur la stationnarité des métabolites intracellulaires dont les cinétiques sont plus rapides que les composés extracellulaires. Ces dernières années, des approches de modélisation du métabolisme dites « hybrides » ont permis de réconcilier la description dynamique et l'analyse statique. Cette dernière a notamment été appliquée à l'étude du métabolisme de *Yarrowia lipolytica* pour la compréhension des changements de régime qui s'opèrent en intracellulaire, plus spécifiquement le métabolisme du citrate et des lipides, soumis à de carences nutritives.

Références

- Alam, M.T., Merlo, M.E., Hodgson, D.A., Wellington, E.M., Takano, E., and Breitling, R. (2010). Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* 11, 202.
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., and Jirstrand, M. (2014). Kinetic models in industrial biotechnology – Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering* 24, 38–60.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V., and Finogenova, T.V. (2008). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology* 2, 107–123.
- Andersen, M.R., Nielsen, M.L., and Nielsen, J. (2008). Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol. Syst. Biol.* 4, 178.
- Aung, H.W., Henry, S.A., and Walker, L.P. (2013). Revising the Representation of Fatty Acid, Glycerolipid, and Glycerophospholipid Metabolism in the Consensus Model of Yeast Metabolism. *Ind Biotechnol (New Rochelle N Y)* 9, 215–228.
- Bailey, J., Bailey, J.E., Ollis, D.F., Simpson, R.J., and Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals* (McGraw-Hill).
- Bowsher, C.G., and Swain, P.S. (2014). Environmental sensing, information transfer, and cellular decision-making. *Current Opinion in Biotechnology* 28, 149–155.
- Choi, P.J., Cai, L., Frieda, K., and Xie, X.S. (2008). A Stochastic Single-Molecule Event Triggers Phenotype Switching of a Bacterial Cell. *Science* 322, 442–446.
- Christensen, B., and Nielsen, J. (2000). Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 66, 209–231.
- Cloutier, M., Perrier, M., and Jolicœur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2393–2404.
- Cornish-Bowden, A. (2013). The origins of enzyme kinetics. *FEBS Letters* 587, 2725–2730.
- Cornish-Bowden, A., Mazat, J.-P., and Nicolas, S. (2014). Victor Henri: 111 years of his equation. *Biochimie* 107, 161–166.

- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L.Y., Toufighi, K., Mostafavi, S., et al. (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science* 327, 425–431.
- Eldar, A., and Elowitz, M.B. (2010). Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 467, 167–173.
- Francke, C., Siezen, R.J., and Teusink, B. (2005). Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. *Trends in Microbiology* 13, 550–558.
- Galazzo, J.L., and Bailey, J.E. (1990). Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 12, 162–172.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., and Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PLoS ONE* 9, e90832.
- Gillespie, D.T. (1976). A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics* 22, 403–434.
- Gillespie, D.T. (2007). Stochastic Simulation of Chemical Kinetics. *Annual Review of Physical Chemistry* 58, 35–55.
- Hanly, T.J., and Henson, M.A. (2013). Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Biotechnol Biofuels* 6, 44.
- Hill, A. (1910). PROCEEDINGS OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY: January 22, 1910. *The Journal of Physiology* 40, i–vii.
- Jouhten, P., Wiebe, M., and Penttilä, M. (2012). Dynamic flux balance analysis of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during the shift from fully respirative or respirofermentative metabolic states to anaerobiosis. *FEBS J.* 279, 3338–3354.
- Kavšček, M., Bhutada, G., Madl, T., and Natter, K. (2015). Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 9, 72.

- Kerkhoven, E.J., Pomraning, K.R., Baker, S.E., and Nielsen, J. (2016). Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Npj Systems Biology and Applications* 2, 16005.
- Kim, D.-H., Wong, P.K., Park, J., Levchenko, A., and Sun, Y. (2009). Microengineered Platforms for Cell Mechanobiology. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11, 203–233.
- Kim, O.D., Rocha, M., and Maia, P. (2018). A Review of Dynamic Modeling Approaches and Their Application in Computational Strain Optimization for Metabolic Engineering. *Front. Microbiol.* 9.
- King, Z.A., Lu, J., Dräger, A., Miller, P., Federowicz, S., Lerman, J.A., Ebrahim, A., Palsson, B.O., and Lewis, N.E. (2016). BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Res.* 44, D515-522.
- Klamt, S., and Gilles, E.D. (2004). Minimal cut sets in biochemical reaction networks. *Bioinformatics* 20, 226–234.
- Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., and Gilles, E.D. (2007). Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Systems Biology* 1, 2.
- Klipp, E. (2007). Modelling dynamic processes in yeast. *Yeast* 24, 943–959.
- Lewis, N.E., Nagarajan, H., and Palsson, B.O. (2012). Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 291–305.
- Li, C., Donizelli, M., Rodriguez, N., Dharuri, H., Endler, L., Chelliah, V., Li, L., He, E., Henry, A., Stefan, M.I., et al. (2010). BioModels Database: An enhanced, curated and annotated resource for published quantitative kinetic models. *BMC Syst Biol* 4, 92.
- Loira, N., Dulermo, T., Nicaud, J.-M., and Sherman, D.J. (2012). A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 6, 35.
- Machado, D., Costa, R.S., Ferreira, E.C., Rocha, I., and Tidor, B. (2012). Exploring the gap between dynamic and constraint-based models of metabolism. *Metab Eng* 14, 112–119.
- Maertens, J., and Vanrolleghem, P.A. (2010). Modeling with a view to target identification in metabolic engineering: A critical evaluation of the available tools. *Biotechnology Progress* 26, 313–331.

- Mahadevan, R., Edwards, J.S., and Doyle, F.J. (2002). Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal* 83, 1331–1340.
- Mahadevan, R., Burgard, A.P., Famili, I., Van Dien, S., and Schilling, C.H. (2005). Applications of metabolic modeling to drive bioprocess development for the production of value-added chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10, 408.
- Mazurie, A., Bonchev, D., Schwikowski, B., and Buck, G.A. (2010). Evolution of metabolic network organization. *BMC Systems Biology* 4, 59.
- Mishra, P., Lee, N.-R., Lakshmanan, M., Kim, M., Kim, B.-G., and Lee, D.-Y. (2018). Genome-scale model-driven strain design for dicarboxylic acid production in *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 12, 12.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology* 12, 88–118.
- Mortierol, M., Dague, P., Pérès, S., and Simon, L. (2016). Minimality of Metabolic Flux Modes under Boolean Regulation Constraints. In 12th International Workshop on Constraint-Based Methods for Bioinformatics WCB'16, (Toulouse, France), p.
- Noor, E., Flamholz, A., Liebermeister, W., Bar-Even, A., and Milo, R. (2013). A note on the kinetics of enzyme action: A decomposition that highlights thermodynamic effects. *FEBS Letters* 587, 2772–2777.
- Ochoa-Estopier, A., and Guillouet, S.E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 170, 35–41.
- Orth, J.D., Thiele, I., and Palsson, B.Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 28, 245–248.
- Pan, P., and Hua, Q. (2012). Reconstruction and In Silico Analysis of Metabolic Network for an Oleaginous Yeast, *Yarrowia lipolytica*. *PLoS One* 7.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2003). Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 651–655.

- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., and Aggelis, G. (2006). Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol* 52, 134–142.
- Peres, S., Morterol, M., and Simon, L. (2014). SAT-Based Metabolics Pathways Analysis without Compilation. In *Computational Methods in Systems Biology*, P. Mendes, J.O. Dada, and K. Smallbone, eds. (Springer International Publishing), pp. 20–31.
- Peters, M., Eicher, J.J., van Niekerk, D.D., Waltemath, D., and Snoep, J.L. (2017). The JWS online simulation database. *Bioinformatics* 33, 1589–1590.
- Pfeiffer, T., Sánchez-Valdenebro, I., Nuño, J.C., Montero, F., and Schuster, S. (1999). METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics* 15, 251–257.
- Poolman, M.G. (2006). ScrumPy: metabolic modelling with Python. *Syst Biol (Stevenage)* 153, 375–378.
- Provost, A. (2006). *Metabolic design of dynamic bioreaction models*. UCL - Université Catholique de Louvain.
- Provost, A., and Bastin, G. (2004). Dynamic metabolic modelling under the balanced growth condition. *Journal of Process Control* 14, 717–728.
- Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008). Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell* 135, 216–226.
- Robitaille, J., Chen, J., and Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PLoS ONE* 10, e0136815.
- Robles-Rodriguez, C.E., Bideaux, C., Guillouet, S.E., Gorret, N., Cescut, J., Uribe Larrea, J.-L., Molina-Jouve, C., Roux, G., and Aceves-Lara, C.A. (2017). Dynamic metabolic modeling of lipid accumulation and citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Computers & Chemical Engineering* 100, 139–152.
- Rojas, I., Golebiewski, M., Kania, R., Krebs, O., Mir, S., Weidemann, A., and Wittig, U. (2007). SABIO-RK: a database for biochemical reactions and their kinetics. *BMC Systems Biology* 1, S6.

- Schomburg, I., Jeske, L., Ulbrich, M., Placzek, S., Chang, A., and Schomburg, D. (2017). The BRENDA enzyme information system—From a database to an expert system. *Journal of Biotechnology* 261, 194–206.
- Schuetz, R., Kuepfer, L., and Sauer, U. (2007). Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology* 3, 119.
- Schuster, S., and Hilgetag, C. (1994). On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J. Biol. Syst.* 02, 165–182.
- Schuster, S., Hilgetag, C., Woods, J.H., and Fell, D.A. (2002). Reaction routes in biochemical reaction systems: Algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *J Math Biol* 45, 153–181.
- Segrè, D., Vitkup, D., and Church, G.M. (2002). Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *PNAS* 99, 15112–15117.
- Smallbone, K., and Simeonidis, E. (2009). Flux balance analysis: A geometric perspective. *Journal of Theoretical Biology* 258, 311–315.
- Smallbone, K., Malys, N., Messiha, H.L., Wishart, J.A., and Simeonidis, E. (2011). Building a kinetic model of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol.* 500, 355–370.
- Soh, K.C., Miskovic, L., and Hatzimanikatis, V. (2012). From network models to network responses: integration of thermodynamic and kinetic properties of yeast genome-scale metabolic networks. *FEMS Yeast Res* 12, 129–143.
- Song, H.-S., Morgan, J.A., and Ramkrishna, D. (2009). Systematic development of hybrid cybernetic models: application to recombinant yeast co-consuming glucose and xylose. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 984–1002.
- Stanford, N.J., Lubitz, T., Smallbone, K., Klipp, E., Mendes, P., and Liebermeister, W. (2013). Systematic construction of kinetic models from genome-scale metabolic networks. *PLoS ONE* 8, e79195.
- Terzer, M., and Stelling, J. (2008). Large-scale computation of elementary flux modes with bit pattern trees. *Bioinformatics* 24, 2229–2235.

- Ullah, M., and Wolkenhauer, O. (2010). Stochastic approaches in systems biology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine 2, 385–397.
- Varma, A., and Palsson, B.O. (1994a). Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. Nature Biotechnology 12, 994–998.
- Varma, A., and Palsson, B.O. (1994b). Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. Appl Environ Microbiol 60, 3724–3731.
- Voliotis, M., Thomas, P., Grima, R., and Bowsher, C.G. (2016). Stochastic Simulation of Biomolecular Networks in Dynamic Environments. PLOS Computational Biology 12, e1004923.
- Wei, S., Jian, X., Chen, J., Zhang, C., and Hua, Q. (2017). Reconstruction of genome-scale metabolic model of *Yarrowia lipolytica* and its application in overproduction of triacylglycerol. Bioresour. Bioprocess. 4, 51.
- Wiechert, W., and Noack, S. (2011). Mechanistic pathway modeling for industrial biotechnology: challenging but worthwhile. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 604–610.
- Wong, W.C., Song, H.-S., Lee, J.H., and Ramkrishna, D. (2010). Hybrid cybernetic model-based simulation of continuous production of lignocellulosic ethanol: Rejecting abruptly changing feed conditions. Control Engineering Practice 18, 177–189.

RESULTATS

Chapitre I

Alternative oxidase inhibition in *Yarrowia lipolytica* triggers citrate overproduction

Résumé du Chapitre I “Alternative oxidase inhibition in *Yarrowia lipolytica* triggers citrate overproduction”. Prêt pour soumission à Systems Biology and Applications

Dans ce chapitre, nous avons d’abord cherché à optimiser expérimentalement la production de citrate chez la souche de levure *Yarrowia lipolytica* W29. Ensuite nous avons simulé les flux intracellulaires à partir d’un modèle du métabolisme de *Y. lipolytica* décrit à l’échelle du génome (GEM). Nos résultats montrent que le fait d’inhiber l’activité de la protéine oxydase alternative (AOX), une enzyme de la chaîne respiratoire présente chez certaines plantes, levures et moisissures, permet d’améliorer la production de citrate. AOX a été inhibée par l’ajout du n-propyl gallate (nPG) aux cultures de cellules et ne montre aucune toxicité ou amélioration de la production de la biomasse. Ensuite, l’utilisation d’un GEM de *Y. lipolytica* appliqué à l’algorithme d’analyse de l’équilibre des flux, dynamique Flux Balance Analysis (dFBA), a permis de caractériser les enzymes et/ou métabolites pouvant expliquer le phénomène d’accumulation de lipides et de production de citrate chez *Y. lipolytica*. Nous proposons ici une explication de la dynamique du citrate intracellulaire lors des différentes phases de croissance de *Y. lipolytica* dans un milieu limité en azote : pendant la phase exponentielle de croissance, le citrate intracellulaire est un précurseur pour la synthèse des lipides membranaires. Lorsqu’une carence en azote extracellulaire, le citrate devient un précurseur pour la lipogénèse et l’accumulation des lipides en phase de décélération de la croissance. Une limitation dans l’accumulation des lipides intracellulaires semble provoquer la fuite/production de citrate extracellulaire. En effet, le modèle montre qu’une surproduction de citrate est associée à la génération plus importante d’espèces oxydantes réactives de type reactive oxygen species (ROS). La consommation d’oxygène n’est plus liée à l’activité de la chaîne respiratoire mais à l’oxydation des acides gras intracellulaires, ce qui provoque une accumulation des ROS. Par ailleurs, l’ajout en phase stationnaire de la forme réduite du glutathion dans une culture de *Y. lipolytica* a permis d’éliminer la production de citrate. Par conséquent, une accumulation plus importante d’acides gras et de corps cétoniques est observée. Ces résultats constituent un apport majeur sur le plan industriel puisque ces deux molécules, nPG et le glutathion, pourraient être utilisées afin de jouer sur l’équilibre citrate/lipide, en fonction du produit désiré.

Alternative oxidase inhibition in *Yarrowia lipolytica* triggers citrate overproduction

Jorgelindo da Veiga Moreira¹, Mario Jolicoeur¹, Laurent Schwartz⁴ and Sabine Peres^{2,3}

¹Research Laboratory in Applied Metabolic Engineering, Department of Chemical Engineering, Ecole Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-Ville Station, Montréal (Quebec), Canada

²LRI, Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

³MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁴Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, 149 avenue Victoria 75004 Paris, France

Abstract

Yarrowia lipolytica is a non-conventional yeast with promising industrial potentials for lipids and citrate production. It is also widely used for studying mitochondrial respiration due to a respiratory chain similar to those of mammalian cells. In this study we used a genome-scale model (GEM) of *Y. lipolytica* metabolism found in literature and performed dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) algorithm to analyze and identify metabolic levers for citrate optimization. Analysis of fluxes at stationary growth phase showed that carbon flux derived from glucose is rewired to citric acid production and lipid accumulation, whereas the oxidative phosphorylation (OxPhos) shifted to alternative oxidation (AOX) mode. Simulations of optimized citrate secretion flux resulted in a pronounced lipid oxidation along with reactive oxygen species (ROS) generation and AOX flux inhibition. Then, we experimentally challenged AOX inhibition by adding n-Propyl Gallate (nPG), a specific AOX inhibitor, on *Y. lipolytica* batch cultures at stationary phase. Our results showed a 2-fold overproduction of citrate (20.5 g/L) when nPG is added compared to 10.9 g/L under control condition (no nPG addition). On the other hand, when the reduced glutathione antioxidant is added to *Y. lipolytica* culture with the nPG, citrate production decreased sharply to 2 g/L at the end of the culture. When glutathione is added without nPG, citrate production is completely inhibited. These observations suggest that ROS management, especially through AOX activity, has a pivotal role on citrate/lipid flux balance in *Y. lipolytica*. All taken together, we thus provide for the first time, a key for the understanding of a predominant metabolic mechanism favoring citrate overproduction in *Y. lipolytica* at the expense of lipids accumulation.

I. Introduction

Yarrowia lipolytica is a non-conventional yeast usually isolated from dairy products, oil and water environments (Barth and Gaillardin, 1996; Nicaud, 2012). This oleaginous yeast is emerging as an important cell factory for lipid production. Indeed, over 50% to 70% of its dry cell weight accounts for lipid accumulation (Dulermo and Nicaud, 2011; Papanikolaou and Aggelis, 2003a), and even 90% of its biomass as lipids has been obtained for an engineered *Y. lipolytica* strain (Blazeck *et al.*, 2014). *Y. lipolytica* wild type strains isolated are Generally Recognized As Safe (GRAS) from the American Food and Drug Administration (FDA) and Qualified Presumption of Safety (QPS) from European Food Safety Authority (EFSA) (Anastassiadis *et al.*, 2008; Groenewald *et al.*, 2014; Ricci *et al.*, 2018). It is used as platform for the production of proteins (specially proteases and lipases) (Nicaud, 2012) and organic acids (citric acid, isocitric acid, acetic acid) (Anastassiadis *et al.*, 2008; Nicaud, 2012; Papanikolaou *et al.*, 2002).

Citric acid is the most widely used organic acid in the world with an annual production of the purified molecule estimated at 1.8 million tons (Sawant *et al.*, 2018). This production is carried out mainly by microbial fermentation of diverse carbon sources (glucose, glycerol and n-alkanes) (Max *et al.*, 2010). The mold *Aspergillus niger* is practically the only microorganism used at industrial scale with nearly 90% of the total production (Anastassiadis *et al.*, 2008; Sawant *et al.*, 2018). However, the direct use of the *A. niger* on a food matrix is not feasible since it is not GRAS and presents a high risk of contamination.

The completion of the *Y. lipolytica* genome and genome-scale models (GEM) allowed investigations of the cells physiology and cellular metabolism involved in citric acid secretion and intracellular lipid accumulation (Dujon *et al.*, 2004; Kavšček *et al.*, 2015; Kerkhoven *et al.*, 2016; Loira *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2018; Pan and Hua, 2012b; Wei *et al.*, 2017). Production of extracellular citric acid or intracellular lipid is triggered by the imbalance between carbon sources in excess and limited biogenic substrates (nitrogen (N), iron (Fe), inorganic phosphate (Pi) and zinc (Zn)) (Anastassiadis *et al.*, 2008; Max *et al.*, 2010; Yalcin *et al.*, 2010). The mostly used parameter to trigger this metabolic shift is a N-limitation (N-lim) in culture medium, allowing a high C/N ratio thus resulting in citrate secretion from an overflow metabolism at high glucose concentration (Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014). Isocitrate dehydrogenase (ICDH), a reversible Krebs enzyme involved in isocitrate to α -ketoglutarate conversion, is reported as key enzyme for lipid accumulation and citrate production in oleaginous

microorganisms (Evans and Ratledge, 1985a, 1985b; Ratledge and Wynn, 2002). Authors proposed that upon N-lim, adenosine monophosphate (AMP) deaminase enzyme catalyze AMP to IMP and NH₃ conversion to compensate for nitrogen depletion. Lower intracellular AMP leads to ICDH inhibition and both isocitrate and citrate accumulation. Then citrate and isocitrate are excreted to extracellular medium but citrate can also be converted to acetyl-CoA, used as precursor for lipid synthesis (Beopoulos *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

Recent studies highlighted the key role of oxygen on citrate optimized production in *Y. lipolytica* cultures (Ferreira *et al.*, 2016; Kamzolova *et al.*, 2003; Sabra *et al.*, 2017). Ferreira *et al.* (2016) found that increased oxygen mass transfer rate (OTR) improves up to 3-fold citrate production by *Y. lipolytica* W29 strain (Ferreira *et al.*, 2016). Similarly, Kamzolova *et al.* (2003) and Sabra *et al.* (2017) managed to trigger citrate optimisation by controlling the dissolved oxygen concentration (pO₂) (Kamzolova *et al.*, 2003; Sabra *et al.*, 2017). The history of the link between oxygen and citrate production in *Y. lipolytica* dates back to an early study conducted by a Russian research team. Akimenko *et al.* (1979) reported that citrate overproduction is inversely correlated to the cyanide-resistance respiratory pathway on *Candida/Yarrowia lipolytica* (Akimenko *et al.*, 1979). Cyanide resistance pathway is mainly present in plants and fungi and involves an alternative oxidase (AOX) protein (Akimenko *et al.*, 2003; Berthold *et al.*, 2000); along with II NADH dehydrogenase (NDH2e), both part of the uncoupled $\Delta\Psi$ -independent mitochondrial respiration (Joseph-Horne *et al.*, 2000; Kerscher, 2000). The exact mechanism involving AOX on citrate production is not clearly determined but NDH2e-AOX pathway has been proposed as defense mechanism against Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation in *Y. lipolytica* at stationary phase (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012).

When glucose is used as a sole carbon source, citric acid production by *Y. lipolytica* at stationary phase is favored over lipid accumulation (Papanikolaou *et al.*, 2009). Recent studies have implemented strategies for controlling substrate feeding rate for lipid accumulation preventing the production of citric acid (Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014). The authors managed to identify a range of N/C ratios favoring the production of lipid without citric acid excretion. Similarly, Kavšček *et al.* (2015) proposed GEM of *Y. lipolytica* in combination with dynamic Flux Balance Analysis (dFBA), a computational algorithm, to study environmental conditions favorable for lipid accumulation over citric acid production (Kavšček *et al.*, 2015). These authors found that the cell specific oxygen consumption rate (rO₂) is reduced during lipid accumulation. Applying a fed-batch strategy under reduced dissolved oxygen concentration,

from 50% to 1%, they improved lipid accumulation, from 200 mg/gDCW to 400 mg/gDCW, and avoid citrate excretion.

Computational strategies such as dFBA allow to analyze genome-scale reconstructed metabolic networks and to run knock-out or environment-based optimization strategies for biomass or metabolites production (Mishra *et al.*, 2018; Orth *et al.*, 2010; Raman and Chandra, 2009). FBA predicts flux balances based on constraints and objective functions for biochemical networks verifying steady-state assumption (Orth *et al.*, 2010). The mathematical description of the metabolic reactions relies on the stoichiometries of reactants and products and does not require enzyme kinetics parameters. Five GEMs are known from the literature so far. The *iNL895* model was the first genome-wide metabolic network of *Y. lipolytica* (Loira *et al.*, 2012). This model is based on the old consensus model of *Saccharomyces cerevisiae*, to which was added the lipid network. The *iYL619_PCP* model was released the same year and experimentally validated by studying growth on glucose and mineral medium (Pan and Hua, 2012b). This GEM was updated with more detailed reactions and became *iYL_2.0*. It has been used to optimize the accumulation of triacylglycerol (TAG) (Wei *et al.*, 2017). Similarly, the model *iMK735* were developed to study conditions for lipid optimization in *Y. lipolytica* (Kavšček *et al.*, 2015). This model was validated with dFBA on mineral medium with glucose or glycerol as sole carbon source. The *iYali4* model was constructed from the consensus network of *S. cerevisiae* (Aung *et al.*, 2013), *iNL895* and *iYL619_PCP*. The model has been applied to the study of amino acid metabolism and the overflow phenomenon associated to lipid accumulation (Kerkhoven *et al.*, 2016). We consider that *iYali4* model is the most complete regarding lipid metabolism, compared to previous models, and has been updated based on the genome sequence of the strain *Y. lipolytica* W29 used in this study (Magnan *et al.*, 2016).

Here, we used the *Yali4* GEM and dFBA strategies to analyze flux distributions associated with citrate production and alternative oxidase (AOX) protein activity. For this end, we adjusted the *iYali4* model with the mitochondrial AOX reaction identified in *Y. lipolytica* (Joseph-Horne *et al.*, 2001; Kerscher *et al.*, 2002b) and performed dFBA to identify metabolic pathways contributing to citrate optimization.

II. Methods

1. Microorganism and media composition

The *Yarrowia lipolytica* W29 wild-type strain was used in this study. It is from CIRM-Levures collection and was provided by Micalis, INRA (Jouy-en-Josas, France) and stored at -80°C on 50% (v/v) glycerol.

Two media were used in this study. The YPD medium is composed of 10 g/L yeast extract, 10 g/L peptone (BD Biosciences, France) and 20 g/L glucose (Merck (Sigma-Aldrich), USA). The mineral medium (Merck (Sigma-Aldrich), USA) was adapted from Ochoa-Estopier *et al.* (2014) and Moeller *et al.* (2007) with the following components (g/L): 1 (NH₄)₂SO₄; 6 KH₂PO₄; 1.5 MgSO₄·7H₂O; 0.02 CuSO₄·5H₂O; 0.01 MnSO₄·H₂O; 0.0105 ZnCl₂; 0.0035 FeSO₄·7H₂O; CaCl₂·2H₂O; 0.00025 D-Biotin; 0.001 D-L-Panthenic acid, 0.001 Nicotinic Acid; 0.00625 Myo-Inositol; 0.001 Thiamin, 0.001 Pyridoxine; 0.0002 para-Aminobenzoic Acid. Glucose was used as carbon source and added to a final concentration of 50 g/L.

2. Culture conditions

All pre-cultures were cultivated in 200 mL Erlenmeyer flasks on YPD medium at pH 6 and incubated on a rotary shaker at 28 °C and 100 rpm. Culture broth was taken at exponential growth phase, after 16-18h of cultivation, centrifuged and washed in a 9 g/L NaCl prior to inoculation in mineral medium for both bioreactors and shaken flasks culture.

Bioreactor culture were performed in the 7L Applikon® system. The temperature was maintained at 28°C and pH at 6 by the addition of 5M NaOH. Dissolved oxygen was maintained above 20% from air saturation by controlling the stirrer speed between 300-600 rpm and aeration at 2 vvm of air and dioxygen from 0 to 1 vvm. An antifoaming agent (B200 K) was added to 0.09% v/v at inoculation.

Culture in Erlenmeyer flasks were performed at the same condition as the pre-culture, on a rotary shaker at 28 °C. The pH of the culture was maintained between 5-6 by manually and periodically adding 300 µL of 5M NaOH in sterile condition.

40 mM n-propyl Gallate (nPG) stock solution were prepared on 70% ethanol and periodically added to cultures, to a final 400 µM concentration. It is a well-known inhibitor of the alternative

oxidase (AOX) enzyme and already used to study mitochondrial respiration in *Yarrowia lipolytica* (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012).

3. Biomass and metabolites analysis

Cell growth was followed by a spectrophotometer with calculation of yeast optical density (OD) at 600 nm. Dried biomass was carried out and calibrated against the $DO_{600\text{ nm}}$ for the calculation of extracellular metabolic fluxes per gram of dry cell weight (gDCW). We found 0.62 gDCW/L concentration of culture with $DO_{600\text{ nm}} = 1$ for *Y. lipolytica* W29 grown on mineral media.

For the determination of extracellular concentrations, 5 mL of the fermentation broth was centrifuged at 5xg for 5 min, aliquoted in 1 mL microtubes (Eppendorf, Germany) and stored at -20°C until further analysis. 500 µL Nanosep® centrifugal tubes (VWR, USA) were used to filter the supernatant prior to metabolites quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using ion chromatography system (Thermo Scientific™ ICS 5000+). IonPac AS11-2*250 mm column (Thermo Scientific™, USA), IonPac AG11-2*500 mm pre-column (Thermo Scientific™, USA) and AERS 500, 2 mm (Thermo Scientific™, USA) were used for organic acids (citrate, isocitrate, succinate, acetate) quantification and with the following conditions: 35 °C column temperature, 0.5 mL/min NaOH (100 mM) eluant flow with gradient concentrations. Glucose concentration was determined with the Dionex™ CarboPac™ PA1 column 4x50 mm (Thermo Scientific™) equipped with amperometric detection. Residual ammonium (NH_4^+) was quantified by a colorimetric assay (#1080240001, Merck (Sigma-Aldrich), USA).

