



HAL
open science

**Modulation par approches microbiologique et génétique
de la synthèse d'acide acétique lors de la production
d'éthanol sous métabolisme oxydo-réductif chez
Saccharomyces cerevisiae**

Jillian Marc

► **To cite this version:**

Jillian Marc. Modulation par approches microbiologique et génétique de la synthèse d'acide acétique lors de la production d'éthanol sous métabolisme oxydo-réductif chez *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2013. Français. NNT : 2013ISAT0051 . tel-04416476

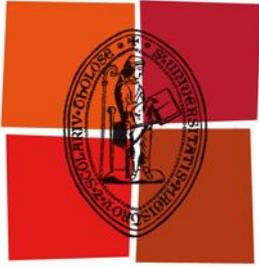
HAL Id: tel-04416476

<https://theses.hal.science/tel-04416476>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

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

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

Discipline ou spécialité :
Ingénieries Enzymatique et Microbienne

Présentée et soutenue par :
Jillian MARC

Le : 26 septembre 2013

Titre :
Modulation par approches microbiologique et génétique
de la synthèse d'acide acétique lors de la production d'éthanol
sous métabolisme oxydo-réductif chez *Saccharomyces cerevisiae*

Jury :

M ^{me} Catherine Béal	Pr. AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapporteur
M. Frank Delvigne	Pr. associé, Université de Liège	Rapporteur
M. Jean-Claude Sigoillot	Pr. ESIL, Luminy	Rapporteur
M ^{me} Carole Camarasa	C.R. INRA, Montpellier	Examineur
M ^{me} Carole Molina-Jouve	Pr. INSA, Toulouse	Président du Jury
M. Stéphane Guillouet	M.d.C. INSA, Toulouse	Directeur de thèse

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

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

Directeur de thèse : M.d.C. Stéphane Guillouet

Rapporteurs : M^{me} C. Béal, M. F. Delvigne, M. J.-C. Sigoillot

Résumé du manuscrit

L'objectif de ces travaux de thèse était de rechercher un potentiel effet inhibiteur de l'acide acétique endogène sur le métabolisme oxydo-réductif de *Saccharomyces cerevisiae*, afin d'évaluer la pertinence d'une stratégie d'amélioration des capacités de production d'éthanol par la modulation de la synthèse de cet acide. Ces travaux devaient également permettre d'approfondir la compréhension des principaux facteurs commandant la synthèse de l'acide acétique et plus largement des acides organiques. La stratégie de modulation de la synthèse d'acide acétique mise en place reposait sur des approches microbiologique et génétique, consistant en l'ajout d'acide oléique et / ou de carnitine dans le milieu de culture ainsi que la surexpression du gène *CIT2* ou la suppression du gène *ALD6*.

Cette démarche a permis de montrer que, contrairement à la version exogène, l'acide acétique endogène ne présentait pas d'effet inhibiteur du métabolisme oxydo-réductif de *Saccharomyces cerevisiae* ou qu'il était négligeable par rapport au stress éthanol. En outre, la modulation de la production de cet acide ne semble pas être une stratégie envisageable en vue de l'amélioration des capacités de production d'éthanol de cette levure, bien qu'une corrélation ait été observée entre les titres finaux de ces deux molécules.

En outre, il a été montré que l'isoforme 6 de l'acétaldéhyde déshydrogénase (Ald6p) était essentiel pour assurer la croissance cellulaire normale ainsi que les mécanismes de résistance au stress éthanol dans ces conditions de culture. Plus largement, l'interrelation entre les différents isoformes ne paraissait pas aussi flexible qu'en anaérobiose. *Saccharomyces cerevisiae* semblait également présenter un métabolisme flexible en réponse à une modulation de la synthèse d'acide acétique. La voie des pentoses-phosphates serait ainsi capable de prendre le relais de l'Ald6p pour assurer la régénération du NADPH cytosolique, bien que le flux à travers cette voie semble avoir été limité par le ratio $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. Enfin, les cellules paraissaient capables de réguler la synthèse de l'acétyl-coA à partir d'acide acétique en réaction à une évolution des besoins anaboliques lors de la fin de la phase de croissance. Elles seraient toutefois incapables de pallier le manque d'acétyl-coA suite à la suppression du gène *ALD6*. La modulation de la synthèse des acides pyruvique et succinique a également fait l'objet de discussions.

Mots clefs

Saccharomyces cerevisiae ; Fermentation alcoolique ; Acétate ; Pyruvate ; Succinate ; NADPH ; Acétyl-coA ; Acétaldéhyde déshydrogénase ; Effet Crabtree ; Carnitine-acétyl transférase.

Summary

The aim of this work was to investigate a potential inhibitory effect of endogenous acetic acid on the oxido-reductive metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, to assess the relevance of a strategy based on the modulation of the synthesis of this acid, to improve ethanol production capacities. This work should also help to broaden the understanding of the main factors controlling the synthesis of acetic acid, and more generally organic acids. The strategy to modulate the synthesis of acetic acid was based on microbiological and genetic approaches, consisting in the addition of oleic acid and / or carnitine in the medium as well as the overexpression of the gene CIT2 or the deletion of the gene ALD6.

This approach has shown that, contrary to exogenous version, endogenous acetic acid did not induce inhibitory effects on the oxido-reductive metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, or was negligible compared to stress caused by ethanol. Moreover, the modulation of the synthesis of this acid appear to be not an attractive strategy to improve ethanol production capacities of the yeast, although a correlation was observed between the end-culture titer of these two molecules.

In addition, it has been shown that the isoform 6 of acetaldehyde dehydrogenase (Ald6p) was essential to ensure regular growth and mechanisms of ethanol stress resistance under these conditions of culture. More broadly, the interrelation between the different isoforms did not seem as flexible as under anaerobic conditions. *Saccharomyces cerevisiae* also seemed to have a flexible metabolism in response to a modulation of the synthesis of acetic acid. The pentose-phosphate way would be able to take over from Ald6p for regeneration of cytosolic NADPH, although the ratio NADP+ / NADPH seemed to lessen the flux through this pathway. Finally, the cells appeared to be able to regulate the synthesis of acetyl-CoA from acetic acid in response to changing in anabolic needs at the end of the growth phase. However, yeasts would be unable to overcome the lack of acetyl-CoA following the suppression of the gene ALD6. The modulation of the synthesis of pyruvic and succinic acids has also been discussed.

Key words

Saccharomyces cerevisiae; Alcoholic fermentation; Acetate; Pyruvate; Succinate; NADPH; Acetyl-coA; Acetaldehyde dehydrogenase; Crabtree effect; Carnitine-acetyl transferase

« Les hommes simplifient le monde par le langage et la pensée, ainsi ils ont des certitudes ; et avoir des certitudes est la plus puissante volupté en ce monde, bien plus puissante que l'argent, le sexe et le pouvoir réunis. Le renoncement à une véritable intelligence est le prix à payer pour avoir des certitudes, et c'est toujours une dépense invisible à la banque de notre conscience »

Martin Page, *Comment je suis devenu stupide*

« Ma première expérience dans le domaine se situe de nombreuses années avant que je ne sois devenu père moi-même »

Fitzhugh Dodson, *Le père et son enfant*

Remerciements

Ce manuscrit est le fruit mûri de longues années de cultures expérimentales, intellectuelles et humaines. Il n'aurait pas pu être cueilli sans l'aide précieuse de nombreuses personnes, que je souhaite remercier très chaleureusement et très sincèrement ici.

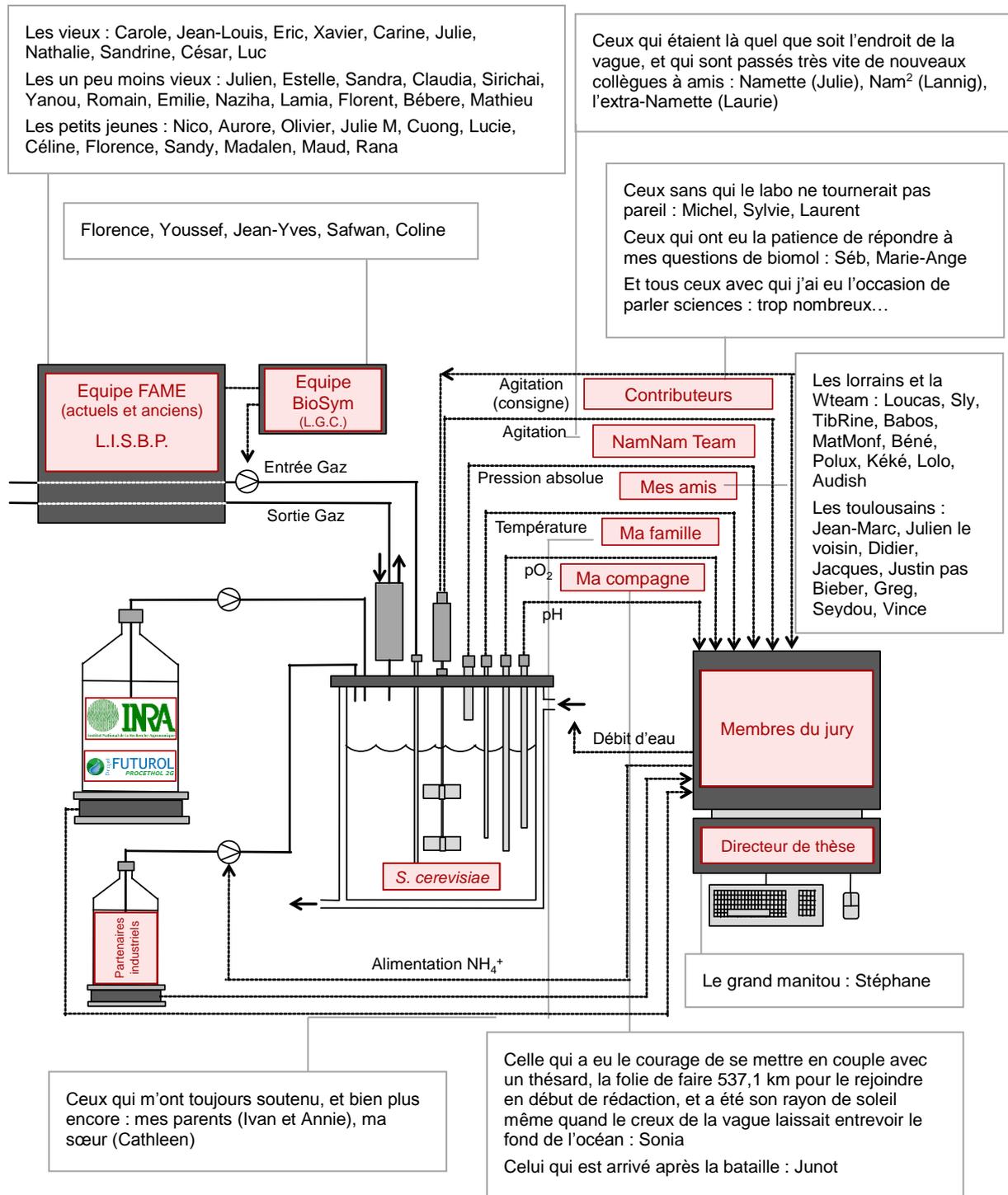


Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART	11
11. LES METABOLISMES DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	15
12. ROLES DES ALCOOLS DANS LE METABOLISME	26
13. ROLES DE LA SYNTHSE DES ACIDES ORGANIQUES	34
14. EFFET DES ACIDES ORGANIQUES SUR LE METABOLISME	45
CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES	61
21. METHODES DE CULTURE	65
22. TECHNIQUES ANALYTIQUES	72
23. TRAITEMENT DES DONNEES	80
24. REPRODUCTIBILITE DES CULTURES	93
CHAPITRE 3 ETUDE DE L'IMPACT DE L'ACIDE OLEIQUE	97
31. INTRODUCTION	101
32. PUBLICATION SCIENTIFIQUE	103
33. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	117
34. DISCUSSIONS	126
CHAPITRE 4 ETUDE DU SYSTEME CAT	135
41. INTRODUCTION	139
42. RESULTATS	141
43. DISCUSSIONS	153
CHAPITRE 5 ETUDE DE LA SUREXPRESSION DU GENE <i>CIT2</i>	161
51. INTRODUCTION	165
52. RESULTATS	167
53. DISCUSSIONS	177
CHAPITRE 6 ETUDE DE LA SUPPRESSION DU GENE <i>ALD6</i>	185
61. INTRODUCTION	189
62. RESULTATS	190
63. DISCUSSIONS	203
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	213
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXE	
ABREVIATIONS	

Table des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Cibles des stratégies de modulation de la synthèse d'acide acétique mises en œuvre au cours des travaux de thèse.	6
Figure 2 : Métabolisme du glucose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	16
Figure 3 : Concept de la capacité respiratoire limite.	19
Figure 4 : Transport du pyruvate et de l'acétyl-coA vers la mitochondrie chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	24
Figure 5 : Mécanismes imputés au stress éthanol dans la littérature.	27
Figure 6 : Les principaux systèmes de transport du pouvoir réducteur chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : la navette éthanol, les déshydrogénases mitochondriales et la navette glycérol.	33
Figure 7 : Places et réactions des différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase.	35
Figure 8 : Le systèmes de transport du NADPH chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proposé par Castegna et al., 2010.	36
Figure 9 : Les deux types de fonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques : cycle oxydatif ou branches oxydative et réductive.	40
Figure 10 : Les trois voies de métabolisation de l'acide pyruvique.	41
Figure 11 : Les différents types de transport des acides faibles chez les levures.	45
Figure 12 : Phénomène de simple diffusion des acides faibles à travers la membrane plasmique, selon l'équation d'Henderson-Hasselbach.	46
Figure 13 : Le mécanisme de l'ATPase à protons induisant l'effet découplant des acides faibles.	49
Figure 14 : Equilibre du dioxyde de carbone entre les milieux intra et extracellulaires.	51
Figure 15 : Mécanisme d'action du transporteur Pdr12p.	54
Figure 16 : Exemple d'évolution de la concentration en glucose dans le bioréacteur.	68
Figure 17 : Profil de l'activité spécifique de la Catp en fonction de la concentration en L-carnitine, en condition in-vitro saturante en acétyl-coA.	69
Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental.	71
Figure 19 : Estimation de la vitesse volumique d'évaporation de l'éthanol en maquette froide.	76
Figure 20 : Evolution du taux de croissance et des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu de culture, lors de deux cultures aérobies de <i>S. cerevisiae</i> en excès de glucose.	94
Figure 21 : Changes in the ethanol concentration and RQ upon a glucose pulse (10 g L^{-1}) at the steady state of glucose limited chemostat of strain CA10/pCD63 and CEN.PK 113-7D on glucose in absence or in presence of an oleic acid.	109
Figure 22 : Specific ethanol production rate and biomass yield during A-stat cultivations on glucose in absence or presence of oleic acid feeding at $D_{ole}=0.0073\text{h}^{-1}$.	110
Figure 23 : Specific ethanol production rate is given as a function of the specific consumption rates of glucose and the specific consumption rate of carbon during A-stat cultivations on glucose in absence or presence of oleic acid feeding at $D_{ole}=0.0073\text{h}^{-1}$.	111
Figure 24 : Concentration of ethanol during aerobic batch cultivations of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D.	112
Figure 25 : Evolution of biomass and ethanol cumulated masses during aerobic fed-batch cultivations of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CENPK 113-7D, under glucose-excess with non-adapted cells and under glucose-oleate-excess with adapted cells.	113
Figure 26 : Evolutions of the gain in biomass yield as a function of the growth rate and the loss in ethanol yield as a function of the specific rate of ethanol production during aerobic fed-batch cultivations of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D.	115
Figure 27 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique.	117

Figure 28 : Evolution du taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique. _____	119
Figure 29 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique. _____	120
Figure 30 : Evolution du rendement en CO ₂ sur éthanol produits et du rendement en O ₂ sur glucose consommés en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique. _____	121
Figure 31 : Evolution des rendements en glycérol, acide acétique, acide succinique et acide pyruvique produits sur glucose consommé en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique. _____	122
Figure 32 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme centrale du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose plus acide oléique. _____	123
Figure 33 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures sur glucose seul et sur glucose plus acide oléique. _____	124
Figure 34 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD ⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures sur glucose seul et sur glucose plus acide oléique. _____	125
Figure 35 : Evolution des masses cumulées lors de la culture discontinue alimentée en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	141
Figure 36 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	143
Figure 37 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	144
Figure 38 : Evolution du taux de croissance et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	145
Figure 39 : Evolution du taux de croissance et des activités spécifiques des acétaldéhyde déshydrogénases NADP ⁺ dépendante, et NAD ⁺ dépendante, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	146
Figure 40 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	146
Figure 41 : Evolution des masses cumulées lors de la culture discontinue alimentée en excès de glucose plus acide oléique, supplémentée en carnitine. _____	147
Figure 42 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls ou supplémentée en carnitine. _____	149
Figure 43 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls ou supplémentée en carnitine. _____	150
Figure 44 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide succinique en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls ou supplémentée en carnitine. _____	151
Figure 45 : Evolution du taux de croissance et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique et en excès de glucose plus acide oléique supplémentée en carnitine. _____	151
Figure 46 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique et en excès de glucose plus acide oléique supplémentée en carnitine. _____	152
Figure 47 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose de la souche CIT2+. _____	167
Figure 48 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, et du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction de la	

concentration en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	170
Figure 49 : Evolution des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	171
Figure 50 : Evolution du rendement en CO ₂ sur éthanol produits et de la vitesse spécifique de consommation d'O ₂ en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	171
Figure 51 : Evolution du taux de croissance et de l'activité spécifique de la citrate synthase, lors des cultures discontinues alimentées de la souche WT et de la souche CIT2+.	172
Figure 52 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine.	173
Figure 53 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	174
Figure 54 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD ⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures des souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	175
Figure 55 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures des souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.	176
Figure 56 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose des souches BY4741 et ΔALD6.	190
Figure 57 : Evolution des taux de croissance viable et apparent et des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et ΔALD6.	193
Figure 58 : Evolution des vitesses spécifiques de production d'acide acétique et de glycérol en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et ΔALD6.	194
Figure 59 : Evolution du rendement en biomasse produite sur glucose consommé ainsi que des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de production de glycérol, en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et ΔALD6.	195
Figure 60 : Evolution des activités spécifiques des acétaldéhyde déshydrogénases NADP ⁺ dépendante et NAD ⁺ dépendante, ainsi que du taux de croissance et de l'activité spécifique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase chez les souches BY4741 et ΔALD6.	196
Figure 61 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose des souches BY4741 et ΔALD6.	197
Figure 62 : Evolution du profil de viabilité, de la vitesse spécifique de production d'acide acétique, ainsi que du CO ₂ dissous et du pourcentage en phospholipides des cellules calculé, en fonction de la concentration en éthanol, chez BY4741 et ΔALD6.	198
Figure 63 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et ΔALD6.	199
Figure 64 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures des souches BY4741 et ΔALD6.	200
Figure 65 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD ⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures des souches BY4741 et ΔALD6.	201
Figure 66 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et ΔALD6.	202
Figure 67 : Vitesse spécifique de consommation d'oxygène en fonction de la vitesse spécifique de production d'acide acétique pour les différentes expériences.	219
Figure 68 : Concentration en éthanol en fin de croissance (Pcritique) en fonction de la concentration en acide acétique en fin de croissance pour les différentes expériences.	221

Figure 69 : Evolution des flux normés des réactions régénératrices du NADPH cytosolique et de leur importance relative chez la souche BY4741. _____	224
Figure 70 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique et du taux de croissance en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose pour les différentes cultures. _____	226
Figure 71 : Evolution du rendement en acide acétique produit sur glucose consommé en fonction du taux de croissance chez les souches BY4741 et Δ ALD6. _____	227
Figure 72 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase, lors des cultures discontinues alimentées de WT en excès de glucose seul et en excès de glucose supplémentée en carnitine. _____	227
Figure 73 : Evolution de la vitesse d'accumulation intracellulaire en fonction du taux de croissance chez la souches BY4741. _____	228
Figure 74 : Répartition du pyruvate entre les flux de la pyruvate déshydrogénase et de la pyruvate carboxylase en fonction de la vitesse spécifique de production d'acide acétique et du rendement en acide acétique produit sur biomasse formée, chez les souches WT, CIT2+, BY4741, Δ ALD6 et WT en présence d'acide oléique. _____	229
Figure 75 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide pyruvique en fonction du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation de glucose lors des différentes cultures. _____	230
Figure 76 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide succinique en fonction de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène chez la souche WT, cultivée sur glucose seul, glucose plus acide oléique et glucose plus acide oléique supplémenté en carnitine. _____	231

Tableaux

Tableau 1 : Principaux résultats de la modulation de la synthèse de glycérol. _____	30
Tableau 2 : Récapitulatif des souches étudiées. _____	65
Tableau 3 : Temps de rétention, seuils de détection et de quantification et gammes de linéarité des composés dosés par chromatographie. _____	74
Tableau 4 : Formules, masses molaires et degrés de réduction généralisés (γ) des composés intervenant dans les calculs de bilan. _____	85
Tableau 5 : Paramètres de cultures de deux expériences réalisées dans des conditions identiques. _____	93
Table 6 : Summary of the different experiments carried out in the present study (publication). _____	106
Table 7 : Final concentrations, global yields and maximal specific rates obtained during aerobic fed-batch cultivations of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D under glucose or glucose-oleate-excess conditions. _____	114
Tableau 8 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose et en excès de glucose plus acide oléique. _____	118
Tableau 9 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec ou sans carnitine. _____	142
Tableau 10 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique, avec ou sans carnitine. _____	148
Tableau 11 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+. _____	168
Tableau 12 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et Δ ALD6. ____	192
Tableau 13 : Récapitulatif des rendements et des vitesses spécifiques de production d'acide acétique obtenus lors des différentes cultures. _____	218
Tableau 14 : Récapitulatif des principaux paramètres de production d'éthanol. _____	220

Introduction générale

Suite à l'augmentation relativement récente et rapide de la population humaine et de l'activité qui en découle au sens large, la Terre subit un phénomène de réchauffement climatique aux enjeux sans précédent. L'immense majorité du monde scientifique s'accorde aujourd'hui pour imputer principalement ce réchauffement aux gaz à effet de serre et, ainsi, en grande partie à l'utilisation outrancière d'énergies fossiles. Dès lors, la recherche et le développement d'un bouquet d'énergies alternatives dites renouvelables se sont avérés essentiels.

Avec 83,3 millions de tonnes produites en 2011 au niveau mondial (calculs DGCCRF d'après source OCDE), l'éthanol carburant est considéré comme l'une de ces énergies renouvelables. Cette molécule est généralement produite par des microorganismes à partir de biomasse. Il en existe trois générations. La première, utilisant les organes de réserve carbonée des plantes, est déjà commercialisée dans certains pays, dont la France, sous forme pure ou mélangée à l'essence traditionnelle. Les analyses de cycle de vie développées par l'ADEME (février 2010) semblent lui conférer un intérêt certain pour la diminution de l'utilisation d'énergies fossiles, bien que l'ensemble de la communauté scientifique ne soit pas forcément en accord avec ce type de conclusions. En outre, cette génération est fortement critiquée pour sa concurrence en terme de matières premières vis-à-vis des cultures vivrières, pouvant mener à un impact négatif au niveau social et de la souveraineté alimentaire des Etats producteurs, comme par exemple au Brésil.

L'éthanol de deuxième et de troisième générations, produit respectivement par des levures à partir de plantes entières ou de déchets végétaux (matière ligno-cellulosique) et à partir du dioxyde de carbone (microorganismes photosynthétiques) est quant à lui toujours au stade de recherche et développement. La mise au point de la deuxième génération est en effet plus délicate que la première puisqu'elle utilise aussi bien les parties ligno-cellulosiques des plantes que les substrats carbonés de réserve, dévoilant ainsi de nouveaux verrous scientifiques. Outre les problématiques liées à l'extraction des oses de la ligno-cellulose, une production d'éthanol dans ces conditions nécessite la transformation efficace des oses à cinq et six carbonés, notamment le xylose et le glucose. *Saccharomyces cerevisiae*, la levure référence pour la synthèse d'éthanol, est extrêmement compétente pour métaboliser les hexoses mais présente plus de difficultés avec les pentoses, pour lesquels on lui préfère d'autres genres comme *Candida* ou *Pichia*. Sur glucose, *Saccharomyces cerevisiae* est ainsi capable d'atteindre des rendements et des titres finaux en éthanol élevés grâce à des mécanismes efficaces de résistance au stress éthanol.

Cette levure a été particulièrement étudiée par génie microbiologique, génétique et métabolique. Elle fait ainsi figure de modèle eucaryote dans de nombreux domaines de recherche, allant des bioprocédés à la recherche médicale. Elle présente la particularité d'être soumise à l'effet Crabtree et, par là, d'être capable de produire de l'éthanol aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène. Cet effet demeure cependant toujours obscur car les mécanismes conduisant à la production aérobie d'éthanol sont particulièrement complexes. A cette date, les scientifiques l'expliquent par la théorie de la capacité respiratoire limite (Käppeli & Sonnleitner, 1986). D'après ce modèle boîte noire, la production d'éthanol serait ainsi due à une capacité limitée de la levure à

métaboliser l'acide pyruvique provenant de la glycolyse, *via* un ensemble de réactions biochimiques incluant le métabolisme mitochondrial et le by-pass de la pyruvate déshydrogénase.

Outre l'éthanol, l'apparition de l'effet Crabtree conduit à l'excrétion d'autres métabolites comme le glycérol et les acides organiques. Le premier est un polyol dont les facteurs biologiques commandant la production sont aujourd'hui relativement bien connus. Il permet ainsi aux cellules de gérer leur équilibre rédox par la réoxydation du NADH et de lutter contre les stress environnementaux, plus particulièrement le stress osmotique. Plusieurs études portant sur la réduction de la synthèse de cette molécule ont permis d'améliorer les capacités de production d'éthanol, principalement au niveau du rendement sur substrat consommé.

En regard du glycérol, les acides organiques ont quant à eux été peu étudiés. En conditions de production d'éthanol, *Saccharomyces cerevisiae* produit principalement de l'acide acétique et, dans une moindre mesure et selon les souches, des acides pyruvique, succinique, malique et fumarique. Ces molécules sont réputées toxiques pour les cellules de part leur caractère acide. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence un impact négatif de l'acide acétique exogène sur la croissance cellulaire. Lorsqu'il est ajouté au milieu de culture, celui-ci aurait en effet pour conséquence de déréguler le pH intracellulaire, de découpler la production d'énergie de celle de la biomasse, d'augmenter la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène et d'induire un signal apoptotique. Dans ce cas, *Saccharomyces cerevisiae* semble alors capable de mettre en œuvre des mécanismes de réponse au stress acide. Il a en outre été démontré qu'elle peut s'adapter au stress acétate, bien que les mécanismes impliqués demeurent inconnus. Néanmoins, il faut noter que certaines études ont rapporté une amélioration des capacités de production d'éthanol suite à l'ajout d'acide acétique.

En revanche, peu d'études ont traité spécifiquement des acides endogènes. De ce fait, de nombreuses zones d'ombre subsistent quant à leur éventuel impact sur le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, les travaux de Pagliardini (2010) sur la modulation de glycérol pourraient laisser penser que l'acide acétique présente effectivement un impact négatif sur la biomasse. Après l'arrêt de la production d'éthanol entre 112 et 117 g L⁻¹ en fin de cultures discontinues alimentées aérobies en excès de glucose, la chute de la viabilité des cellules s'est en effet poursuivie et semblait corrélée à l'augmentation de la concentration en acide acétique dans le milieu de culture. Cependant, aucune autre étude spécifique n'a rapporté un tel impact de l'acide acétique synthétisé sur les cellules.

Outre leur effet inhibiteur sur la croissance, les mécanismes biologiques conduisant à la production des acides organiques sont également mal connus. Ceux-ci semblent particuliers à chaque acide, puisqu'ils occupent chacun une place stratégique différente dans le réseau métabolique. L'acide acétique est ainsi notamment présent dans le by-pass de la pyruvate déshydrogénase et source importante de NADPH, de NADH et d'acétyl-coenzyme A. L'acide pyruvique est quant à lui situé à un carrefour métabolique en fin de glycolyse, distribuant le carbone entre le métabolisme mitochondrial et la voie fermentaire. Enfin, les acides succinique, malique et fumarique sont principalement localisés au niveau du cycle des acides tricarboxyliques, fournisseur notamment de précurseurs métaboliques pour l'anabolisme.

Afin d'expliquer le phénomène d'excrétion des acides organiques, la communauté scientifique a longtemps avancé l'hypothèse d'un flux de synthèse de ces molécules trop important pour être géré par les enzymes situées juste en aval. Toutefois, la surexpression des deux isoformes de l'acétyl-coA synthase, permettant de transformer l'acide acétique en acétyl-coA, n'a pas permis de réduire la production de cet acide (de Jong-Gubbels et al., 1998). En outre, une étude de la synthèse d'acide succinique par marquage du glucose au ^{13}C a montré qu'en anaérobiose, cet acide était produit à cause d'un fonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques de manière branchée et non plus cyclique (Camarasa et al., 2003). Ces études remettent donc en cause l'hypothèse première d'un flux de synthèse trop important de ces acides organiques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont donc eu pour objectif d'éclaircir le rôle des acides organiques synthétisés lors de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que d'appréhender leur potentiel effet inhibiteur du métabolisme microbien. Pour y parvenir, l'idée directrice a été de moduler la synthèse de ces acides et plus particulièrement de l'acide acétique par des stratégies variées. Cette démarche a ainsi permis d'apporter des éléments de réponses aux problématiques suivantes :

- L'acide acétique endogène présente-t-il un effet inhibiteur sur le métabolisme oxydo-réductif chez *Saccharomyces cerevisiae* ? Est-il ainsi possible de moduler sa production dans le but d'améliorer les capacités de production d'éthanol ainsi que sa tolérance aux stress ?
- Quels sont les principaux facteurs commandant la synthèse d'acide acétique et plus généralement celle des acides organiques ? Permettent-ils une flexibilité du métabolisme à ce niveau ?

Les stratégies de modulation de la production d'acide acétique mises en œuvre ici ont fait appel à des approches microbiologique et génétique. L'ajout d'agents modulateurs du métabolisme comme l'acide oléique et la carnitine devaient ainsi permettre d'influer principalement sur le transport de l'acétyl-coA à travers la membrane mitochondriale. De plus la surexpression du gène *CIT2*, connu pour être impliqué dans les mécanismes de résistance au stress acétate, pourrait mener à une diminution de la production d'acide acétique comme déjà observé lors de l'effet Crabtree « court terme ». Enfin la suppression du gène *ALD6*, codant pour l'isoforme majeur de l'acétaldéhyde déshydrogénase, permettrait d'étudier plus particulièrement la flexibilité du métabolisme au niveau de la synthèse d'acétyl-coA et de la régénération du NADPH.

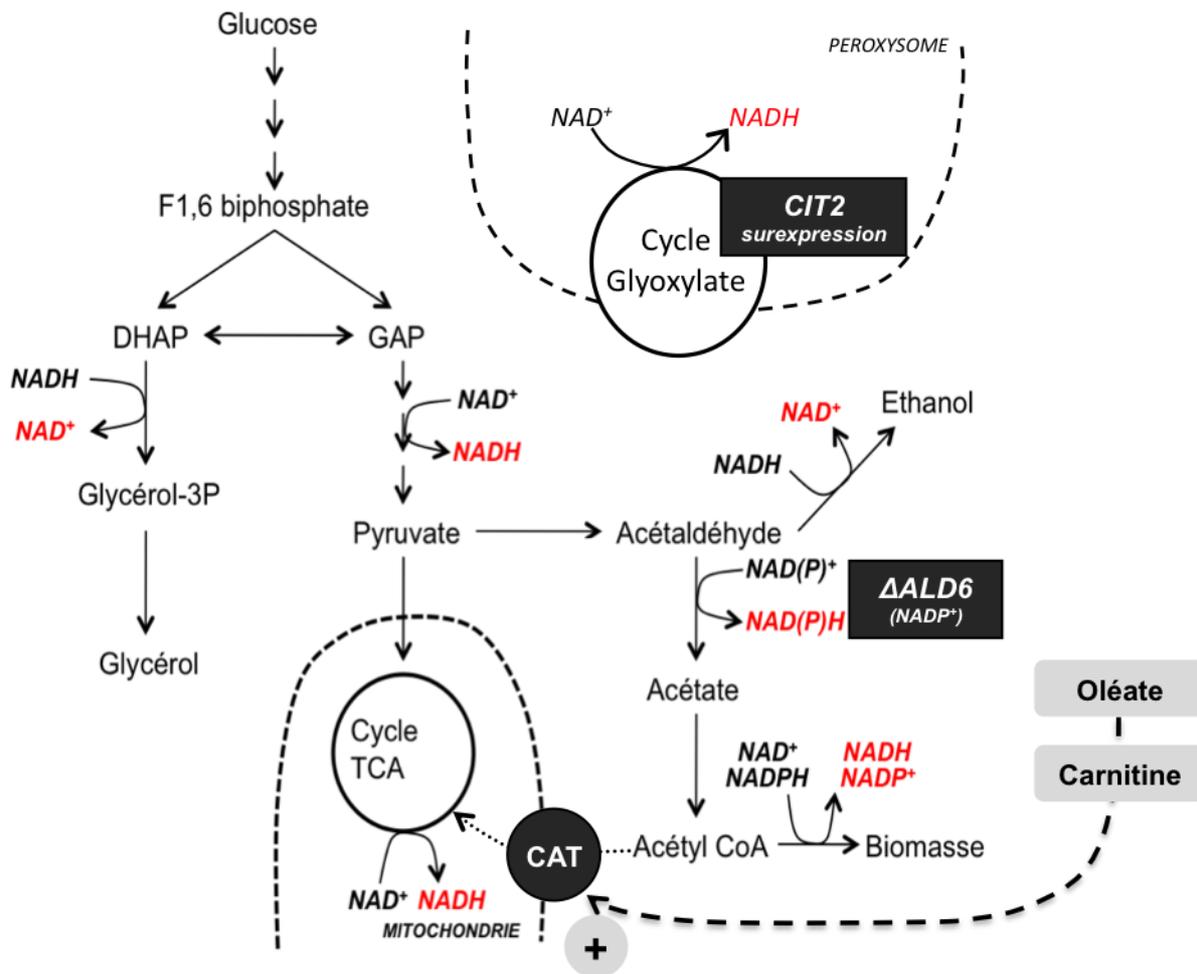


Figure 1 : Cibles des stratégies de modulation de la synthèse d'acide acétique mises en œuvre au cours des travaux de thèse.

Ce manuscrit a été rédigé en sept parties. Le chapitre 1 décrit l'état de l'Art vis-à-vis des problématiques posées. Il présente la physiologie générale de *Saccharomyces cerevisiae* et le rôle biologique des alcools produits, ainsi que l'effet de la modulation de la production de glycérol. Les informations disponibles à propos du rôle biologique des acides organiques endogènes sont également exposées, ainsi que l'impact des acides exogènes sur le métabolisme et les mécanismes de réponse mis en place par la levure.

Le chapitre 2 présente les souches, le matériel, les stratégies de conduite de culture et les techniques analytiques utilisés afin de mener à bien les différentes expériences. Une caractérisation de la reproductibilité des cultures y est également détaillée.

Les chapitres 3 à 6 sont une analyse des rendements, des cinétiques macroscopiques et de l'estimation des flux intracellulaires obtenus lors des différentes expériences.

Le chapitre 3 est une étude de l'impact de l'acide oléique sur l'effet Crabtree « long terme » observé chez la souche sauvage. Une partie de ce chapitre est rédigé sous forme de publication scientifique reprenant également des résultats d'autres études en cultures continues et en accélérostat.

Le chapitre 4 regroupe plusieurs cultures permettant d'étudier le système enzymatique de la carnitine-acétyl transférase, un transporteur mitochondrial de l'acétyl-coA, en condition de production d'éthanol aérobie avec ajout d'acide oléique et / ou de carnitine.

Le chapitre 5 analyse l'effet d'une augmentation de la production d'acide acétique sur le métabolisme oxydo-réductif de la levure suite à la surexpression du gène *CIT2*, codant pour une citrate synthase non mitochondriale.

Le chapitre 6 étudie l'impact de la suppression du gène *ALD6*, codant pour l'isoforme majeur de l'acétaldéhyde déshydrogénase, sur le métabolisme de la levure et son profil de viabilité. Il permet également de discuter la flexibilité de l'apport en NADPH et en acétyl-coA.

Enfin, le dernier chapitre rapproche les résultats des différents chapitres, menant ainsi à une discussion générale permettant de répondre aux problématiques posées par l'étude de l'état de l'Art. Des perspectives de travail y sont également proposées.