4. Need for accurate *Y. lipolytica* GEM description

We used *iYali4* the GEM of *Y. lipolytica* by Kerkhoven *et al.* (2016) and an updated version for *Y. lipolytica* W29 to study citrate optimization. Growth rate on glucose and nitrogen-limited mineral medium was predicted by the model based on glucose specific consumption rate adequately fitted to the experimental results (Tab. 1 and Fig. 1). It was noted that *iYali4* and the other GEMs did not integrate the alternative oxidase (AOX) reaction. So we added the AOX reaction as part of the electron transfer chain (ETC), based on the hypothesis that this enzyme has a protective effect against ROS generation in *Y. lipolytica* and probably on citrate production (Akimenko *et al.*, 1979, 2003; Guerrero-Castillo *et al.*, 2012). The stoichiometry of

AOX reaction were determined from literature and in coherence with *iYali4* ETC reaction: ubiquinol + 0.25 O₂ => ubiquinone + 0.5 H₂O (Berthold *et al.*, 2000). AOX reaction is doesn't contribute to proton pumping across the mitochondrial membrane (Vishwakarma *et al.*, 2015).

III. Results

1. Experimentally-determined kinetic parameters

We performed a series of bioreactor batch cultivations of *Yarrowia lipolytica* in mineral medium for kinetic parameters determination. These cultures were ran in nitrogen-limited (N-lim) conditions to favor citrate production. Glucose was used as carbon source. Initial two glucose concentrations were accessed in order to determine the N/C ratio effect on cells specific growth rate (μ_{max}) and other kinetic physiological parameters (Tab. 1). Specific growth rate of $0.076 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ is observed in the lower N/C ratio compared to $0.049 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ in the higher N/C ratio condition. The opposite effect of the N/C ratio is observed for glucose uptake where higher glucose uptake of $1.148 \pm 0.264 \text{ mmol/gDCW/h}$ is observed for the higher N/C ratio condition. Citrate, isocitrate, pyruvate, acetate and succinate were detected in the batch cultures but only after extracellular nitrogen source (NH₄⁺) is totally consumed (between 28h and 30h of culture). Citrate and isocitrate specific production rates are higher under low N/C ratio batch cultivation. For the remaining of our investigations, we considered the higher N/C ratio condition to avoid the glucose inhibition effect at 100 g/L.

2. *In silico* growth prediction

We first used FBA to challenge *Yali4* GEM accuracy on predicting *Y. lipolytica* growth. The experimentally-determined kinetic parameters such as specific glucose and oxygen uptake at the higher N/C (0.00204) condition were used as constrains to predict cell growth behavior. The model predicts a growth rate of 0.052 h^{-1} , with low 0.616 % error (Tab. 1). Thus, the *Yali4* model accurately predicts the *Yarrowia lipolytica* W29 strain growth in mineral medium. However, this model applied to FBA algorithm was not able to predict the glucose inhibition effect on 100 g/L glucose concentration medium. We also tried the *iMK735* model but it did

not succeed to predict accurate growth. We got troubles to run the xml file on COBRA Toolbox on MATLAB®, probably due to errors on the model structure.

3. Predicting citrate production upon N-lim

Nitrogen limitation (N-lim) is the mostly-used limitation parameter to trigger lipid accumulation and citrate production by *Y. lipolytica*. Initial NH₄⁺ and glucose concentrations were set to 102 mg/L and 50 g/L, respectively. Experimental data obtained from duplicate flasks show two growth phases (Fig. 1). In the first growth phase an exponential growth rate $\mu_{max1} = 0.100 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$ was determined at nitrogen depletion between 45-50 h (residual NH₄⁺ were qualitatively estimated by colorimetric essay). A second stable growth phase, with a μ_{max2} of $0.0240 \pm 0.0013 \text{ h}^{-1}$ is observed thereafter until the culture reached stationary phase, at 96-100 h. The biomass concentration is up to 6 gDCW/L has been observed. Citrate production clearly started upon nitrogen starvation and cell growth limitation. Its mainly produced during the cell growth stationnary phase and reached 10.9 g/L at the end of cell cultivation. Lower isocitrate concentration of 1.3 g/L was then observed. After 170h of culture, residual 5 g/L of glucose remained in the medium (Fig. 1).

The initial dried biomass was set to 0.06 gDCW/L based on experimental data. Then we applied the dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) algorithm to *Yali4* model with the aim to simulate our experimental results. Experimental initial glucose concentration (50 g/L) and uptake rate (0.64 mmol/gDCW/h) were first set in the model according to the experimental data. Slightly adjusting the specific glucose uptake rate down to 0.60 mmol/gDCW/h allowed to better fit the experimental curve. The alternative oxidase (AOX) reaction flux was inhibited during the growth phase, as reported by Guerrero-Castillo *et al.* (2012), and free bounded during the stationnary phase (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009, 2011, 2012). Therefore, a modified *dynamicFBA.m* MATLAB® function has been proposed to allow further dFBA simulations when growth rate reaches the stationnary phase ($\mu = 0$). Then, the initial objective function of biomass optimization during the growth phase was changed to “lipid accumulation” as it’s observed experimentally upon reached stationnary phase. Therefore, the dFBA model showed to predict glucose consumption, biomass and citrate production in good agreement with the experimental results (Fig. 2a). Nevertheless, isocitrate production cannot be predicted by the model. The predicted specific growth rate of 0.052 h^{-1} differs from the experimental μ_{max1}

($0.100 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$) but looks closer if we consider the average of the whole culture, i.e. the mean μ of the two successive growth phases (0.062 h^{-1}).

4. Reduced simulated OxPhos during citrate production and lipid accumulation

Glucose consumption reached the upper-bound rate value of 0.60 mmol/gDCW/h during exponential growth phase (exp-phase), and it was constrained to 0.39 mmol/gDCW/h at stationary growth phase (stat-phase). Predicted NH_4^+ and oxygen specific consumption rates are respectively 0.47 mmol/gDCW/h and 1.56 mmol/gDCW/h at exp-phase and both drops to 0 and 0.05 mmol/gDCW/h respectively at stat-phase. Carbon dioxide (CO_2) is produced only on stat-phase (Fig. 2b). Interestingly, these results are hallmarks of reduced cell energy demand. To specifically illustrate that, we investigated the simulated mitochondrial activity, emphasizing the fluxes along the complexes of the electron transfer chain (ETC). The model reports ATP synthesis inhibition by complex V (CV) at stat-phase (Fig. 2c). Complex I (CI) and complex II (CII) are also inhibited at stat-phase. Only complexes III (CIII) and complex IV (IV) show positive fluxes with drastic decrease from exp-phase to stat-phase. Further, the added alternative oxidase (AOX) reaction is active on stat-phase and reached $0.022 \text{ mmol/gDCW/h}$ oxygen consumption rate. Surprisingly, the model also predicts NADH dehydrogenase (NADH_2e) activity at stat-phase (0.08 mmol/gDCW/h) whereas this enzyme shows being inactive during exp-phase. This is a hallmark of the uncoupled mitochondrial respiratory pathway as reported by Guerrero-Castillo *et al.* (2012). NADH_2e , instead of CI, supplies electrons to AOX through ubiquinone/ubiquinol cycling without contributing to the mitochondria intermembrane proton gradient. This result clearly suggests that this uncoupled alternative pathway is contributing to citrate production, as mainly observed on the stationary phase. We have then assessed this hypothesis proceeding by stimulating Krebs enzymes activity.

5. Krebs enzymes activity sustain mitochondrial citrate accumulation

When the simulated growth reaches stat-phase, Krebs enzymes activity seem to sustain mitochondrial citrate accumulation. Pyruvate dehydrogenase (PDH) activity is decreased from 0.67 mmol/gDCW/h at exp-phase to 0.12 mmol/gDCW/h at stat-phase but while remaining the dominant mitochondrial carbon supplier (Fig. 2d). Citrate synthase (CS) activity also decreases from 0.61 to 0.12 mmol/gDCW/h . The model predicts inactive aconitase during stat-phase but highly active, on the reverse way, from isocitrate to citrate, during the stationary growth phase.

The same effect is reported for NAD-dependent mitochondrial isocitrate dehydrogenase (ISDHm) whereas NADP-dependent counterpart (ISDPHm) is inactive during both growth phases. All the other Krebs enzymes, from oxoglutarate dehydrogenase (OXDH) to fumarase, are inactive during on stat-phase (Fig. 2d). During this phase, mitochondrial oxaloacetate is supplied through malate dehydrogenase (MDHm) and aspartate transamination to glutamate, ensured by aspartate transaminase, and both active at stationnary growth phase. Therefore, at stationnary phase, mitochondrial carbon fluxes are redirected towards citrate accumulation. Citrate is then transported to cytosol mainly though malate/citrate transporter and to a lesser extent though oxoglutarate/citrate transporter (Fig. 2d).

6. Activities of key enzymes of the citrate node

Ochoa-Estropier *et al.* (2014) investigated expressions level of enzymes often cited as keys in lipid accumulation and citrate production. These authors reported high acetyl-CoA carboxylase (ACC) and malic enzyme (ME) activities and reduced malate dehydrogenase (MDH) and ATP citrate lyase (ACL) activities during citrate production phase. Our simulated results show a sharp increase of mitochondrial MDH activity at stat-phase. The peroxisomal isoform activity is much lower. MDHc flux feeds malate synthesis and reversed for the mitochondrial isoform (MDHm) promoting oxaloacetate accumulation (Fig. 2e). DFBA predicts inactive ME, ACC and ACL enzymes activities at stat-phase (Fig. 2e). Simulated results also show an active cytosolic pyruvate carboxylase (PC) favoring pyruvate conversion to oxaloacetate. Therefore, a sustained PDH-PC-MDH route and inhibition of citrate oxidation by aconitase and ACL at stationnary phase strongly favors mitochondrial and cytosolic citrate production over lipid accumulation. This is remarkable with the lower free fatty acid accumulation fluxes (FA), mainly from lipolysis of lipid bodies (0.06 mmol/gDCW/h), compared to specific citrate production (0.12 mmol/gDCW/h) (Fig. 2bef).

7. Optimization of citrate synthesis

We also intended to investigate metabolic triggers promoting citrate overproduction. For that we simulated higher citrate production rate at stationnary phase and identified major effectors (inhibiting or increasing reaction fluxes) of carbon overflow resulting in increased extracellular citrate production. We first restricted our study to Krebs enzymes, ETC complexes and reactions involved in the citrate pathway. Our results show that PDH-PC-CS route is the main contributor of carbon overflow to mitochondrial citrate accumulation. These simulated enzymes

activities are proportional to citrate production rate (Fig. 3). Likewise, the mitochondrial aconitase works on the reversed direction and triggers isocitrate to citrate flux. A third phenotype associated with citrate overproduction is an increased extracellular oxygen consumption rate (Fig. 3). This is counterintuitive since less ATP is required during the stationary growth phase and OxPhos complexes activities are decreased, except for the complex I (CI), which increases concomitantly with citrate production rate. Interestingly, the simulated increased CI flux is not accompanied with overexpressed complexes III and IV. Looking more closely at the intracellular reactions, it appears that a specific cytosolic reaction of long-chain alcohol oxidation, ensured by fatty alcohol oxidase (FAO), is the main consumer of oxygen at a rate of 0.29 mmol/gCDW/h, corresponding to 0.18 mmol/gDCW/h extracellular oxygen consumption rate (Fig. 4). Intracellular oxygen consumption is balanced by catalase reduction of hydrogen peroxidase (H_2O_2) with a specific 0.143 mmol/gDCW/h flux rate. This result also emphasizes that the NADH₂e-AOX alternative route for NADH oxidation and O₂ reduction shows null fluxes when citrate is overproduced during the stationary phase (Fig. 4). Based on these observations, we have then experimentally assessed the effect of AOX inhibition on citrate production in batch cultures of *Y. lipolytica* in shake flasks in mineral medium at 50 g/L of glucose. When the culture reached the stationary phase, we added 100 μ M n-propyl gallate (nPG), a well-known inhibitor of AOX, at 72h then repeated every 24h. Experimental results show optimized citrate production in the nPG-implemented medium (Fig. 5). Up to 20.5 g/L of citrate is produced, compared to 10.9 g/L found on control media (Fig. 1), biomass reaches 5.8 gDCW/L and only traces of glucose remain at the end of the culture (Fig. 5). Experimental data are well predicted by the model, except for glucose consumption during stationary phase. To our knowledge this is the first report of *Y. lipolytica* citrate overproduction on mineral medium based on a culture management strategy designed using mathematical predictions.

Another way to confirm these predictions would have been to add salicylhydroxamic acid (SHAM), another well-known and used inhibitor of AOX (Garcia-Neto *et al.*, 2017). The dFBA model of *Y. lipolytica* also was also used to predict the effect of adding various Krebs intermediates such as α -ketoglutarate, malate and oxaloacetate for citrate optimization. Whereas simulations reported an improved citrate production (data not showed), these results were not experimentally confirmed, compared to the control (SI II).

IV. Discussion

Few studies already reported optimization of citrate in *Aspergillus niger* and *Yarrowia lipolytica* by modulating mitochondrial metabolism with specific effector compounds or by cell engineering strategies (Papanikolaou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Our predicted results show that the oxidative phosphorylation (OxPhos) pathway is globally reduced when the cell culture reaches the stationary phase (Fig. 2c). These results were confirmed by a series of oxygraphic experiments (cell respiration) carried out at different growth states, therefore with cells exhibiting different mitochondrial membrane potential (SI. I). We observed that mitochondrial respiration is functional through the alternative NADH₂e-AOX pathway whereas complex IV (CIV) oxygen consumption is inhibited (Fig. 2c). This is in good agreement with the proposed association/dissociation mechanism of NADH₂e/CIV channeling electron from the external NADH to cytochrome pathway or towards the alternative oxidase (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012). In agreement with the literature we propose AOX activity as a protective mechanism against mitochondrial ROS production in *Y. lipolytica* and some other yeasts and plants species (Garcia-Neto *et al.*, 2017; Vanlerberghe, 2013). Indeed, OxPhos is considered as the main ROS producer, specially through CI and CIII (Vanlerberghe, 2013). Our results of simulated intracellular oxygen consumption upon citrate optimization show that fatty acid oxidation may also be a source of ROS production. The *long-chain alcohol oxidase (C10)* model reaction provided by the fatty alcohol oxidase gene (FAO1) become the main O₂ consumer (0.29 mmol/gDCW/h) at stationary phase and triggers the oxidation of cytosolic decanol to decanal. This reaction is accompanied by the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) on important ROS species. FAO1 gene has been recently identified in *Y. lipolytica* as key in ω -oxidation of long-chain fatty acids (Gatter *et al.*, 2014). One may consider a global mechanism in *Y. lipolytica* where citrate is mainly used for lipids accumulation at the entry in stationary phase, followed by ω and β -oxidation of fatty acids upon lipid saturation and exposure to free oxygen species. Fatty acids oxidation is thus thought to trigger cell defense mechanisms such as catalase (CAT) and alternative NADH₂e-AOX oxidase to circumvent ROS accumulation (Fig. 4). Further oxygenation of the culture by controlling pO₂ or OTR or inhibition of AOX activity is then expected as a key to trigger citrate overproduction. The proposed mechanism is in good agreement with the work of Kavscek *et al.* (2015), Sabra *et al.* (2017) (Sabra *et al.*, 2017) and (Ferreira *et al.*, 2016) showing that the fine modulation of oxygen consumption enzymes in *Y. lipolytica* favors citrate overflow metabolism.

A recent study of citrate production in *Aspergillus niger* by disruption or overexpression of *aox1* gene, in addition to antimycin A during cell growth, showed an improved citrate production in overexpressed *aox1* strains compared to the parental strain (Hou *et al.*, 2018). Up to 169.1 g/L citrate is reported for one of the overexpressed strains against 158.9 g/L for the parental strain. According to our understanding of the results presented, the highest amount of citrate obtained for the overexpressed *aox1* strain should only be attributed to a better germination rate. Moreover, antimycin A compound used in the study is stated as an inhibitor of AOX protein, which is in contradiction with the effect sought by the overexpression of *aox1*. In the absence of contradicting our study, Hou *et al.* (2018) confirm the hypothesis that AOX may contribute to clearing ROS species and improving cell survival.

V. Conclusion

We applied dFBA algorithm to the existing *Yali4* model of *Yarrowia lipolytica* W29 strain metabolism to predict favorable metabolic conditions for citrate optimization. The model first predicted carbon overflow to lipid accumulation and citrate production during stationary phase. *Y. lipolytica* respiration is drastically decreased during citrate production phase and shifts from OxPhos to the alternative $\Delta\Psi$ -independent pathway ensured by NADH₂e/AOX route. Simulated overproduction of citrate is accompanied by inhibition of the NADH₂e/AOX pathway as well as increased lipid oxidation and ROS production. The prediction of citrate overproduction has been confirmed experimentally by inhibition of AOX protein. We also challenged the importance of ROS in balancing lipid accumulation and citrate production fluxes by adding glutathione to *Y. lipolytica* culture in the presence of nPG. Our results showed a global inhibition of citrate production. We propose AOX gene as a target for metabolic engineering and industrial production of citrate and, maybe, some other organic acids.

Tables and Figures

Table 1 : Kinetic physiological parameters			
Initial glucose conc. (g/L)	100 g/L	50 g/L	Simulation
Growth rate (h ⁻¹)	0.076 ± 0.004	0.049 ± 0.004	0.052
q _{Gluc} (mmol/gDCW/h)	0.34 ± 0.027	1.148 ± 0.264	1.148
q _{O₂} (mmol/gDCW/h)	0.6	1.1	1.1
r _{Cit} (mmol/gDCW/h)	0.301	0.093	0.093
r _{Icit} (mmol/gDCW/h)	0.140	0.060	0.060

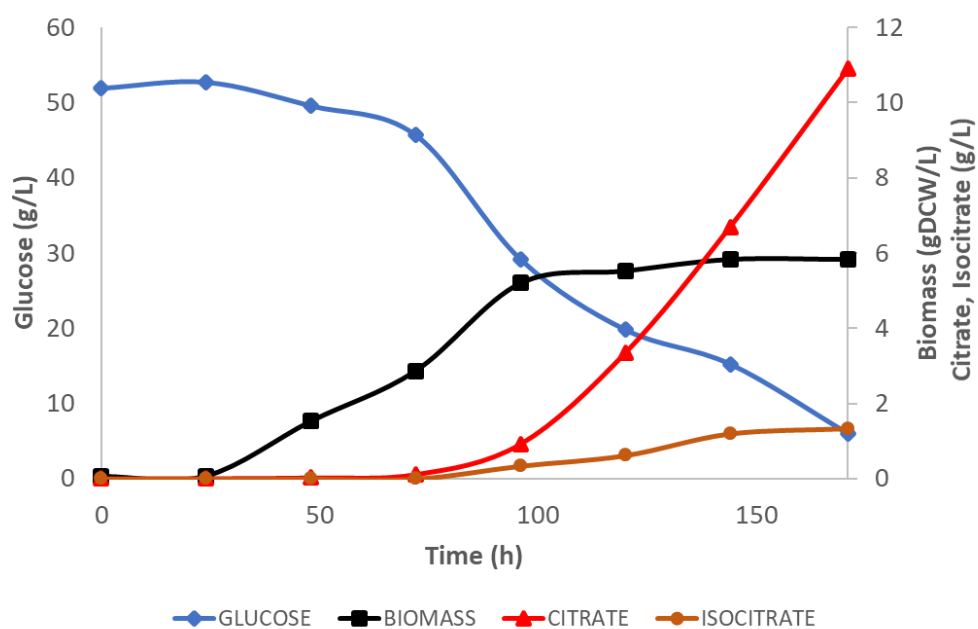


Figure 1: Experimental data obtained from batch of *Y. lipolytica* culture. Citrate and isocitrate are produced upon cultures reach stationary phase.

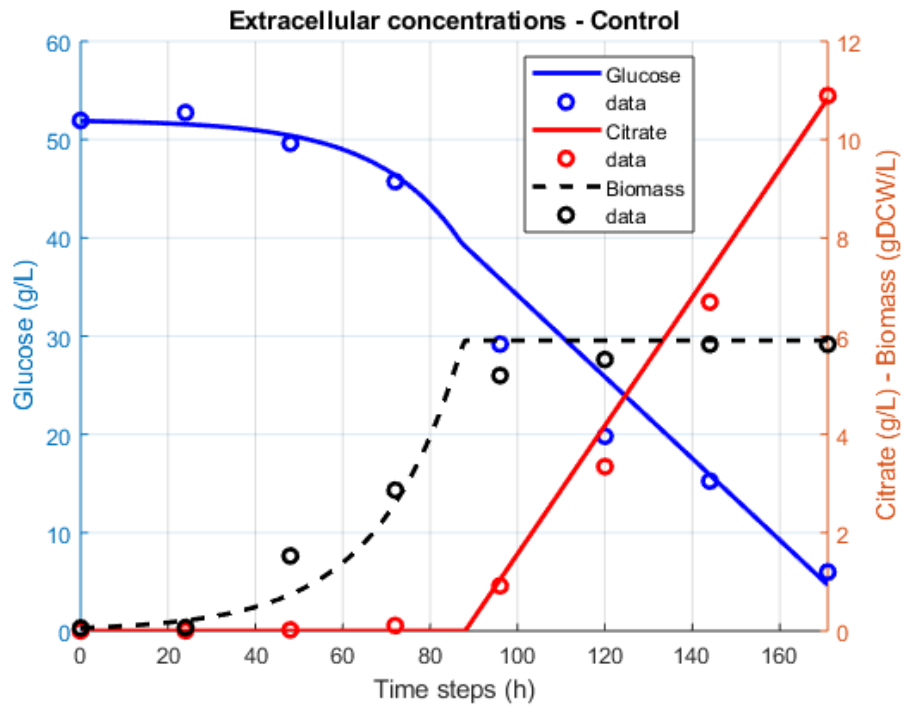


Figure 2a: Calibrating dFBA model with experimental flux rates allowed predictions close to experimental results, except for isocitrate which is not predicted by the model.

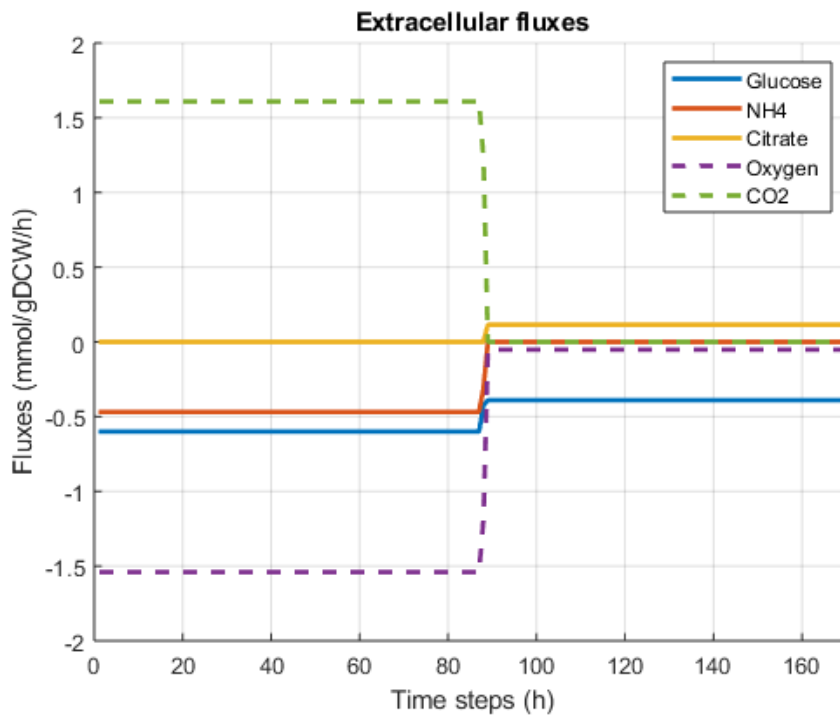


Figure 2b: Simulated extracellular fluxes. Upon NH_4^+ limitation between 80-90h, citrate flux increases. Glucose and oxygen consumption fluxes are lower during stationary phase (stat-phase).

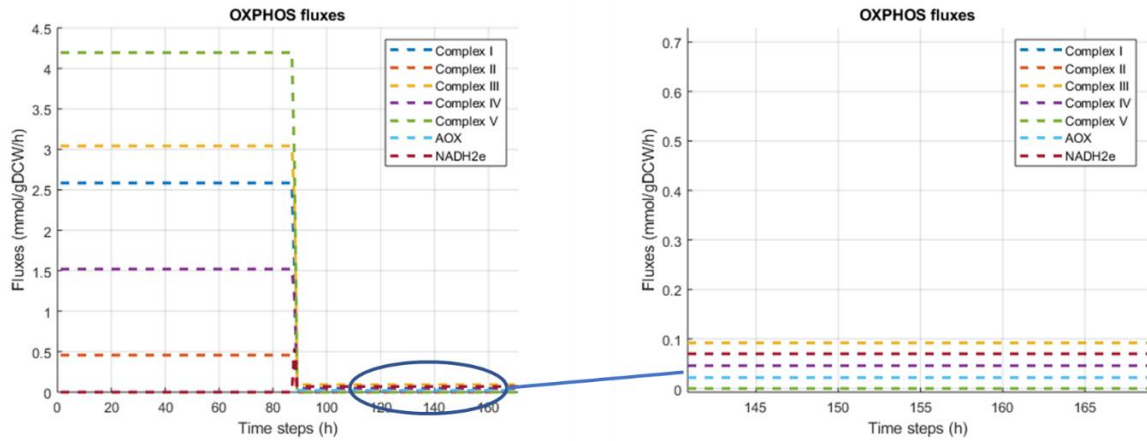


Figure 2c: Simulated oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity. OXPHOS activity is globally reduced upon stat-phase. AOX and NADH2e are inhibited on growth phase and activated during stat-phase. Complexes I and V are inhibited on stat-phase, which is a marker of the metabolic switch, with limited energy demand and activation of the alternative respiration.

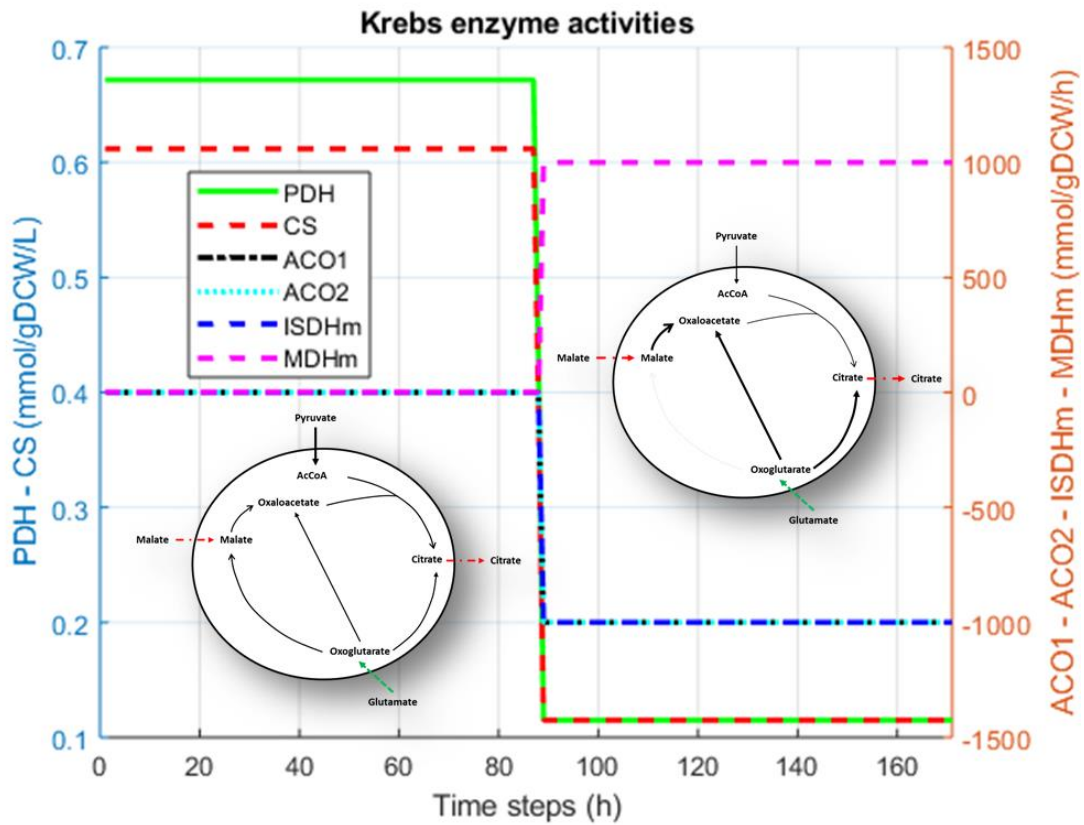


Figure 2d: Characterisation of Krebs enzymes activities. On growth phase, Krebs cycle is active since pyruvate dehydrogenase (PDH), citrate synthase (CS), aconitate 1 and 2, mitochondrial isocitrate dehydrogenase (ISDHm) and malate dehydrogenase (MDHm) have positive fluxes. During stat-phase carbon fluxes are redirected towards mitochondrial citrate accumulation.

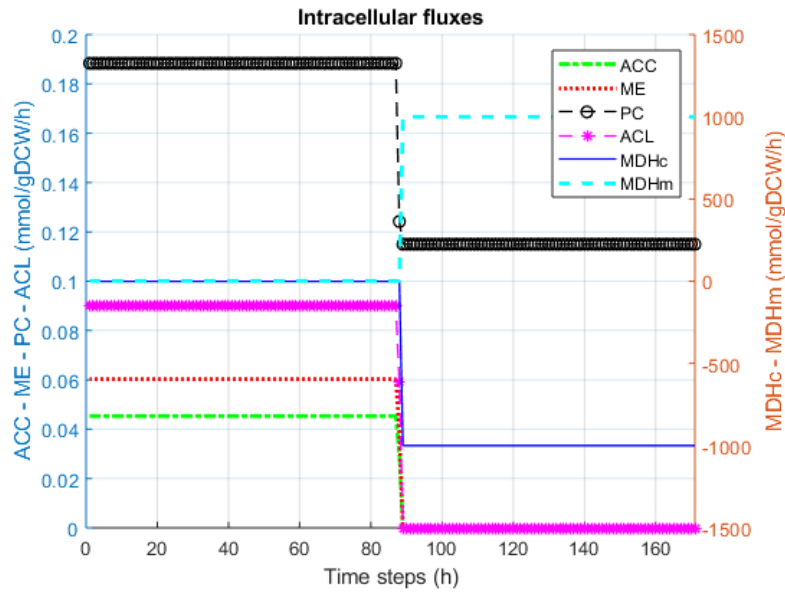


Figure 2e: Simulated intracellular fluxes contributing to overflow of citrate. At stat-phase, ATP citrate lyase (ACL) and acyl-CoA carboxylase (ACC) fluxes are inhibited. Malic enzyme (ME), pyruvate carboxylase (PC) and cytosolic malate dehydrogenase (MDHc) are limited. Only MDHm shows increased activity contributing to citrate synthesis.

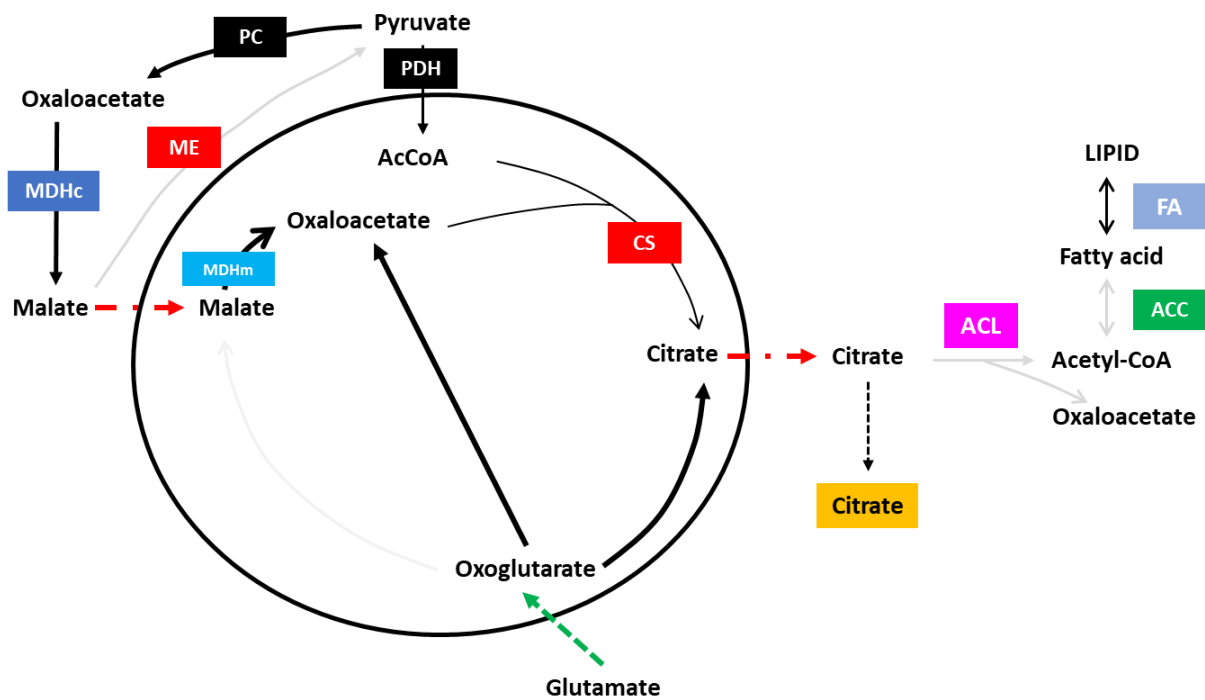


Figure 2f: Illustrated balance of citrate overflow. Glutamate, malate and partially pyruvate mainly contribute to citrate overflow. Fluxes to lipogenesis is globally limited and triggers extracellular citrate production.

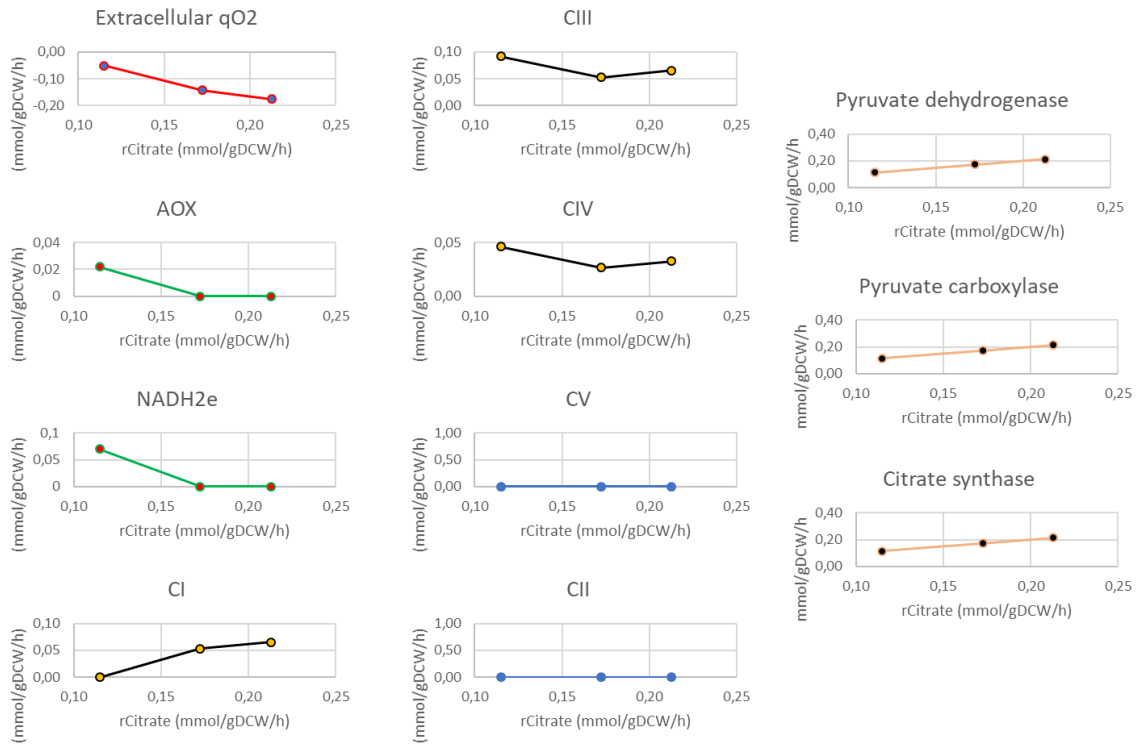


Figure 3: Simulated OXPPOS and enzymes activities at stationary phase with increased citrate production rate. Optimising citrate production rate is correlated with limited oxygen consumption rate, decreased AOX and NADH2e. Complex I (CI) activity increases for NADH turnover. PDH, PC and CS supports citrate overproduction.

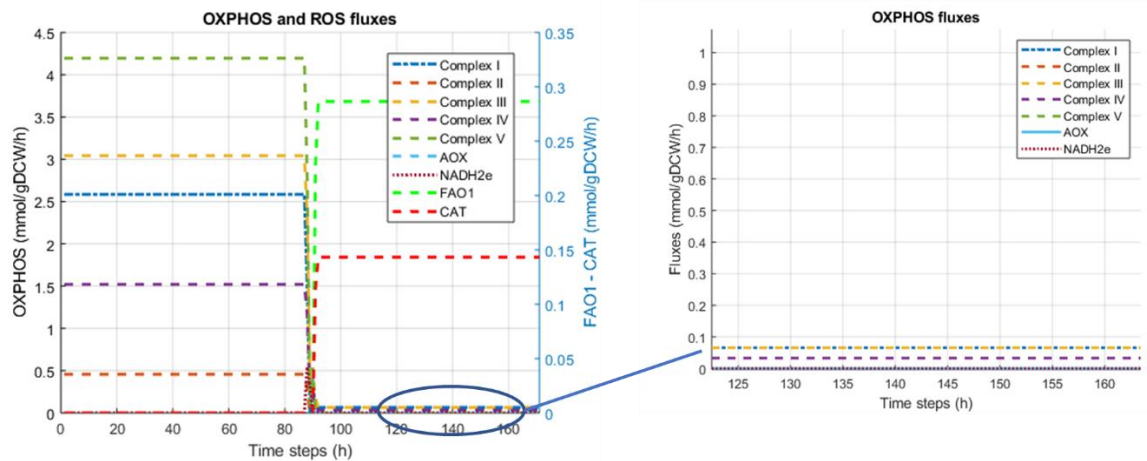


Figure 4: Simulated OXPPOS and ROS generation. Fatty alcohol oxidase gene (FAO1) and catalase (CAT) activities increase on stat-phase. FAO1 contribute to ROS generation and catalase participates in cleaning ROS species.

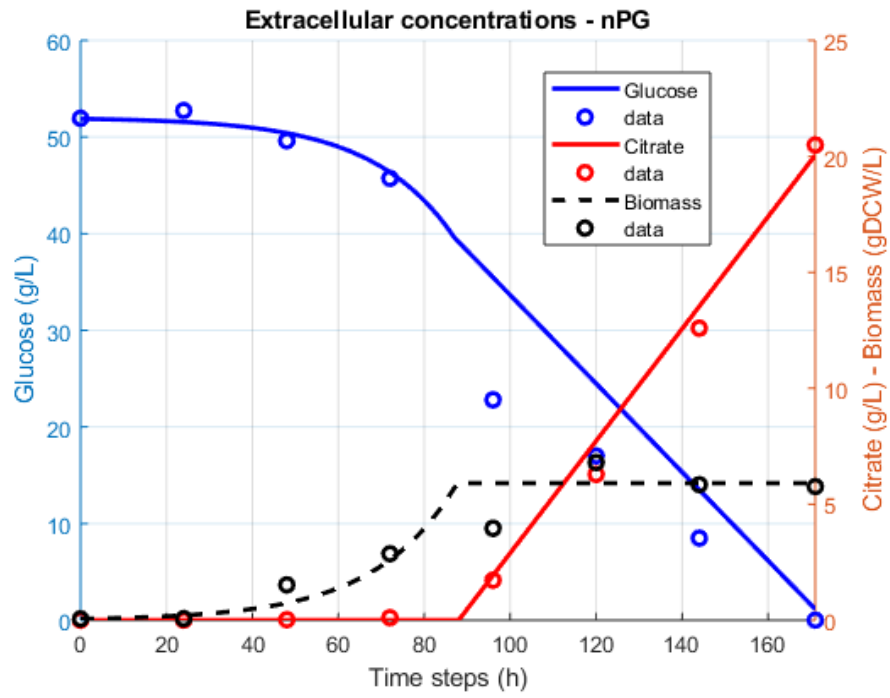


Figure 5: Inhibition of AOX activities by nPG triggers citrate production experimentally and *in silico*. UP to 20 g/L of citrate is produced during the stat-phase.

Supplementary informations

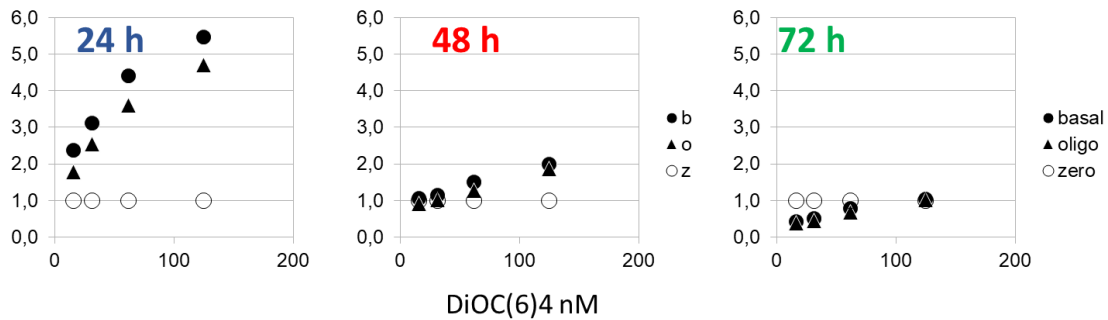


Figure SI 1: Experimental measurements of mitochondrial membrane potential (MMP) at 24h, 48h and 72h of *Y. lipolytica* culture. DiOC(6) marker were used at different concentrations to evaluate MMP. Basal curves are MMP without OXPHOS inhibition. Oligo condition are MMP reported with oligomycin addition to cell culture. MMP are expressed on fold-change compared to 'zero' condition where all complexes' inhibitors were added to the culture. MMP globally decreases with culture time and practically inhibited on stat-phase (72h).

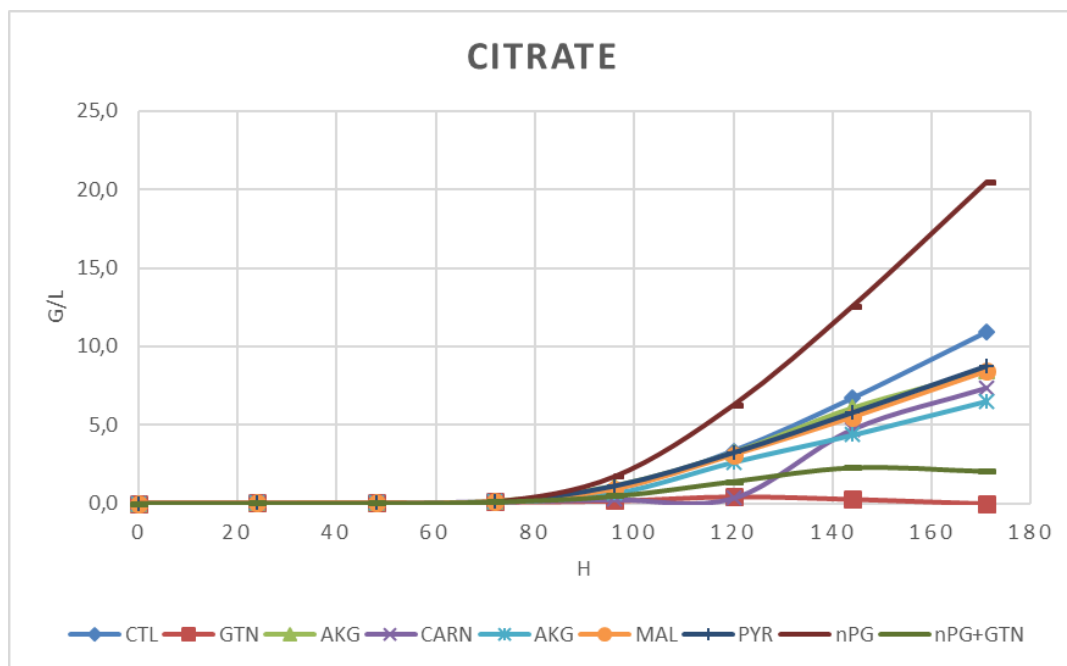


Figure SI 2: Experimental results of citrate production with addition of different metabolites on stat-phase. Compared to the control (CTL) condition, nPG addition stimulates citrate overproduction whereas other Krebs metabolites, α -ketoglutarate/oxoglutarate (AKG), carnitine (CARN), malate (MAL), pyruvate (PYR), do not significantly change citrate production. Glutathione (GTN) addition to *Y. lipolytica* culture vanishes citrate production. When nPG is added jointed to GTN, citrate is produced but to a lesser extent.

References

1. Barth, G. & Gaillardin, C. *Yarrowia lipolytica*. in *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* 313–388 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1996). doi:10.1007/978-3-642-79856-6_10
2. Nicaud, J.-M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29, 409–418 (2012).
3. Dulermo, T. & Nicaud, J.-M. 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 (2011).
4. Papanikolaou, S. & Aggelis, G. Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 651–655 (2003).
5. Blazeck, J. et al. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nature Communications* 5, 3131 (2014).
6. Ricci, A. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. *EFSA Journal* 16, (2018).
7. Groenewald, M. et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 187–206 (2014).
8. Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V. & Finogenova, T. V. Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology* 2, 107–123 (2008).
9. Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. & Marc, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.* 92, 737–744 (2002).
10. Sawant, O., Mahale, S., Ramchandran, V., Nagaraj, G. & Bankar, A. FUNGAL CITRIC ACID PRODUCTION USING WASTE MATERIALS: A MINI-REVIEW. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 8, 821–828 (2018).
11. Max, B. et al. Biotechnological production of citric acid. *Braz J Microbiol* 41, 862–875 (2010).
12. Kavšček, M., Bhutada, G., Madl, T. & Natter, K. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 9, 72 (2015).
13. Dujon, B. et al. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44 (2004).
14. Loira, N., Dulermo, T., Nicaud, J.-M. & Sherman, D. J. A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 6, 35 (2012).
15. Pan, P. & Hua, Q. Reconstruction and In Silico Analysis of Metabolic Network for an Oleaginous Yeast, *Yarrowia lipolytica*. *PLOS ONE* 7, e51535 (2012).

16. Kerkhoven, E. J., Pomraning, K. R., Baker, S. E. & Nielsen, J. Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *npj Systems Biology and Applications* 2, 16005 (2016).
17. Wei, S., Jian, X., Chen, J., Zhang, C. & Hua, Q. Reconstruction of genome-scale metabolic model of *Yarrowia lipolytica* and its application in overproduction of triacylglycerol. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 51 (2017).
18. Mishra, P. et al. Genome-scale model-driven strain design for dicarboxylic acid production in *Yarrowia lipolytica*. *BMC Systems Biology* 12, 12 (2018).
19. Yalcin, S. K., Bozdemir, M. T. & Ozbas, Z. Y. Citric acid production by yeasts: Fermentation conditions, process optimization and strain improvement. 9 (2010).
20. Ochoa-Estopier, A. & Guillouet, S. E. D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 170, 35–41 (2014).
21. Evans, C. T. & Ratledge, C. physiological significance of citric acid in the control of metabolism in lipid-accumulating yeasts. *Biotechnology and genetic engineering reviews* (1985).
22. Ratledge, C. & Wynn, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51, 1–51 (2002).
23. Evans, C. T. & Ratledge, C. Possible regulatory roles of ATP:citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Can. J. Microbiol.* 31, 1000–1005 (1985).
24. Beopoulos, A., Nicaud, J.-M. & Gaillardin, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1193–1206 (2011).
25. Zhang, H., Wu, C., Wu, Q., Dai, J. & Song, Y. Metabolic Flux Analysis of Lipid Biosynthesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica* Using ¹³C-Labeled Glucose and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *PLoS One* 11, (2016).
26. Sabra, W., Bommarreddy, R. R., Maheshwari, G., Papanikolaou, S. & Zeng, A.-P. Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microbial Cell Factories* 16, 78 (2017).
27. Ferreira, P., Lopes, M., Mota, M. & Belo, I. Oxygen transfer rate and pH as major operating parameters of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* W29 and CBS 2073. *Chem. Pap.* 70, 869–876 (2016).
28. Kamzolova, S. V., Shishkanova, N. V., Morgunov, I. G. & Finogenova, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 3, 217–222 (2003).

29. Akimenko, V. K., Finogenova, T. V., Ermakova, I. T. & Shishkanova, N. V. [Respiratory cyanide resistance in *Candida lipolytica* and the supersynthesis of citric acids]. *Mikrobiologiya* 48, 632–638 (1979).
30. Akimenko, V. K., Arinbasarova, A. Y., Smirnova, N. M. & Medentsev, A. G. The Alternative Oxidase of *Yarrowia lipolytica* Mitochondria Is Unable To Compete with the Cytochrome Pathway for Electrons. *Microbiology* 72, 403–407 (2003).
31. Berthold, D. A., Andersson, M. E. & Nordlund, P. New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1460, 241–254 (2000).
32. Kerscher, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1459, 274–283 (2000).
33. Joseph-Horne, T., Babij, J., Wood, P. M., Hollomon, D. & Sessions, R. B. New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Letters* 481, 141–146 (2000).
34. Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D. & Uribe-Carvajal, S. During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 353–362 (2012).
35. Papanikolaou, S. et al. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 1221–1232 (2009).
36. Orth, J. D., Thiele, I. & Palsson, B. Ø. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 28, 245–248 (2010).
37. Raman, K. & Chandra, N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Brief Bioinform* 10, 435–449 (2009).
38. Aung, H. W., Henry, S. A. & Walker, L. P. Revising the Representation of Fatty Acid, Glycerolipid, and Glycerophospholipid Metabolism in the Consensus Model of Yeast Metabolism. *Ind Biotechnol (New Rochelle N Y)* 9, 215–228 (2013).
39. Magnan, C. et al. Sequence Assembly of *Yarrowia lipolytica* Strain W29/CLIB89 Shows Transposable Element Diversity. *PLOS ONE* 11, e0162363 (2016).
40. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. & Wood, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1504, 179–195 (2001).
41. Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., Zickermann, V. & Brandt, U. *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 83–91 (2002).
42. Vishwakarma, A., Tetali, S. D., Selinski, J., Scheibe, R. & Padmasree, K. Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis

- to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 116, 555–569 (2015).
43. Guerrero-Castillo, S. et al. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 323–331 (2011).
 44. Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D. & Uribe-Carvajal, S. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 75–85 (2009).
 45. Garcia-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A. J. & Alberto Luévano-Martínez, L. High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces Hansenii*. *PLoS One* 12, (2017).
 46. Wang, L. et al. Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.* 14, 7 (2015).
 47. Papanikolaou, S. et al. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* 168, 303–314 (2013).
 48. Vanlerberghe, G. C. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6805–6847 (2013).
 49. Gatter, M. et al. A newly identified fatty alcohol oxidase gene is mainly responsible for the oxidation of long-chain ω -hydroxy fatty acids in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 14, 858–872 (2014).
 50. Hou, L. et al. Functional analysis of the mitochondrial alternative oxidase gene (*aox1*) from *Aspergillus niger* CGMCC 10142 and its effects on citric acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2018). doi:10.1007/s00253-018-9197-9

Chapitre II

Modèles cinétiques pour prédire la production de citrate chez *Y. lipolytica*

I. Introduction

Les méthodes computationnelles d'analyse de réseaux métaboliques de type Flux Balance Analysis (FBA) présentées et utilisées dans les chapitres précédents prennent en compte la stœchiométrie des réactions chimiques et permettent, le plus souvent, une analyse à l'état stationnaire. Dans le cadre d'une problématique industrielle, il est aussi nécessaire de faire appel à d'autres méthodes et outils qui vont permettre de suivre la dynamique des métabolites, en temps réel. L'avantage des modèles cinétiques, basés sur des équations différentielles ordinaires (EDO), par rapport aux modèles statiques est la prise en compte de la cinétique des réactions enzymatiques. Cet avantage est contrebalancé par la sous-détermination des paramètres enzymatiques, même s'il y a eu des tentatives de modélisation du métabolisme à l'échelle du génome (Karr *et al.*, 2012). Dans ce cas il est nécessaire de réduire le nombre de réaction enzymatiques tout en gardant un système de réaction qui puisse rendre compte, *in silico*, des dynamiques observées expérimentalement. La construction d'un tel modèle passe donc obligatoirement par des phases de validation *in vivo*. Le dosage des métabolites internes et externes va permettre d'avoir un modèle le plus réaliste possible. Une récente publication propose une méthode de réduction d'un GSM en un réseau métabolique suivi de sa transcription en un modèle cinétique (Stanford *et al.*, 2013). Elle a été appliquée à réduction du modèle consensus (v.4.0) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Comme indiqué dans le chapitre IV, un certains nombres de modèle dynamique de la production de citrate existe chez l'*Aspergillus niger* (Torres, 1994; Torres *et al.*, 1996; Alvarez-Vasquez *et al.*, 2000; Papagianni, 2007) ainsi que l'accumulation de lipide et production de citrate chez *Y. lipolytica* (Papanikolaou and Aggelis, 2003; Robles-Rodriguez *et al.*, 2017; Robles-Rodriguez *et al.*, 2018). D'autres modèles dynamiques d'optimisation des ressources nutritives pour l'optimisation de la production de molécules d'intérêt biotechnologiques et transposables à l'échelle industrielle ont été proposés. Jolicoeur *et al.*, ont proposé une série de modèles cinétiques d'optimisation de la production d'anticorps monoclonaux chez la cellule Chinese Hamster Ovary (CHO) (Ghorbaniaghdam *et al.*, 2014; Robitaille *et al.*, 2015) ainsi que l'optimisation de la productivité des modèles de plantes en mode batch/cuvée (Cloutier *et al.*, 2007, 2009).

Dans ce travail, nous avons utilisé le réseau GEM *iYali4* (Kerkhoven *et al.*, 2016) ainsi que le réseau métabolique proposé par Robles-Rodriguez *et al.* (2017) pour la construction d'un

modèle réduit et un cinétique macroscopique, respectivement, pour prédire la production de citrate chez *Y. lipolytica*.

II. Matériels et méthodes

1. Description mathématique d'un système batch

Le système d'équations mathématiques utilisé pour modéliser les deux modèles cinétiques est celui développé dans le chapitre IV.I. La cinétique enzymatique est celle dite de Michaelis-Menten (voir Chap. IV.II.1.a). Les régulations enzymatiques n'ont pas été prises en compte dans ces modèles préliminaires.

2. Réduction systématique du GEM de *Y. lipolytica*

Comme souligné précédemment, les modèles à l'échelle du génome (GEM) sont utilisés pour étudier des flux à l'état stationnaire (FBA ou dFBA) et difficilement applicables à des études dynamiques. Une publication récente propose une méthode de réduction des GEMs en des réseaux métaboliques de plus petites tailles (Stanford *et al.*, 2013). Elle a été en partie appliquée à réduction du modèle consensus (v.4.0) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le modèle résultant montre une capacité du modèle à prédire les flux et concentrations obtenues en laboratoire.

Nous avons appliqué cette méthode au GEM *iYali4* afin de répondre à notre problématique de prédiction de la production de citrate. Voici les étapes de réduction de *iYali4* :

(1) exécuter la méthode geometric FBA (gFBA) qui, comme souligné précédemment, permet une distribution optimale et propose une solution unique de flux à l'état stationnaire, pour une « fonction objectif ». L'ajout des contraintes de flux au niveau des bornes est important et dépend des objectifs de modélisation. La production de la biomasse a été définie comme « fonction objectif », avec des contraintes supplémentaires d'accumulation des lipides et de production de citrate. D'autres contraintes peuvent être ajoutées basées sur les données expérimentales.

(2) récupérer le sous-réseau réduit, correspondant aux réactions « actives », pour des flux différents de zéro, optimal et issu de la prédiction avec gFBA. Nous avons écrit la fonction `convertCobra2kinetic.m` pour récupérer ce réseau réduit.

(3) les paramètres cinétiques (K_M , V_{max} , k_a , k_i) ainsi que les concentrations des métabolites sont déterminées expérimentalement ou récupérées de la littérature. L'aspect central de cette approche réside, justement, dans cette étape de récupération des paramètres (la plupart du temps répertoriés dans la littérature) puisqu'il s'agit d'une technique d'approximation qui permet l'utilisation de données cinétiques incomplètes pour générer un modèle cinétique réduit représentatif du modèle GEM. Nous proposons là aussi une fonction MATLAB® *generateParameters* pour automatiser la génération de ces paramètres ainsi que leurs valeurs respectives.