Chapitre 1

Etat de l'Art

CHAPITRE 1 ETAT DE L'ART	11
11. LES METABOLISMES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	15
111. PHYSIOLOGIE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUR GLUCOSE	15
1111. Métabolisme purement oxydatif	15
1112. Métabolisme anaérobie	17
1113. Effet Crabtree	18
112. PHYSIOLOGIE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUR ACIDE OLEIQUE	19
1121. Métabolisation des acides gras	20
1122. L'acide oléique et l'expression génique	20
113. LE TRANSPORT DU CARBONE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE	21
1131. Le système de la carnitine acétyl-transférase	21
1132. Le système du cycle du glyoxylate	22
1133. Le système de l' α -isopropylmalate synthase	25
12. ROLES DES ALCOOLS DANS LE METABOLISME	26
121. L'ETHANOL, PRODUIT MAJEUR DU METABOLISME OXYDO-REDUCTIF	26
1211. Implication dans la balance oxydo-reductive cytosolique	26
1212. Le stress éthanol	26
122. LE DOUBLE ROLE DU GLYCEROL DANS LE METABOLISME OXYDO-REDUCTIF	28
1221. Implication dans la balance oxydo-reductive cytosolique	28
1222. Implication dans la réponse aux stress environnementaux	28
1223. Impact de la modulation de la synthèse de glycérol	29
123. LE TRANSFERT DU POUVOIR REDUCTEUR VERS LA MITOCHONDRIE	31
1231. La navette éthanol	31
1232. La navette glycérol	32
1232. Les déshydrogénases mitochondriales Nde1p et Nde2p	32
13. ROLES DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES ORGANIQUES	34
131. L'ACIDE ACÉTIQUE ET LA CROISSANCE MICROBIENNE	34
1311. Implication dans la balance oxydo-réductive	34
1312. L'acétique acétique et l'acétyl-coA chez <i>S. cerevisiae</i>	36
1313. Implication dans la réponse aux stress environnementaux	37
1314. Impact de la modulation de la synthèse d'acide acétique	38
132. LE RÔLE MECONNU DES ACIDES SUCCINIQUE ET PYRUVIQUE	39
1321. L'acide succinique et les cycles réactionnels	39
1322. Le nœud du pyruvate	41
14. EFFET DES ACIDES ORGANIQUES SUR LE METABOLISME	45
141. IMPACT DES ACIDES FAIBLES EXOGENES	45
1411. Transport et équilibre des acides faibles	45
1412. Gestion du pH intracellulaire par <i>S. cerevisiae</i>	47
1413. Effet découplant des productions d'énergie et de biomasse	48
1414. Conséquence indirecte de l'effet découplant	50
1415. Cas particulier du dioxyde de carbone	50
1416. Concentrations critiques et production de l'acide acétique	51
142. INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR L'ACIDE ACÉTIQUE	52
143. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ACIDES ORGANIQUES	54
1431. Régulation du pH intracellulaire et équilibre ionique	54
1432. Induction de systèmes de régulations de l'expression de gènes.	55
1433. Stratégies d'adaptation des cellules à l'acide acétique	57

11. LES METABOLISMES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Saccharomyces cerevisiae est une levure très utilisée au niveau industriel. Elle l’est depuis très longtemps pour la transformation alimentaire, notamment dans le domaine de la panification et de la production d’alcool (Piskur et al., 2006). Cette levure est également très répandue dans une large gamme de procédés technologiques, allant de la synthèse de protéines hétérologues à la production d’éthanol carburant.

Saccharomyces cerevisiae est également l’un des microorganismes dont le métabolisme est le plus décrit et détaillé dans des travaux scientifiques. Comme pour toutes les cellules celui-ci dépend, outre de la souche, de l’environnement dans lequel elle évolue. De nombreux facteurs sont à l’origine d’inhibitions ou de stimulations affectant tout ou partie du métabolisme microbien.

111. PHYSIOLOGIE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUR GLUCOSE

De manière générale, les levures sont capables d’utiliser le glucose comme seule source de carbone et d’énergie (Barnett, 1976). Chez *S. cerevisiae*, une levure Crabtree positive, le métabolisme de cet ose peut cependant se faire de trois manières différentes, dépendamment de l’apport en glucose et en oxygène (Figure 2).

1111. Métabolisme purement oxydatif

Sous certaines conditions environnementales n’exposant pas les cellules à une limitation en oxygène ou à des concentrations en glucose trop élevées (Verduyn et al., 1984), *S. cerevisiae* peut présenter un métabolisme oxydatif pur. A travers les voies de la glycolyse (ou voie d’Embden-Meyerhof-Parnas), du cycle des acides tricarboxyliques et de la phosphorylation oxydative, le glucose consommé est alors totalement oxydé en dioxyde de carbone et en eau, avec formation d’adénosine triphosphate (ATP). L’équation globale simplifiée en résultant est la suivante :



Équation 1 : Equation générale du métabolisme oxydatif du glucose

Dans un premier temps, le glucose est transporté dans le cytosol de la cellule, où il va être oxydé par la glycolyse jusqu’au stade du pyruvate. Ceci entraîne la synthèse de 2 moles d’ATP et la réduction de 2 moles de NAD^+ par mole de glucose. La régulation allostérique de cette voie se situe principalement au niveau de deux enzymes : la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. La première est activée par l’adénosine monophosphate

(AMP) et le fructose-2,6-diphosphate, mais inhibée par l'ATP et le citrate. La seconde est quant à elle activée par l'AMP et le fructose-1,6-diphosphate, mais inhibée par l'ATP, l'alanine et l'acétyl-co-enzyme A (acétyl-coA).

Le pyruvate est ensuite transporté du cytosol vers la matrice mitochondriale, où il est transformé en acétyl-coA pour entrer dans le cycle des acides tricarboxyliques, étape ultime du catabolisme des glucides. Ce cycle réactionnel assure la formation des précurseurs nécessaires au métabolisme anabolique de la cellule, mais aussi la réduction des cofacteurs oxydés, tels que le NAD^+ et le FAD (Rose & Harrison, 1971).

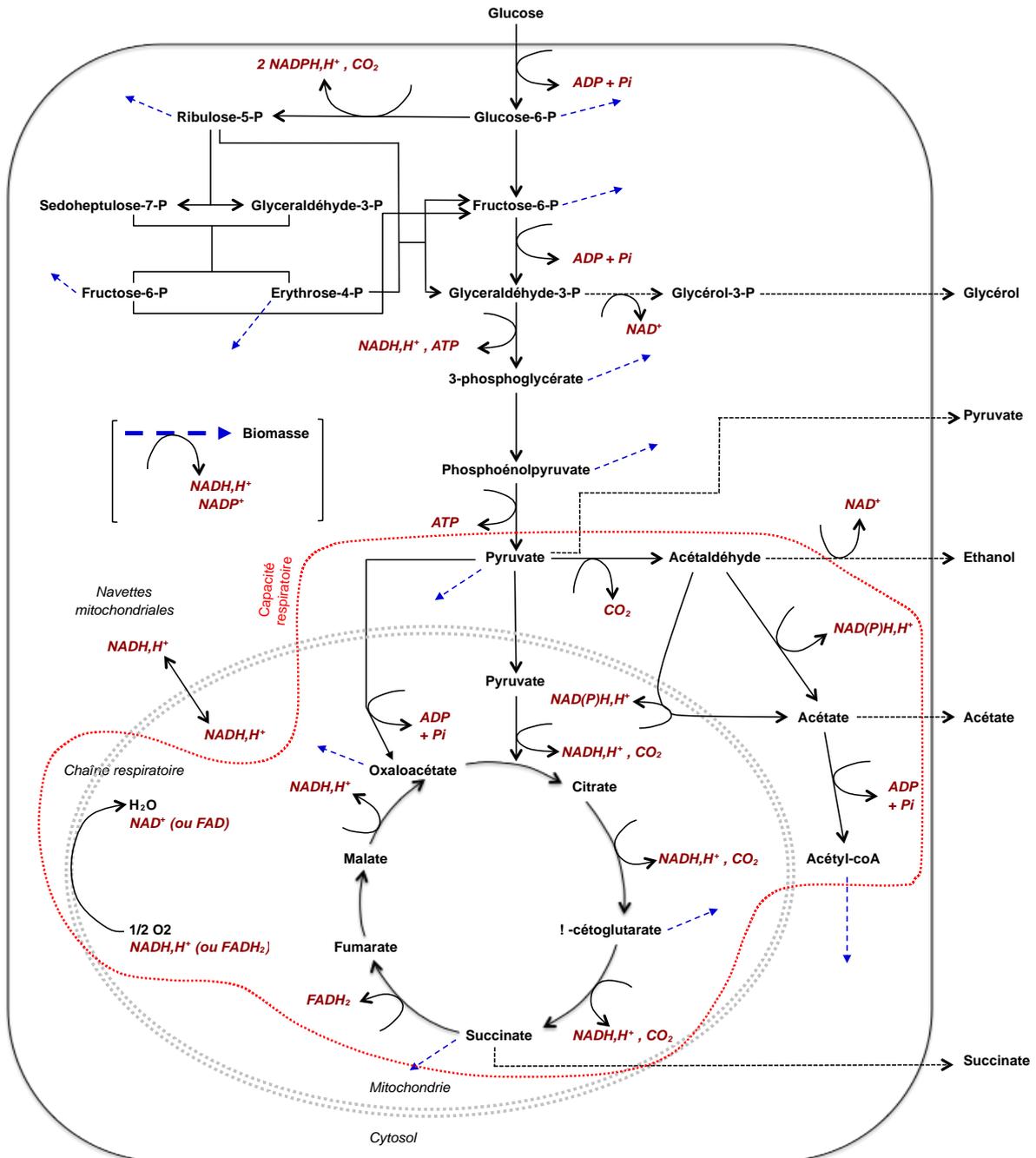


Figure 2 : Métabolisme du glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les excrétions de métabolites en flèches pointillées sont spécifiques au métabolisme fermentaire.

La capacité respiratoire est représentée par l'ensemble des réactions biochimiques incluses dans la zone délimitée par les pointillés.

Enfin, les cofacteurs précédemment réduits sont réoxydés lors de la phosphorylation oxydative. Les électrons ainsi libérés sont transférés le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'oxygène, jouant le rôle d'accepteur final d'électrons. Ce transfert induit un pompage des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire des mitochondries, créant ainsi un gradient de concentration en protons. La force protomotrice en découlant permet ainsi la phosphorylation d'ADP en ATP par l'ATP synthase membranaire (de Vries & Marres, 1987).

Cependant chez *S. cerevisiae*, la NADH déshydrogénase (Ndi1p ; Figure 6) ne permet pas d'exporter des protons. La réoxydation d'une mole de NADH, H⁺ ou de FADH₂ conduit donc à la formation d'une même quantité d'ATP. L'efficacité de cette voie peut être estimée de façon expérimentale par l'utilisation du ratio P/O (mole d'ATP formé par atome d'oxygène consommé), selon l'équation suivante :

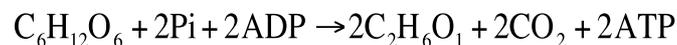


Équation 2 : Stœchiométrie globale de la phosphorylation oxydative

La valeur théorique limite du coefficient P/O est de 2. Cependant chez *S. cerevisiae*, la valeur expérimentale de ce coefficient est plutôt comprise entre 1,2 et 1,33, selon les conditions de croissance (van Gulik & Heijnen, 1995 ; Verduyn, 1992).

1112. Métabolisme anaérobie

En l'absence totale d'oxygène, *S. cerevisiae* n'est plus capable d'utiliser la phosphorylation oxydative comme source d'énergie. Elle modifie alors son métabolisme de façon à répondre à ses besoins énergétiques en produisant de l'éthanol, selon l'équation globale suivante :



Équation 3 : Equation générale du métabolisme anaérobie du glucose

Comme pour le métabolisme oxydatif, le glucose est d'abord principalement dégradé en pyruvate *via* la glycolyse. Une partie importante du carbone est alors envoyée vers la synthèse d'éthanol, avec un rendement théorique maximal de production de 0,511 g_{EtOH} g_{Glucose}⁻¹. Ceci permet ainsi de réoxyder les cofacteurs réduits lors de la glycolyse, tout en produisant 2 moles d'ATP par mole de glucose. Ce mécanisme de synthèse d'énergie est cependant beaucoup moins productif que la respiration aérobie, puisque la quantité de moles d'ATP formé par mole de glucose consommé chute de près de 95 % (Käppeli & Sonnleitner, 1986).

Dans ces conditions, le métabolisme mitochondrial n'a alors qu'un rôle purement anabolique pour fournir des précurseurs métaboliques, tels que l' α -cétoglutarate ou l'oxaloacétate. La levure produit cependant d'autres molécules, comme du glycérol à partir de glyceraldéhyde-3-P. Ce phénomène permet de réoxyder des cofacteurs réduits provenant de l'anabolisme. Des acides organiques peuvent également être excrétés, tels les acides acétique, succinique et pyruvique, altérant également la balance oxydo-réductive (Pagliardini, 2010 ; Visser et al., 2004).

1113. Effet Crabtree

S. cerevisiae est soumise à l'effet Crabtree (Crabtree, 1929). Lors d'une croissance aérobie en excès de glucose ($> 150 \text{ mg L}^{-1}$), le métabolisme purement oxydatif du glucose bascule vers un métabolisme oxydo-réductif (De Deken, 1966 ; Fiechter et al., 1981 ; Verduyn et al., 1984). Il provoque notamment la formation de produits typiques du métabolisme fermentaire comme l'éthanol, le glycérol et les acides acétique, succinique et pyruvique. A l'inverse, le rendement en biomasse chute (Pagliardini, 2010 ; Rieger et al., 1983 ; Rose & Harrison, 1971 ; Visser et al., 2004).

L'effet Crabtree se caractérise par différents phénomènes moléculaires selon sa durée de mise en œuvre. Il est nommé effet « court terme » lorsqu'il apparaît suite à un pulse de glucose dans un réacteur continu sous limitation de glucose. Il est en revanche nommé effet « long terme » lors de cultures discontinues ou discontinues alimentées en excès de glucose, ou lors d'une culture continue limitée en glucose conduite à un taux de dilution supérieur au taux de dilution critique (D_c) (Petrik et al., 1983).

A l'origine de ce phénomène, les levures Crabtree positives seraient incapables de réguler le flux entrant de glucose par diffusion facilitée à faible affinité, alors que les Crabtree négatives régulent l'entrée du glucose à l'aide d'un système de symport H^+ à haute affinité (Van Urk et al., 1989 ; 1990).

La théorie communément admise permettant d'expliquer l'effet Crabtree est le concept de « capacité respiratoire limite ». Celle-ci, considérée comme une boîte noire, comprend l'ensemble des voies cytosoliques et mitochondriales responsables du catabolisme respiratoire du pyruvate, y compris la chaîne respiratoire (Figure 2). La capacité respiratoire serait saturée au-dessus d'un seuil critique de consommation de glucose. La cellule dirigerait alors l'excès de flux glycolytique vers le métabolisme fermentaire avec apparition de la production d'éthanol (Figure 3) (Beck & von Meyenburg, 1968 ; Käppeli & Sonnleitner, 1986). Cependant, la suppression ou la surexpression isolée de différents gènes codant pour des enzymes de la capacité respiratoire n'ont pas permis de révéler une réaction limitante (Flikweert et al., 1996 ; Guillou, 1996 ; van Hoek et al., 1998b ; de Jong-Gubbels et al., 1992 ; de Jong-Gubbels et al., 1998 ; Meaden et al., 1997 ; Saint-Prix et al., 2004 ; Verduyn et al., 1992).

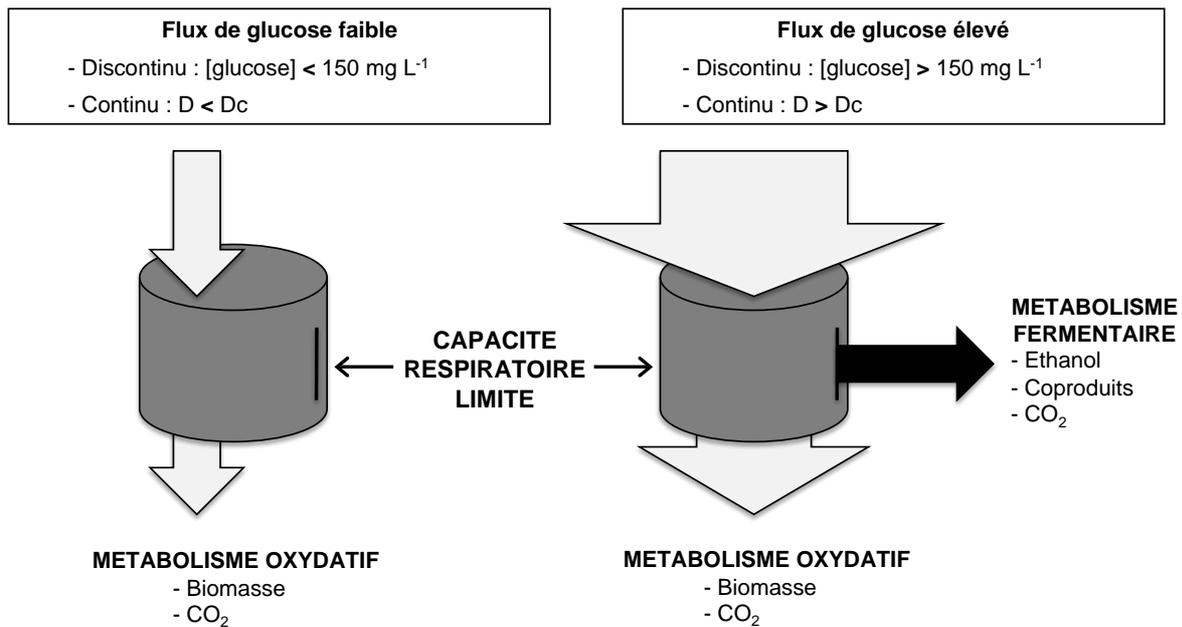


Figure 3 : Concept de la capacité respiratoire limite.

Une modulation de cette transition métabolique a cependant été rapportée lors de travaux touchant à des fonctions de régulations globales. La suppression des gènes *MIG1* et *MIG2*, codant pour un régulateur positif de la répression du glucose, a conduit à un taux critique de dilution (D_c) supérieur de 5 %, à $0,274 \text{ h}^{-1}$ (Klein et al., 1999). La surexpression du gène *HAP4*, codant pour un régulateur positif de gènes impliqués dans le métabolisme respiratoire, a permis d'atteindre un D_c 10 % plus élevé, à $0,33 \text{ h}^{-1}$ (van Maris et al., 2001). La diminution intracellulaire du ratio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ en exprimant un gène hétérologue codant pour une oxydase mitochondriale (*AOX1*) a également conduit à un D_c 10 % plus élevé, à $0,32 \text{ h}^{-1}$ (Vemuri et al., 2007). En outre, une modulation de l'effet Crabtree « court terme » a été observée suite à une alimentation en co-substrat glucose plus acide oléique, se traduisant par un retard à l'apparition de la transition métabolique ainsi que par une redirection du carbone (Feria-Gervasio et al., 2008).

112. PHYSIOLOGIE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUR ACIDE OLEIQUE

Outre le glucose, *S. cerevisiae* est capable de croître sur acide oléique comme seule source de carbone. Contrairement aux substrats fermentescibles, le métabolisme de cet acide gras ne conduit pas à une production d'éthanol. Il faut noter que les peroxysomes, organites où se déroule la β -oxydation, sont également impliqués dans la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène, par l'action d'une catalase (Fukui & Tanaka, 1979).

1121. Métabolisation des acides gras

Chez *S. cerevisiae*, le transport des acides gras du milieu extracellulaire vers le cytosol demeure incertain. Ils peuvent en effet traverser la membrane plasmique par simple diffusion ou *via* un transport facilité. Chez les levures oléagineuses, comme *Yarrowia lipolytica*, le transporteur n'est activé que pour de faibles concentrations extracellulaires en acides gras, inférieures à 10 μM . Pour des valeurs supérieures, le transport est assuré par simple diffusion (Berk & Stump, 1999 ; Fickers et al., 2005 ; Hamilton, 1998). Chez *S. cerevisiae*, ce transporteur semblait être codé par le gène *FAT1* (Faergeman et al., 1997 ; Schaffer & Lodish, 1994). Cependant, des travaux ultérieurs lui prêter un rôle dans l'homéostasie des acides gras à longue chaîne, en permettant le transport au niveau des membranes du peroxysome et du réticulum endoplasmique (Choi & Martin, 1999 ; Watkins et al., 1998).

Une fois dans le cytosol, les acides gras sont envoyés vers l'intérieur des peroxysomes. Ce mécanisme est assuré par les transporteurs Pxa1p et Pxa2p pour les acides gras à longue chaîne et par le Pex11p pour les acides gras plus courts (Hettema et al., 1996). Ces acides sont ensuite activés par fixation d'un coenzyme A grâce à la protéine Faap2p, puis métabolisés *via* la voie de la β -oxydation. Le produit carboné final de ce catabolisme est l'acétyl-coA, avec régénération importante du pool de NADH peroxysomale (Hiltunen et al., 2003). Or la membrane des peroxysomes est imperméable à ces deux molécules (van Roermund et al., 1995). La cellule va donc exporter l'acétyl-coA à l'aide de deux voies distinctes : le système enzymatique de la carnitine-acétyl transférase (CAT) et le cycle peroxysomal du glyoxylate. La première permet d'exporter l'acétyl-coA vers le cytosol sous forme d'acétyl-carnitine. La seconde fait entrer l'acétyl-coA dans le cycle du glyoxylate, au niveau de la formation des acides citrique et malique. Les intermédiaires de ce cycle peuvent alors être dirigés vers le cytosol grâce à différents transporteurs mitochondriaux, notamment les acides citrique, malique et succinique (Figure 4). Au moins une de ces voies doit être fonctionnelle pour permettre à *S. cerevisiae* de croître sur acide oléique seul (van Roermund et al., 1995). Ces voies sont schématisées dans le chapitre traitant du transport de l'acétyl-coA (chapitre 113).

1122. L'acide oléique et l'expression génique

L'utilisation d'acide oléique comme substrat carboné implique également un impact sur l'expression de nombreux gènes. Lors d'une culture sur acide oléique seul, une centaine de gènes sont différemment exprimés, soit environ 2 % du génome (Kal et al., 1999). La plupart de ces gènes codent pour des protéines nécessaires au transport et à la dégradation des acides gras. Dans ces conditions, une prolifération des peroxysomes, dont la biogénèse nécessite 13 protéines, est observable (Distel et al., 1996 ; Veenhuis et al., 1987). L'expression des gènes codant pour les enzymes du cycle peroxysomal du glyoxylate est également induite. C'est notamment le cas de l'isocitrate lyase et de la malate synthase, qui sont en revanche inhibées sur glucose seul (Trotter, 2001). En outre, une surexpression des gènes codant pour des transporteurs mitochondriaux et pour le métabolisme mitochondrial a été rapportée. La pyruvate carboxylase est également activée en présence d'acides gras et d'acétyl-coA, alors que la pyruvate déshydrogénase est inhibée (Myers et al., 1983). Enfin, des gènes impliqués

dans la réponse à des stress généraux et thermique sont surexprimés en présence d'acide oléique (Kal et al., 1999).

Lors d'une culture continue limitée en glucose et supplémentée en acide oléique, Feria-Gervasio (2008) a également rapporté une expression différente de 280 gènes sous l'effet de cet acide gras, dont 103 présentant une fonction inconnue. Les familles de gènes les plus touchées étaient « organisation cellulaire et biogénèse », « localisation cellulaire » et « communication cellulaire ». Cependant, aucune différence de l'expression des gènes responsables du transport de l'acétyl-coA n'a été observée, alors que les activités spécifiques de la Cit2p, Catp et Leu4/9p étaient augmentées.

113. LE TRANSPORT DU CARBONE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L'acétyl-coenzyme A est un composé essentiel dans le métabolisme général de *S. cerevisiae*. Cette molécule est une source importante du squelette carboné des cellules, par l'intermédiaire des voies anaboliques cytosoliques ou mitochondriales, telles que la synthèse de lipides ou de protéines. Sur glucose, l'acétyl-coA est principalement obtenu *via* la pyruvate déshydrogénase (mitochondriale), et *via* les acétaldéhyde déshydrogénases (cytosoliques et mitochondriales) (Flikweert et al., 1996 ; Saint-Prix et al., 2004). Sur acide oléique comme seule source de carbone, il est produit par la β -oxydation des acides gras.

Cependant, l'acétyl-coA ne peut pas traverser les membranes des peroxysomes et de la mitochondrie (van Roermund et al., 1995). La cellule doit donc être capable d'assurer le transport de l'acétyl-coA entre les différents compartiments pour l'amener aux lieux de consommation. Plusieurs équipes ont étudié les voies de transport de cette molécule à travers les membranes mitochondriale et peroxysomale. Ce transport est ainsi assuré par trois systèmes : ceux du cycle du glyoxylate, également appelé de la citrate synthase (Cit2p), de la carnitine-acétyl transférase (CAT) et de l' α -isopropylmalate synthase (Leu4/9p). Les deux premiers systèmes sont toutefois capables de se compléter en l'absence de l'un d'entre eux (van Roermund et al., 1995).

1131. Le système de la carnitine acétyl-transférase

Ce système est composé de quatre enzymes codées par les gènes *CAT2*, *YAT1*, *YAT2* et *CRC1*. Il permet de transférer l'acétyl-coA entre le cytosol, la mitochondrie et les peroxysomes. L'acétyl-coA est d'abord transformé en acétyl-carnitine par les carnitine-acétyl transférases (Cat2p, Yat1p et Yat2p), puis transféré à travers la membrane mitochondriale par la translocase (Crc1p). Le transport effectif à travers la membrane peroxysomale demeure en revanche inconnu.

Le gène *CRC1* code pour la carnitine-acétyl translocase, située dans la membrane interne de la mitochondrie (van Roermund et al., 1999). *In vitro*, cette enzyme est capable de catalyser le transport d'acétyl-carnitine, de propionyl-carnitine et de carnitine. Elle transfère également, mais plus difficilement, les

acides gras à moyenne et longue chaîne. En outre, ce gène est réprimé par le glucose et induit par l'acide oléique *via* la séquence ORE (Palmieri et al., 1999b ; van Roermund et al., 1999).

Le gène *CAT2* code pour la version mitochondriale et peroxysomale de la carnitine-acétyl transférase (Elgersma et al., 1995). Elle semble être très importante dans le dispositif CAT, car elle représente 99 % de son activité totale lors d'une croissance sur galactose, et plus de 95 % sur acide oléique (Kispal et al., 1993 ; van Roermund et al., 1999). L'expression de ce gène et l'activité correspondante sont induites par le glycérol, l'acétate et surtout l'acide oléique, mais le glucose réprimerait *CAT2* (van den Berg et al., 1998 ; Elgersma et al., 1995). L'équipe de Franken (2008) lui attribue également un rôle dans une réponse de protection à un stress oxydatif.

Le gène *YAT1* code pour la carnitine-acétyl transférase, une enzyme de 688 acides aminés située dans la membrane externe de la mitochondrie (Schmalix & Bandlow, 1993). Celle-ci est responsable de 5 % de l'activité de la CAT lors d'une croissance sur acide acétique. *YAT1* est induit par cette molécule, l'éthanol et le glycérol, mais réprimé par le glucose et le galactose. L'acide oléique n'a en revanche aucun effet (van den Berg et al., 1998 ; Elgersma et al., 1995 ; Karpichev & Small, 1998 ; Schmalix & Bandlow, 1993).

Le gène *YAT2* code pour une carnitine-acétyl transférase qui serait cytosolique, représentant 50 % de l'activité de la CAT lors d'une croissance sur éthanol. Son rôle demeure incertain, mais *YAT2* est induit par cet alcool (Franken et al., 2008 ; Swiegers et al., 2001).

Le transport à travers le système CAT nécessite de la carnitine pour être fonctionnel. *S. cerevisiae* étant incapable de la synthétiser, il faut donc l'apporter dans le milieu de culture. Il faut toutefois noter que cet ajout n'est pas réalisé dans la plupart des études publiées. La carnitine peut alors être transportée à travers la membrane plasmique grâce à la protéine Agp2p, qui y est incorporée (Franken et al., 2008 ; van Roermund et al., 1999 ; Swiegers et al., 2001). Le gène *AGP2* est induit par l'acide oléique *via* l'ORE et le glycérol, mais inhibé par le glucose, la D-carnitine et l'acétyl-carnitine (van Roermund et al., 1999).

La délétion de *CAT2* ne montre aucune diminution de la croissance sur acide oléique. Il existe donc un transport alternatif vers les peroxysomes capable de suppléer la CAT en cas de défaillance (van Roermund et al., 1995). Il est également important de noter qu'aucun gène codant pour la carnitine-acétyl transférase ne semble absolument essentiel au fonctionnement peroxysomal du système CAT. Des mutants Δ *CIT1* ont en effet réussi à croître en l'absence d'un seul de ces gènes (*CAT2*, *YAT1*, *YAT2*), quel qu'il soit (Swiegers et al., 2001).

1132. Le système du cycle du glyoxylate

La croissance aérobie sur glucose et substrats non fermentescibles d'un mutant Δ *CIT1*, incapable de transformer l'oxaloacétate en citrate dans la mitochondrie, est fortement altérée (Przybyla-Zawislak et al., 1999). L'équipe de Kispal (1988) a montré que cette délétion n'affectait pas l'activité des enzymes du cycle de Krebs, mais altèrait celle de la pyruvate déshydrogénase et de l' α -céto-glutarate déshydrogénase. Le transport résiduel

de l'acétyl-coA serait alors assuré par le système du cycle du glyoxylate grâce à la Cit3p, forme mitochondriale mineure de la citrate synthase (Jia et al., 1997). La surexpression du gène *CIT2* permet cependant de restaurer la croissance sur acétate (Kispal et al., 1988).

Ce gène *CIT2* code pour une citrate synthase initialement considérée comme extra-mitochondriale (Rickey & Lewin, 1986). Plus précisément, cette enzyme serait localisée au niveau des peroxysomes (Lewin et al., 1990). Cependant, certaines études la placent également dans le cytosol (Kispal et al., 1988) ou encore potentiellement dans la mitochondrie (Lee et al., 2006). Cit2p est impliquée dans le cycle du glyoxylate peroxysomal et considérée comme une enzyme caractéristique de ce cycle. En outre, elle est surexprimée en présence d'acide acétique (Kawahata et al., 2006).

L'expression de *CIT2* est soumise à des phénomènes de régulation. Il est induit par l'acide oléique *via* le site ORE (Chelstowska & Butow, 1995). Par ailleurs, il est le seul gène du cycle peroxysomal du glyoxylate dont l'expression soit soumise à la régulation mitochondriale rétrograde RTG2 (Liu & Butow, 2006). *ICL1*, *MDH3* et *MLS1* n'y sont pas sujets. *CIT2* est également surexprimé 30 fois chez les cellules montrant une déficience respiratoire (cellules ρ), les gènes des voies anaplérotiques étant induits (Liao et al., 1991). Ceci permet aux cellules ρ , dont les mitochondries sont atrophiées, de synthétiser des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques et du cycle du glyoxylate (citrate, malate, succinate). Sur milieu riche, la surexpression du gène *RTG2* a permis de diminuer la production des acides acétique et citrique chez *S. cerevisiae*. En revanche, sa suppression a eu un effet inverse sur ces acides, mais permis de diminuer la production d'acide succinique (Yoshida & Yokoyama, 2012). En outre, Wiebe *et coll.* (2008) ont rapporté une augmentation d'ARN messenger correspondant à ce gène avec l'augmentation de l'apport en dioxygène, en culture continue limitée en glucose (anaérobiose, micro-aérobiose, aérobiose).

Des études utilisant un mutant Δ *CIT2* ont montré que cette voie de transport de l'acétyl-coA n'est pas essentielle lors d'une croissance sur glucose en présence d'un système CAT fonctionnel et de carnitine, mais l'est sur des substrats tels que l'acide oléique, l'acide acétique, l'éthanol ou le glycérol. Chez ce mutant, les peroxysomes synthétisés sont instables (Lewin et al., 1990 ; Swiegers et al., 2001). Un mutant présentant une double délétion de *CIT2* et de l'un des quatre gènes du système CAT se développe normalement sur glucose, mais est incapable de croître sur acide oléique. Le système CAT et le cycle du glyoxylate sont donc nécessaires à la croissance sur acide oléique, mais peuvent se compléter (van Roermund et al., 1995 ; Swiegers et al., 2001).

Une fois l'acétyl-coA transféré dans le cytosol sous forme d'intermédiaires du cycle du glyoxylate, ceux-ci peuvent être transportés dans la matrice mitochondriale *via* plusieurs transporteurs (Figure 4) (Palmieri et al., 2006). L'acide citrique peut ainsi traverser la membrane mitochondriale grâce à deux transporteurs : Ct1p et Yhm2p. Ce dernier, qui échange un citrate contre un α -cétoglutarate, est considéré par certains auteurs comme une navette NADPH (Castegna et al., 2010 ; Kaplan et al., 1994 ; Ma et al., 2007). L'acide succinique peut quant à lui atteindre la matrice mitochondriale grâce à deux transporteurs : Dic1p et Sfc1p (anciennement

1133. Le système de l' α -isopropylmalate synthase

Enfin, le gène *LEU4* code pour l' α -isopropylmalate synthase cytosolique qui catalyse la première réaction de la synthèse de leucine, condensant l' α -céto-isovalérate et l'acétyl-coA en α -isopropylmalate (Huh et al., 2003). Son activité est réduite de 80 % chez un mutant Δ *LEU4*. En l'absence de leucine, ce microorganisme est capable de croître normalement sur glucose, grâce à l' α -isopropylmalate synthase II, codée par le gène *LEU9* et située dans la matrice mitochondriale. Mais sa croissance sur substrats non fermentescibles est réduite en l'absence de leucine (Casalone et al., 2000).

Un mutant Δ *LEU9* présente quant à lui une réduction de l'activité α -isopropylmalate synthase de 20 %. Mais sa croissance n'est perturbée ni sur glucose, ni sur substrats non fermentescibles, en présence ou en l'absence de leucine. Enfin, un mutant Δ *LEU4,9* est incapable de croître en l'absence de leucine, quelque soit le substrat, ne présentant aucune activité α -isopropylmalate synthase (Casalone et al., 2000).

Enfin, le gène *LEU5* semblerait être impliqué dans le transport de l' α -isopropylmalate à travers la membrane mitochondriale. Initialement considérée comme un isoforme mineur de l' α -isopropylmalate synthase, Leu5p serait en fait une protéine correspondant à un transporteur mitochondrial. Un mutant Δ *LEU5* présente une croissance réduite sur des substrats non fermentescibles et une diminution d'un facteur 15 de la quantité d'acétyl-coA mitochondrial. Un mutant Δ *LEU5* Δ *LEU9* est lui auxotrophe pour la leucine.

Son action n'est cependant pas essentielle à la synthèse de leucine, impliquant un autre moyen de transport de l' α -isopropylmalate (Drain & Schimmel, 1986 ; El Moulaj et al., 1997 ; Prohl et al., 2001).

12. ROLES DES ALCOOLS DANS LE METABOLISME

121. L'ETHANOL, PRODUIT MAJEUR DU METABOLISME OXYDO-REDUCTIF

1211. Implication dans la balance oxydo-reductive cytosolique

Chez *S. cerevisiae*, l'éthanol est de loin le coproduit le plus important et le plus étudié. Il est synthétisé dans le cytosol à partir d'acétaldéhyde, grâce à l'action de l'alcool déshydrogénase. A l'origine codée par un gène unique, *ADH₁*, il y a environ 80 millions d'années, cette enzyme l'est maintenant par trois gènes distincts (Leskovac et al., 2002 ; Thomson et al., 2005). *Adh1p* et *Adh2p* sont cytosoliques. La première est utilisée pour la production (K_m élevé) et la seconde, dont le gène est réprimé par le glucose, pour la consommation d'éthanol (K_m faible) (Leskovac et al., 2002 ; Piskur et al., 2006 ; Wills, 1979). *Adh3p* est quant à elle située dans la mitochondrie, et impliquée dans un système de navette mitochondriale (Young & Pillgrim, 1985).

La réaction biochimique catalysée par ces différents isoformes utilise des cofacteurs NADH. Quel que soit le compartiment cellulaire, la synthèse d'éthanol à partir d'acétaldéhyde permet ainsi de réoxyder le NADH, et la réaction inverse de régénérer le pool de NADH. Lors des métabolismes fermentaire et oxydo-réductif, la synthèse d'éthanol permet ainsi à la cellule de réoxyder le NADH issu de l'anabolisme et de la glycolyse.

1212. Le stress éthanol

Mais, par l'action de divers mécanismes encore mal compris, l'éthanol est inhibiteur de la propre activité fermentaire de la cellule (Figure 5) (Ghose & Tyagi, 1979 ; de Mot et al., 1985 ; Novak et al., 1981). En effet, il inhibe de manière non compétitive l'entrée du glucose et de l'ammoniaque chez *S. cerevisiae* (Leão & van Uden, 1985 ; Leão & van Uden, 1982). Il inhibe également l'activité de plusieurs enzymes clefs du métabolisme central du carbone, comme la pyruvate décarboxylase, l'hexokinase et l'alcool déshydrogénase (Millar et al., 1982 ; Navarro & Durand, 1978).

Cet alcool fait également chuter la viabilité cellulaire à de hautes concentrations dans le milieu de culture (Alfenore et al., 2002 ; Alfenore et al., 2004 ; Pagliardini, 2010). Il semble ainsi augmenter la perméabilité et la fluidité de la membrane plasmique (Alexandre et al., 1994 ; del Castillo Agudo, 1992 ; Leão & van Uden, 1982 ; Swan & Watson, 1997). Ce phénomène serait imputable à une évolution de la composition de la membrane plasmique, et plus précisément à une diminution des ratios stérols / phospholipides et stérols / protéines et une augmentation des insaturations des phospholipides, nécessitant donc l'oxydation de NADPH (Alexandre et al., 1994). La cellule serait ainsi capable d'améliorer sa résistance au stress éthanol en augmentant la proportion d'ergostérol et d'acides gras insaturés dans la membrane plasmique, tout en forçant la synthèse de phospholipides. Il faut également noter que l'éthanol joue sur l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse à différents stress (Alexandre et al., 2001 ; Piper et al., 1994 ; Sales et al., 2000)

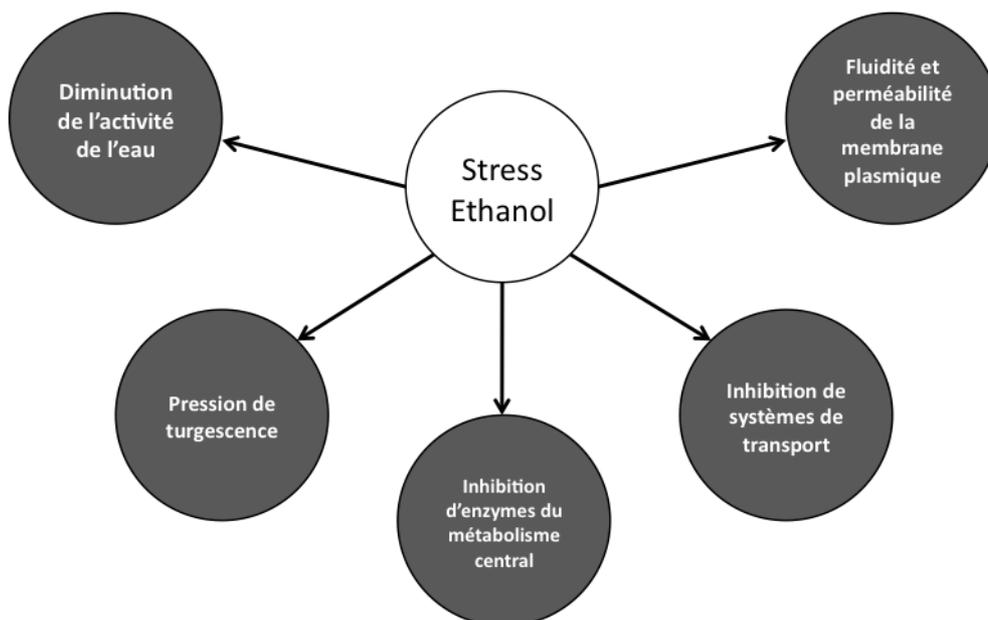


Figure 5 : Mécanismes imputés au stress éthanol dans la littérature.