(4) par simplification, la vitesse maximale V_{max} des réactions enzymatiques sont assimilées aux flux issus de la simulation par gFBA.

(5) nous proposons une fonction MATLAB® *generateur_equadiff* pour automatiser la génération des équations différentielles à partir du réseau métabolique réduit.

3. Construction d'un modèle cinétique macroscopique de *Y. lipolytica*

En parallèle de ces études sur la réduction du GEM de *Y. lipolytica* et construction d'un modèle cinétique, nous avons travaillé sur un modèle macroscopique du même organisme. Le réseau métabolique est le même que celui proposée par Robles-Rodriguez *et al.* (2017). Ce réseau comprend les principales voies métaboliques du métabolisme central du carbone. On peut identifier la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle de Krebs, la lipogénèse et la β -oxydation des acides gras et la réaction de production de la biomasse. Le réseau intègre 59 réactions et 61 métabolites et distingue 3 compartiments : le milieu extracellulaire, le cytosol et la mitochondrie. Les constantes enzymatiques ont été récupérées dans les bases de données telles que BRENDA et Sabio-RK. Nous avons utilisé la fonction *generateur_equadiff.m* pour générer le système d'équation différentielle.

4. Estimation des paramètres

Pour l'optimisation des paramètres cinétiques, nous avons appliqué la fonction d'optimisation non-linéaire *fmincon* (MATLAB®). La « fonction objectif » définie pour l'optimisation des paramètres est la suivante :

$$\min \left(\sum_{n=1}^N \sum_{t=1}^T \left(\frac{Y_{n,t}^{exp} - Y_{n,t}(p)}{\sigma_{n,t}} \right)^2 \right)$$

$Y_{n,t}^{exp}$: données expérimentales à chaque temps t
 $Y_{n,t}(p)$: variables simulées pour chaque paramètre p optimisé à temps t
 $\sigma_{n,t}$: l'écart-type des données expérimentales entre deux temps t

III. Résultats et discussion

1. Modèle cinétique réduit de *Y. lipolytica*

Geometric FBA (gFBA) a permis la réduction de *iYali4*. Le sous-réseau obtenu comprend 399 réactions au lieu des 1985 réactions du GEM. Ce modèle a été généré avec les contraintes de flux de consommation de glucose dans un milieu complexe (4 mmol/gDCW/h). Un flux net de production de citrate a aussi été fixé selon les données expérimentales (0.301 mmol/gDCW/h). Nous avons utilisé notre générateur d'équations différentielles *generateur_equadiff.m* pour convertir le réseau métabolique à 399 réactions en un modèle cinétique exécutable sous MATLAB®. La consommation des ressources (glucose, ammonium, oxygène) et la production de métabolites d'intérêt (citrate, lipides) ou de la biomasse est prédite *in silico*. Nous avons aussi évalué la variation des ratios énergétiques afin de rendre compte des transitions métaboliques qui s'opèrent dans les différentes phases.

a. Modélisation de l'accumulation des lipides

Ce modèle prédit des consommations en substrats (glucose et ammonium) et production de la biomasse, ainsi que l'accumulation des lipides (Fig. 17a). Cependant ce modèle n'a pas permis une prédiction de la production de citrate. Cette prédiction est en contradiction avec le résultat obtenu en laboratoire où la production de citrate est majoritairement observée pendant la phase stationnaire conjointement avec l'accumulation de lipides. La phase stationnaire est atteinte à 10h concomitante avec la carence en NH_4^+ . Dans ce modèle, le taux de lipides intracellulaires diminue pendant la phase de croissance et augmente pendant la phase stationnaire (à partir de 10h). Le modèle prédit une incapacité de la levure *Y. lipolytica* à produire à la fois le citrate extracellulaire et accumuler les lipides intracellulaires. Les deux phénomènes sont concurrents puisque le citrate est un précurseur de la lipogénèse. Ce phénomène est assimilé à l'overflow métabolique lors duquel le glucose consommé est préférentiellement stocké en intracellulaire sous forme de lipides et converti en citrate extracellulaire par saturation de l'accumulation (voir Chap. I de la partie Résultat). L'incapacité du modèle à prédire une production de citrate pourrait être due à des régulations et/ou limitations qui ne sont pas prises en compte dans ce modèle.

b. Prédiction des marqueurs énergétiques du phénomène d'overflow

Les ratios ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) et NAD^+/NADH augmentent pendant la phase exponentielle de croissance et ralentissent pendant la phase stationnaire (Fig. 17b). Quant au ratio ($\text{ADP}+\text{AMP}/\text{ATP}$), il diminue pendant la phase de croissance et reste constant en phase stationnaire, probablement lié à la maintenance (Fig. 17b). Un ratio NAD^+/NADH élevé est un marqueur d'une glycolyse accélérée (Stein et Imai, 2012; da Veiga Moreira *et al.*, 2016). Cela se traduit par une activité catabolique du glucose plus importante pendant cette phase de croissance. Pour ce qui est du marqueur anabolique ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), son augmentation linéaire en phase stationnaire est corrélée avec l'accumulation de lipides.

Cette méthode de réduction des GEMs est intéressante pour la prédiction des concentrations des métabolites intracellulaires et extracellulaires. Cependant, elle semble limitée pour identifier les phénomènes impliqués dans les transitions métaboliques telles que la production de la biomasse, accumulation des lipides et production de citrate.

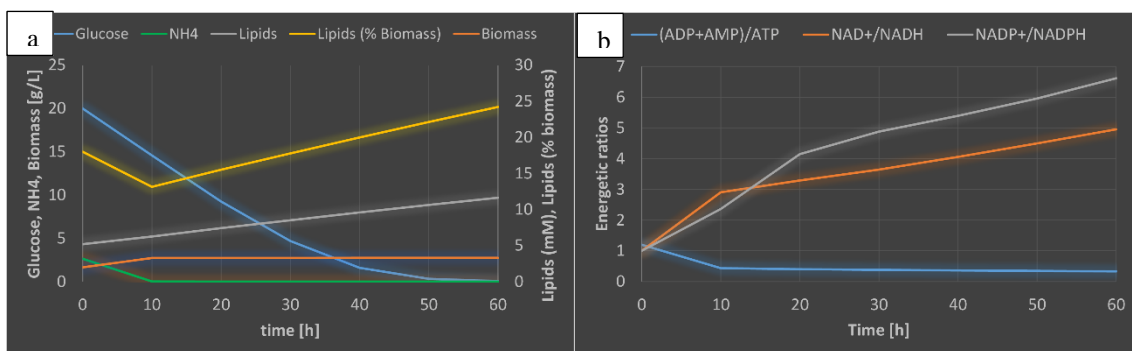


Figure 17: Caractérisation in silico du phénomène d'overflow chez *Y. lipolytica*. (Poster YSGSB, Jena 2016)

2. Modèle cinétique macroscopique de *Y. lipolytica*

La construction du modèle macroscopique très synthétique du métabolisme de *Y. lipolytica* avait d'abord pour but de gagner en capacité de prédiction de la production de citrate et d'accumulation de lipides par rapport au modèle réduit précédent. Ensuite, il s'agissait de faire le lien entre les prédictions obtenues par dynamic FBA (cf. Chap. I) et leurs mises en application dans un modèle cinétique qui décrit la variation des concentrations de l'ensemble des métabolites intra et extracellulaires. Les simulations ont été confrontées à des données métabolomiques obtenues à partir d'une culture de *Y. lipolytica* réalisée en batch.

Ce modèle macroscopique prédit la consommation de glucose et ammonium (NH_4^+) et la production de citrate et de la biomasse (Fig. 18a). L'accumulation du triglycéride (TAG) et la réaction de la maintenance sont considérées en extracellulaire tel que définies par Robles-Rodriguez *et al.* (2017). Les prédictions sur la production de la biomasse ainsi que pour de citrate sont proches des données obtenues expérimentalement. La phase exponentielle de croissance est prédite avec un taux de croissance μ_{max} de $0,12 \text{ h}^{-1}$, obtenu par optimisation. Ce taux de croissance est éloigné de celui obtenu expérimentalement ($\mu_{max} = 0.05 \text{ h}^{-1}$). Cependant la phase de décélération n'est pas correctement prédite, sûrement à cause des régulations inhibitrices de la croissance ou des limitations qui ne seraient pas assez bien décrites par le modèle. La biomasse atteint une concentration de $8,8 \text{ gDCW/L}$. Le citrate est majoritairement produit en phase stationnaire et atteint $5,5 \text{ g/L}$ en fin de culture. Le TAG est accumulé en phase de croissance et chute brutalement en phase stationnaire. Son accumulation est inversement corrélée à la production de citrate.

Les prédictions sur les variations des métabolites intracellulaires doivent encore être améliorées. Notamment sur les métabolites de la glycolyse (pyruvate, fructose-6-phosphate et le phosphoénolpyruvate) mais aussi pour l'isocitrate et le citrate (Fig. 18b). Du point de vue énergétique, le modèle prédit la phase de maintenance décrite par la stabilisation de la quantité d'ATP. Cela correspond à l'entrée en phase stationnaire de croissance entre 50-60h concomitante avec une limitation en acide aminé (glutamine) et la carence en azote intracellulaire (NH_3).

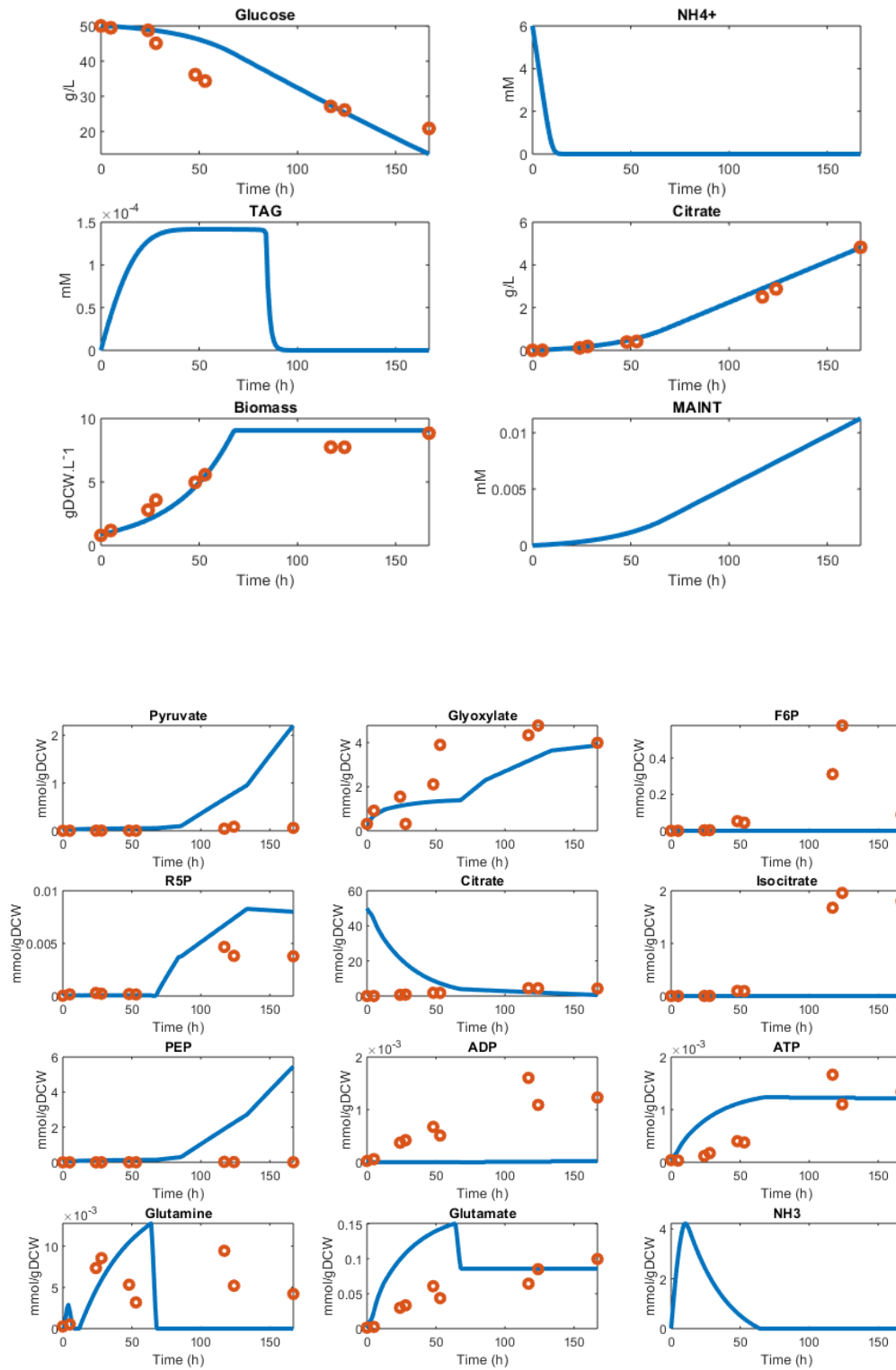


Figure 18 : Prédiction de la production de citrate par un modèle macroscopique du métabolisme de *Y. lipolytica*.

Conclusion

Les méthodes statiques comme FBA ou pseudo-dynamiques telle que dFBA permettent de décrire des flux à l'équilibre mais offrent aussi la possibilité d'optimiser la production de la biomasse ou des métabolites extracellulaires d'intérêt. Les méthodes cinétiques de modélisation par réduction d'un réseau à l'échelle du génome par gFBA ou par construction « à la main » d'un réseau macroscopique décrivent la cinétique de toutes les espèces qui constituent le réseau. La méthode de réduction du modèle peut constituer une solution à court terme car il a permis de décrire le phénomène d'overflow chez *Y. lipolytica* caractérisé par l'accumulation de lipides. Cela vient du fait que de nombreuses ressources (informatiques et humaines) sont nécessaires et que ces constructions ont une grande part de subjectivité, notamment dans l'intégration des contraintes des flux. Le modèle macroscopique semble être plus adapté à notre problématique afin d'intégrer des régulations enzymatiques connues de la littérature ou déterminées expérimentalement. Le modèle macroscopique, en l'état, permet des variations de concentrations extracellulaires proches des données expérimentales mais une meilleure description des dynamiques intracellulaires est nécessaire.

Références

- Alvarez-Vasquez, F., González-Alcón, C., and Torres, N.V. (2000). Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 82–108.
- Cloutier, M., Perrier, M., and Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2393–2404.
- Cloutier, M., Chen, J., De Dobbeleer, C., Perrier, M., and Jolicoeur, M. (2009). A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant Biotechnol. J.* 7, 939–951.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., and Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PLoS ONE* 9, e90832.
- Karr, J.R., Sanghvi, J.C., Macklin, D.N., Gutschow, M.V., Jacobs, J.M., Bolival, B., Assad-Garcia, N., Glass, J.I., and Covert, M.W. (2012). A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype. *Cell* 150, 389–401.
- Kerkhoven, E.J., Pomraning, K.R., Baker, S.E., and Nielsen, J. (2016). Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Npj Systems Biology and Applications* 2, 16005.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* 25, 244–263.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. (2003). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr. Microbiol.* 46, 398–402.
- Robitaille, J., Chen, J., and Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PLoS ONE* 10, e0136815.
- Robles-Rodríguez, C.E., Bideaux, C., Guillouet, S.E., Gorret, N., Cescut, J., Uribelarrea, J.-L., Molina-Jouve, C., Roux, G., and Aceves-Lara, C.A. (2017). Dynamic metabolic modeling of lipid accumulation and citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Computers & Chemical Engineering* 100, 139–152.
- Robles-Rodríguez, C.E., Muñoz-Tamayo, R., Bideaux, C., Gorret, N., Guillouet, S.E., Molina-Jouve, C., Roux, G., and Aceves-Lara, C.A. (2018). Modeling and optimization of lipid accumulation by *Yarrowia lipolytica* from glucose under nitrogen depletion conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 115, 1137–1151.
- Stanford, N.J., Lubitz, T., Smallbone, K., Klipp, E., Mendes, P., and Liebermeister, W. (2013). Systematic construction of kinetic models from genome-scale metabolic networks. *PLoS ONE* 8, e79195.

Stein, L.R., and Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23, 420–428.

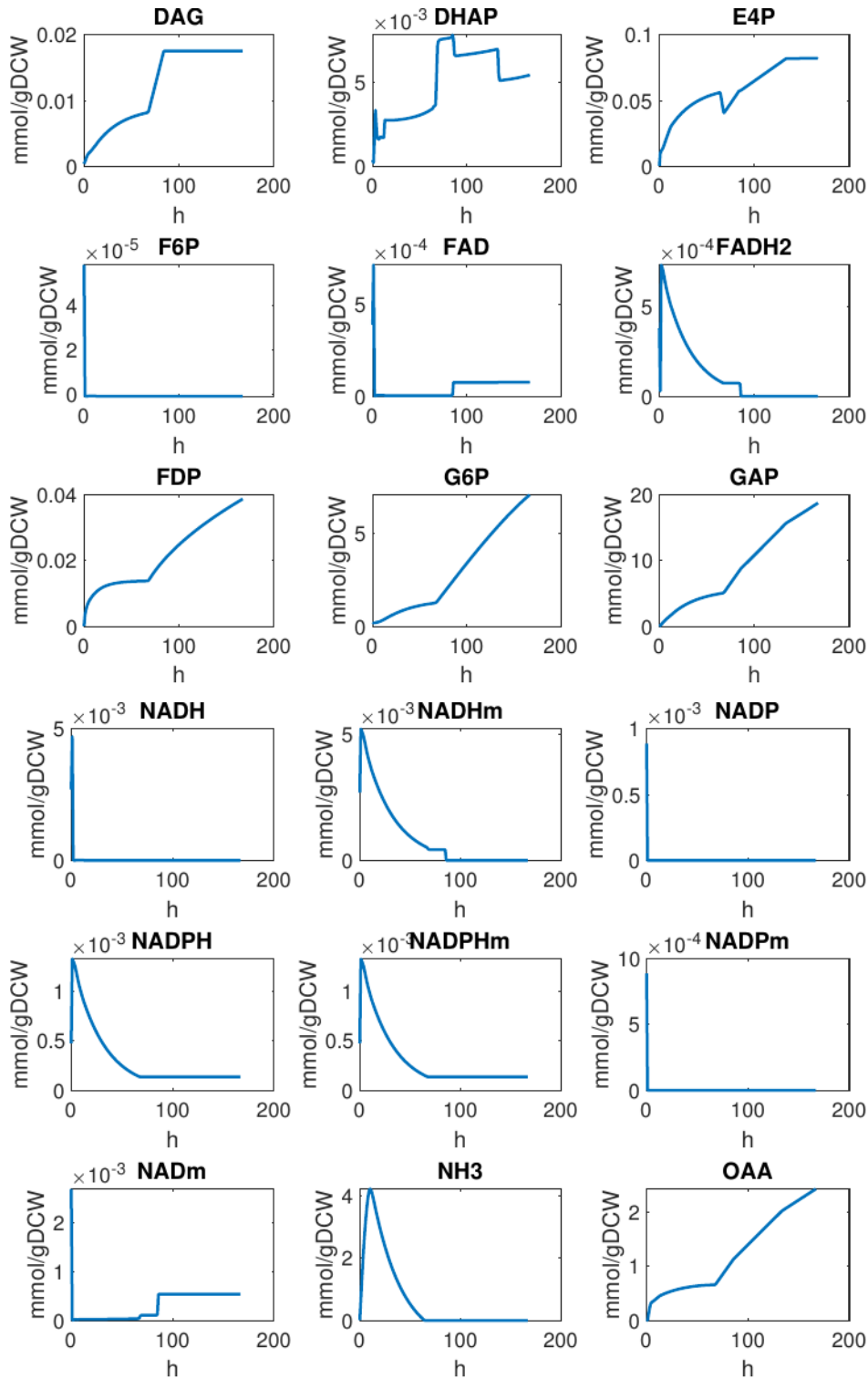
Torres, N.V. (1994). Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*: II. Sensitivity analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 112–118.

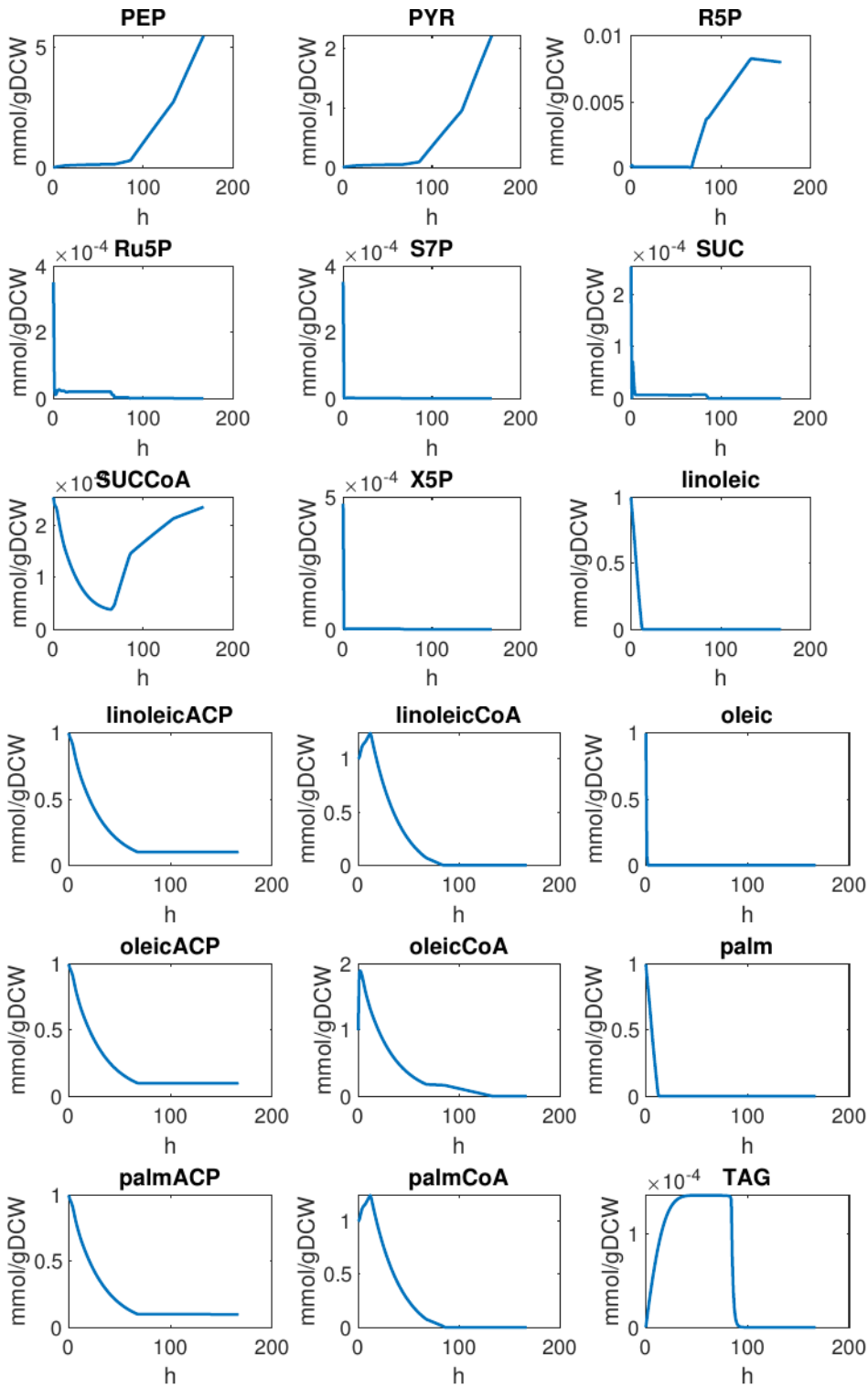
Torres, N.V., Voit, E.O., and González-Alcón, C. (1996). Optimization of nonlinear biotechnological processes with linear programming: Application to citric acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 247–258.

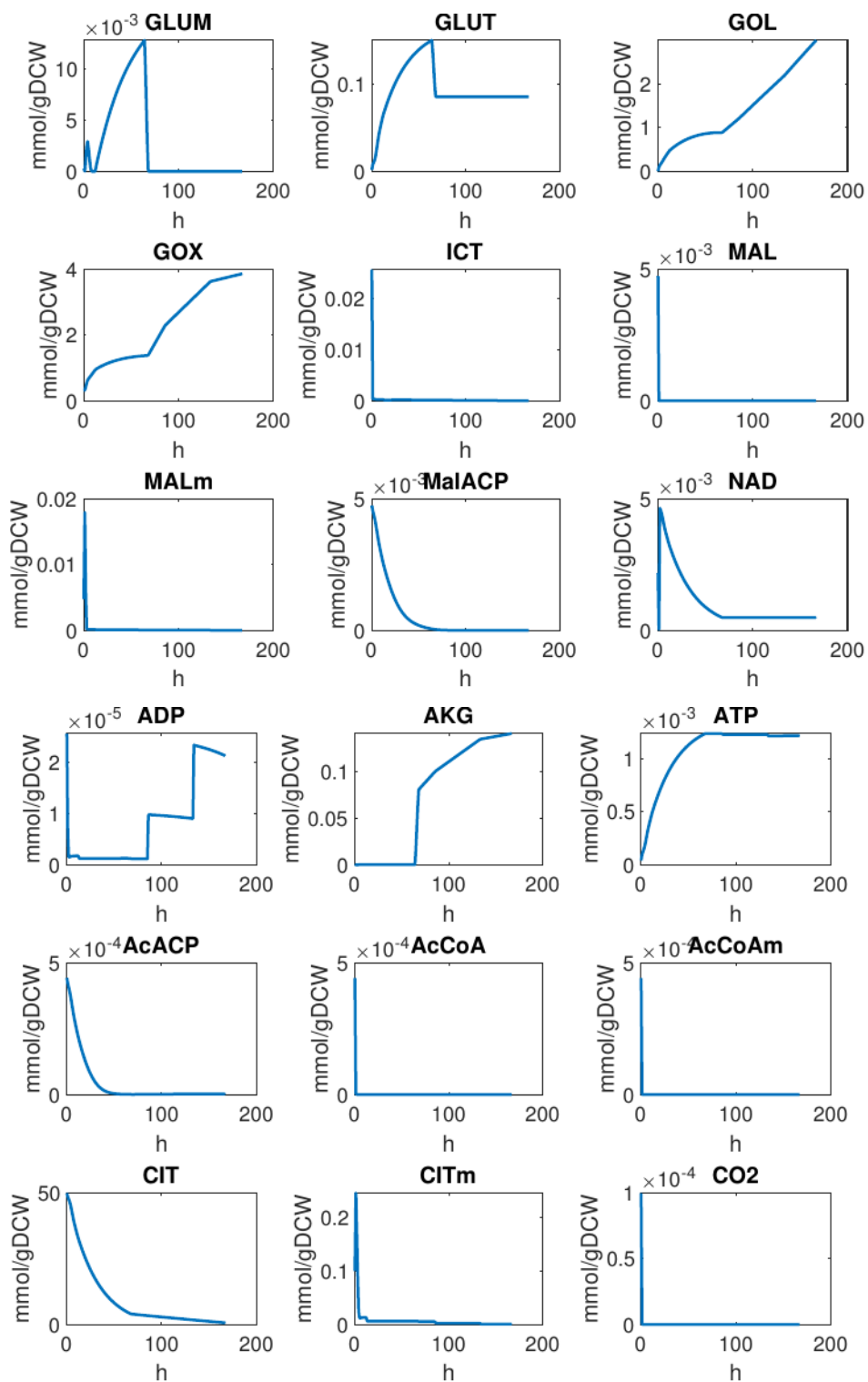
da Veiga Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Bigan, E., Pérès, S., Paulevé, L., Levy Nogueira, M., Steyaert, J.-M., and Schwartz, L. (2016). The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect. *Metabolites* 6.

Données supplémentaires

Simulations des concentrations des métabolites intracellulaires







Chapitre III

The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect

Résumé de l'article "The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect" da Veiga Moreira *et al.* (2016). *Metabolites*

Dans cet article de recherche, nous décrivons des résultats qui confirment certaines hypothèses émises par Otto H. Warburg, notamment sur la différence de profil métabolique entre les cellules saines et cancéreuses (cf. Chap. II.3.2). Cette démonstration est basée sur la caractérisation de paramètres physico-chimiques chez des cellules primaires saines et cancéreuses isolées du colon chez des patients, avec l'accord d'un comité éthique de l'hôpital de Téhéran. Pour chacune des deux populations cellulaires, les cellules ont été séparées par élutriation (séparation par centrifugation) puis collectées dans différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1/S/G2/M) en fonction de leurs tailles. Les paramètres étudiés sont le potentiel rédox des cellules par la quantification des espèces NAD(P)/NAD(P)H, l'état énergétique des cellules par le dosage d'ATP et le pH intracellulaire (pHi) qui pourrait être associé à l'activité métabolique globale de la cellule (cf. Chap. II.2).

Les résultats confirment les deux phénomènes majeurs associés aux cellules cancéreuses : l'activité métabolique y est plus prononcée par rapport aux cellules saines, ce qui se traduit par un pHi plus alcalin. En effet, les populations cancéreuses en G0 présentent, en moyenne, un pHi de $7,29 \pm 0,13$ alors que le pHi des cellules saines dans la même phase du cycle est de $6,87 \pm 0,10$. Nous avons aussi rapporté un rendement énergétique plus faible chez la population cancéreuse. Cela est caractérisé par une quantité d'ATP plus faible (2X moins importante en G0). Les ratios rédox NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ sont, respectivement, jusqu'à 5X et 10X plus élevés chez les cellules cancéreuses. Cela traduit aussi un flux glycolytique plus prononcé tel que hypothétisé par Warburg, même si la production de lactate dans le milieu de culture n'a pas été déterminée. En effet, un ratio NAD^+/NADH élevé est nécessaire pour le maintien de la glycolyse alors que la production du lactate assure le turnover du NAD^+ par la lactate déshydrogénase. De même pour le $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ qui conditionne l'entrée dans la voie des pentoses phosphates et génère le NADPH nécessaire pour la synthèse des acides gras et autres lipides membranaires.

Ces résultats ont été ensuite confirmés chez différentes lignées cellulaires humaines chez la souris. De plus, le potentiel de la membrane mitochondriale a été quantifié chez des lignées cellules saines et cancéreuses mais n'a pas pu être réalisé chez les cellules primaires. Les résultats montrent que le potentiel mitochondrial est significativement plus faible chez les lignées cancéreuses humaines et de souris. Ce potentiel mitochondrial plus faible chez les

lignées cancéreuses est aussi un marqueur d'un rendement énergétique (production d'ATP) plus faible alors même que le flux glycolytique est plus prononcé. Ce phénotype confirme donc les observations de Warburg et offre des pistes pour des interventions thérapeutiques.

Article

The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect

Jorgelindo da Veiga Moreira ^{1,*}, Minoou Hamraz ², Mohammad Abolhassani ³, Erwan Bigan ¹, Sabine Pérès ^{4,5}, Loïc Paulevé ⁴, Marcel Levy Nogueira ^{1,6}, Jean-Marc Steyaert ¹ and Laurent Schwartz ^{1,*}

¹ Laboratoire d'Informatique de l'Ecole Polytechnique—Unité Mixte de Recherche 7161, Ecole Polytechnique, Palaiseau 91128, France; bigan.erwan@orange.fr (E.B.); marcel.levy@psl.aphp.fr (M.L.N.); jean-marc.steyaert@polytechnique.edu (J.-M.S.)

² Imen Pharmed Iranian Company (IPI), Tehran 1514633711, Iran; mhamraz@ipiranian.com

³ Nosco Pharmaceuticals, Paris 75015, France; mabolhas@noscopharm.fr

⁴ Laboratoire de Recherche en Informatique (LRI), Université Paris-Sud, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8623, Orsay 91190, France; sabine.peres@lri.fr (S.P.); loic.pauleve@lri.fr (L.P.)

⁵ MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas 78350, France

⁶ Institute of Translational Neurosciences (IHU-A-Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière), Pitié Salpêtrière Hospital, Paris 75013, France

* Correspondence: daveiga@lix.polytechnique.fr (J.V.M.); laurent.schwartz@polytechnique.edu (L.S.); Tel.: +33-1-80-35-07-20 (J.V.M.); + 33-1-77-57-80-49 (L.S.)

Academic Editor: Peter Meikle

Received: 12 August 2016; Accepted: 27 September 2016; Published: 3 October 2016

Abstract: To better understand the energetic status of proliferating cells, we have measured the intracellular pH (pHi) and concentrations of key metabolites, such as adenosine triphosphate (ATP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) in normal and cancer cells, extracted from fresh human colon tissues. Cells were sorted by elutriation and segregated in different phases of the cell cycle (G0/G1/S/G2/M) in order to study their redox (NAD, NADP) and bioenergetic (ATP, pHi) status. Our results show that the average ATP concentration over the cell cycle is higher and the pHi is globally more acidic in normal proliferating cells. The NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH redox ratios are, respectively, five times and ten times higher in cancer cells compared to the normal cell population. These energetic differences in normal and cancer cells may explain the well-described mechanisms behind the Warburg effect. Oscillations in ATP concentration, pHi, NAD⁺/NADH, and NADP⁺/NADPH ratios over one cell cycle are reported and the hypothesis addressed. We also investigated the mitochondrial membrane potential (MMP) of human and mice normal and cancer cell lines. A drastic decrease of the MMP is reported in cancer cell lines compared to their normal counterparts. Altogether, these results strongly support the high throughput aerobic glycolysis, or Warburg effect, observed in cancer cells.

Keywords: redox oscillators; Warburg effect; cancer disease; mitochondria; central carbon metabolism

1. Introduction

The central carbon metabolism (CCM) is a metabolic blueprint shared by almost all living organisms. It consists of a complex series of enzymatic reactions that convert carbon sources (carbohydrates, proteins, lipids) into biomass and energy [1]. The core of the CCM is composed of glycolysis, the pentose phosphate pathway (PPP), the tricarboxylic acid cycle (TCA), and the fatty-acid pathway (Figure 1). The shift either from oxidative catabolism (energy production) to reductive anabolism (biomass synthesis), or from anabolism to catabolism, appears to be controlled by

bio-oscillators, playing the role of co-enzymes [2]. These bio-oscillators include reductive and oxidative (redox) couples, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+/NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), the universal energy carrier, adenosine triphosphate (ATP), the transmembrane potential (TMP), and, finally, the intracellular pH (pHi). The dynamics of these internal biological rhythms are shown to oscillate when eukaryotic cells enter proliferation [2–4]. These orchestrated oscillations ensure genome duplication and cell membrane synthesis prior to cell division [5,6].

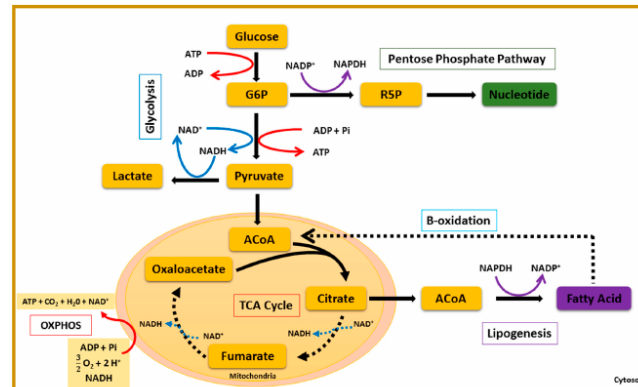


Figure 1. The central carbon metabolism (CCM). The CCM combines enzymatic reactions that convert carbon sources into biomass precursors. This figure shows the five main pathways forming the CCM: glycolysis, the pentose phosphate pathway, the tricarboxylic acid cycle (TCA), lipogenesis, and beta-oxidation. Two opposite metabolic demands are at the core of the CCM: anabolic reactions, which consist in biomass synthesis, and catabolic reactions, leading to the breakdown of macromolecules for energetic use. These two aspects of cell metabolism are managed by biochemical oscillators, including redox couples, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+/NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), and the universal energy carrier, adenosine triphosphate (ATP/ADP). Transitions in CCM are reported to depend on these bio-oscillators. The NAD^+/NADH ratio measures the glycolytic flux (glycolysis, PPP, and oxidative phosphorylation (OXPHOS)). A high $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio rewires glucose oxidation to the pentose phosphate pathway, whereas a low $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio triggers lipogenesis. The $\text{ATP}/(\text{ADP} + \text{Pi})$ ratio senses the metabolic state of the cell and may lead to metabolic switches in the CCM.

The eukaryotic cell cycle has been shown to be a redox cycle [7–10]. When resting cells are committed to division, it enters the first growth phase (G1). Then follows genome duplication in the S phase and the second growth phase (G2), prior to mitosis (M). As opposed to proliferating cells, differentiated cells have a basal oxidative metabolism. Pyruvate converted from glucose or acetyl-CoA obtained from beta-oxidation of fatty acids are degraded by the TCA cycle (Figure 1) [11]. The oxidative phosphorylation of acetyl-CoA into mitochondria yields large amounts of ATP and releases carbon dioxide and water as waste products [2]. Thus, contrary to differentiated cells, rapidly proliferating cells, such as stem cells or cancer cells, use the aerobic glycolysis for ATP synthesis, even in the presence of oxygen. This is known as the “Warburg effect”, in reference to the Nobel laureate Otto Heinrich Warburg who first reported the high glycolytic flux in proliferating tumors [12–14]. In G1 of the cell cycle, the shift from pyruvate to lactate may be conditioned by the NAD^+/NADH ratio and is thought to support the high glycolytic demand in cancer cells [5,12]. Thus, the Warburg effect may also be characterized by a high NAD^+/NADH ratio. In the S phase, the CCM may shift to the PPP, the main route to nucleotide synthesis [4,5]. High metabolic flux through the PPP

supplies enough NADPH to protect proliferating cells against oxidative stresses and triggers lipid synthesis in G2 [15–17]. Moreover, mitochondria activity is key to cell decision-making and cell cycle progression [18]. These organelles were first considered as a mere “powerhouse” of the eukaryotic cell, before the pioneering studies that deciphered their key role in such processes as cell development, cell survival, cell division, and cell death [18]. Regarding cell division, investigations support and highlight the idea of intertwined relationships between morphological changes in mitochondria and their signaling activity [18–20]. Subsequently, it has been demonstrated that energetic transitions occurring in the cell cycle are intrinsically related to mitochondrial ability to sense state parameters, such as pHi and the ATP/ADP ratio [21–23].

These measurements of pHi, ATP/ADP, and redox species are reported in several species, in different environmental conditions, but lack consistencies (pHi variations are contradictory [3,4,22]) and comprehensive overview of bio-oscillators variation (in yeast or human cancer cells [4,11,22]). Therefore, there is a need for a comprehensive analysis of changes in pHi, ATP/ADP, NAD^+/NADH , and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ during the proliferating cell cycle for healthy and cancerous human cells. Such analysis is a first step towards a holistic understanding of the coupling between electrochemistry and metabolism, and could ultimately lead to a better understanding of the principles operating current metabolic therapies and to identify new ones [24]. In this work, we studied the redox and energetic variations in freshly isolated normal and cancer cells extracted from human patients and controls ($n = 8$).

2. Results

Human normal and cancer cells have been extracted from their respective tissues and isolated in five populations by the method of elutriation. This segregation, based on cell density, resulted in suspensions of cells in G0, G1, G1/S transition, S and G2/M transition phase of the cell cycle. By applying fluorometric measurements in each cell suspension, both in the normal and cancerous population, we managed to quantify the amount of ATP, NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , as well as the intracellular pH (pHi). Figures 2 and 3 show experimental results obtained from eight patients ($n = 8$) for both the normal and the cancerous region of the colon.

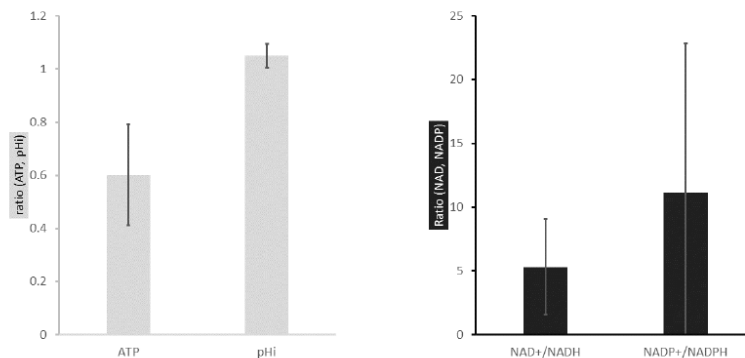


Figure 2. Comparison of the energetic status of normal and cancer cells. These histograms represent the average of ATP, pHi, NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ cancer/normal ratios over the cell cycle. Raw data for all experiments are reported in the Appendix Section. (A) In normal cells, the average ATP concentration over the cell cycle is higher compared to the cancer cell population (ratio = 0.60 ± 0.19). The intracellular pH (pHi) of cancer cells is slightly higher than normal cells (ratio = 1.05 ± 0.04); and (B) the redox ratios (NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) are five and ten time higher in cancer cells compared to the normal cell population (5.31 ± 3.76 and 11.15 ± 11.71 , respectively).

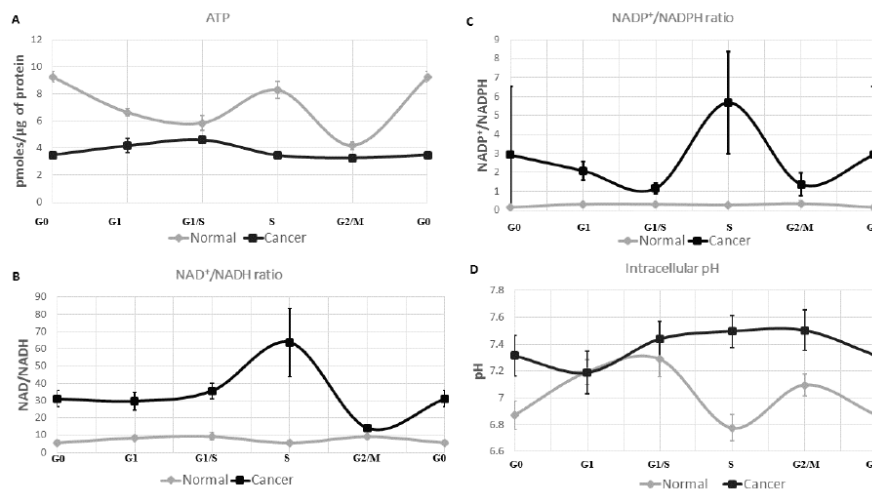


Figure 3. Redox signatures of normal and cancer cells during cell cycle progression. (A) In normal cells, the ATP concentration oscillates during the cell cycle: it is high in G0 (9.25 ± 0.40 pmoles/ μg of protein) and S (8.29 ± 0.62 pmoles/ μg of protein) and lower in G1/S (5.85 ± 0.57 pmoles/ μg of protein) and G2/M (4.18 ± 0.29 pmoles/ μg of protein). In cancer cells, ATP concentration is about twice lower in G0 (3.49 ± 0.25 pmoles/ μg of protein), slightly increases from G0 to G1/S (4.6 ± 0.19 pmoles/ μg of protein), and decreases from G1/S to G2/M (3.25 ± 0.11 pmoles/ μg of protein); (B) in normal cells, the NAD⁺/NADH ratio oscillates between 5 and 10. For the cancerous cell line, the ratio increases from G0 (31.03 ± 1.54) and reaches a maximum value of 55 in S. Then, it declines at the G2/M transition (14); (C) the NADP⁺/NADPH ratio slightly increases from G0 (0.13 ± 0.05) to G1 (0.32 ± 0.04) in the normal cell population and stays stable. For the cancer cell population, a major peak is observed in S (5.68 ± 2.68); and (D) the intracellular pH (pHi) of cancer cells is alkaline and globally more acidic for normal cells. It oscillates from G0 (pH = 6.87 ± 0.10) to G1/S (pH = 7.29 ± 0.13), and then shows a marked decrease in S (pH = 6.78 ± 0.10). The cancerous cell population loses the pHi drop in the S phase and is much more alkaline (pH = 7.50 ± 0.12).

2.1. ATP Concentration Is Reduced in Colon Cancer Cells

The average ATP concentration (averaging over the various cell cycle phases) is about twice lower in colon cancer cells than in normal cells (Figure 2). This low energetic state characterizing cancer cells is already known from the literature where Otto Warburg first reported that rapidly-proliferating cells preferentially use the aerobic glycolysis/fermentation for ATP synthesis instead of oxidative phosphorylation [12–14]. Nevertheless, much less is known about the ATP concentration at the scale of one cell cycle. Thus, we report an oscillatory ATP concentration through all phases of a normal cell cycle (Figure 3A). Its concentration is found to be higher in G0 (9.25 ± 0.40 pmoles/ μg of protein). Then, follows a decrease in G1 (6.63 ± 0.30 pmoles/ μg of protein), and reaches a value of 5.85 ± 0.57 pmoles/ μg of protein in G1/S. The ATP concentration increases from the G1/S transition to the S (8.29 ± 0.62 pmoles/ μg of protein) phase, prior to a drop at the G2/M transition (4.18 ± 0.29 pmoles/ μg of protein). In the colon cancer cell population the oscillatory phenotype of ATP concentration observed in their normal counterpart is lost. It slightly increases from G0 (3.49 ± 0.25 pmoles/ μg of protein) to G1/S (4.6 ± 0.19 pmoles/ μg of protein) and decreases through the S phase, until reaching a lower value in G2/M (3.25 ± 0.11 pmoles/ μg of protein). These results, reported at the scale of one cell cycle, may suggest a global shift in ATP turnover in the cancer cell

population compared to normal cells. Using the same method we also investigated the reductive and the oxidative (redox) status of the colonic normal and cancer cells.

2.2. Colon Cancer Cells Have a Reductive Energetic Status

The nicotinamide adenine dinucleotide redox couple (NAD^+/NADH) is a marker of catabolism, whereas its phosphorylated counterpart ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) is responsible for anabolism and antioxidant stress. Here, we aimed at describing the redox signature of the cancer cell population, compared to normal cells, both isolated from fresh human colon. These results show a divergent redox profile in cancer and normal cell populations. (Figures 2B and 3B,C). Figure 2B shows the average of NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ cancer/normal ratios for all phases of the cell cycle. NAD^+/NADH ratio is higher in the cancer cell population (mean ratio = 5.31 ± 3.76) (Figure 2B). Considering these redox species individually, we note that NAD^+ concentration is higher in cancer cells (Appendix Figure A1C), whereas its reductive counterpart has a lower concentration in the same cell population (Appendix Figure A1D). NAD^+/NADH ratio oscillates throughout the cell cycle in these normal colon cell populations (Figure 3B). In normal cells, the catabolic ratio (NAD^+/NADH) slightly increases from G0 (mean ratio = 5.59 ± 1.56) to the G1/S transition phase (mean ratio = 9.28 ± 2.54) prior to a drop in S (mean ratio = 5.44 ± 1.43), and another increasing phase in G2/M (mean ratio = 9.25 ± 1.09). The anabolic couple (NADP^+ and NADPH) quantification is also reported. The $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ profiling ratio over the cell cycle is similar to the NAD^+/NADH couple. The anabolic ratio is higher in cancer cells compared to the normal cell population (mean ratio = 11.15 ± 11.71) (Figure 2B). Thus, the cancer cell population shows anabolic ratio variations with more pronounced amplitudes (Figure 3C). It decreases from G0 (mean ratio = 2.91 ± 3.60) to G1 (mean ratio = 2.08 ± 0.48) and the G1/S transition phase (mean ratio = 1.16 ± 0.27). A major spike on the anabolic ratio is observed in S (mean ratio = 5.68 ± 2.68) followed by a second drop in G2/M (mean ratio 1.37 ± 0.60). An increased $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio in cancer cells compared to normal ones may be related to the increased demand for nucleotide synthesis, lipogenesis, or/and reduction in oxidative stress. This is consistent with higher NADP^+ and a decreased NADPH concentrations reported in cancer cells (Appendix Figure A1E,F). All taken together, these results are consistent with higher metabolic fluxes reported in the cancer population where a high NAD^+/NADH ratio may sustain the aerobic glycolysis and an elevated $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio would meet the anabolic demand for building blocks synthesis. Nevertheless, additional experiments, such as lactate quantification and oxidative stress measurements, are needed to fully confirm these assumptions.

2.3. The Intracellular pH of Cancer Cells Is Alkaline

In normal cell population, the pHi is slightly acidic, whereas the cancer cell population has an alkaline pHi (mean ratio = 1.05 ± 0.04) (Figure 2A). Thus, the pHi exhibits an oscillatory phenotype at the scale of one normal cell cycle, contrary to the cancer cell population where the pHi oscillation is reduced and plateaued at an alkaline value (Figure 3D). More precisely, normal cells have an acidic pHi in G0 (pH = 6.87 ± 0.10), which increases through G1 (pH = 7.19 ± 0.09) and G1/S G0 (pH = 7.29 ± 0.13). The intracellular pH drops in the S phase (pH = 6.78 ± 0.10). Then, it increases from the S phase to the G2/M transition (pH = 7.09 ± 0.08), prior to another drop during mitosis. These observations are in line with data from the literature [25,26].

2.4. Reduced Mitochondrial Membrane Potential in Immortal Cancer Cell Lines

Here, the goal was to depict possible correlations between alkaline pHi, low ATP concentration, the reductive metabolism (increased redox ratios), and lower mitochondria activity already hypothesized in cancer cells [13,14]. Indeed, mitochondria is often considered as the “powerhouse” of the cell since ATP is synthesized through the oxidative phosphorylation. Misregulations in this organelle may lead to cell death or metabolic diseases, such as cancer [12,19,22,27–29]. We did not manage to carry out

these experiments in colon cells for lack of fresh colon cancer cells from patients. Instead, we used well-known human and mouse cell lines. Results are reported in Appendix Figure A2A. What is clear from these results is the low mitochondrial membrane potential (MMP) reported in cancer cell lines compared to the normal primary cells. Thus, decreased MMP in cancer cells may explain the low ATP concentration observed in colon cancer cells, as well as in cancer cell lines.

3. Discussion

One of the main metabolic divergences between quiescent and proliferating cells is the pathway responsible for adenosine triphosphate (ATP) synthesis (Figure 1). In quiescent cells, ATP is synthesized during the oxidative phosphorylation (OXPHOS). Proliferating cells, such as stem cells, preferentially use the fermentative pathway for ATP synthesis in a “transient high throughput” manner, defined as the Warburg effect [13,14,25]. In the same manner as normal proliferating cells, cancer cells use the aerobic glycolysis (Warburg effect) for ATP synthesis in a “sustained high throughput” manner [30]. Here we hypothesized that the sustained fermentative character of cancer cell population may be correlated with shifts in redox potential and poor mitochondrial activity. As such, we quantified redox couples (NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) and ATP concentration at different phases of the cell cycle (G0, G1, G1/S, S, and G2/M) in normal and cancer colon cell populations. We also quantified the intracellular pH (pHi), which is a marker of high metabolic activity and measured the mitochondrial membrane potential (MMP) in the cell lines. These results bring a comprehensive understanding which needs additional study to fully support our hypothesis: we confirmed the general assumption of less effective ATP turnover in cancer cells. The redox ratios NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ found in cancer cells support an enhanced glycolytic demand for sustained cell proliferation. Although the high $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio in cancer cells is consistent with nucleotide demand for biomass synthesis, such a higher ratio may also imply a lower rate of synthesis for fatty acids, which are required for membrane synthesis. While a lower membrane synthesis may, at first sight, appear incompatible with a higher rate of biomass synthesis, such an incompatibility might actually be resolved by a change in cell shape. Moreover, both alkaline pHi and low mitochondrial membrane potential (MMP) in cancer cells may explain the Warburg effect. Different hypotheses could be addressed. Considering the generation of ATP by the movement of hydrogen ions across the inner mitochondrial membrane during cellular respiration, one would conclude that alkaline pHi may lead to a reduced ATP synthesis. Indeed, reduced oxidative phosphorylation and lower CO_2 release may lead to less cytosolic acidification. Figure 3 showed ATP concentration, NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratios, and pHi oscillation in normal and cancer colon cell populations ($n = 8$) throughout the cell cycle. ATP concentration is shown to be low in cancer cells compared to normal ones. On the contrary, the redox couple ratios (NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) are both very high in cancer cell populations. Indeed, a high catabolic ratio (NAD^+/NADH) showed in Figures 2B and 3B, especially in the S phase for the cancer cell population, which may explain a high glycolytic flux for building blocks synthesis [12]. Similarly, the anabolic ratio ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) is found to be high in cancer cells. Thus, lower ATP concentration in cancer cells, compared to normal cells and the hybrid metabolism (high catabolism and anabolism) materialized by both high NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratios, may explain the already reported metabolic advantage of cancer cells [31]. We also tried to capture the intracellular pH (pHi) dynamics in both normal and cancer colon cell population. Indeed, as described above, the pHi of normal proliferating cells is globally acidic, whereas it is alkaline in cancer cells. Moreover, the pHi exhibits an oscillatory phenotype in normal cells and is flat in cancer cells. In order to explain these oscillations, additional experiments in pHi variation and a dynamic model of the central carbon metabolism is needed. Nevertheless, evidence has been reported [30], and recent findings highlighted, the relationship between pHi, chromatin remodeling, and the transcriptional activity in proliferating cells. Indeed, McBrien (2013), showed that pHi regulates histone acetylation which, in turn, conditions gene transcription [32–34]. He showed that alkaline pHi induces histone acetylation, whereas acidic pHi is linked to a deacetylated histone

and, by extension, to a silenced transcription. Interestingly, deacetylation of histone is known to be a NAD-dependent mechanism [35]. Thus, it is likely that pHi and NAD⁺ regulate cell transcriptional activity and cell fate decision. Puysségur (1985) showed the existence of a pHi threshold of 7.2, which conditions entry into the S phase. Moreover, Aerts (1985) demonstrated that an increase in pHi results in both increased protein synthesis and DNA replication [26]. He reported the optimal protein and DNA synthesis being correlated with an alkaline pHi of 7.4. Busa [36] showed that pHi oscillations are master regulators of the embryonic cells' decision-making to stay in dormancy or to enter the cell cycle [36]. He reported that an acidic pHi is linked to dormancy, whereas an alkaline pHi is a characteristic of rapidly proliferating cells—a hallmark of cancerous tissues. All of these data taken together, we propose a swaddling between the metabolic blueprint of the central carbon metabolism (CCM) (Figure 1) and the energetic demand for cell proliferation. These bio-oscillators, including ATP, pHi, and redox couples (NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH) seem to coordinate switches in the CCM during normal cell proliferation. Misregulations on these balances could have a drastic impact on the integrity of the eukaryotic cell cycle, which could result in uncontrolled growth, such as in cancer. Results obtained with different normal and cancer cell lines reported lower MMP in cancer cells compared to normal cells (Appendix Figure A1A). To our knowledge, this is the first time experimental results have characterized the redox status of cancer cells by considering oscillations in the central carbon metabolism, where the energetic markers (ATP, pHi, and TMP) and, more importantly, the redox species (NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH), may explain the Warburg effect mechanisms.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Suspension Preparation and Centrifugal Elutriation

Normal and cancerous segments of 12 to 18 cm of the upper colon from eight 57–62 year-old female patients with tumors (adenocarcinoma) were obtained from the internal ward of the gastroenterology-surgical unit at the Teheran Medical Sciences University Imam Khomeini Hospital in Iran (Nosco Pharmaceuticals' partnership, Paris, France). The epithelial and intraepithelial lymphocytes (IEL) were detached, as described previously [37]. The normal and cancerous colon segments from each patient were quickly made into a loop, inverted, and then incubated in a saline solution with 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 4 °C, while shaking gently to dislodge the colon crypts. The isolated crypts were then collected and incubated for 30 min at 37 °C in phosphate-buffered saline (PBS) solution without calcium containing 10% trypsin-EDTA (Gibco-Life Technologies, Cergy Pontoise, France). The cells were used for fresh culture. The isolated cell suspension of the colon epithelium (colonocytes) was distributed into 15-mL Falcon tubes containing 3 mL of cold fetal calf serum (Eurobio, Montpellier, France) and centrifuged for 5 min at 750 rpm. Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solutions (70% and 44%) were prepared for the isolation of human IEL and enterocytes. Up to 40 million epithelial cell-IEL suspensions were loaded per 15-mL tube by resuspending with 8 mL of 44% isotonic Percoll. This cell suspension was underplayed with 4 mL 70% isotonic Percoll. The gradients were centrifuged at 1500 rpm for 20 min (without breaks) at room temperature. Upon centrifugation, cells were collected in five fractions. Isolated cells of the epithelial cell layer of human colonocytes were centrifuged in a 50-mL Falcon tube for 5 min at 750 rpm and resuspended in 50 mL of MEM-alpha modification with L-glutamine medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After passing through the double chamber, the cell sample was transferred to the elutriation chamber with the elutriation buffer at a flow rate of 10 mL/min. A Beckmann Coulter centrifuge (Villepinte, France, model J-6M) with two JE-6B and E-10M rotors containing the 40 and 50-mL elutriation chamber and a Masterflex L/S digital pump (Cole-Parmer Instrument Co., Barrington, IL, USA) was used. Before each elutriation run, 200 mL of 70% ethanol was run through the elutriation chamber at about 60 mL/min (washing flow rate) to sterilize the system. This was sequentially followed by a wash with 500 mL of water, with 500 mL of PBS at approximately 60 mL/min and 2000 rpm to check for leaks and bubbles in the system. The loading/washing buffers

are contained in the buffer reservoir connected to the Masterflex pump via a T-valve. After a pressure check, the fluid is reversed into a bubble chamber to avoid air bubbles in the rotor. Subsequently, the sample with the cell suspension and the elutriation buffer was forced into the elutriation chamber.