Enfin, l'équilibre des concentrations intra et extracellulaires pourrait provoquer une accumulation de l'éthanol dans la cellule. Un stress hydrique serait ainsi induit par une augmentation de la concentration intracellulaire en éthanol, impliquant une altération des liaisons hydrogènes (Hallsworth, 1998). Cependant, ce phénomène d'accumulation est très controversé dans la littérature. Différentes études rapportent effectivement une concentration intracellulaire en éthanol supérieure, inférieure, ou encore égale à celle du milieu extracellulaire (Dasari et al., 1983 ; Dombek & Ingram, 1986 ; Guijarro & Lagunas, 1984 ; Nagodawithana, TW Steinkraus, 1976 ; Navarro & Durand, 1978).

Ghose & Tyagi (1979) ont défini les concentrations critiques en éthanol P_m , à laquelle la croissance est nulle, et P_m' , à laquelle la production d'éthanol est également nulle, d'une valeur respective de 87 et 114 g L⁻¹. Cependant, la sélection et l'adaptation de souches et l'utilisation de procédés innovants ont permis d'atteindre des concentrations finales plus élevées (Alfenore et al., 2002 ; Ben Chaabane et al., 2006 ; Pagliardini, 2010 ; Thomas & Ingledew, 1992). De plus, il est possible d'améliorer la tolérance à l'éthanol des microorganismes par l'apport maîtrisé de certaines molécules comme les vitamines (Alfenore et al., 2002). Vriesekoop et Pamment (2005) ont quant à eux réussi à diminuer la phase de latence due à l'éthanol de 90 %, en ajoutant de l'acétaldéhyde et en cultivant préalablement les cellules en présence de 10 grammes d'éthanol par litre. Ceci s'expliquerait par une régénération du pool de NADH grâce à la consommation d'acétaldéhyde, ainsi qu'à une vitesse de consommation de glucose moins affectée (Vriesekoop et al., 2007).

Outre une production d'énergie neutre d'un point de vue oxydo-réductif, plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'objectif et l'utilité de la synthèse d'une telle molécule. L'éthanol serait ainsi produit

afin d'inhiber ou tuer les microorganismes compétiteurs de *S. cerevisiae*, puis reconsumé lorsque les autres sources de carbone sont épuisées (Piskur et al., 2006).

122. LE DOUBLE ROLE DU GLYCEROL DANS LE METABOLISME OXYDO-REDUCTIF

Le glycérol est un polyol produit à des taux beaucoup plus faibles que l'éthanol lors des métabolismes fermentaire et oxydo-réductif. Toutefois, il joue plusieurs rôles essentiels au bon fonctionnement du métabolisme de *S. cerevisiae*. Il est synthétisé dans le cytosol à partir de dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Cette molécule est d'abord réduite en glycérol-3-P grâce à la glycérol-3-P déshydrogénase, codée par les gènes *GPD1* et *GPD2*. Puis ce métabolite est transformé en glycérol par la glycérol-3-phosphatase.

1221. Implication dans la balance oxydo-reductive cytosolique

Comme pour l'éthanol, la synthèse de glycérol présente une fonction importante dans le maintien de l'équilibre oxydo-réductif de la cellule. En effet, la synthèse de glycérol-3-P à partir de dihydroxyacétone phosphate est couplée à la réoxydation de NADH. Cette réaction se plaçant en amont de la production de NADH par la glycolyse, elle permet de réoxyder deux moles de NADH par mole de glucose consommé. Cette voie est donc plus intéressante que la synthèse d'éthanol, neutre d'un point de vue oxydo-réductif, mais elle n'aboutit à aucune production d'énergie. En absence d'oxygène, la synthèse de glycérol est ainsi essentielle pour assurer la réoxydation du NADH provenant de l'anabolisme.

Ce rôle dans la balance oxydo-réductive est principalement assuré par l'isoforme codé par le gène *GPD2* (Ansell et al., 1997). Il a en effet été montré que l'augmentation de l'activité de la glycérol-3-P déshydrogénase avec la croissance est principalement due à l'induction de *GPD2*, *GPD1* ne jouant alors qu'un rôle mineur (Bjorkqvist et al., 1997).

1222. Implication dans la réponse aux stress environnementaux

Le second gène, *GPD1*, est quant à lui impliqué dans la réponse à plusieurs stress environnementaux (Albertyn et al., 1994 ; Larsson et al., 1993) mais pas *GPD2* (Ansell et al., 1997). Son expression est en effet soumise à différentes régulations, comme les facteurs transcriptionnels Msn2/Msn4 ou la voie de signalisation HOG (High Osmolarity Glycerol Pathway) (Albertyn et al., 1994 ; Hohmann, 2002 ; Rep et al., 1999).

Lorsque la concentration en solutés augmente dans le milieu extracellulaire, la pression de turgescence diminue. Afin de maintenir cette pression, essentielle pour l'activité microbienne, *S. cerevisiae* va, entre autre, réguler le transport plasma-membranaire de solutés tels que le glycérol (Luyten et al., 1995 ; Tamás et al., 1999). Elle est ainsi capable d'accumuler ce polyol dans son cytoplasme jusqu'à 600 fois la concentration extracellulaire en présence de NaCl à 0,9 M (Olz et al., 1993). Ceci permet en outre aux cellules de maintenir une activité de l'eau élevée nécessaire à l'activité cellulaire.

Cette accumulation de glycérol semble être la conséquence de plusieurs phénomènes. La composition de la membrane plasmique est modifiée lors d'une augmentation de la pression osmotique (Hohmann, 2002). Plus particulièrement, *S. cerevisiae* est capable de fermer les canaux plasma-membranaires Fps1p, des aquaglycéroporines responsables d'un transport facilité ou passif du glycérol (Luyten et al., 1995 ; Oliveira, 2003 ; Tamás et al., 1999). De plus le gène *STL1*, codant pour un transporteur actif, est induit lors d'un stress osmotique (Ferreira et al., 2005). Il est toutefois réprimé par le glucose et Stl1p ne serait utilisé que lors de croissances sur oses non fermentescibles (Lages & Lucas, 1997). Enfin, une simple diffusion à travers la membrane plasmique est généralement admise, le glycérol étant liposoluble. Mais son importance serait très faible par rapport aux transporteurs (Oliveira, 2003).

En parallèle d'une accumulation de glycérol, une augmentation de la pression osmotique induit une modification de la production énergétique. En effet, *S. cerevisiae* régule également la concentration intracellulaire des ions monovalents (H^+ , K^+ , Na^+), impliqués dans la pression de turgescence, le potentiel membranaire et la force ionique (Darley et al., 2000 ; Kinclova-Zimmermannova et al., 2000 ; Serrano, 1980). Or le transport de ces ions est généralement couplé à la consommation d'ATP (Gustafsson & Larsson, 1990 ; Norkrans & Kylin, 1969 ; Watson, 1970).

Le synthèse de glycérol répond également à des stress thermiques, augmentant sous la contrainte de températures supérieures à 36 °C (Aldigier et al., 2004 ; Siderius et al., 2000). Ce polyol permettrait ainsi de protéger le pool protéique en stabilisant et renaturant ces molécules (Zancan & Sola-Penna, 2005).

1223. Impact de la modulation de la synthèse de glycérol

Plusieurs équipes ont étudié la modulation de la synthèse de glycérol par deux approches distinctes : le génie microbiologique et le génie métabolique.

La gestion de la température a ainsi permis d'augmenter la synthèse de glycérol à partir d'une température comprise entre 36 et 39 °C (Aldigier et al., 2004). Toutefois, ce phénomène était accompagné d'une chute des rendements en éthanol et en biomasse. Alfenore *et al.* (2004) ont également montré l'importance de la disponibilité en oxygène pour la cellule. Par rapport à une aération complète ($pO_2 > 20\%$), une stratégie de micro-aération a provoqué une hausse du rendement en glycérol, au détriment de celui en éthanol. La composition du milieu de culture a également un impact sur la production de glycérol. Celle-ci est en effet diminuée lorsque l'apport azoté est assuré par des acides aminés plutôt que par l'ion ammonium (Albers et al., 1996). En conséquence, le rendement en éthanol et le taux de croissance maximal ont été améliorés. Enfin, l'utilisation de modèles prédictifs a pu permettre de moduler la synthèse de glycérol par la maîtrise des paramètres de culture. De cette manière, le maintien d'un quotient respiratoire à une valeur de 6 a permis de diminuer la concentration finale en glycérol de 3,2 à 1,7 g L⁻¹, au détriment de la concentration finale en éthanol et de son rendement de production (Bideaux et al., 2006).

D'autres études présentent une approche différente, par génie métabolique. Un premier groupe de travaux a consisté à utiliser des mutants présentant une simple ou double suppression des gènes *GPD1* et *GPD2* (Tableau 1) (Michnick et al., 1997 ; Nissen et al., 2000a). De manière générale, cette stratégie a permis de diminuer le rendement en glycérol en augmentant celui en éthanol. En anaérobiose, un double mutant est cependant incapable de croître et un simple mutant Δ GPD2 présente une croissance très affectée. Il faut noter que la production des acides organiques a également été modulée par ces jeux de délétions. Une augmentation du rendement en acide succinique a été observée en anaérobiose chez le mutant Δ GPD2. Une augmentation des rendements en acides acétique et pyruvique a également été observée chez les trois mutants mais uniquement en aérobie (Nissen et al., 2000a).

Tableau 1 : Principaux résultats de la modulation de la synthèse de glycérol.

	Souche	Construction génétique	μ_{max} h ⁻¹	Y _{Glycérol/ Glucose} mg g ⁻¹	Y _{Ethanol/ Glucose} g g ⁻¹	Y _{Acétate/ Glucose} mg g ⁻¹	Tolérance à l'éthanol	Référence
AÉROBIOSE	TN1	! <i>GPD1</i>	0,41 / 0,38	24 / 8	0,34 / 0,35	9 / 23	Non renseigné	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	TN1	! <i>GPD2</i>	0,41 / 0,38	24 / 8	0,34 / 0,36	9 / 17	Non renseigné	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	TN1	! <i>GPD1</i> / ! <i>GPD2</i>	0,41 / 0,41	24 / non détecté	0,34 / 0,39	9 / 16	Non renseigné	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	CEN.PK 113-7D	<i>GPD1p</i> ! :: <i>TEFmut2p</i> / ! <i>GPD2</i>	0,35 / 0,24	13 / 1,6	0,43 / 0,45	17 / 15	Non affectée	Pagliardini, 2010
ANAÉROBIOSE	TN1	! <i>GPD1</i>	0,41 / 0,38	105 / 98	0,38 / 0,39	4 / 4	Non renseigné	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	TN1	! <i>GPD2</i>	0,41 / 0,008	105 / 73	0,38 / 0,36	4 / 5	Non renseigné	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	TN1	! <i>GPD1</i> / ! <i>GPD2</i>	Pas de croissance	-	-	-	-	Nissen <i>et al.</i> , 2000a
	V5	! <i>GPD1</i>	Non déterminé	80 / 30	0,47 / 0,049	Non déterminé	Non renseigné	Michnick <i>et al.</i> , 1997
	CEN.PK 113-7D	<i>GPD1p</i> ! :: <i>TEFmut2p</i> / ! <i>GPD2</i>	0,30 / 0,046	56 / 22	0,47 / 0,48	5 / non détecté	Réduite	Pagliardini, 2010

Une seconde stratégie a consisté à considérer l'équilibre oxydo-réductif global de la cellule, en prenant en compte les cofacteurs NADH et NADPH (Bro et al., 2006). L'insertion d'une transhydrogénase hétérologue chez *S. cerevisiae*, naturellement dépourvue de cette enzyme, n'a pas permis de réduire la production de glycérol (Bruinenberg et al., 1983 ; Nissen et al., 2001). Au contraire, cette enzyme a transféré le pouvoir réducteur du NADPH vers le NAD⁺, entraînant une augmentation de la synthèse de glycérol et une altération de la croissance.

L'assimilation de l'ammonium a également été étudiée (Nissen et al., 2000b). La suppression du gène *GDH1*, codant pour une glutamate déshydrogénase NADPH dépendante, a permis de diminuer le rendement en glycérol, tout en augmentant celui en éthanol sans réduire le rendement en biomasse de manière drastique. Le couplage de cette suppression à la surexpression des gènes *GLN1* et *GLT1*, codant respectivement pour une glutamine synthase et une glutamate synthase, mène à des observations similaires. D'autres études ont mis en culture des mutants présentant une surexpression de *GLT1* couplée à différentes combinaisons de suppression des gènes *GPD1*, *GPD2* et *FPS1*, codant pour le transporteur membranaire du glycérol (Cao et al., 2007 ; Kong et al.,

2006 ; Kong et al., 2007a ; Kong et al., 2007b). L'utilisation de milieux de cultures riches ne permet cependant pas d'en tirer des conclusions sur le réarrangement du métabolisme.

En outre, la synthèse de protéines hétérologues chez *S. cerevisiae* a conduit à des résultats positifs. L'expression *in vivo* d'un gène de *Streptococcus mutans* codant pour une enzyme catalysant l'oxydation de glycéraldéhyde-3-P en 3-phosphoglycérate en régénérant du NADPH a permis de valider des résultats obtenus *in silico* (Boyd et al., 1995 ; Bro et al., 2006). L'insertion de cette réaction, permettant de shunter la réaction productrice de NADH dans la glycolyse, a ainsi provoqué une chute importante de la production de glycérol, sans toutefois améliorer le rendement en éthanol produit. Une augmentation de 13 % de celui-ci a été rapportée par l'insertion du gène bactérien *mhpF*, codant pour une acétaldéhyde déshydrogénase NAD⁺ dépendante, chez un mutant présentant une double délétion des gènes *GPD1* et *GPD2*, restaurant ainsi la croissance en anaérobiose (Guadalupe Medina et al., 2010).

Enfin, une approche originale par génie métabolique s'est intéressée à une suppression de *GPD2*, couplée à une régulation fine du gène *GPD1* (Tableau 1). L'utilisation de promoteurs mutés, issus du promoteur TEF d'*Ashbya gossypii*, a ainsi permis de diminuer la production de glycérol au profit du rendement en éthanol (Alper et al., 2005 ; Pagliardini, 2010 ; Steiner & Philippsen, 1994). En anaérobiose, ces mutants présentaient cependant une tolérance plus faible à l'éthanol, couplée à une excrétion nulle des acides acétique et pyruvique et augmentée pour l'acide succinique. Le taux de croissance maximal était également diminué, quelque soit le métabolisme vis-à-vis de l'oxygène.

123. LE TRANSFERT DU POUVOIR REDUCTEUR VERS LA MITOCHONDRIE

La membrane mitochondriale interne est imperméable au NAD⁺ et au NADH (Geertman et al., 2006 ; von Jagow, 1970). Or l'anabolisme conduit à une régénération de NADH dans les différents compartiments cellulaires. Les cellules ont donc besoin de transporter le pouvoir réducteur d'un compartiment à l'autre. Chez *S. cerevisiae*, il existe plusieurs systèmes de navettes entre le cytosol et la mitochondrie. Les plus importants sont les navettes à alcool et la déshydrogénase mitochondriale. D'autres systèmes sont présents sous forme de navettes à acides, présentant cependant un rôle mineur : malate / aspartate, malate / oxaloacétate, malate / pyruvate et glutamate / α -cétoglutarate (Overkamp et al., 2000).

1231. La navette éthanol

La navette éthanol transfère le pouvoir réducteur de la mitochondrie vers le cytosol (Bakker et al., 2000 ; Overkamp et al., 2000). Elle est ainsi particulièrement utile en métabolisme anaérobie, puisqu'elle permet de palier l'inactivité de la chaîne respiratoire. Pour assurer ce transfert, l'acétaldéhyde est d'abord dirigée vers la matrice mitochondriale, pour y être réduite en éthanol par l'alcool déshydrogénase Ald3p. Puis cet alcool est renvoyé vers le cytosol, y transférant son pouvoir réducteur lors de sa reconversion en acétaldéhyde. Cette

navette est essentielle chez un mutant présentant une délétion du gène *NDI1*, codant pour la déshydrogénase intra-mitochondriale transférant le pouvoir réducteur à la chaîne respiratoire (Bakker et al., 2000).

1232. La navette glycérol

La navette glycérol repose sur un principe similaire, mais semble fonctionner du cytosol vers la mitochondrie (Bakker et al., 2001 ; Vemuri et al., 2007). Le glycérol-3-P est ainsi transféré vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, pour y être oxydé en dihydroxyacétone phosphate par la glycérol-3-P déshydrogénase mitochondriale, codée par le gène *GUT2* (Rønnow & Kielland-Brandt, 1993). Cette réaction biochimique transfère le pouvoir réducteur au FAD, lui permettant d'atteindre la chaîne respiratoire (Larsson et al., 1998). Le DHAP est ensuite renvoyé vers le cytosol pour être réduit à nouveau en glycérol-3-P.

Toutefois, cette navette serait réprimée en présence de fortes concentrations en glucose et à des taux de croissance élevés (Larsson et al., 1998 ; Pahlman et al., 2002 ; Rigoulet et al., 2004). Dans ces conditions, son rôle est considéré comme minime par rapport aux déshydrogénases mitochondriales Nde1p et Nde2p. Il faut noter que l'efficacité énergétique de ces navettes, caractérisée par le rapport P/O, serait liée à leur flux (Pahlman et al., 2002). La navette glycérol fournirait ainsi un rendement énergétique plus élevé. En revanche, son importance augmenterait avec la diminution du taux de croissance. La navette glycérol semble en outre nécessaire aux cellules afin de croître sur des substrats non fermentescibles (Grauslund & Rønnow, 2000).

1232. Les déshydrogénases mitochondriales Nde1p et Nde2p

Les enzymes Nde1p et Nde2p sont deux isoformes de la déshydrogénase mitochondriale, codés par les gènes *NDE1* et *NDE2* (Geertman et al., 2006 ; Luttik et al., 1998). Comme la navette glycérol, elles permettent de transférer le pouvoir réducteur cytosolique vers la chaîne respiratoire. Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane mitochondriale interne (Luttik et al., 1998). Le NADH traverse donc la membrane mitochondriale externe, pour être réoxydé en NAD⁺ puis renvoyé vers le cytosol. Le pouvoir réducteur est alors directement envoyé vers la chaîne respiratoire.