The separation of the cell suspension in the elutriation chamber was controlled virtually through the viewing point in the rotor. During the loading phase platelets and contaminating erythrocytes were already eluted from the elutriation chamber (fraction 1). Once all the cells were loaded and accumulated in the elutriation chamber (after approximately 10 min), the flow rate was increased to 20 mL/min at a constant rotor speed of 2000 rpm. The elutriated lymphoid cells were collected (fraction 2). Thereafter, the flow rate was increased to 40 mL/min (at a constant rotor speed of 2000 rpm) to elutriate the epithelial cell fraction (fraction 3, in three tubes of 45 mL each). At the end of the procedure, we obtained about 500 million epithelial cells that must be resuspended in 4 L of the medium. The median cell volumes for G1, S, and G2/M cells were respectively 620, 950, and 1260 μm^3 and the corresponding rotor speeds (E-10M rotor containing the 50-mL elutriation chamber) for cell separation were 1160–1050 rpm, 1000–950 rpm, and 900–850 rpm, respectively. We started centrifugation at 2000 rpm and gradually reduced the speed against a 40 mL/min force of injection. Prolonged centrifugation permits separation of cells from these three categories and we collected five fractions of 12–15 million cells. For this study, informed consent was obtained from all subjects. All of the methods involving human subjects were performed in accordance with the standard practice procedures, regulations, and guidance, and were approved by the Teheran Imam Khomeini Hospital.

4.2. Fluorescence and Luminescence Measurements

All fluorescence and luminescence measurements have been made using a NOVOstar multifunctional microplate reader from Isogen Life Science (Utrecht, The Netherlands) and were analyzed using BMG Labtech software V1.30 R9 (Offenburg, Germany).

4.3. pHi Measurement

Intracellular calibration of the fluorescence response to total cytosolic pH indicators was performed using K^+/H^+ ionophore nigericin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), which causes equilibration of intracellular and extracellular pH in the presence of a depolarizing concentration of extracellular K^+ . After dissolving nigericin in 354 μL anhydrous Dimethyl Sulfoxide (DMSO) to make a 20 mM solution, it was mixed with 100 μL of Valinomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), used as an ionophore, to make a 1000 \times stock solution (10 mM each) for cell loading dye components. For cell acidification, we used the $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (20 mmol/L) prepulse technique. We used the Cell Meter Fluorometric Intracellular pH (pHi) Assay KitTM (AAT Bioquest[®], Sunnyvale, CA, USA). Cells were dispatched overnight in MEM alpha medium at 80,000 cells/well/100 μL for a 96-well plate. Stock solutions were made and the pH assay was run for 20 min by monitoring the fluorescence at Ex/Em = 490/535 nm (cut-off at 515 nm).

4.4. Reduced Mitochondrial Membrane Potential in Immortal Cancer Cell Lines

In all assays, we loaded the wells with 200,000 cells and the results were normalized using total protein concentrations in eight independent experiments ($n = 8$) corresponding to eight patients. All procedures followed the kit instructions: ENLITEN[®] ATP Assay System (Promega FF2000; Charbonnières, France) for ATP quantification, NADP⁺/NADPH and NAD⁺/NADH assays were run using the NADP/NADPH-Glo Bioluminescent Assay kit (Promega G9082) and the NAD/NADH-Glo Bioluminescent Assay kit (Promega G9072), respectively. The assay of total intracellular (cytosol and organelles) ATP quantification, luciferase is used as the catalyzing enzyme of the ATP reaction with D-Luciferin. ATP being the limiting component of the reaction, the intensity of the emitted light is proportional to the amount of ATP. ATP extraction from cells is primordial and each step must limit ATP degradation. Briefly, ATP extraction is carried out with trichloroacetic acid reagent which releases ATP from the cell population and prevents ATP degradation by potential enzymes. After

addition of the enzyme reagent to the intracellular extract, light emission is detected by a luminometer at 560 nm. The assay of total intracellular (cytosol and organelles) NAD(P) and NAD(P)H were performed individually following the Promega protocol. For both couples, cells are lysed with dodecyltrimethyl ammonium bromide (DTAB) and treated to neutralize their counterparts. To measure the oxidized forms (NAD⁺ and NADP⁺) the extract is treated with 25 µL of 0.4 N HCl and heated at 60 °C for 15 min. Then follows a 10 min incubation at room temperature and the addition of 25 µL of Trizma[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) base. NAD⁺ and NADP⁺ are measured using a NAD/NADH-Glo[™] (Charbonnières, France) assay and NADP/NADPH-Glo[™] assay, respectively. To quantify the reduced forms (NADH and NADPH), the extract is incubated at 60 °C for 15 min and then another 10 min incubation at room temperature. Fifty microliters of HCl/Trizma[®] solution is added to the extract. Similarly to the oxidized forms, NADH and NADPH are measured using a NAD/NADH-Glo[™] assay and a NADP/NADPH-Glo[™] assay, respectively. The specificity of each assay (NAD or NADP) is related to the cycling enzymes used. In the presence of each species, a reductase reduces a proluciferin reductase to luciferin. The intensity of light detected by a luminometer is proportional to the amount of each metabolite.

5. Conclusions

The metabolic description of the cancer phenotype introduced by Otto Warburg has been supported by numerous studies focusing on the fermentative aspect of it. Far fewer studies have examined the reductive and oxidative status of cancer cells in order to explain their metabolic reprogramming and the resulting hybrid metabolism where catabolism and anabolism occur at the same time. Consequently, we reported low ATP concentration, high NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH ratios, and low mitochondrial membrane potential in cancer cells, compared to normal proliferating cells. These results give new perspectives on aerobic glycolysis, or the Warburg effect. Therapies should focus on improving the oxidative phosphorylation in cancer cells. Drugs such as dichloroacetate [38,39], hydroxycitrate, and lipoic acid [24,40] have been used to increase mitochondrial yield for ATP and decrease cancer growth in rodents and humans.

Acknowledgments: We especially thank Philippe Icard and Jean-Yves Trosset and Olivier Lafitte for interesting discussions and suggestions for this article. We deeply thank “Association Cancer & Métabolisme” and Bertrand Halfé for their support.

Author Contributions: Mohammad Abolhassani, Jorgelindo da Veiga Moreira and Laurent Schwartz equally contributed to this work. They planned the experiments with Erwan Bigan and wrote the manuscript. Mino Hamraz carried out some experiments. Jean-Marc Steyaert, Sabine Pérès, Erwan Bigan, Loïc Paulevé and Marcel Levy Nogueir participated in discussing the different results and provided edition and critical review. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix

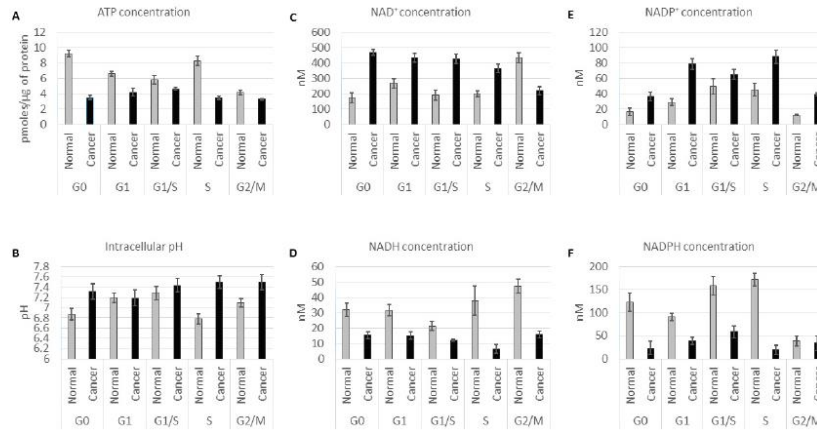


Figure A1. ATP, intracellular pH (pHi) and redox (NAD/NADH, NADP⁺/NADPH) concentrations and variations throughout colon normal and cancer cell cycle.

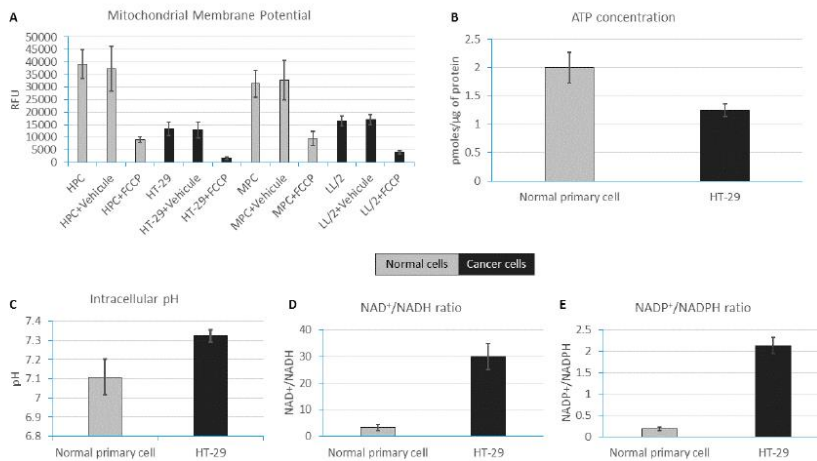


Figure A2. MMP, ATP, pHi and redox species concentrations in normal and cancer cell lines. (A) MMP are measured in human and mouse normal and cancer cell lines. FCCP is a compound that carries protons across the IMM and dissipates the electrochemical gradient (membrane potential). In order to maintain the membrane potential, the mitochondria need to increase the flow of electrons and thus oxygen consumption. Optimizing the concentration of the uncoupler (FCCP) reveals the maximal respiration for the sample; (B) The ATP concentration is lower in HT-29 compared to normal primary cells; (C) The intracellular pH (pHi) is alkaline in HT-29; (D) The NAD⁺/NADH ratio is higher in HT-29 cancerous line compared to normal primary cells; (E) The NADP⁺/NADPH ratio is higher in HT-29 cancerous line. Abbreviations: MMP (mitochondrial membrane potential); FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine); IMM (internal mitochondrial membrane); HPC (Hematopoietic progenitor cells), LL/2 (mouse Lewis lung cancer cell line); MPC (mouse normal pheochromocytoma cell line).

References

1. Noor, E.; Eden, E.; Milo, R.; Alon, U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 809–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Da Veiga Moreira, J.; Peres, S.; Steyaert, J.-M.; Bigan, E.; Paulevé, L.; Nogueira, M.L.; Schwartz, L. Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theor. Biol. Med. Model.* **2015**, *12*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tyson, J.J. Biochemical oscillations. In *Computational Cell Biology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2002; pp. 230–260.
4. Yu, F.X.; Dai, R.P.; Goh, S.R.; Zheng, L.; Luo, Y. Logic of a mammalian metabolic cycle: An oscillated NAD⁺/NADH redox signaling regulates coordinated histone expression and S-phase progression. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 773–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Diaz-Moralli, S.; Tarrado-Castellarnau, M.; Miranda, A.; Cascante, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 255–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Norbury, C.; Nurse, P. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *6*, 441–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nurse, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **2000**, *100*, 71–78. [[CrossRef](#)]
8. Burhans, W.C.; Heintz, N.H. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *4*, 1282–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Chiu, J.; Dawes, W. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **2012**, *20*, 592–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Menon, S.G.; Goswami, P.C. A redox cycle within the cell cycle: Ring in the old with the new. *Oncogene* **2007**, *26*, 1101–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sarsour, E.H.; Kumar, M.G.; Chaudhuri, L.; Kalen, A.L.; Goswami, P.C. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2985–3011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. DeBerardinis, R.J.; Lum, J.J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C.B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **2008**, *7*, 11–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Warburg, O. The metabolism of carcinoma cells. *J. Cancer Res.* **1925**, *9*, 148–163. [[CrossRef](#)]
14. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fabregat, I.; Vitorica, J.; Satrustegui, J.; Machado, A. The pentose phosphate cycle is regulated by NADPH/NADP ratio in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *236*, 110–118. [[CrossRef](#)]
16. Fabregat, I.; Revilla, E.; Machado, A. Short-term control of the pentose phosphate cycle by insulin could be modulated by the NADPH/NADP ratio in rat adipocytes and hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *146*, 920–925. [[CrossRef](#)]
17. Revilla, E.; Fabregat, I.; Santa-María, C.; Machado, A. The NADPH-producing pathways (pentose phosphate and malic enzyme) are regulated by the NADPH consumption in rat mammary gland. *Biochem. Int.* **1987**, *14*, 957–962. [[PubMed](#)]
18. McBride, H.M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: More than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 551–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Scalettar, B.A.; Abney, J.R.; Hackenbrock, C.R. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8057–8061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hackenbrock, C.R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* **1968**, *37*, 345–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mitra, K.; Wunder, C.; Roysam, B.; Lin, G.; Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11960–11965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Christen, R.; Schackmann, R.W.; Shapiro, B.M. Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5392–5399. [[PubMed](#)]
23. Jones, R.G.; Plas, D.R.; Kubek, S.; Buzzai, M.; Mu, J.; Xu, Y.; Birnbaum, M.J.; Thompson, C.B. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 283–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Schwartz, L.; Buhler, L.; Icard, P.; Lincet, H.; Steyaert, J.M. Metabolic treatment of cancer: Intermediate results of a prospective case series. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 973–980. [[PubMed](#)]
25. Pouyssegur, J.; Franchi, A.; L'Allemain, G.; Paris, S. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett.* **1985**, *190*, 115–119. [[CrossRef](#)]
26. Aerts, R.J.; Durston, A.J.; Moolenaar, W.H. Cytoplasmic pH and the regulation of the Dictyostelium cell cycle. *Cell* **1985**, *43*, 653–657. [[CrossRef](#)]
27. Finkel, T.; Hwang, P.M. The Krebs cycle meets the cell cycle: Mitochondria and the G1–S transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11825–11826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Westrate, L.M.; Sayfie, A.D.; Burgenske, D.M.; MacKeigan, J.P. Persistent mitochondrial hyperfusion promotes G2/M accumulation and caspase-dependent cell death. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Toyama, E.Q.; Herzig, S.; Courchet, J.; Lewis, T.L., Jr.; Losón, O.C.; Hellberg, K.; Young, N.P.; Chen, H.; Polleux, F.; Chan, D.C.; et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* **2016**, *351*, 275–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zhang, S.; Yang, C.; Yang, Z.; Zhang, D.; Ma, X.; Mills, G.; Liu, Z. Homeostasis of redox status derived from glucose metabolic pathway could be the key to understanding the Warburg effect. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 928–944. [[PubMed](#)]
31. Israël, M.; Schwartz, L. The metabolic advantage of tumor cells. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McBrian, M.A.; Behbahan, I.S.; Ferrari, R.; Su, T.; Huang, T.W.; Li, K.; Hong, C.S.; Christofk, H.R.; Vogelauer, M.; Seligson, D.B.; et al. Histone acetylation regulates intracellular pH. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 310–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kurdistani, S.K. Chromatin: A capacitor of acetate for integrated regulation of gene expression and cell physiology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *26*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kurdistani, S.K.; Grunstein, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 276–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Imai, S.I.; Armstrong, C.M.; Kaeberlein, M.; Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **2000**, *403*, 795–800. [[PubMed](#)]
36. Busa, W.B.; Nuccitelli, R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am. J. Physiol.* **1984**, *246*, 409–438.
37. Abolhassani, M.; Aloulou, N.; Chaumette, M.T.; Aparicio, T.; Martín-García, N.; Mansour, H.; Le Gouvello, S.; Delchier, J.C.; Sobhani, I. Leptin receptor-related immune response in colorectal tumors: The role of colonocytes and interleukin-8. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9423–9432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Michelakis, E.D.; Abdulkarim, B. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kinnaird, A.; Michelakis, E. 297 Dichloroacetate is a novel therapy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **2012**, *187*, e120–e121. [[CrossRef](#)]
40. Kafara, P.; Icard, P.; Guillamin, M.; Schwartz, L.; Lincet, H. Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-x L and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. *J. Ovarian Res.* **2015**, *8*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre IV

Metabolic therapies inhibit tumor growth *in vivo* and *in silico*

Résumé de l'article "Metabolic therapies inhibit tumor growth *in vivo* and *in silico*" da Veiga Moreira *et al.* (2019). *Scientific Reports*

Dans le chapitre précédent nous avons présenté des résultats en concordance avec les hypothèses de Warburg sur le caractère fermentaire du métabolisme des cellules cancéreuses comparées aux cellules saines qui, elles, privilégient l'oxydation phosphorylative (OxPhos) pour la production d'énergie. Des pistes d'interventions thérapeutiques ont été proposées afin d'inverser le phénotype cancéreux au profil de l'OxPhos.

Dans cet article, nous présentons des résultats de recherche sur des souris auxquelles des tumeurs ont été greffées et soumises à des traitements métaboliques pendant 59 jours. Les molécules utilisées sont bien connues dans la pharmacopée mondiale et utilisées dans notre travail comme inhibiteurs ou activateurs des enzymes du métabolisme central du carbone (MCC). Il s'agit de l'acide α -lipoïque et de l'hydroxycitrate, tous deux utilisés comme compléments alimentaires et activateur de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de l'ATP-citrate lyase (ACL), respectivement, la metformine est un glucophage utilisée dans le diabète de type II et activateur du complexe I et enfin le diclofénac qui est un anti-inflammatoire et inhibiteur de la lactate déshydrogénase (LDH) et du transporteur du monocarboxylate (MCT1). Un groupe « contrôle » de souris a été traité au cisplatine, un agent chimio-thérapeutique classique.

Les résultats montrent que la combinaison de ces quatre molécules a un effet inhibiteur sur la croissance de la tumeur implantée aux souris. En effet, lorsque les molécules sont utilisées séparément, elles ne montrent pas d'effets majeurs comparés à la chimiothérapie. Cependant lorsque la metformine est appliquée à haute dose en complément de l'acide α -lipoïque et de l'hydroxycitrate, la croissance de la tumeur est nettement ralentie puis inhibée à environ 50 jours de suivi (cf. Fig. 2b de l'article). L'inhibition est encore plus marquée lorsque le diclofénac à haute dose est ajouté à la thérapie (cf. Fig. 2e de l'article).

Un modèle cinétique du MCC a été développé pour simuler la croissance de la tumeur et prédire l'effet des molécules précédentes sur les flux énergétiques intracellulaires. Ce modèle comprend des voies métaboliques réduites et simplifiées du métabolisme des cellules cancéreuses et parvient à simuler la croissance de la tumeur mais aussi l'effet inhibiteur de la thérapie métabolique obtenu expérimentalement (cf. Fig. 4 de l'article). Les simulations montrent une inversion de l'effet Warburg sous l'action des molécules. Cela est mise en évidence par un flux net de re-consommation du lactate sanguin via la LDH et une augmentation

de la respiration mitochondriale (cf. Fig. 5 de l'article), un phenotype caractéristique des cellules saines.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Metabolic therapies inhibit tumor growth *in vivo* and *in silico*

Jorgelindo da Veiga Moreira¹, Mino Hamraz⁴, Mohammad Abolhassani⁵, Laurent Schwartz⁶, Mario Jolicœur¹ & Sabine Peres^{2,3}

Received: 18 July 2018
Accepted: 9 January 2019
Published online: 28 February 2019

In the recent years, cancer research succeeded with sensitive detection methods, targeted drug delivery systems, and the identification of a large set of genes differently expressed. However, although most therapies are still based on antimitotic agents, which are causing wide secondary effects, there is an increasing interest for metabolic therapies that can minimize side effects. In the early 20th century, Otto Warburg revealed that cancer cells rely on the cytoplasmic fermentation of glucose to lactic acid for energy synthesis (called "Warburg effect"). Our investigations aim to reverse this effect in reprogramming cancer cells' metabolism. In this work, we present a metabolic therapy specifically targeting the activity of specific enzymes of central carbon metabolism, combining the METABLOC bi-therapeutic drugs combination (Alpha Lipoic Acid and Hydroxycitrate) to Metformin and Diclofenac, for treating tumors implanted in mice. Furthermore, a dynamic metabolic model describing central carbon metabolism as well as fluxes targeted by the drugs allowed to simulate tumors progression in both treated and non-treated mice, in addition to draw hypotheses on the effects of the drugs on tumor cells metabolism. Our model predicts metabolic therapies-induced reversed Warburg effect on tumor cells.

Is cancer a genetic disease or a metabolic alteration? This issue has been subject to debates in the history of cancer^{1,2}. The genomic hypothesis of cancer originally raised with the discovery of a proto-oncogene tyrosine-protein kinase (Src) responsible of cancer in chicken. J. Michael Bishop and Harold E. Varmus, two Nobel Prize winners (1989) discovered in 1979 that mutations in *src* gene in normal chickens can lead to cancer³. Then, the genomic area of cancer reached its peak with the complet sequencing of the human genome by the International Human Genome Sequencing Consortium in 2001⁴. This has opened new markets for the pharmaceutical industry while defining new approaches in cancer therapy. For instance synthetic drugs such as Cisplatin and 5-Fluorouracil were introduced and are now part of the chemotherapeutic regimen. However, the limited success of these chemotherapeutic agents opened avenues for new strategies. New thoughts wave has emerged with a disruptive synthetic review aiming at redefining "The hallmarks of Cancer" and the common rules that govern the reprogramming of normal cells into malignant cancers⁵. Hanahan and Weinberg described common molecular machinery involved in regulating cell proliferation, differentiation and death. Indeed, dysfunctions on the internal "machine" or on its environment lead to the same deleterious phenotype: "sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, replicative immortality, sustained angiogenesis, and activating invasion and metastasis". More recently, the same authors proposed an updated version of the previous review where they added "two emerging hallmarks", including "reprogramming of energy metabolism and evading immune destruction"⁶. These new concepts have been the subject of numerous studies these last years⁷, including those from our research group⁸⁻¹¹.

To the question of whether cancer is a genetic disease or a metabolic alteration, hypothesis enabled explaining how cancer cells' metabolic reprogramming confer them an advantage from normal cells¹²⁻¹⁴. Our studies among others contributed rehabilitating past studies from the german Nobel Prize winner, Otto Warburg, who introduced the idea of metabolic alteration in cancer cells¹⁵. In his seminal article, Warburg (1956) presented the concepts of "uncoupling of respiration" and "aerobic glycolysis" occurring in cancer cells, to explain that cancer cells rely on the cytoplasmic fermentation of glucose to lactic acid for energy (ATP) synthesis rather than the oxidative phosphorylation¹⁶. Otto Warburg explained this observation as a phenotypic expression of deleterious mitochondria.

¹Research Laboratory in Applied Metabolic Engineering, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada. ²LRI, Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405, Orsay, France. ³MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France. ⁴Institut Cochin, Université Paris- Descartes, 75014, Paris, France. ⁵Nosco Pharmaceuticals, 75015, Paris, France. ⁶Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, 149 avenue Victoria, 75004, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P. (email: speres@lri.fr)

This characteristic of cancerous cells, labeled as the Warburg effect, has been the subject of extensive investigations the past years¹⁷. The Warburg effect confers a metabolic advantage to the cancerous tissue compared to normal somatic cells. This has been described as a consequence of the hybrid aspect of cancer cells metabolism where anabolism and catabolism occur simultaneously¹⁸. Carbon substrates are catabolized and intermediate compounds used as primary source for building blocks synthesis (lipids, proteins and nucleic acids), essential for cell growth^{18–20}. This hybrid metabolism explains why targeting one pathway with a chemotherapeutic agent is barely enough to stop tumor growth. Indeed, metabolic and epigenetic reprogramming of cancer cells confer a metabolic plasticity in their central carbon metabolism (CCM), which could explain their acquired resistance to current chemotherapies.

To this end, an interesting approach would be to target the CCM using metabolic drugs known to inhibit specific enzymes. Among enzymes of the CCM, both pyruvate dehydrogenase (PDH) and ATP citrate lyase (ACL) play key role in metabolic reprogramming of cancer cells¹⁸. PDH enzymatic complex converts pyruvate to acetyl-CoA and fuels the tricarboxylic acid cycle in normal cells. In cancer cells, PDH has been shown to be inhibited whereas ACL is overexpressed. ATP citrate lyase converts cytoplasmic citrate to oxaloacetate and acetyl-CoA, a precursor for lipid synthesis. Other key enzymes playing pivotal role on cancer metabolism are lactate dehydrogenase (LDH) and enzymes involved on the electron transfer chain (ETC) reactions. Indeed, metabolic therapies targeting these enzymatic reactions involved in carbon resources fermentation could limit their uptake by the tumor in order to vanish the Warburg phenotype.

We used Alpha Lipoic Acid (ALA) and Hydroxycitrate (HCA), two old drugs from the pharmacopoeia targeting PDH and ACL, respectively. Interestingly, we managed to show that combination of ALA and HCA deeply inhibits cultures of three cancer cell lines (MBT-2 bladder carcinoma, B16-F10 melanoma and LL/2 lung carcinoma)²¹. These results agree with that from Hatzivassiliou and colleagues who reported the inhibition of cancer cells growth when using specific silencing RNA (siRNA) to vanish ACL protein expression²². Similarly, a study from Bonnet and colleagues (2006) demonstrated the efficacy of a small molecule, Dichloroacetate, in restoring PDH activity in cancer cells²³. Taken together, these experimental results show the potential of targeting enzymes involved in programming the Warburg effect. These therapeutic approaches show a similar efficacy as for conventional therapies but without any side effects. Furthermore, we have also investigated the efficacy of our drug combination, namely METABLOC (ALA and HCA), used in synergy with standard chemotherapy drugs such as Cisplatin or Methotrexane²⁴. We reported an enhanced delay in tumor growth when Cisplatin and Methotrexane are applied in combination with METABLOC. A standardized screening method allow identifying the best drug combinations to assess their effects on cancer cells metabolism and tumor growth²⁵. A pre-clinical investigation thus consisted to further evaluate the effect of METABLOC combined to new drugs (Metformin and Diclofenac) on the growth of transplanted LL/2 Lewis lung carcinoma into mice. The choice of these two drugs is based on their reported positive effect at slowing tumor growth. Metformin is an old drug commonly used in type II diabetes [Diabetes Prevention Program Research Group]. Emerging studies are showing the positive effect of using Metformin in cancer therapy^{26–28}. Since Metformin is used as an hypoglycemic drug in type II diabetes, it slows down insulin secretion and cell proliferation by decoupling mitochondrial respiration throughout the ETC. Interestingly, retrospective epidemiological studies have shown that diabetic patients with long-term Metformin treatment have a reduced risk of developing cancer^{26,29}. Moreover, another pre-clinical study showed an anti-proliferative effect of Metformin on tumor xenograft in mice³⁰. Diclofenac is also an old drug currently used as an anti-inflammatory agent. Recent studies mentioned the potential use of Diclofenac in cancer treatment^{31–33}. For instance, Gottfried *et al.* (2013) showed that Diclofenac impairs the Warburg effect by targeting glucose transport into cancer cells and inhibiting lactate dehydrogenase (LDH) and monocarboxylate Transporter 1 (MCT1). This results in decreased glucose uptake and lactate secretion.

In this work, we injected xenograft of LL/2 Lewis lung carcinoma cells into the peritoneal cavity of mice and we tested the effect of different combinations of drugs on the tumor volume evolution. Results show a decrease in LL/2 tumor volume when METABLOC is administrated in combination with Diclofenac and Metformin. The METABLOC effect is enhanced when Metformin is used at high-dose. Results are compared to the case of administration of a classic chemotherapeutic agent (Cisplatin), as a positive control. We also set up a kinetic metabolic model of tumor growth in order to characterize the effect of metabolic therapies on tumor metabolism. The model was not only able to simulate tumor growth in accordance with experimental data, but also allowed to simulate inhibition of growth after application of the metabolic therapy. This approach to kinetic modeling of tumor growth opens avenues to the identification of new metabolic targets.