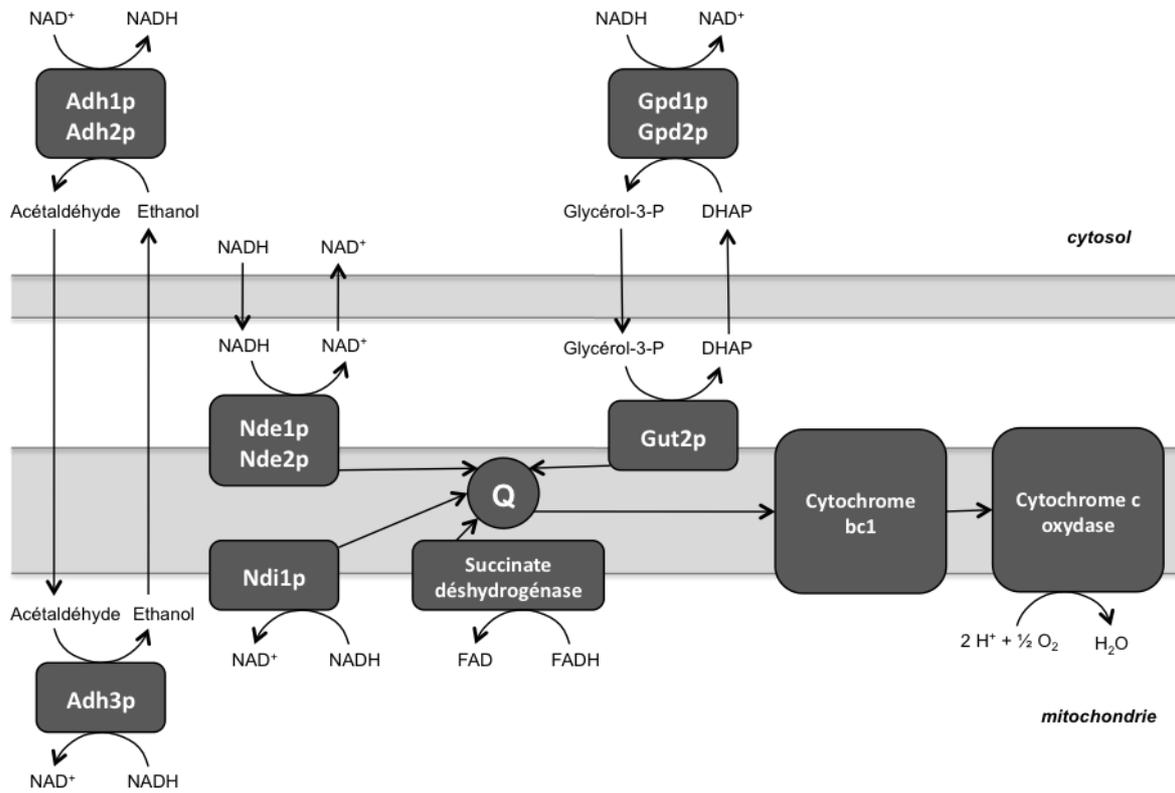


Figure 6 : Les principaux systèmes de transport du pouvoir réducteur chez *Saccharomyces cerevisiae* : la navette éthanol, les déshydrogénases mitochondriales et la navette glycérol. D'après Overkamp *et al.*, 2000.

13. ROLES DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES ORGANIQUES

Les acides organiques sont des coproduits inhérents aux métabolismes aérobie et anaérobie. Les principaux acides retrouvés dans le milieu extracellulaire lors d'une culture sur milieu défini sont l'acétate, le succinate, le pyruvate et, dans une moindre mesure et selon les souches, le malate, le fumarate et l' α -cétoglutarate (Pagliardini, 2010 ; Verduyn et al., 1990). Toutefois, ils n'ont pas fait l'objet de suffisamment de travaux pour permettre d'identifier précisément leurs rôles biologiques et les mécanismes qui gouvernent leur synthèse. Celle-ci est en effet soumise à de nombreux mécanismes de régulation de l'expression génique (Yoshida & Yokoyama, 2012).

131. L'ACIDE ACÉTIQUE ET LA CROISSANCE MICROBIENNE

L'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique est catalysée par cinq isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase chez *S. cerevisiae*, codés par les gènes *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* et *ALD6* (Navarro-Aviño et al., 1999). De par la place qu'il occupe dans le réseau métabolique, cet acide semble jouer plusieurs rôles essentiels pour l'activité microbienne. Il peut ainsi être considéré comme une source de carbone pour l'anabolisme et est relié à la balance oxydo-réductive de la cellule. En outre l'expression des 5 gènes est régulée de manière différente lors d'une culture anaérobie (Saint-Prix et al., 2004). Cette équipe a également démontré à l'aide d'un mutant ne montrant aucune activité Aldp que d'autres voies de synthèse existent, aujourd'hui non identifiées. La synthèse de cet acide est donc dépendante de mécanismes complexes encore mal compris.

1311. Implication dans la balance oxydo-réductive

Les cinq isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase présentent des affinités différentes vis-à-vis des cofacteurs NAD^+ et NADP^+ , ainsi que des ions activateurs (Figure 7). L'Ald5p, et plus particulièrement l'Ald6p, occupent une place prépondérante dans la production d'acide acétique en anaérobiose (Meaden et al., 1997 ; Saint-Prix et al., 2004). Ces enzymes sont NADP^+ et respectivement Mg^{2+} et K^+ dépendantes. Les isoformes Ald2p et Ald3p sont quant à eux NAD^+ dépendants. Enfin, l'Ald4p est NAD(P)^+ et K^+ dépendante. En outre, le pool d'acétaldéhyde déshydrogénase est localisé dans différents compartiments cellulaires. Ald2p, Ald3p et Ald6p sont en effet cytosoliques, alors qu'Ald4p et Ald5p sont mitochondriales (Navarro-Aviño et al., 1999).

Les réactions permettant la formation de NADPH sont essentielles pour assurer la croissance cellulaire. Elles permettent en effet de rétablir le ratio $\text{NADPH} / \text{NADP}^+$ diminué par l'anabolisme. Il existe plusieurs sources de la forme réduite de ce cofacteur chez *S. cerevisiae*, variant avec la source de carbone (Minard & McAlister-Henn, 2005). Sur glucose, la majorité de la régénération du pool cytosolique est assurée par l'Ald6p et la voie des pentose-phosphates, via l'action de la glucose-6-P déshydrogénase et la 6-P-gluconate déshydrogénase

(Grabowska & Chelstowska, 2003 ; Minard & McAlister-Henn, 2005). Deux autres sources mineures sont l'activité de l'aconitase Aco1p et de l'isocitrate déshydrogénase Idp2p.

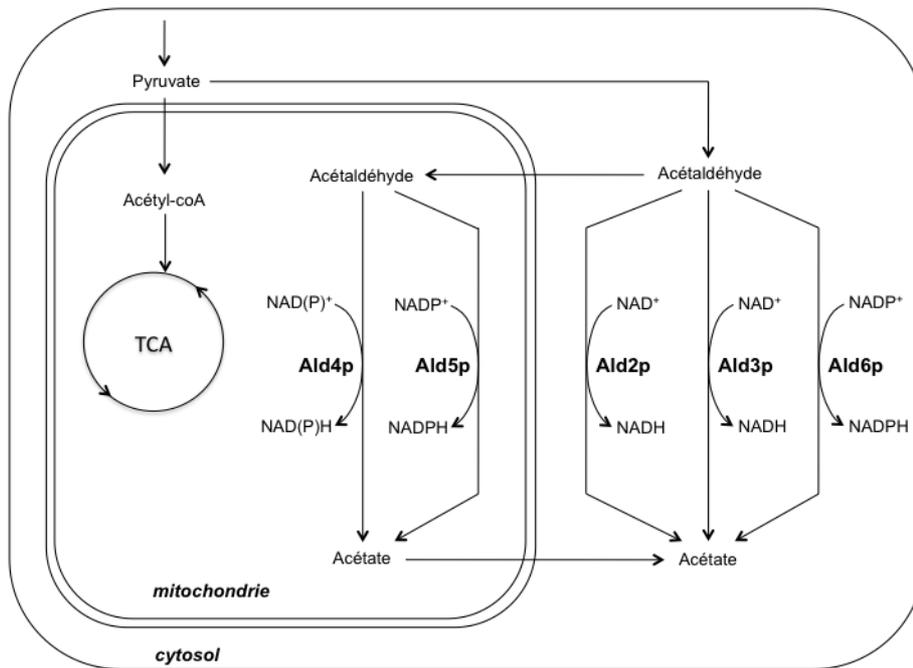


Figure 7 : Places et réactions des différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase.

Au niveau mitochondrial, la régénération du NADPH serait principalement assurée par Pos5p, une NADH kinase. L'Adl4p serait également un acteur important, capable de prendre en partie le relais de la kinase. Cet isoforme pourrait ainsi être nécessaire à la croissance en condition de faible disponibilité en ATP (Miyagi et al., 2009 ; Outten & Culotta, 2003). L'enzyme malique Mae1p et l'isocitrate déshydrogénase Idp1p ne présentent quant à elles qu'un rôle mineur.

Un système de navette mitochondriale pour le transfert de NADPH a également été récemment rapporté (Castegna et al., 2010). L'acide citrique est ainsi transporté en échange d' α -cétoglutarate. L'action des aconitases et des isocitrate déshydrogénases permettrait ensuite le transfert du pouvoir réducteur (Figure 8).

En sus du NADPH, la synthèse d'acide acétique est également fortement liée à l'équilibre du ratio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$. En effet, les travaux portant sur la diminution du glycérol rapportent généralement une modulation de l'excrétion de cet acide organique (Tableau 1) (Nissen et al., 2000a ; Pagliardini, 2010). Cependant, les travaux de Nissen *et al.* ont rapporté une augmentation en aérobiose, alors que Pagliardini *et al.* n'ont pas observé de différence. En anaérobiose, cette équipe a par contre rapporté un arrêt total de l'excrétion d'acide acétique, alors que Nissen *et al.* n'ont observé aucune différence. En outre, le lien entre la production de ces deux molécules est dépendant des souches utilisées (Cambon et al., 2006). Bien que les synthèses de glycérol

et d'acide acétique soient intimement liées par l'intermédiaire de la balance oxydo-réductrice, cette relation semble plus complexe qu'un simple transfert du pouvoir réducteur.

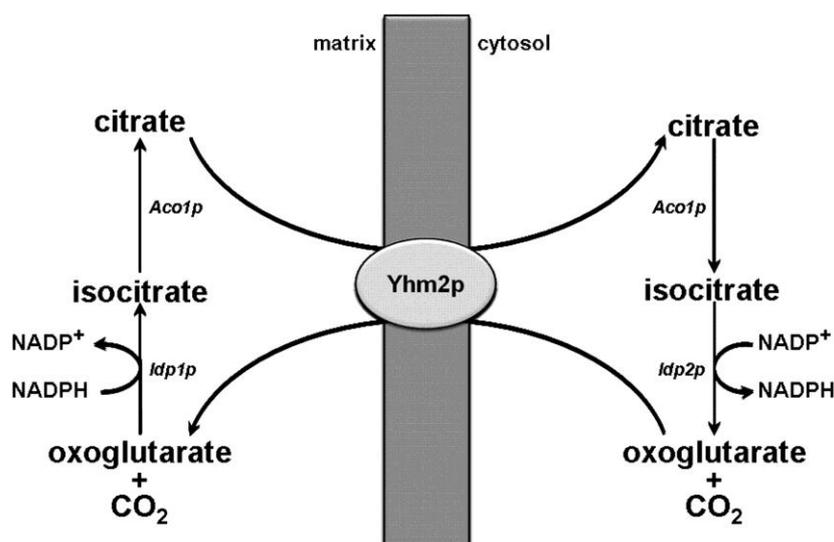


Figure 8 : Le systèmes de transport du NADPH chez *Saccharomyces cerevisiae* proposé par Castegna *et al.*, 2010.

La synthèse d'acide acétique par les Aldp est ainsi *de facto* couplée à la régénération de cofacteurs réduits NADH et NADPH, à la fois dans la mitochondrie et dans le cytosol. Les mécanismes régulant ce pool enzymatique sont cependant peu investis dans la littérature. Ils demeurent donc encore largement incertains.

1312. L'acide acétique et l'acétyl-coA chez *S. cerevisiae*

La synthèse d'acétyl-coA est une réaction essentielle dans le métabolisme général de *S. cerevisiae*. Cette molécule est en effet le précurseur de nombreuses voies anaboliques cytosoliques ou mitochondriales, comme la lipogenèse ou encore la synthèse de protéines, et est en conséquence nécessaire dans les différents compartiments cellulaires. Il a été mis en évidence que l'acide acétique est une source importante d'acétyl-coA.

Or l'acide acétique peut être transformé en acétyl-coA par l'intermédiaire des acétyl-coA synthases. Ces enzymes sont codées par les gènes *ACS1* et *ACS2*, et seraient localisées respectivement dans les peroxysomes et le cytosol. L'*Acs2p* est l'isoforme essentiel pour la croissance sur glucose (van den Berg & Steensma, 1995 ; de Jong-Gubbels *et al.*, 1998 ; Stanley *et al.*, 2010).

La consommation d'acide acétique exogène marqué a permis de confirmer, dans les conditions d'étude, l'envoi de l'acide acétique vers l'ensemble de l'anabolisme. Gilvarg & Bloch (1951) ont d'abord rapporté qu'il est précurseur de nombreux constituants des protéines, puisqu'il est dirigé vers la synthèse de nombreux acides aminés, formant notamment le squelette carboné de la lysine. Or 1 gramme de protéines en contient 0,72 mmol,

soit près de 10 % (m/m) (Flikweert et al., 1999). Il ne semble cependant pas utile à la synthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et de la glycine (Gilvarg & Bloch, 1951).

D'autres travaux ont également rapporté une implication de cette molécule dans la synthèse de lipides, de tréhalose, et d'acides aminés ainsi que l'existence d'un cycle d'échange de carbone entre le cycle des acides tricarboxyliques et la formation de glutamate (Dickinson et al., 1983 ; den Hollander et al., 1981 ; dos Santos et al., 2003). Lors d'une culture continue en co-substrats glucose plus acide acétique, la majorité de l'acétyl-coA provenant de cet acide étant toutefois envoyé vers l'anabolisme cytosolique (dos Santos et al., 2003).

Plusieurs études, supprimant un ou plusieurs gènes codant pour les Aldp ou la pyruvate décarboxylase, ont en outre démontré l'importance de la synthèse d'acide acétique pour la croissance cellulaire (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Flikweert et al., 1996 ; Meaden et al., 1997 ; Remize et al., 2000 ; Saint-Prix et al., 2004).

1313. Implication dans la réponse aux stress environnementaux

Les stress environnementaux ont également un impact sur la synthèse d'acide acétique. Plusieurs équipes rapportent en effet un rôle dans la réponse aux stress oxydatif, thermique, osmotique et de carence en glucose.

Les gènes *ALD2* et *ALD3* sont ainsi soumis à Msn2 et Msn4, des facteurs de transcription impliqués dans la réponse globale aux stress. Il ne sont en revanche pas soumis au signal HOG (Navarro-Aviño et al., 1999). Ald2p est ainsi plus active lors d'un stress osmotique et en situation de carence de glucose. L'Ald3p répond de la même manière à ces stress, ainsi qu'à des chocs de température et des environnements fortement oxydés. Ils joueraient ainsi un rôle important dans l'équilibre rédox des cellules soumises à des stress de cette nature (Akhtar et al., 1997 ; Blomberg & Adler, 1989 ; Norbeck & Blomberg, 1997 ; Norbeck & Blomberg, 2000). A noter que ces deux enzymes seraient alors également impliquées dans la synthèse de coenzyme A (White et al., 2003).

La synthèse d'acide acétique est également liée à la réponse au stress oxydatif de manière indirecte. En effet, les réactions biochimiques permettant de neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) nécessitent, pour beaucoup, du NADPH (Larochelle et al., 2006 ; Minard & McAlister-Henn, 2001 ; Ng et al., 2008). Dans la mitochondrie, le NADPH serait principalement fourni par Pos5p, une kinase. En l'absence de cette enzyme, l'Ald4p serait capable de prendre le relais de la régénération du NADPH mitochondrial, permettant d'assurer le traitement des DRO (Miyagi et al., 2009 ; Outten & Culotta, 2003). Cet isoforme semble également être impliqué dans la réponse au stress éthanol, tout comme Ald5p. *ALD4* et *ALD5* sont en effet surexprimés dans ces conditions (Chandler et al., 2004).

Enfin, il faut noter qu'une plus faible disponibilité de NADPH peut provoquer une altération des structures tertiaires et quaternaires des protéines en modulant les ponts disulfures (Minard et al., 2007).

1314. Impact de la modulation de la synthèse d'acide acétique

La production biologique d'acétate résulte d'un système complexe de réactions enzymatiques, réparties dans les différents compartiments cellulaires. Ceci rend donc difficile la maîtrise du métabolisme dans le but de moduler la synthèse de cet acide. Bien qu'ils soient moins nombreux que pour le glycérol, plusieurs travaux ont porté sur ce sujet et plus particulièrement sur sa diminution. Ainsi une première hypothèse pour expliquer l'excrétion de cet acide consistait à penser que la réaction gérée par les acétyl-coA synthases Acs1p et Acs2p était limitante, bloquant le flux de carbone au niveau de l'acide acétique ainsi excrété (Postma et al., 1989). Cependant, la surexpression des gènes *ACS1* et *ACS2* n'a pas permis de diminuer cette excrétion suite à un pulse de glucose en culture continue, bien que l'activité spécifique correspondante ait été multipliée de trois à six fois (de Jong-Gubbels et al., 1998).

D'autres équipes se sont intéressées à la suppression d'un ou plusieurs isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase, afin de comprendre l'implication de chacun dans la synthèse d'acide acétique. Certains des mutants étudiés ont ainsi montré une altération de la croissance et peu de modifications de la production d'éthanol.

Les mutants Δ *ALD4*, Δ *ALD5*, Δ *ALD6* et Δ *ALD5,6* présentaient une croissance normale en anaérobiose (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Remize et al., 2000 ; Saint-Prix et al., 2004). En revanche, un mutant Δ *ALD4* Δ *ALD6* croît moins vite que la souche sauvage, et le mutant Δ *ALD4,5,6* encore moins vite. Les isoformes Ald4p et Ald6p sont donc essentiels mais peuvent se relayer l'un, l'autre. L'Ald5p prend également part au métabolisme fermentaire mais dans une moindre mesure. Le rôle de cet isoforme n'est donc pas limité à la maintenance de la chaîne respiratoire (Kurita & Nishida, 1999). Par contre, Ald2p et Ald3p ne semblent pas avoir de rôle essentiel dans ces conditions. Les mutants Δ *ALD2,3,4,5,6* et Δ *ALD4,5,6* présentent en effet le même profil de croissance (Saint-Prix et al., 2004).

Toutefois, il faut noter qu'une diminution du taux de croissance maximal d'un mutant Δ *ALD6* a été observé en aérobiose (Meaden et al., 1997 ; Navarro-Aviño et al., 1999). Il semble donc que l'importance de cet isoforme et, par extension hypothétique, de l'ensemble des Aldp soit relative au métabolisme des cellules vis-à-vis de l'oxygène.

En revanche, la modulation de la synthèse d'acide acétique ne semble pas impacter la production d'éthanol. La culture du mutant Δ *ALD6* n'a ainsi pas permis d'améliorer le rendement en éthanol ni son titre final lors de cultures discontinues en anaérobiose (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002). Par contre, aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne les performances de production d'éthanol de tels mutants en aérobiose.

D'autres travaux ont permis de limiter la production d'acide acétique en agissant de manière indirecte. L'expression du gène *GLT1*, codant pour une glutamate synthase utilisant l' α -céto-glutarate, dans un mutant

ΔFPS1 a permis d'atteindre un titre final en éthanol plus haut de 14 %, à 123 g L⁻¹. En parallèle, les titres en glycérol et en acétate étaient réduits de 30 et 78 %, respectivement, à 4,8 et 0,35 g L⁻¹. Ce mutant ne présentait pas d'inhibition de sa croissance (Kong et al., 2006).

En outre, plusieurs équipes ont inséré des gènes codant pour des NADH oxydases hétérologues mitochondriales ou cytoplasmiques. Le ratio NADH / NAD⁺ étant diminué jusqu'à 6 fois, ceci a provoqué une augmentation de la production d'acétate, en présence ou en l'absence d'oxygène, notamment due à la forme cytosolique (Heux et al., 2006 ; Hou et al., 2009 ; Vemuri et al., 2007).

L'ingénierie évolutive a également permis à Cadière *et al.* (2011) d'obtenir un microorganisme envoyant un flux de glucose plus important vers le cycle des pentose-phosphates. Ceci a eu pour effet une diminution de l'excrétion d'acide acétique, en rapport avec l'équilibre NADP⁺ / NADPH de la cellule.

Enfin, la délétion de nombreux gènes impliqués dans la régulation de l'activité métabolique a permis de moduler la synthèse des différents acides organiques. Cette étude illustre la complexité des mécanismes régissant ce phénomène. Il est intéressant de noter que la surexpression du gène *RTG2* a provoqué une diminution de l'excrétion d'acides acétique et citrique. Sa suppression a provoqué un effet inverse, ainsi qu'une diminution de l'acide succinique (Yoshida & Yokoyama, 2012). Ce gène est impliqué dans la régulation rétrograde de l'activité mitochondriale sur l'expression des gènes nucléaires dont dépend, entre autres, le gène *CIT2* (Liu & Butow, 2006). Une étude portant sur la suppression des gènes *MIG1* et *MIG2*, impliqués dans l'apparition de l'effet Crabtree, a également permis de diminuer la production d'acide acétique (Cao et al., 2011).

132. LE ROLE MECONNU DES ACIDES SUCCINIQUE ET PYRUVIQUE

Les mécanismes métaboliques engendrant l'excrétion des acides succinique et pyruvique sont très mal connus, comme leurs rôles potentiels. Ils sont cependant tous les deux impliqués dans l'anabolisme, puisqu'ils sont des précurseurs de la synthèse des acides aminés.

1321. L'acide succinique et les cycles réactionnels

La modulation de la production d'acide succinique est un sujet qui a été principalement traité chez les bactéries. Certains de ces microorganismes sont en effet naturellement producteurs de cet acide à haute dose. Les souches les plus productrices ont été isolées dans des environnements riches en dioxyde de carbone, comme le rumen des vaches (Song & Lee, 2006). Il faut noter que l'acide succinique peut être produit par fixation de CO₂ sur le pyruvate.

Le cycle des acides tricarboxyliques sur glucose et celui du glyoxylate peroxyosomal sur acide oléique sont les principales sources d'acide succinique chez *S. cerevisiae*. Il a ainsi été démontré par marquage moléculaire que cette molécule provenait en très grande partie du cycle des acides tricarboxyliques lors d'une culture discontinue

(Zelle et al., 2008). Ce cycle, qui semble effectivement être un cycle en aérobiose, fonctionnerait de manière branchée en anaérobiose (Atzpodien et al., 1968 ; Chapman & Bartley, 1968 ; Sols et al., 1971). Dans ces conditions, les gènes codant pour la succinate déshydrogénase et la succinyl-coA synthase sont en effet réprimés (de Groot et al., 2007). Afin d'assurer les besoins anaboliques en acide succinique et de réoxyder le FADH, la fumarate réductase transforme alors l'acide fumarique en acide succinique (Camarasa et al., 2003 ; Camarasa et al., 2007).

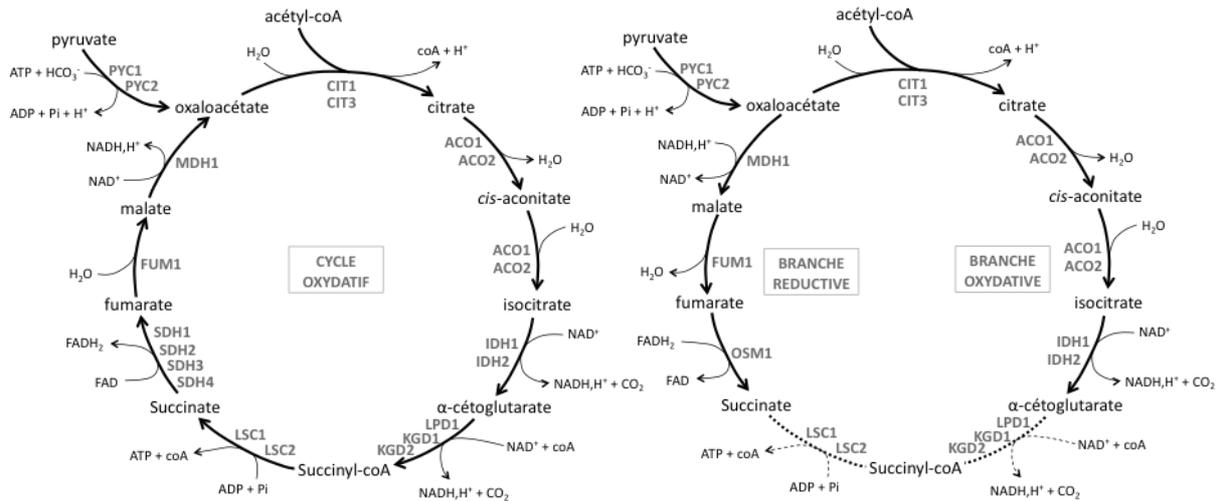


Figure 9 : Les deux types de fonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques : cycle oxydatif ou branches oxydative et réductive.

Plusieurs équipes ont étudié la synthèse d'acide succinique chez *S. cerevisiae*. L'insertion du transporteur malate SpMae1p de *Saccharomyces pombe* chez *S. cerevisiae* a montré une augmentation de l'excrétion d'acide succinique. Ce transporteur est connu pour transférer les deux acides (Zelle et al., 2008).

Des résultats similaires ont été observés en supprimant parallèlement les gènes *SDH1*, *SDH2*, *IDH1* et *IDP1*, codant respectivement pour la succinate déshydrogénase et les deux isoformes mitochondriales de l'isocitrate déshydrogénase. Chez un tel mutant, le cycle des acides tricarboxyliques est littéralement coupé. Ceci a conduit à une augmentation de la production d'acide succinique d'un facteur 4,8. Cette étude a également montré que *S. cerevisiae* est capable d'éviter une accumulation intracellulaire importante de cet acide en l'exportant vers le milieu extracellulaire. Ce transport demeure cependant inconnu (Raab et al., 2010).

En outre, une équipe a supprimé certains gènes du métabolisme mitochondrial chez des souches productrices de saké. La suppression des gènes *KGD1* et *FUM1*, codant respectivement pour une α-cétoglutarate déshydrogénase et une fumarase, a ainsi permis de réduire la production d'acide succinique dans les deux cas. Néanmoins, cette réduction a été observée en début de culture chez le mutant Δ *KGD1* mais en fin de culture chez le mutant Δ *FUM1*. La production d'acide succinique serait ainsi imputable à la voie oxydative du cycle des acides

tricarboxyliques dans les premières heures de cultures, pour finir par être réalisée par la branche réductrice (Arikawa et al., 1999).

1322. Le nœud du pyruvate

L'acide pyruvique est généralement produit lors de la croissance pendant des cultures discontinues. Il est ensuite partiellement reconsumé dans la seconde partie de la culture (Coote & Kirsop, 1974, dans Yoshida & Yokoyama, 2012 ; Pagliardini, 2010). Contrairement à l'acide succinique, il n'a fait l'objet que de très peu de travaux. Deux équipes néerlandaises ont cependant étudié le métabolisme de cet acide à l'aide de mutants (Flikweert et al., 1996 ; Flikweert et al., 1999 ; van Hoek et al., 1998b ; de Jong-Gubbels et al., 1992 ; Pronk et al., 1996 ; van Urk et al., 1989b). Bien que la cause de l'excrétion d'acide pyruvique demeure inconnue, ces travaux ont permis d'éclaircir la place de cette molécule dans le métabolisme cellulaire.

Le « nœud » du pyruvate est l'un des carrefours métaboliques les plus importants chez *S. cerevisiae*. C'est en effet au niveau de cette molécule que se fait la distinction entre les voies oxydative et fermentaire. Deux voies peuvent amener à la formation de pyruvate à partir de glucose : la glycolyse et la voie d'Entner-Doudoroff, inexistante chez *S. cerevisiae*. Selon l'environnement dans lequel évolue la cellule, cette molécule est ensuite répartie dans trois voies différentes :

- la décarboxylation oxydative, dans la mitochondrie,
- la décarboxylation en acétaldéhyde, dans le cytosol,
- la carboxylation oxydative, dans le cytosol.

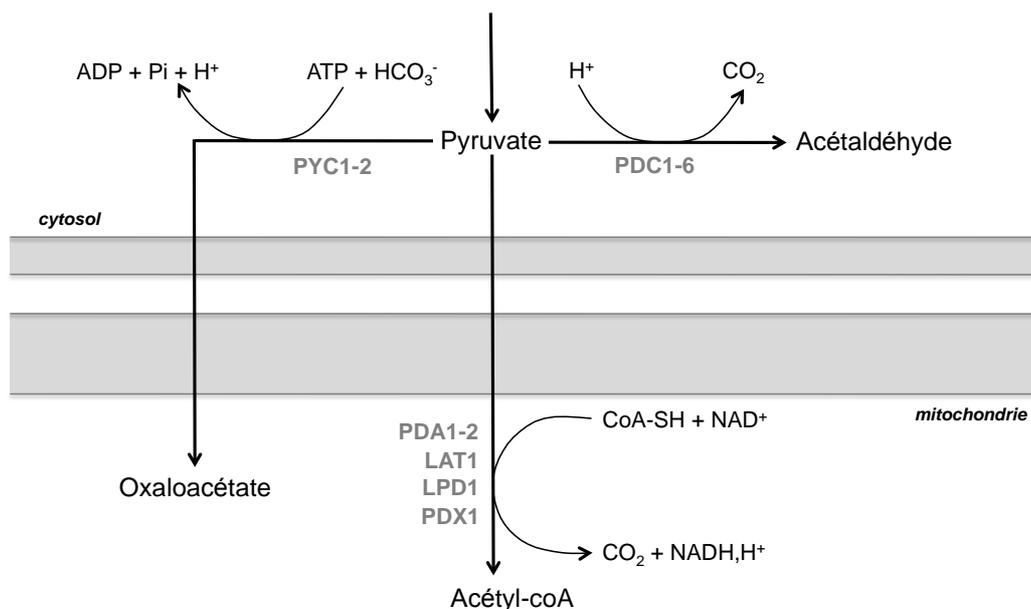


Figure 10 : Les trois voies de métabolisation de l'acide pyruvique.

Décarboxylation oxydative en acétyl-coA

La principale voie, la décarboxylation oxydative, sert à alimenter le cycle des acides tricarboxyliques en carbone. Le pyruvate est tout d'abord transporté à travers la membrane mitochondriale par diffusion passive et transport actif (Briquet, 1977). Le gène *YIL006w*, découvert en 2003 code pour un transporteur mitochondrial de 41,9 Da. Celui-ci est inhibé par l' α -cyano-4-hydroxycinnamate, l' α -cyano- β -(1-phénylindol-3-yl)acrylate et l' α -cyano-3-cinnamate (Hildyard & Halestrap, 2003 ; Pronk et al., 1996).

Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé en acétyl-coenzyme A grâce à l'action de la pyruvate déshydrogénase ($K_m = 0,4$ mM), dépendante des cofacteurs NAD^+ , coA, FAD et Thiamine PP. Ce complexe enzymatique se compose de cinq sous-unités, E1 α , E1 β , E2, E3 et X, respectivement codées par les gènes *PDA1*, *PDB1*, *LAT1*, *LPD1* et *PDX1* (James et al., 1995 ; Pronk et al., 1996). Ce complexe est activé par sa déphosphorylation en présence de Ca^{2+} , et inactivé par une phosphorylation spécifique (James *et al.*, 1995). La suppression partielle de cette voie a diminué le rendement en biomasse de 15 % en croissance aérobie sur glucose (Pronk et al., 1994). Ceci est dû à l'utilisation du pyruvate par une voie parallèle consommant plus d'énergie, le by-pass de la pyruvate déshydrogénase.

Décarboxylation en acétaldéhyde

Sous certaines conditions, le pyruvate utilise une voie alternative située dans le cytosol, la décarboxylation en acétaldéhyde, aussi nommé le by-pass de la pyruvate déshydrogénase. Son rôle serait de fournir des équivalents réducteurs sous forme de NADH, ainsi que de l'acétyl-coA mitochondriale pour alimenter le cycle des acides tricarboxyliques et de l'acétyl-coA cytosolique pour la synthèse de lipides, de stérols et de lysine (Postma *et al.*, 1989). Cette voie est composée de différentes étapes de transformation, assurées successivement par la pyruvate décarboxylase (Pdcp), l'acétaldéhyde déshydrogénase (Aldp) et l'acétyl-coA synthase (Acsp).

Le pyruvate est tout d'abord transformé en acétaldéhyde avec libération d'une molécule de CO_2 . Cette réaction, dépendante du Mg^{2+} et du coenzyme TPP, est catalysée par la PDC ($K_m = 6$ mM), un tétramère de 62 kDa (Pronk *et al.*, 1996). Parmi les six gènes codant pour ce complexe enzymatique, *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* sont des gènes structuraux, *PDC2* est quant à lui un facteur de transcription de *PDC1*, *PDC5*, et les rôles de *PDC3* et *PDC4* demeurent flous (Flikweert *et al.*, 1996 ; Pronk *et al.*, 1996).

Alors que la délétion du gène *PDC1* a permis à la cellule de conserver 60 à 75 % de l'activité de l'enzyme (Remize et al., 2000 ; Seebboth et al., 1990), la suppression de *PDC2* a altéré son activité d'un facteur trois. Ceci a provoqué une diminution de la production d'acétate et d'éthanol de 60 à 70 % et de la vitesse de consommation du glucose de 50 % suite à un pulse de glucose (Flikweert *et al.*, 1999). Un mutant $\Delta PDC1,5,6$ présentait quant à lui aucune activité enzymatique, et ne pouvait croître sur milieu synthétique contenant du glucose que par supplémentation en acétate ou en éthanol, démontrant ainsi la nécessité de cette voie dans le métabolisme de *S.*

cerevisiae (Flikweert *et al.*, 1996, 1999). De plus, un mutant PDC⁻ est incapable de produire de l'éthanol, mais uniquement du pyruvate comme coproduit. Dans ce cas, l'accumulation intracellulaire du NADH rend la transformation des oses extrêmement dépendante du métabolisme oxydatif (Flikweert *et al.*, 1996). La surexpression du gène *GLY1*, responsable de la transformation du tréhalose en glycine et acétyl-coA, a permis cependant au mutant de recouvrer une croissance cellulaire (Maris *et al.*, 2003). Pour l'ensemble de ces délétions, il est à noter que le taux de croissance est affecté de manière négative.

D'autres travaux ont également porté sur la surexpression du gène *PDC1* grâce à l'utilisation d'un gène multi-copies. L'activité était alors multipliée par 14, bien que le taux de croissance maximal en aérobiose ait diminué de 0,30 h⁻¹ à 0,23 h⁻¹. En temps normal, le pyruvate est principalement distribué vers la PDH ($K_m = 0,4$ mM) plutôt que vers la PDC ($K_m = 6$ mM), mais il semble que cette surexpression augmente la part de pyruvate orientée vers cette dernière (Pronk *et al.*, 1994, 1996 ; Van Hoek *et al.*, 1998b).

Une fois l'acétaldéhyde formée, celle-ci peut être transformée en éthanol par l'alcool déshydrogénase ($K_m = 6$ μM). Mais elle sert aussi de substrat à l'acétaldéhyde déshydrogénase ($K_m = 6$ mM), qui le transforme en acétate (Postma *et al.*, 1989). Ensuite, celui-ci est transformé en acétyl-coA, précurseur élémentaire de nombreux métabolismes annexes. Cette réaction est assurée par l'acétyl-coA synthase, et transforme également un ATP en AMP. Cette enzyme est codée par deux gènes, *ACS1* et *ACS2*, dont les isoenzymes correspondantes ont un K_m de 0,3 et 9 mM, respectivement (Van der Berg & De Steensma, 1995 ; Meaden *et al.*, 1997).

Le gène *ACS1* étant réprimé par le glucose, la suppression de *ACS2* a empêché toute activité enzymatique lors d'une culture sur glucose, rendant toute croissance impossible (van den Berg & Steensma, 1995 ; de Jong-Gubbels *et al.*, 1998 ; Kratzer & Schüller, 1995). En revanche, lors de la surexpression du gène *ACS2* en anaérobiose, l'activité a été amplifiée d'un facteur quatre à sept, bien que sans effet sur la production d'acétate (Remize *et al.*, 2000). L'effet obtenu était similaire lors de la surexpression simultanée des deux gènes (Jong-Gubbels *et al.*, 1998).

Enfin, l'acétyl-coA est soit utilisé pour la synthèse cytoplasmique de molécules organiques, soit transporté à travers les membranes mitochondriale ou peroxysomale par des transporteurs spécifiques.

Carboxylation oxydative

La troisième et dernière voie que le pyruvate peut emprunter est la carboxylation oxydative, le transformant en oxaloacétate pour alimenter le cycle de des acides tricarboxyliques en carbone *via* la citrate synthase. La pyruvate carboxylase (Pycp) est une isoenzyme cytosolique codée par les gènes *PYC1* et *PYC2* (Walker *et al.*, 1991). Indépendamment de la source de carbone, la régulation de *PYC1* se fait au niveau transcriptionnel par la source d'azote. Par rapport à l'ammoniaque, l'aspartate, l'asparagine, le glutamate et la glutamine diminuent son activité enzymatique d'un facteur 2 à 5 (acides aminés dont le métabolisme aboutit à l'oxaloacétate), alors que l'arginine, la méthionine, la thréonine et la leucine l'augmentent d'un facteur 1,5 à 3 (acides aminés dont le métabolisme aboutit au pyruvate) (Huet *et al.*, 2000).

La croissance sur glucose n'est pas affectée si l'un des gènes est supprimé. Elle est cependant impossible chez un double mutant sans l'ajout d'aspartate comme seule source d'azote (Stucka et al., 1991). Leur surexpression n'altère cependant ni la production d'acétate ni celle d'éthanol (Bauer *et al.*, 1999).