Results

High-dose Metformin and Diclofenac slightly induce tumor regression. We first analyzed the effect of exposing groups of C57BL/6 mice ($n = 10$) bearing the LL/2 Lewis lung tumor xenograft to chronic low and high-dose of Metformin and Diclofenac. As control, we also designed groups for chronic injection of Phosphate Buffer Saline (PBS), Cisplatin (chemotherapeutic drug) and METABLOC (calcium hydroxycitrate + lipoic acid). Results are reported in Fig. 1. Mice group treated with PBS, as negative control, reaches a tumor volume of 4000 mm³, whereas the group treated with Cisplatin (positive control) have half of the tumor volume at day 59 (Fig. 1a,b). We also applied chronic dose of METABLOC, already used in our previous studies. This combination of calcium citrate (HCA) and lipoic acid (ALA) does reduce tumor growth, as reported in our previous works (Fig. 1c). High-dose of Metformin and Diclofenac slightly delay tumor growth from day 10 to day 59 after cell inoculation (Fig. 1e,g). Low-dose metformin also delays tumor growth but not low-dose diclofenac (Fig. 1d,f). Metformin shows a dose-response effect on tumor volume (3500 mm³ for low-dose and 3300 mm³ for high-dose). This is not the case of Diclofenac-treated group where the high-dose Diclofenac slightly reduces the tumor volume (mean value = 3300 mm³) but the low-dose group is similar to PBS at day 59 (Fig. 1). Experiments were

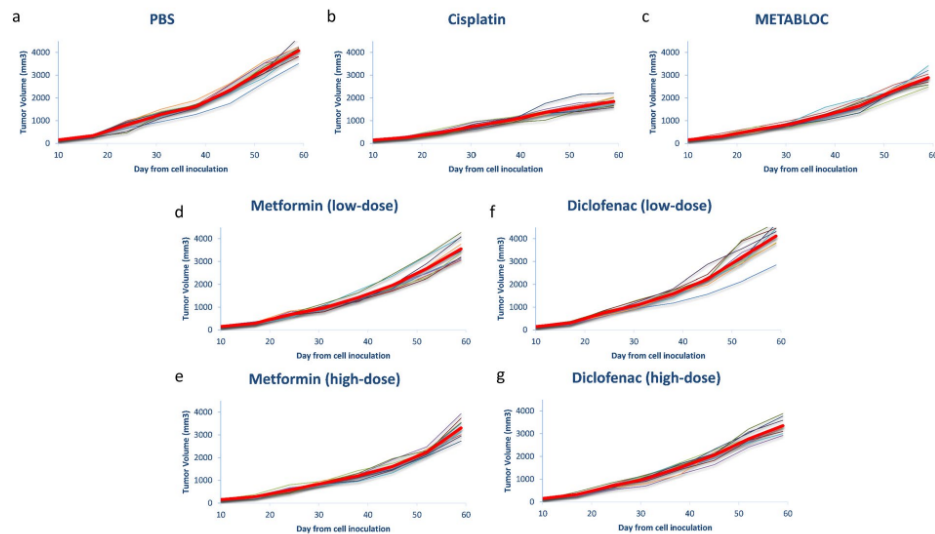


Figure 1. Xenograft tumor evolution in mice under metabolic therapies. Treatments started at day twelve after tumor inoculation in mice. The thin curves represent tumor volumes for each single mouse. The red bold curves are the mean values of all the thin curves. (a) Phosphate-buffered saline (PBS) is used as a control. (b) The chemotherapeutic agent, Cisplatin, slows down tumor growth. (c) Tumor growth is slightly reduced under METABLOC therapy. (d–g) Low-dose and high-dose Metformin and Diclofenac have no significant effects on tumor evolution.

stopped at day 59 since PBS group reaches a lethal tumor volume. Then another group were fed with METABLOC and Metformin or Diclofenac.

METABLOC and high-dose Metformin combination slows and inhibits tumor growth. METABLOC combination with high-dose Metformin and Diclofenac significantly delays LL/2 carcinoma progression in mice compared to PBS or METABLOC treatment (Fig. 2b,c). METABLOC with low-dose Metformin also have a positive effect whereas its combination with low-dose diclofenac has poor effect (Fig. 2d). Among these curves, only METABLOC and high-dose Metformin treated group shows a regression in tumor volume (Fig. 2b). The mean tumor volume is significantly decreased from day 45 to day 59 in the case of METABLOC + Metformin (high-dose) combination ($p < 0.005$). The tumor has a better response to our combination compared to Cisplatin treatment ($p < 0.001$). High-dose Metformin clearly enhances our previous METABLOC combination (Hydroxycitrate + Lipoic acid).

High-dose Diclofenac enhances Metformin effect in inhibiting tumor growth. We went further in our investigation and treated a group of mice ($n = 10$) with full combination of METABLOC + Metformin (low and high-dose) + Diclofenac. Addition of high-dose Diclofenac to METABLOC + high-dose Metformin improves the tumor response to treatment (Fig. 2e). Tumor volume starts regressing at day 45 in METABLOCs (METABLOC + Metformin (high-dose) + Diclofenac (high-dose)) treated group whereas that regression is observed at day 52 for METABLOC + Metformin (high-dose) (Fig. 2b). Combination with low-dose Metformin is less pronounced. METABLOCs significantly decreases tumor growth at day 59 compared to METABLOC + high-dose Metformin ($p < 0.001$) (Fig. 2b). Compared to Cisplatin-treatment, METABLOC has less effect but tumor cell sensitivity increases when the last is combined with metformin and then with Metformin + Diclofenac. Combinations of these old and low-cost drugs are two-times more efficient than the classic chemotherapeutic agent. Our new finding is that a combination of METABLOC (Hydroxycitrate + Lipoic acid) and high-dose Metformin strongly inhibits growth of tumor xenograft inoculated to a group of mice ($n = 10$).

In silico metabolic therapy simulates tumor growth inhibition. A kinetic metabolic model (see the metabolic network in Fig. 3 and the system of differential equations in methods) has been set up from previous models describing the simulation of Chinese Hamster Ovary cells (CHO) growth on different media for the production of monoclonal antibodies³⁴. Here, our model is first used to simulate the growth of a tumor xenograft implanted to a group of mice. Then, the model was used to simulate the impact of *in silico* metabolic therapy - METABLOC - Metformin - Diclofenac on tumor growth. This model is not only useful for simulating

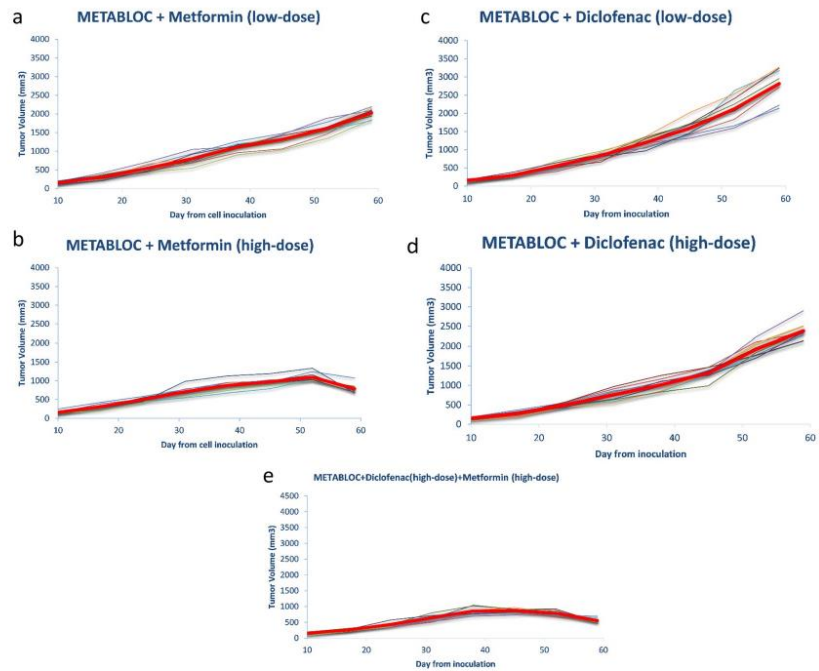


Figure 2. Tumor evolution under metabolic therapy combinations. The thin curves represent tumor volumes for each single mouse. The red bold curves are the mean values of all the thin curves. (a) METABLOC + low-dose Metformin slows down tumor growth. (b) METABLOC + high-dose Metformin significantly reduces tumor evolution and inhibits tumor growth at day 50 from cell inoculation. (c,d) METABLOC + low-dose and high-dose Diclofenac has no significant effect on tumor growth inhibition. (e) METABLOC + high-dose Metformin and Diclofenac drastically inhibits tumor growth and reverses the tumor curve.

experimentally obtained tumor growth, but it also allowed us to characterize the metabolic phenotypes the tumor developing in mice with time.

The model simulates adequately tumor xenograft growth in mice for the most efficient treatment strategy (Fig. 4a). The predicted tumor volume is within the standard deviations of experimental tumor volume. The model predicts a tumor volume evolution from 154 mm^3 to 3900 mm^3 , in line with the experimental data (154 ± 16 to $4076 \pm 297 \text{ mm}^3$). It is important to note that model predictions are only based on total tumor cell volume and blood network of capillaries. Results thus confirming model ability to describe tumor growth. For the model integrating metabolic therapy, the therapeutic molecules are supplied within the blood inlet flux (F) feeding the capillaries blood volume (i.e. tumor cells microenvironment). These molecules are known to specifically target specific enzymatic pathways; with the known effects on cell metabolism that are explicitly described in the model. Model simulations describe the inhibition of tumor growth by metabolic therapy (METABLOC + Metformin + Diclofenac) Fig. 4b. Both experimental and predicted data of tumor evolution show a reduced growth phase from t_0 (10 days after tumor inoculation) and reach a plateau at day 35. Model simulations show a growth plateau at around 873 mm^3 as for the experimental data ($873 \pm 70 \text{ mm}^3$). However, the model does not simulate the decrease in tumor volume. This is probably due to the occurrence of apoptosis in the tumor, a phenomenon that is not described in the model.

The metabolic model predicts reversed Warburg effect upon metabolic therapy. In a recent work³⁵, we reported concentrations of key metabolites involved in energy management throughout the central carbon metabolism. Concentrations of adenosine triphosphate (ATP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) have been measured in normal and cancer cells, extracted from fresh human colon tissues. Our results showed high NAD^+ -to-NADH and NADP^+ -to-NADPH redox ratios in cancer cell populations compared to normal proliferating cells. Interestingly enough, our model also predicts the high throughput aerobic glycolysis, commonly known as the Warburg effect, observed in cancer cells (Fig. 5(a,c)). Consumption of glucose by the tumor cells is linear, until reaching limitation level at the end of the 25th day and totally consumed 59 days after incubation. This accelerated glycolysis results in a massive

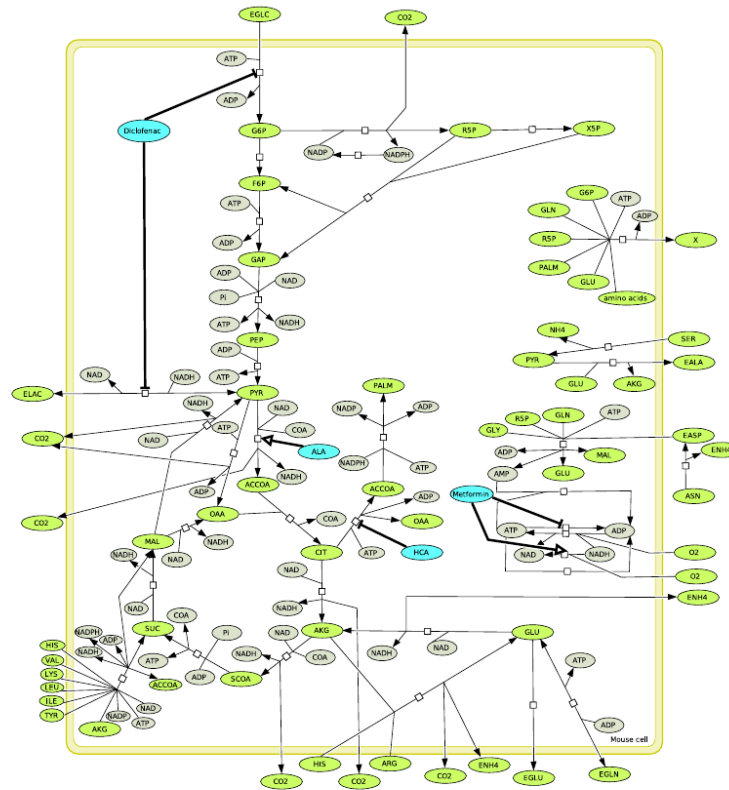


Figure 3. The metabolic network. The core metabolism of cancer cells integrates glycolysis, the pentose phosphate pathway, the citric acid cycle, lipogenesis and amino acids metabolism. Biomass synthesis is described as the incorporation of amino acids, intermediate metabolites and palmitic acid. The metabolic therapy includes Diclofenac as hexokinase and lactate dehydrogenase inhibitor; alpha-Lipoic acid (ALA) as pyruvate dehydrogenase activator; Hydroxycitrate (HCA) as ATP citrate lyase inhibitor; Metformin as ATP synthase inhibitor and NAD leakage activator. Notations: ACCOA: Acetyl-CoenzymeA, ACCOA: Acetyl-CoenzymeA, ACL: ATP-citrate lyase, ADP: Adenosine diphosphate, AK: Adenylate kinase, AKG: α -ketoglutarate, ALA: Extracellular alanine, AMP: Adenosine monophosphate, ARG: Extracellular arginine, ASN: Asparaginase, ASP: Extracellular aspartate, ATP: Adenosine triphosphate, CIT: Citrate, CO₂: Carbone dioxide, DICLO: Extracellular diclofenac, EGLC: Extracellular glucose, EGLN: Extracellular glutamine, EGLU: Extracellular glutamate, F6P: Fructose-6- Phosphate, FADH2: Flavine adenine dinucleotide, FUM: fumarate, G6P: Glucose-6-phosphate, GAP: Glyceraldehyde 3-phosphate, concentration, GlnT: Glutamine synthetase, GLU: Glutamate, GLY: Extracellular Glycine, H₂O: Hydrogen dioxide, HCIT: Extracellular hydroxycitrate, HIS: Extracellular histidine, HISARGTA: Histidine/arginine transamination, ILE: Extracellular isoleucine, LA: Extracellular lipoic acid, LAC: Extracellular lactate, LEU: Extracellular leucine, LYS: Extracellular lysine, MAL: Malate, ME: Malic enzyme, Metformin: Extracellular metformin, NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized), NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced), NADP: nictinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH: nictinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced), NH₄: Extracellular ammonia, OXA: Oxaloacetate, PALM: Palmitate, PEP: Phosphoenolpyruvate, Pi: inorganic phosphate, PK: Pyruvate kinase, PPRibP: Nucleotide synthesis, PYR: Pyruvate, R5P: Ribulose-5-phosphate, SER: Extracellular serine, SUC: succinate, SUCCOA: Succinyl coenzyme A, THR: Extracellular threonine, TYR: Extracellular tyrosine, VAL: Extracellular valine.

release and accumulation of lactate in the blood stream. NAD⁺-to-NADH is the catabolic marker of that aerobic glycolysis proposed by Warburg in his seminal article¹⁶. Therefore, an important NAD⁺-to-NADH ratio allows the maintenance of the glycolytic potential of cancer cells. Combining METABLOC and high-dose of Metformin and Diclonenac considerably reduces glucose consumption by tumor cells. This phenomenon thus

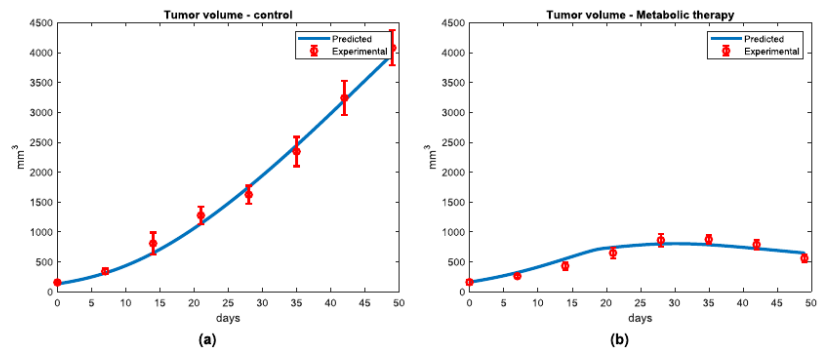


Figure 4. Predictions of the tumor growth in control and under *in silico* metabolic therapy. (a) The kinetic model of tumor metabolism simulates tumor volume in line with the experimental data. (b) Under metabolic therapies (METABLOC combined with diclofenac and high dose of Metformin), the model predicts tumor inhibition and its volume regression, as determined experimentally.

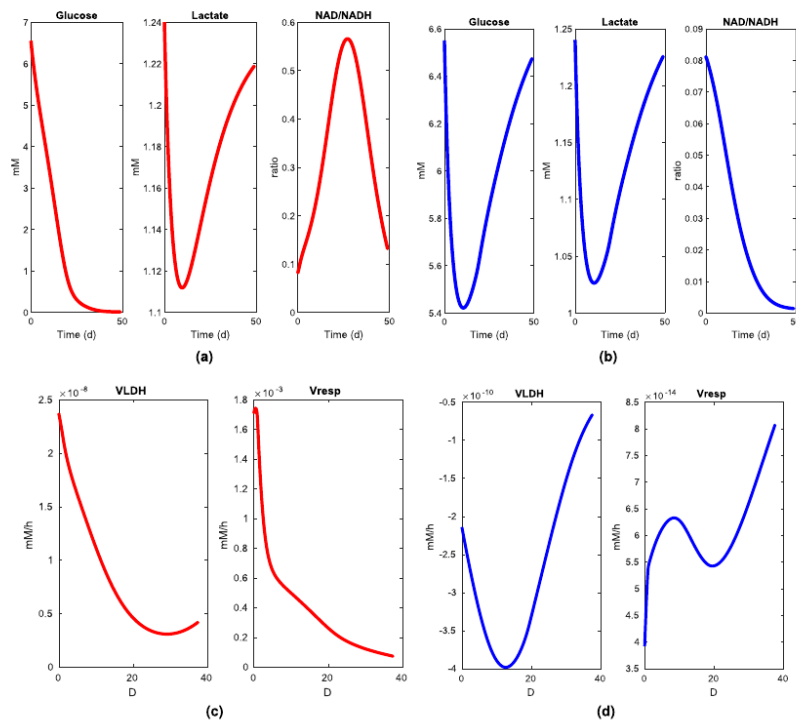


Figure 5. Simulated blood metabolites (glucose and lactate) and simulated redox ratio (NAD^+/NADH) in tumor (a) and tumor treated with metabolic drugs (b). Simulated fluxes of lactate dehydrogenase (VLDH) and respiration (Vresp) in tumor (c) and tumor treated with metabolic drugs (d). (a) Lactic acid is first eliminated by the blood flow and then accumulates with tumor growth. NAD^+/NADH ratio decreases upon glucose exhaustion. (b) Under metabolic therapy glucose uptake slows down, as well as lactic acid secretion. NAD^+/NADH ratio decreases with tumor growth. (c) The high value of VLDH and the decrease of the respiration flux are markers of the Warburg effect in the tumor. (d) The negative flux of VLDH which corresponds to lactate uptake and the increase of the respiration flux both translate a reverse Warburg effect.

results in decreased lactate secretion and accumulation (Fig. 5(b,d)). NAD^+ -to- NADH redox ratio is low and decreases with metabolic therapies. These observations are both signatures of a reduced glycolytic flux or the reverse Warburg effect.

Conclusion

Metabolic therapies have been used to study tumor xenograph growth in mice. We experimentally showed that the combination of METABLOC, high-dose Metformin and Diclofenac inhibits the tumor growth. We proposed a dynamic metabolic model of the tumor which simulates the effects of the metabolic therapies on tumor evolution and tumor cell metabolism. This model also predicts tumor regression, a lower glycolytic flux and lactic acid secretion upon metabolic treatments. Intracellular NAD^+ / NADH redox ratio is low and decreases, as a consequence of reduced glycolytic flux. Indeed, the oxidative phosphorylation may be rewired from the fermentation pathway, favoring mitochondrial respiration and inverted Warburg effect. Our model supports our experimental results and it can also be used to test new combination of metabolic treatments. These results pave the way for new strategies in metabolic therapy and *in silico* metabolic drug design.

Methods

Cell culture. The LLC/1 cell-line ATCC® CRL-1642 (LGC Standards, Molsheim-France) cultivated in the medium DMEM Glutamax I (Invitrogen-Gibco) with 10% of FBS (Eurobio) and 1/10000 IU of Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich P4333) were injected into the peritoneal cavity of mice at 5 million cells per mouse in a 150 μl shot and within 12 days of incubation, when tumors reached 130 mm^3 , mice were randomized and the treatments were started.

Metabolic treatment. Lipoic acid (Sigma Aldrich T1395), calcium hydroxycitrate (IWDO) and cisplatin (Sigma Aldrich 479306) were dissolved in PBS and injected intraperitoneally (i.p.) two times per day (2X/D) for lipoic acid and calcium hydroxycitrate, 1X/2D for cisplatin at 10 mg/kg, 250 mg/kg and 1 mg/kg, respectively. Drops of ethanol were added to completely dissolve lipoic acid in PBS solution. Diclofenac sodium (Sigma-Aldrich 93484) at 3 mg/kg and 30 mg/kg adjusted in 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (LOW) and 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (HIGH) of drinking water were administered orally (Per Os). A mouse drinks about 3 mL water per day. Metformin (Sigma-Aldrich 1396309) at 2.5 mg/kg, 12.5 mg/kg and 25 mg/kg adjusted in 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (LOW), 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (MEDIUM) and 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (HIGH) of drinking water were also administered orally.

Animal handling. Mice were divided in a weight-normalized manner into the groups of 10 animals per group. Forty eight groups of 6–8 weeks old inbred male C57BL/6 mice (mean weight: 21.15 ± 1.11 g) were obtained from Pasteur Institute, Iran. They were housed five to a cage with access to autoclaved mouse chow and water *ad libitum*. They were kept in a room under controlled temperature (22°C), humidity (55%) and light (lights on 7h00 am–7h00 pm). All animals received human care in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [DHEW Publication No. (NIH) 85–23, from 1985 with all next updates, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD 20205]. The experimental protocols were approved by the company Nosco Pharmaceuticals.

The metabolic network. The metabolic network presented here and displayed in Fig. 3 has been modified from previous models of Chinese Hamster Ovary cells (CHO) and mouse myeloid derived suppressor cells (MD-SCs)^{34,36–39}. It includes 35 enzymatic reactions describing the fate of 52 metabolites. We distinguished two compartments: external (i.e. blood microenvironment of tumor cells) and intracellular cell metabolites, with the cell as a unique compartment. The network integrates pathways of the central carbon metabolism (CCM) such as glycolysis, the pentose phosphate pathway, the tricarboxylic acid cycle, lipogenesis, the oxidative phosphorylation and pathways of amino acid metabolism. In this CCM, glucose and amino acids are the main sources of carbon and nitrogen for cell proliferation and biomass synthesis. For further details see³⁴.

Minimal cut sets of the metabolic networks. The concept of minimal cut set has been introduced to determine the minimal set of reactions whose deletion completely blocks a target⁴⁰. In our metabolic network, there are 1058 minimal cut sets which prevent the tumor growth (X). They have been calculated with CellNetAnalyzer^{41,42} and we have selected the shortest. Twenty of them have their size lower than two and only 6 are of size one: VHK, VG6PDH, VCS, VACL, VPALM, Vgrowth. As our therapy is not a genetic modification, the inhibition of one of them will not totally prevent the tumor growth. This structural analysis shows that the diclofenac which inhibits the hexokinase (VHK), and the hydroxycitrate which inhibits the ATP citrate lyase (VACL), should have a negative impact on the tumor growth.

Dynamic modeling of tumor volume. The tumor volume includes cancer cells and the network of capillaries (Fig. 6). The model was established on the basis of mass balances on metabolites and tumor cells concentration. The tumor cells are continuously perfused from a network of capillary of total volume V_b , which is considered as a perfectly mixed stirred-tank reactor (CSTR). The blood composition within the tumor volume was thus considered homogeneous. In a perfusion system the cells are retained within the vessel.

The tumor is continuously fed from the network of capillaries, with a global blood flow rate (F) of composition C_0 at tumor inlet. For simplification purposes, the variation of the blood flow with tumor growth was neglected. Here, C and C_0 are the vectors of tumor blood concentrations and blood concentrations in metabolites at tumor inlet, respectively (in mM), and m is the vector of concentrations of tumor cells intracellular metabolites (in mM). S_c and S_m are the stoichiometric matrices of the reactions involving the extracellular and intracellular metabolites, respectively. The r term is the specific rates vector (in mM/h in cells and $\text{mmol}/10^6$ cells/h in capillaries) of each reaction in the metabolic network, whilst μ and μ_{blood} are the cells and capillaries specific growth or volume

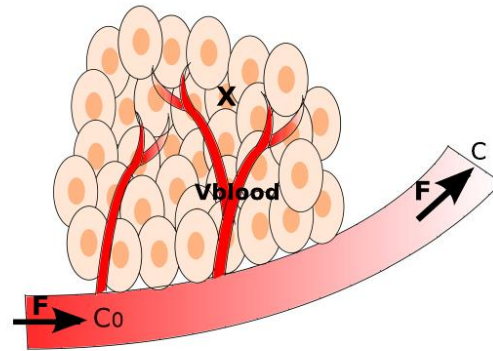


Figure 6. Tumor microenvironment assimilated to a perfusion reactor.

increase rates (h^{-1}), respectively. X is the total tumor cells volume (in 10^6 cells/ml) and ε_m is the fraction of intracellular metabolites that are integrated into the cells matter. The dynamical system is written as follow and is explained in supplementary materials:

$$\begin{cases} \frac{dC}{dt} &= S_c \times r \times \frac{X}{V_{blood}} + \frac{(C_0 - C) \times F}{V_{blood}} - \mu_{blood} \times C \\ \frac{dm}{dt} &= S_m \times r - (\varepsilon_m + m) \times \mu \\ \frac{dX}{dt} &= \mu \times X - k_d \times \frac{1 - \left(\frac{NAD}{NADH}\right)^n}{\left(\frac{k_{NAD}}{NADH}\right)^n + \left(\frac{NAD}{NADH}\right)^n} \times X \\ \frac{dV_{blood}}{dt} &= \mu_{blood} \cdot V_{blood} \\ \frac{dV_{tumor}}{dt} &= \frac{dX}{dt} + \frac{dV_{blood}}{dt} \end{cases}$$

Parameter estimation. Parameters value where first taken from previous works on CHO cells^{34,36}, when not available for cancer or human cells in the literature or databanks. Then, we used nonlinear optimization function, *fmincon* (MatWorks®), to optimize sensitive parameters which are F_{in} , F_{out} and the specific growth rate of tumor cells (μ). Parameters value optimization was based on the following objective function:

$$\min \left(\sum_{n=1}^N \sum_{t=1}^T \left(\frac{Y_{n,t}^{exp} - Y_{n,t}(p)}{\sigma_{n,t}} \right)^2 \right)$$

where $Y_{n,t}^{exp}$ is the n^{th} experimental data at the t^{th} experimental time, $Y_{n,t}(p)$ the simulated output with “p” a vector of the three sensitive parameters and “ σ ” the standard deviation of the experimental measurements.

References

- Seyfried, T. N. & Shelton, L. M. Cancer as a metabolic disease. *Nutr. & Metab.* **7**, 7, <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-7> (2010).
- Gatenby, R. A. Is the Genetic Paradigm of Cancer Complete? *Radiology* **284**, 1–3, <https://doi.org/10.1148/radiol.2017171004> (2017).
- Oppermann, H., Levinson, A. D., Varmus, H. E., Levintow, L. & Bishop, J. M. Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **76**, 1804–1808 (1979).
- Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921, <https://doi.org/10.1038/35057062> (2001).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (2011).
- Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)* **357**, 539–545, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(2001\)](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(2001)).
- Abolhassani, M. *et al.* Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2a. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. et al.* **57**, 419–429, <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7213-0> (2008).
- Abolhassani, M., Guais, A., Chaumet-Riffaud, P., Sasco, A. J. & Schwartz, L. Carbon dioxide inhalation causes pulmonary inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**, L657–665, <https://doi.org/10.1152/ajplung.90460.2008> (2009).

10. Schwartz, L. *et al.* Hyperosmotic stress contributes to mouse colonic inflammation through the methylation of protein phosphatase 2a. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G934–941, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90296.2008> (2008).
11. Schwartz, L., Guais, A., Pooya, M. & Abolhassani, M. Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? *J. Inflamm. (London, England)* **6**, 21, <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-21> (2009).
12. Israël, M. & Schwartz, L. The metabolic advantage of tumor cells. *Mol. Cancer* **10**, 70, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-70> (2011).
13. Israël, M. A possible primary cause of cancer: deficient cellular interactions in endocrine pancreas. *Mol. Cancer* **11**, 63, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-63> (2012).
14. Israël, M. Comment on cancer metabolism and on the role of the endocrine pancreas. *J. Clin. Medicine Res.* **6**, 490–491, <https://doi.org/10.14740/jocmr1912w> (2014).
15. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The Metabolism Of Tumors In The Body. *The J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530 (1927).
16. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Sci. (New York, N.Y.)* **123**, 309–314 (1956).
17. Gatenby, R. A. & Frieden, B. R. Information dynamics in carcinogenesis and tumor growth. *Mutat. Res.* **568**, 259–273, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.018> (2004).
18. Deberardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D. & Thompson, C. B. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* **18**, 54–61, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.02.003> (2008).
19. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005> (2008).
20. da Veiga Moreira, J. *et al.* Cell cycle progression is regulated by intertwined redox oscillators. *Theor. Biol. Med. Model.* **12**, 10, <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0005-2> (2015).
21. Schwartz, L. *et al.* A combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results. *Oncol. Reports* **23**, 1407–1416 (2010).
22. Hatzivassiliou, G. *et al.* ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* **8**, 311–321, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.008> (2005).
23. Bonnet, S. *et al.* An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630–2641, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008> (2006).
24. Guais, A. *et al.* Adding a combination of hydroxycitrate and lipoic acid (METABLOCTM) to chemotherapy improves effectiveness against tumor development: experimental results and case report. *Investig. New Drugs* **30**, 200–211, <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9552-x> (2012).
25. Abolhassani, M. *et al.* Screening of well-established drugs targeting cancer metabolism: reproducibility of the efficacy of a highly effective drug combination in mice. *Investig. New Drugs* **30**, 1331–1342, <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9692-7> (2012).
26. Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**, 1304–1305, <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7> (2005).
27. Sahra, I. B., Marchand-Brustel, Y. L., Tanti, J.-F. & Bost, F. Metformin in Cancer Therapy: A New Perspective for an Old Antidiabetic Drug? *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1092–1099, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1186> (2010).
28. Loubiere, C., Dirat, B., Tanti, J. & Bost, F. Metformine et cancer: passé, présent, avenir. *Obesité* **3**, 205–213 (2014).
29. Libby, G. *et al.* New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32**, 1620–1625, <https://doi.org/10.2337/dc08-2175> (2009).
30. Krisztina, K., Aune, M., James, S.-S., Guido, E. & Enrique, R. Metformin Inhibits the Growth of Human Pancreatic Cancer Xenografts. *Pancreas* **42**, 781–785, <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31827aec40> (2013).
31. Gottfried, E. *et al.* New aspects of an old drug—diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. *PLoS One* **8**, e66987, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066987> (2013).
32. Mayorek, N., Naftali-Shani, N. & Grunewald, M. Diclofenac inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer by modulation of VEGF levels and arginase activity. *PLoS One* **5**, e12715, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012715> (2010).
33. Al-Nimer, M. S., Hameed, H. G. & Mahmood, M. M. Antiproliferative effects of aspirin and diclofenac against the growth of cancer and fibroblast cells: *In vitro* comparative study. *Saudi. Pharm. J.* **23**, 483–486, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.002> (2015).
34. Robitaille, J., Chen, J. & Jolicœur, M. A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PLoS One* **10**, e0136815, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136815> (2015).
35. da Veiga Moreira, J. *et al.* The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect. *Metabolites* **6**, <https://doi.org/10.3390/metabo6040033> (2016).
36. Ghorbaniaghdam, A., Henry, O. & Jolicœur, M. A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 469–487, <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0804-3> (2013).
37. Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O. & Jolicœur, M. Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PLoS One* **9**, e90832, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090832> (2014).
38. Ghorbaniaghdam, A., Henry, O. & Jolicœur, M. An *in-silico* study of the regulation of CHO cells glycolysis. *J. Theor. Biol.* **357**, 112–122, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.04.035> (2014).
39. Goffaux, G., Hammami, I. & Jolicœur, M. A Dynamic Metabolic Flux Analysis of Myeloid-Derived Suppressor Cells Confirms Immunosuppression-Related Metabolic Plasticity. *Sci. Reports* **7**, 9850, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10464-1> (2017).
40. Klamt, S. & Gilles, E. Minimal cut sets in biochemical reaction networks. *Bioinformatics* **20**, 226–234 (2004).
41. Klamt, S., Saez-Rodriguez, J. & Gilles, E. Structural and functional analysis of cellular networks with cellnetanalyzer. *BMC Syst. Biol.* **1**, 2, <https://doi.org/10.1186/1752-0509-1-2> (2007).
42. von Kamp, A., Thiele, S., Hädicke, O. & Klamt, S. Use of cellnetanalyzer in biotechnology and metabolic engineering. *J. Biotechnol.* **261**, 221–228, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.001> Bioinformatics Solutions for Big Data Analysis in Life Sciences presented by the German Network for Bioinformatics Infrastructure (2017).

Acknowledgements

We especially thank Jean-Marc Steyaert and Marcel Levy Nogueira for interesting discussions and suggestions for the experimental part of this article.

Author Contributions

J.D.M., M.J., L.S. and S.P. conceived the study. J.D.M. implemented the calculations. J.D.M., M.J., L.S. and S.P. analyzed and discussed the results. J.D.M., M.J. and S.P. wrote the manuscript. M.H. and M.A. made the experiments.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39109-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette thèse CIFRE, nous nous sommes interrogées sur l'application potentielle du citrate à des fins thérapeutiques ou en tant que complément alimentaire. Notre équipe a déjà reportée un effet positif du citrate sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Icard *et al.*, 2012). Une autre voie possible de valorisation de ce travail en santé serait l'utilisation du citrate en tant que complément alimentaire à destination des enfants ou des femmes ménopausées.

Les produits laitiers contribuent à diminuer l'apparition de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. Les principes actifs majoritaires sont le calcium et la vitamine D. En Europe, des allégations de santé ont été autorisées pour ces deux molécules, pour leurs utilisations en tant que compléments alimentaires, à destination des femmes ménopausées. Au vu des connaissances actuelles reportées dans la littérature, nous formulons l'hypothèse qu'une matrice laitière enrichie en citrate pourrait diminuer le risque d'ostéoporose au même titre que le calcium et la vitamine D. Nous nous proposons de valider cette hypothèse, dans le cadre de notre projet de recherche, en étudiant les effets d'un apport de sels de citrate sur le métabolisme des cellules animales osseuses.

I. Le citrate stimule la différenciation des ostéoblastes

L'ostéoporose est une maladie de l'os caractérisée par une diminution excessive de la masse osseuse due à un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse (Tanaka *et al.*, 2005). Deux types de cellules sont majoritairement impliqués dans le remodelage osseux : les ostéoblastes, qui participent à la formation et solidification de l'os et les ostéoclastes, responsables de la résorption des microstructures de l'os (Tanaka *et al.*, 2005). Une activité dominante des ostéoclastes conduit donc à l'ostéoporose (Zaidi *et al.*, 2003). Les principales hormones responsables du remodelage osseux sont la parathormone PTH (parathyroïd hormone) et la calcitonine, sécrétées par les glandes parathyroïdes. La PTH favorise la résorption osseuse des ostéoclastes en induisant la libération du calcium dans le sang (hypercalcémie) alors que la calcitonine inhibe les ostéoclastes, ce qui diminue la résorption osseuse et augmente donc le stockage du calcium dans l'os (hypocalcémie) (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Lombardi *et al.*, 2011).

Des études récentes ont établi que l'os contient des taux élevés de citrate (20-100 $\mu\text{mol}/\text{g}$). Environ 90% du citrate total du corps est stocké dans les microstructures osseuses (Costello et

Franklin, 2016). Il a été proposé que le citrate ait un rôle fonctionnel et structurel puisqu'il participe à la minéralisation de l'os par complexation avec le calcium mais aussi à la régulation du taux homéostatique de citrate sanguin (Costello et Franklin, 2016). Le citrate plasmatique est maintenu dans une fourchette de concentration physiologique comprise entre 100 et 150 μM . Cet équilibre dépend des sources d'entrées et d'élimination de citrate de la circulation sanguine. Le citrate alimentaire est une source importante pour le maintien du taux de citrate plasmatique (Costello et Franklin, 2016). Il est absorbé au niveau du tube digestif, avant de rejoindre la circulation sanguine, en passant par le foie. Lorsque l'apport alimentaire est insuffisant, les os deviennent les principales sources en citrate pour le maintien de la concentration plasmatique (Costello et Franklin, 2016). Comme pour le calcium, le citrate est libéré dans le sang pendant la résorption osseuse initiée par les ostéoclastes, sous l'action de la PTH. Quelle est alors la source de citrate permettant son incorporation à la matrice osseuse puis libération dans le sang ? Jusqu'à très récemment, le mécanisme accepté était que le citrate sanguin aurait été capté par les ostéoblastes par un transport en symport avec le calcium. Cependant, les dernières études sur le sujet remettent en cause ce mécanisme et proposent que les ostéoblastes soient les cellules productrices de citrate, utilisé pour la formation du complexe apatite-citrate-collagène (Caudarella *et al.*, 2003; Costello *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2010, 2011). Par conséquent, le maintien des concentrations plasmatiques physiologiques en citrate et en calcium est assuré par l'activité métabolique des ostéoclastes et ostéoblastes ainsi que l'élimination rénale. Un déséquilibre conduit souvent à des pathologies comme la coagulation excessive du sang ou l'ostéoporose (Costello et Franklin, 2016).

Dans une étude statistique sur les marqueurs biochimiques dans les cas d'ostéoporose, Caudarella *et al.* (2003) ont reporté une corrélation significative entre les fractures des vertèbres chez les femmes ménopausées et la diminution de la concentration de citrate dans l'urine (Caudarella *et al.*, 2003). De plus, l'administration de sels de citrate alcalins a eu pour effet d'augmenter la masse osseuse, tant chez les sujets normaux que dans les cas de calculs rénaux, ajoutant ainsi un outil thérapeutique supplémentaire pour le traitement de l'ostéoporose, en particulier chez les sujets hypocitraturiques. Sellmeyer *et al.* (2002) ont constaté qu'une supplémentation en citrate de potassium réduit la perte urinaire de calcium et la résorption osseuse dans un groupe de 60 femmes ménopausées nourries avec un régime alimentaire à haute teneur en sodium (Sellmeyer *et al.*, 2002). Dans une étude plus récente et randomisée en double aveugle, 52 hommes et femmes ont été traités au citrate de potassium (60 mmol/j et 90 mmol/j) ou à un placebo. Après 6 mois de suivi, des marqueurs de la résorption osseuse (PTH) et le

métabolisme du calcium ont été estimés dans les trois groupes. Le calcium éliminé dans l'urine et la PTH sont nettement diminués chez les sujets traités comparé au groupe placebo. Ainsi un meilleur équilibre du calcium est reporté. Bien que l'effet direct du citrate exogène sur ne soit pas clairement démontré dans ces études, on pourrait émettre l'hypothèse de son rôle dans le maintien d'une concentration plasmatique et/ou osseuse normale en calcium et une réserve ostéoblastique adaptée pour la formation osseuse. Cette hypothèse a été partiellement explorée dans une étude récente sur l'effet du citrate et autres acides organiques sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuse humaines (hMSC) en ostéoblastes pour la formation osseuse (Barati *et al.*, 2015). Il a été démontré qu'une culture de hMSC sur un milieu ostéogénique supplémenté en citrate induit sa différenciation en ostéoblaste, la synthèse du collagène et la minéralisation du complexe calcium-phosphate (CaP). Le citrate exogène pourrait alors améliorer la disponibilité en calcium pour la prolifération et la différenciation des MSCs. En effet, une autre étude reporte un effet positif du calcium extracellulaire sur la différenciation des MSCs (Aquino-Martínez *et al.*, 2017). Le calcium potentialise l'effet de la protéine osseuse morphogénétique (BMP) sur la prolifération et la différenciation des MSCs en culture sur un gel de gélatine en 3D. Ces études confirment le bienfait reconnu d'un apport alimentaire en calcium sur l'ostéoporose, chez les femmes ménopausées.

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de la supplémentation en citrate sur la prolifération et la différenciation des lignées cellulaires primaires d'ostéoblastes de souris. Deux formes de citrate, le citrate de sodium (NaCitrate) et le citrate de calcium (CaCitrate), ont été testées à différentes concentrations. Le chlorure de calcium (CaCl_2) a été utilisé comme condition contrôle positif pour les effets du calcium sur la différenciation des ostéoblastes. Nous avons utilisé la synthèse du collagène comme marqueurs des cellules de différenciation.

Matériels et méthodes

Le protocole utilisé pour les différentes étapes d'extraction et de culture des cellules primaires ainsi que le marquage du collagène est celui proposé par Scutt *et al.*, 2003.

Résultats et Discussion

Les données présentées ici (Fig. 19abc) sont des résultats préliminaires issus d'une seule série d'expériences. Des essais supplémentaires seront réalisés afin de valider ces premiers résultats.

Différentes concentrations en sels citrate (NaCit et CaCit) ont été utilisées dans cette étude expérimentale par variation autour de la concentration physiologique en citrate de 100 μM . Parmi les deux sels de citrate ajoutés aux cultures, seule la forme de citrate complexée au calcium semble avoir un effet positif sur la synthèse du collagène. L'ajout du CaCit à 200 μM semble stimuler la synthèse du collagène de manière significative (Fig. 1C). La forme NaCit du citrate ne montre aucun effet majeur du citrate par rapport aux contrôles (sans ajouts de citrate). Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse communément acceptée indiquant que le calcium est capté par les ostéoblastes en symport avec le citrate. Bien que l'effet du calcium seul (CaCl_2), par rapport au citrate, ne montre pas d'effet significatif, le citrate pourrait avoir un effet indirect sur la stimulation de la différenciation des ostéoblastes et donc de sur synthèse du collagène. Des concentrations plus importantes en CaCit devraient être utilisées afin d'évaluer un effet potentiellement plus important du citrate sur la synthèse du collagène par les ostéoblastes différenciés.

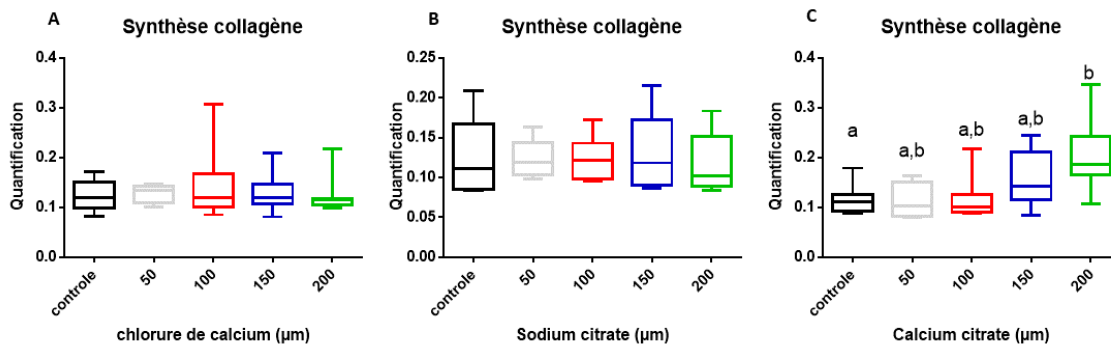


Figure 19 : L'effet des sels de citrate sur la synthèse du collagène par les ostéoblastes.

Conclusion

Les résultats présentés ici sont issus d'expériences préliminaires et montrent un effet stimulant du citrate de calcium (CaCit) à haute dose (200 μ M) sur la différenciation des cellules primaires osseuses de souris. Le citrate semble potentialiser les effets du calcium sur la différenciation des ostéoblastes. Ces expériences doivent être répétées, notamment à des concentrations en citrate plus importantes. En termes d'application directe de ces résultats, il est aussi envisageable d'étudier *in vivo* les effets d'une matrice alimentaire enrichie en citrate sur la santé de l'os chez des modèles de souris ovariectomisées.

Références

- Aquino-Martínez, R., Artigas, N., Gámez, B., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2017). Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling. *PLoS ONE* 12, e0178158.
- Barati, D., Walters, J.D., Shariati, S.R.P., Moeinzadeh, S., and Jabbari, E. (2015). Effect of organic acids on calcium phosphate nucleation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on peptide functionalized nanofibers. *Langmuir* 31, 5130–5140.
- Caudarella, R., Vescini, F., Buffa, A., and Stefoni, S. (2003). Citrate and mineral metabolism: kidney stones and bone disease. *Front. Biosci.* 8, s1084-1106.
- Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2016). Plasma Citrate Homeostasis: How It Is Regulated; And Its Physiological and Clinical Implications. An Important, But Neglected, Relationship in Medicine. *HSOA J Hum Endocrinol* 1.
- Costello, L.C., Franklin, R.B., Reynolds, M.A., and Chellaiah, M. (2012). The Important Role of Osteoblasts and Citrate Production in Bone Formation: “Osteoblast Citration” as a New Concept for an Old Relationship. *Open Bone J* 4.
- Hadjidakis, D.J., and Androulakis, I.I. (2006). Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396.
- Hu, Y.-Y., Rawal, A., and Schmidt-Rohr, K. (2010). Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22425–22429.
- Hu, Y.-Y., Liu, X.P., Ma, X., Rawal, A., Prozorov, T., Akinc, M., Mallapragada, S.K., and Schmidt-Rohr, K. (2011). Biomimetic Self-Assembling Copolymer–Hydroxyapatite Nanocomposites with the Nanocrystal Size Controlled by Citrate.
- Lombardi, G., Di Somma, C., Rubino, M., Faggiano, A., Vuolo, L., Guerra, E., Contaldi, P., Savastano, S., and Colao, A. (2011). The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J. Endocrinol. Invest.* 34, 18–22.
- Scutt, A., Reading, L., Scutt, N., and Still, K. (2003). Mineralizing Fibroblast-Colony-Forming Assays. In *Bone Research Protocols*, M.H. Helfrich, and S.H. Ralston, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 29–39.
- Sellmeyer, D.E., Schloetter, M., and Sebastian, A. (2002). Potassium citrate prevents increased urine calcium excretion and bone resorption induced by a high sodium chloride diet. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2008–2012.
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., and Okada, Y. (2005). Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 325–328.
- Zaidi, M., Blair, H.C., Moonga, B.S., Abe, E., and Huang, C.L.H. (2003). Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J. Bone Miner. Res.* 18, 599–609.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce travail de thèse portant sur la compréhension du phénomène de bascule métabolique chez les cellules eucaryotes, nous avons porté une attention particulière sur le métabolisme de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica* mais aussi chez des cellules animales, en particulier du phénotype glycolytique et prolifératif des cellules cancéreuses.

L'étude de l'amélioration du rendement de production de citrate, *in vivo* et *in silico*, nous a permis d'identifier une protéine mitochondriale dont l'activité influence la production de citrate chez la souche *Yarrowia lipolytica* W29. Nous avons découvert que l'inhibition de la protéine oxydase alternative ou alternative oxidase (AOX), en anglais, par la propyl gallate (synonymes en anglais : gallic acid, propyl ester, n-Propyl gallate, E310) permet d'améliorer (environ x2) la production de citrate par fermentation du glucose. Ces résultats ont été obtenus sur des cultures de *Y. lipolytica* W29 en conditions non-optimales, en fioles agitées, pour la production de citrate.

L'AOX est impliquée dans la respiration alternative chez *Yarrowia lipolytica* mais aussi chez des plantes et certains champignons) (Akimenko *et al.*, 2003; Guerrero-Castillo *et al.*, 2012; Medentsev *et al.*, 2002). Son rôle exacte n'est pas encore bien décrit dans la littérature mais elle pourrait avoir un pouvoir tampon contre les ROS (Reactive Oxygen Species) (Guerrero-Castillo *et al.*, 2012). La propyl gallate est un antioxydant (E310) utilisé depuis de nombreuses années dans les industries agro-alimentaires et pharma-cosmétiques. C'est une molécule reconnue GRAS (Generally Recognized as Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) américaine et utilisée comme conservateur dans les produits alimentaires à base d'huile (International Journal of Toxicology, 2007).

Ces résultats suggèrent l'importance du contrôle de l'état rédox du milieu intracellulaire chez toutes les cellules, et en particulier chez des microorganismes dotés de mitochondries et d'un métabolisme oxydatif, les principales sources d'espèces ROS. Le métabolisme mitochondrial de l'oxygène semble être impliqué dans la transition respiro-fermentaire de par la contrainte métabolique que l'O₂ impose aux flux d'électrons qui parcourent la chaîne respiratoire. Ainsi une inhibition de la consommation de l'oxygène par la nPG peut expliquer une saturation électro-chimique des électrons au niveau de la chaîne de transfert des électrons et une diminution des flux oxydation du carbone par le cycle de Krebs. La production d'acides organiques issus du Krebs dont majoritairement le citrate pourrait s'expliquer par cette limitation du flux oxydatif et constituerait alors une « issue de secours » où voie d'overflow de carbone.

De plus ces résultats confirment certaines observations reportées dans la littérature scientifique décrivant l'accumulation de citrate dans le milieu de culture comme la conséquence d'un overflow métabolique et/ou transition métabolique décorélée de l'expression des gènes. Ainsi, les données transcriptomiques n'ont montré que très peu de différences au niveau de l'expression des enzymes impliquées dans les voies métaboliques favorisant l'accumulation de citrate (Ochoa-Estopier *et al.*, 2014). Ces observations ont justifié la nécessité d'utiliser des approches informatiques pour l'étude du métabolisme de *Y. lipolytica* afin d'identifier les potentiels points de bascule métabolique et leviers dans l'optique d'une optimisation de la production de citrate. La méthode dynamic FBA (Flux Balance Analysis) nous a permis de modéliser le métabolisme de *Y. lipolytica* à l'échelle du genome. L'analyse des flux a mis en évidence des mécanismes intracellulaires pouvant expliquer l'accumulation de citrate dans une culture de *Y. lipolytica* ainsi qu'une surproduction par l'application de la nPG. Les simulations de l'inhibition de l'AOX par la nPG semble augmenter le flux d'oxydation des lipides et une accumulation des espèces ROS. Nos résultats expérimentaux préliminaires tendent à valider ces simulations puisqu'il a été observé que l'ajout de la nPG dans une culture de *Y. lipolytica* favorise non seulement une surproduction de citrate mais aussi une accumulation de corps cétoniques issues de la dégradation de triglycérides. Ce phénomène est proche de l'effet Warburg observé chez les cellules animales en division ou dans le cas des cellules cancéreuses lors de la production de déchets métaboliques tels que les acides organiques. Ainsi, les dysfonctionnements mitochondriaux observés chez ces cellules en dégénérescence métabolique telles que les cellules cancéreuses pourraient aussi être expliquées par la saturation mitochondriale en flux énergétiques et son incapacité à réduire l'oxygène libre en molécule d'eau.

En perspectives, on pourrait bien imaginer l'intégration d'un système de respiration alternative chez certaines cellules animales. Cela contribuerait à apporter un degré de liberté supplémentaire aux cellules dans le recyclage des espèces NAD^+/NADH et une diminution du phénotype fermentaire.

Références

Akimenko, V.K., Arinbasarova, A.Y., Smirnova, N.M., and Medentsev, A.G. (2003). The Alternative Oxidase of *Yarrowia lipolytica* Mitochondria Is Unable To Compete with the Cytochrome Pathway for Electrons. *Microbiology* 72, 403–407.

Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., and Uribe-Carvajal, S. (2012). During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 353–362.

International Journal of Toxicology (2007). Final Report on the Amended Safety Assessment of Propyl Gallate1.

Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Golovchenko, N.P., and Akimenko, V.K. (2002). Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. *FEMS Yeast Res.* 2, 519–524.

Ochoa-Estopier, A., & Guillouet, S. E. (2014). D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of biotechnology*, **170**, 35-41.

Titre : Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*

Mots clés : Métabolisme des cellules eucaryotes, Modélisation, Bascule métabolique, Citrate, *Yarrowia lipolytica*

Résumé : L'objectif de cette thèse est d'étudier et caractériser les mécanismes impliqués dans la bascule respiro-fermentaire chez des cellules eucaryotes dotées d'un métabolisme mitochondrial. Les cellules eucaryotes ont des besoins différents en oxygène pour la production d'énergie et leur survie dans un environnement donnée. Elles sont qualifiées de type aérobie stricte lorsque la présence d'oxygène leur est nécessaire ou aéro-anaérobie facultatif dans le cas où l'oxygène n'est pas indispensable à la production d'énergie. La levure *Yarrowia lipolytica* a été choisie comme modèle d'étude de par sa particularité à être un micro-organisme aérobie strict avec une grande capacité d'accumuler de lipides et de production d'acides organiques. Les études expérimentales et analytiques, par l'emploi de méthodes mathématiques de modélisation du métabolisme, ont permis d'identifier des contraintes métaboliques impliquées dans la transition respiro-fermentaire chez cette levure au métabolisme énergétique oxydatif. La production de l'acide citrique par *Y. lipolytica*, déjà rapportée dans la littérature, a été choisi comme un marqueur de cette transition respiro-fermentaire.

Nous avons découvert que l'inhibition de la protéine oxydase alternative (AOX), impliquée dans la respiration mitochondriale, par la molécule n-propyl gallate (nPG) permet d'améliorer le rendement de production d'acide citrique par fermentation du glucose dans une culture de *Y. lipolytica*. Ces résultats montrent que la nPG, déjà utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique en tant que conservateur joue sur la bascule respiro-fermentaire par inhibition de la consommation d'oxygène et stimule ainsi la production d'acide citrique. La modélisation du réseau métabolique de *Y. lipolytica*, décrit à l'échelle du génome, par dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) a permis d'identifier l'accumulation des espèces oxydantes dites ROS (Reactive Oxygen Species) comme un levier majeur de la bascule respiro-fermentaire et donc de la production d'acide citrique chez la levure *Y. lipolytica*. De plus, nos résultats préliminaires montrent que l'oxydation des lipides accumulés par *Y. lipolytica* pourrait être à l'origine de la génération des ROS. Cette étude doit être approfondie expérimentalement et constitue un apport important pour l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

Title: Modeling respiratory to fermentative switch in eukaryotic cells: application to citrate production in yeast *Yarrowia lipolytica*

Keywords: Eucaryotic cell metabolism, Modeling, Respiratory to fermentative switch, Citrate, *Yarrowia lipolytica*

Abstract: The main goal of this thesis is to study and characterize mechanisms involved in respiratory to fermentative shift in eukaryotic cells endowed with mitochondrial metabolism. Eukaryotic cells have different oxygen requirements for energy production and survival in a given environment. They are described as strict aerobic when the presence of oxygen is necessary or optional aero-anaerobic in when oxygen is not essential for energy production. The yeast *Yarrowia lipolytica* was chosen as our study model thanks to its particularity since it is a strict aerobic microorganism with a high capacity to accumulate lipids and to produce organic acids. Experimental and analytical studies, using mathematical methods for modeling cell metabolism, allowed us to identify metabolic constraints involved in respiratory to fermentative transition in this yeast showing oxidative energy metabolism. Production of citric acid by *Y. lipolytica*, already reported in the literature, has been chosen as a marker for this in respiratory to fermentative shift.

We found that the inhibition of the alternative oxidase protein (AOX) involved in mitochondrial respiration, by adding n-Propyl gallate (nPG) molecule improves the yield of citric acid production by fermentation of glucose in a *Y. lipolytica* culture. These results show that nPG, already used in food and pharmaceutical industry as a preservative, plays on respiratory to fermentative balance by inhibition of oxygen consumption and thus stimulates the production of citric acid. Modeling of the metabolic network of *Y. lipolytica*, described at genome-scale, by dynamic Flux Balance Analysis (FBA) has identified the accumulation of intracellular ROS (Reactive Oxygen Species) species as major levers for respiratory to fermentative shift and therefore the production of citric acid by *Y. lipolytica*. Therefore, our preliminary results show that oxidation of lipids accumulated by *Y. lipolytica* could be involved in generation of ROS species. This study must be experimentally deepened and constitutes an important contribution for the food and pharmaceutical industry.