14. EFFET DES ACIDES ORGANIQUES SUR LE METABOLISME

141. IMPACT DES ACIDES FAIBLES EXOGENES

1411. Transport et équilibre des acides faibles

Plusieurs types de transports des acides existent chez les levures, et plus précisément chez *S. cerevisiae*. Quatre mécanismes ont ainsi été identifiés au niveau de la membrane plasmique, répondant à des modes d'action et de régulation variés (Figure 11) (Casal et al., 2008). Le transport des acides peut s'opérer par simple diffusion à travers la membrane plasmique, ou à l'aide de transporteurs protéiques. Ceux-ci se répartissent entre deux familles : la Major Facilitator Superfamily (MFS), regroupant les systèmes d'antiports, de symports et d'uniports, et la famille ATP-Binding Cassette (ABC), regroupant les systèmes de transport nécessitant une hydrolyse d'ATP.

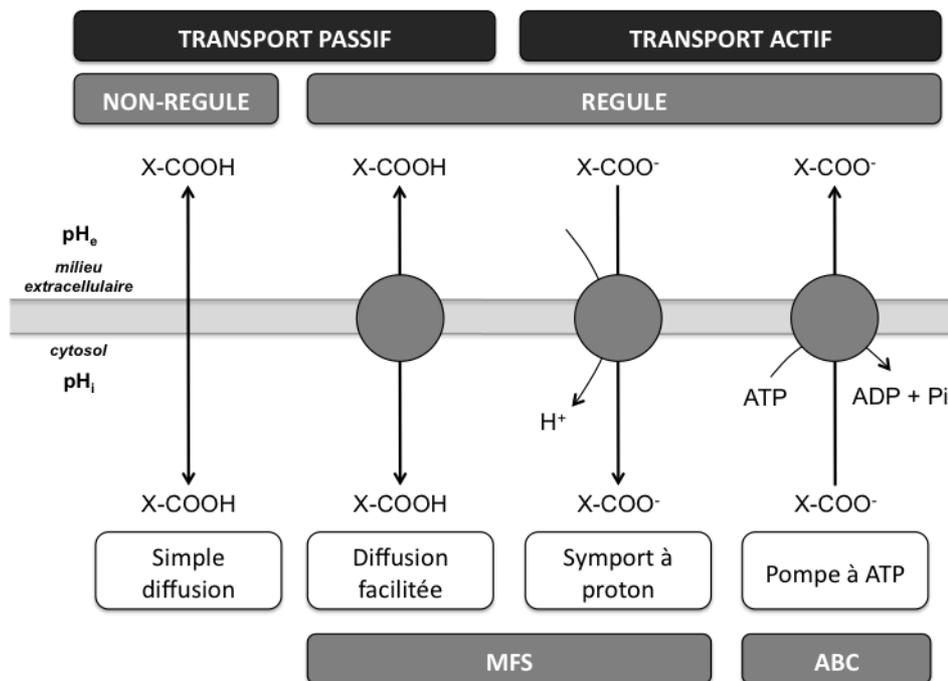


Figure 11 : Les différents types de transport des acides faibles chez les levures. Les transporteurs régulés appartiennent à deux familles différentes : la Major Facilitator Superfamily (MFS) et la famille ATP-Binding Cassette (ABC).

En solution, les acides organiques et plus précisément les acides faibles s'équilibrent entre leur forme protonée (non dissociée) et leur forme ionique (dissociée). Cet équilibre est propre à chaque acide et dépend de leur constante de dissociation propre, K_a . Il est en outre fortement dépendant du pH de la solution : la prédominance de la forme dissociée augmente avec le pH et inversement. Cet équilibre est donné par l'équation de Henderson-Hasselbach :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{Acide}^-]}{[\text{Acide} - \text{H}]}$$

Équation 4 : Equation de Henderson-Hasselbach

Ces acides faibles sont de petites molécules capables de traverser la membrane plasmique des cellules par simple diffusion. Cependant, seule la forme protonée peut diffuser de cette façon, la membrane pouvant en effet être considérée comme imperméable à la forme dissociée (Kell et al., 1981 ; Krebs et al., 1983 ; Warth, 1989). Cette particularité, associée au phénomène d'équilibre des acides selon le pH, peut amener à une accumulation intracellulaire des acides. Lors de cultures de levures, le pH extracellulaire (pH_e) est inférieur au pH intracellulaire (pH_i). La forme protonée du milieu extracellulaire va donc diffuser dans la cellule afin d'équilibrer les concentrations de part et d'autre de la membrane. Dans le milieu intracellulaire, l'acide se dissocie alors en partie en proton plus forme dissociée, incapable de rediffuser vers le milieu extracellulaire (Figure 12). Toutefois, il faut noter que certains acides, comme l'acide acétique, sembleraient capables de diffuser sous forme dissociée du cytosol vers la mitochondrie (Brierley et al., 1968).

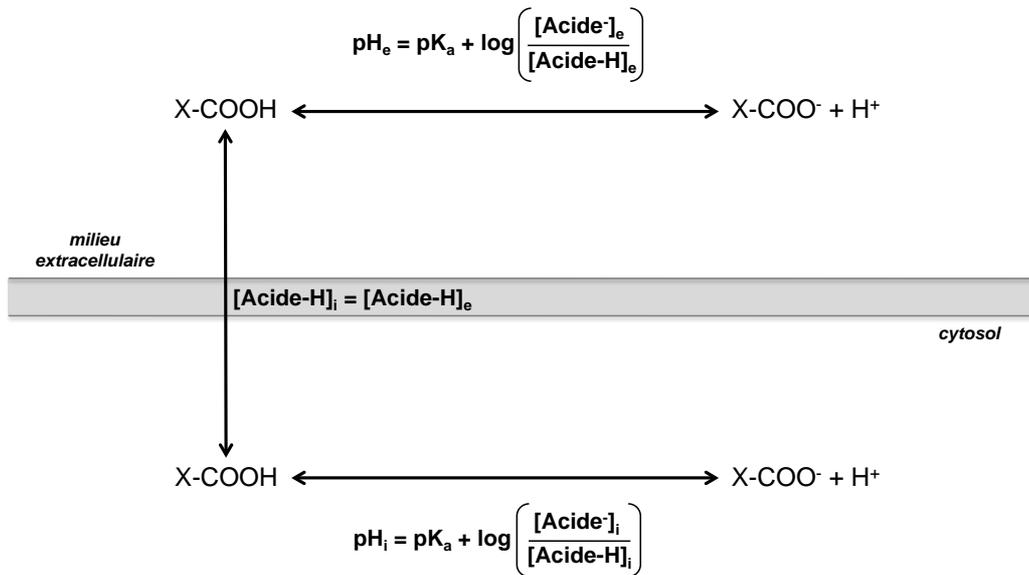


Figure 12 : Phénomène de simple diffusion des acides faibles à travers la membrane plasmique, selon l'équation d'Henderson-Hasselbach.

Outre la simple diffusion, *S. cerevisiae* est capable de transporter les acides faibles par des systèmes protéiques variés. Deux symports à protons ont été identifiés. Le premier permet de transférer les acides acétique, pyruvique, propionique et D-L-lactique (Cassio et al., 1987). Le second transporte les acides acétique, propionique et formique, mais pas les pyruvique et lactique (Casal et al., 1996). Ils sont induits par ces acides, mais réprimés par le glucose.

Plusieurs systèmes de perméases ont également été identifiés. Les gènes *ADY2* et *AZR1* sont ainsi impliqués dans le transport de l'acide acétique vers le cytoplasme (Paiva et al., 2004 ; Tenreiro et al., 2000). *Ady2p*, un transporteur actif, est d'ailleurs impliqué dans la consommation d'acide acétique comme substrat. *Azr1p* semble par contre impliqué dans la réponse au stress acétate. Cet acide peut également traverser la membrane plasmique par diffusion facilitée *via* l'aquaglycéroporine *Fps1p*, codée par le gène *FPS1* (Mollapour & Piper, 2007). Le pyruvate peut quant à lui entrer dans la cellule par une protéine codée par *JEN1* (Akita et al., 2000 ; Makuc et al., 2001). Celle-ci est également capable de transporter l'acide lactique. Les gènes *MCH1*, *MCH2*, *MCH3*, *MCH4* et *MCH5*, un temps pressentis pour coder une perméase pour des acides monocarboxyliques, ne semblent cependant coder que pour une enzyme située dans la membrane mitochondriale interne, et non plasma-membranaire (Makuc et al., 2001). Toutefois, cinq gènes codant pour des perméases présumées de la membrane plasmique ont été identifiés.

Cependant, aucune perméase plasma-membranaire permettant de transporter l'acide succinique n'a été identifiée chez *S. cerevisiae*. D'autres levures possèdent tout de même des transporteurs assurant le transport de certains acides dicarboxyliques, dont les acides succinique, malique, oxaloacétique, α -cétoglutarique et fumarique. C'est le cas par exemple de *Saccharomyces pombe* avec la protéine *Mae1p*, *Kluyveromyces lactis* avec *Jen2p*, ou encore *Candida utilis* (Cássio & Leño, 1993 ; Grobler et al., 1995 ; Milton et al., 1975 ; Zelle et al., 2008).

Enfin, deux transporteurs de la famille ABC ont été identifiés. Il s'agit des protéines *Pdr12p* et *Yrs1p*, impliquées dans la réponse au stress acide (Cui et al., 1996 ; Piper et al., 1998). Ces protéines permettent de transporter un anion vers le milieu extracellulaire en hydrolysant une molécule d'ATP.

L'ensemble de ces systèmes permet à *S. cerevisiae* de réguler le transport des acides organiques à travers sa membrane plasmique selon les conditions environnementales. Ainsi, une modulation de l'accumulation de certains acides a pu être observée avec l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu de culture (Casal et al., 1998).

1412. Gestion du pH intracellulaire par *S. cerevisiae*

La gestion du pH intracellulaire (pH_i) est essentielle pour les levures. En effet, celui-ci influe sur le fonctionnement général du métabolisme au niveau de l'activité de la glycolyse, de la croissance cellulaire ou encore de la transduction des différents signaux cellulaires (Anand & Prasad, 1989 ; François et al., 1986 ; Krebs et al., 1983 ; Russell, 1992 ; Thevelein, 1994). Or les acides faibles ont un impact important sur ce pH_i , puisqu'ils libèrent des protons lors de leur dissociation dans le milieu intracellulaire (Pampulha & Loureiro-Dias, 1989).

Cependant, tous les auteurs ne s'accordent pas sur les phénomènes de régulation du pH intracellulaire. Certains avancent que la valeur de ce paramètre est relativement stable et aux alentours de la neutralité : $6,4 < \text{pH}_i < 7,2$ (Dombek & Ingram, 1987 ; Eraso et al., 1987 ; Eraso & Gancedo, 1987 ; Kotyk & Georghiou,

1991 ; Kresnowati et al., 2008 ; Ramos et al., 1989a ; Ramos et al., 1989b ; Tenreiro et al., 2000). Cette particularité dénoterait une capacité de régulation du pH_i chez *S. cerevisiae*, assurée notamment par des ATPases de la membrane plasmique qui vont expulser les protons afin de conserver le potentiel électrique de la membrane (Eraso & Gancedo, 1987 ; Serrano, 1980). Il faut toutefois noter que les vacuoles participent également à cette régulation du pH_i (Calahorra et al., 1998). Le pH de ces organites est ainsi maintenu à des valeurs comprises entre 6,0 et 6,2 par l'action d'ATPases vacuolaires. Il chute en outre suite à l'acidification du milieu extracellulaire, notamment lorsque cette acidification est due à l'acide acétique (Carmelo et al., 1997 ; Chattopadhyay et al., 2000 ; Mollapour et al., 2004).

A l'inverse, d'autres auteurs remettent en doute la capacité des cellules à réguler leur pH intracellulaire à des valeurs aussi hautes (Pampulha & Loureiro-Dias, 1989 ; Taherzadeh et al., 1997 ; Valle et al., 1986). Enfin, une autre équipe avance l'existence d'un pH_i critique, en deçà duquel *S. cerevisiae* ne serait plus capable de réguler son pH intracellulaire (Arneborg et al., 2000).

Même si ces faibles variations peuvent affecter le métabolisme de *S. cerevisiae*, le pH extracellulaire (pH_e) semble jouer un rôle bien plus important, agissant sur la production de biomasse et de coproduits, sur les rendements globaux de conversion et sur sa viabilité cellulaire. Ainsi, la croissance est totalement inhibée lorsque le pH extracellulaire est inférieur à 2,4 ou supérieur à 8,6 (Carmelo et al., 1996 ; Jones et al., 1981). Par contre, les cinétiques microbiennes (croissance et production) ne semblent pas être drastiquement affectées lorsque ce pH_e est compris entre 3,5 et 6,0 (Matthews & Webb, 1991, cité par Carmelo et al., 1996). Un pH_e optimal de croissance de 5 à 5,5 est admis par tous (Verduyn et al., 1990).

Enfin, Kresnowati et ses collaborateurs (2008) ont mis en évidence l'existence d'une diminution brutale et rapide du pH intracellulaire lors de la perturbation métabolique induite par l'effet Crabtree « court terme ». Après un pulse de glucose lors d'une culture continue limitée en glucose, le pH_i a diminué de 6,43 à environ 5,0 en seulement quelques secondes. La cellule a cependant présenté une capacité à se réalcaliniser, et a stabiliser son pH à une valeur d'environ 6,0 en 30 secondes. D'autres études utilisant des méthodes d'analyse différentes ont rapporté une diminution similaire, comprise entre 0,3 et 0,6 unité pH (Ramos et al., 1989b ; Valle et al., 1986). Différentes théories ont été proposées afin d'expliquer ce phénomène de diminution du pH_i , comme l'accumulation de CO_2 ou l'augmentation de la vitesse de phosphorylation du glucose (Gillies et al., 1981 ; Ramos et al., 1989b), mais c'est la production d'acide acétique qui semblerait en être la principale source (Kresnowati et al., 2008).

1413. Effet découplant des productions d'énergie et de biomasse

Le principal mécanisme d'inhibition imputé aux acides faibles, et surtout le plus observable, est l'effet découplant qu'il opère entre la production de biomasse et d'énergie. Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell (1961), le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est couplé à la production d'ATP. L'effet découplant des acides se traduit alors par une augmentation de la consommation d'oxygène afin d'assurer

le bon fonctionnement de son anabolisme. Lors de cultures continues, l'ajout d'acide benzoïque a ainsi augmenté la vitesse spécifique de consommation d'oxygène pour un taux de croissance donné, sa valeur maximale augmentant de près de 100 %, de 12 à 21 mmol g_x⁻¹ h⁻¹ (Verduyn et al., 1992). Toutefois, ce phénomène est plus marqué pour des taux de croissance faibles et est proportionnel à la concentration en acide ajouté.

Lorsque des acides faibles sont présents dans le milieu de culture, ils entrent dans la cellule, notamment par diffusion passive (Casal et al., 1996 ; Mollapour & Piper, 2007). Si le pH est plus alcalin dans la cellule que dans le milieu de culture, les acides se dissocient à l'arrivée dans le cytosol. La libération de protons en résultant provoque alors une chute du pH_i, que la cellule doit réguler pour conserver un fonctionnement intègre de son métabolisme. Afin de contrer ce phénomène, *S. cerevisiae* utilise donc des ATPases plasma-membranaires pour lui permettre d'expulser ces protons, lui permettant ainsi de se réalcaliser (Russell, 1992 ; Sigler et Hofer, 1991). Cette pompe à protons est codée principalement par le gène *Pma1* (Holyoak et al., 1996 ; Piper et al., 2001).

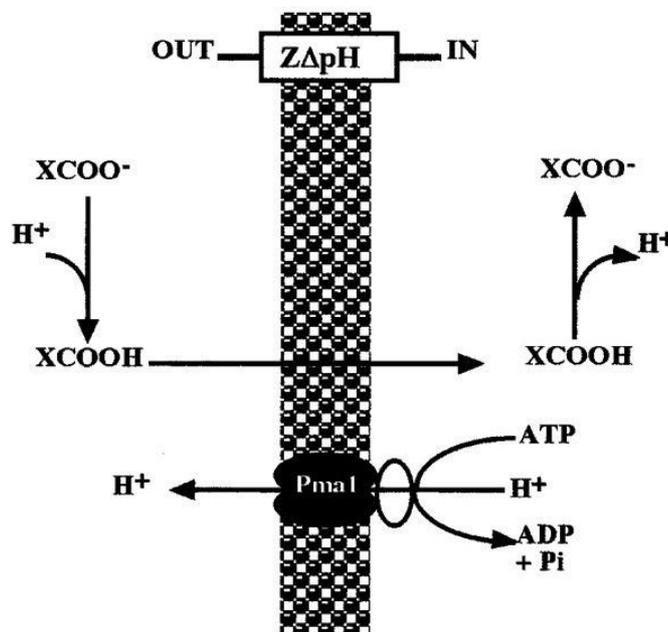


Figure 13 : Le mécanisme de l'ATPase à protons induisant l'effet découplant des acides faibles. Piper *et al.*, 2001.

Bien que nécessaire, ce mécanisme consomme une quantité importante d'ATP, augmentant ainsi sa production par rapport à la demande énergétique du métabolisme anabolique (Russell, 1992 ; Taherzadeh et al., 1997). La concentration intracellulaire en ATP chute ainsi d'un facteur 100 lors d'un stress acide diminuant le pH extracellulaire de 4,5 à 3,8 (influençant le pH_i dans le même sens), sans cependant affecter le taux de croissance (Holyoak et al., 1996). Il faut toutefois noter que cette observation a également été faite lors de divers stress. Ainsi, un stress thermique a augmenté la proportion d'ATP utilisée par les ATPase de 15 à 50 % (Piper, 1993 ; Piper et al., 1994). En utilisant un mutant incapable de consommer l'oxygène, Pampulha et Loureiro-Dias (2000) ont ainsi rapporté une diminution du rendement en biomasse produit sur ATP de 14 à 4 g_x mol_{ATP}⁻¹ (Y_{ATP}) suite à l'ajout de 170 mM d'acide acétique. Une diminution du rendement en biomasse produite sur glucose consommé

a en outre été observée lors de l'ajout d'acide benzoïque (Verduyn et al., 1992). Enfin, une phase de latence a pu être observée après un choc acide (Lambert & Stratford, 1999 ; Tenreiro et al., 2000).

Néanmoins, l'ensemble de ces travaux n'ont porté que sur des acides faibles exogènes. Il semble logique que des acides organiques synthétisés par les cellules conduisent au même phénomène de découplage. Cependant, des phénomènes de régulation des transporteurs pourraient permettre à la cellule d'adapter différemment sa réponse à l'accumulation de protons (Mollapour & Piper, 2007).

1414. Conséquence indirecte de l'effet découplant

L'effet découplant a pour effet direct d'augmenter la vitesse spécifique de consommation de dioxygène. Or le métabolisme de cette molécule est lié à la génération de molécules extrêmement réactives : les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Gille & Nohl, 2001 ; Tarrío et al., 2008). Cet effet indirect de l'effet découplant sur la production de ces DRO est relativement mal renseigné dans la littérature. Il a cependant été montré que le dysfonctionnement du transport des électrons dans la mitochondrie augmente l'apparition de DRO en présence d'acides sorbique et benzoïque (Piper, 1999). En outre, une forte augmentation de ces dérivés a été observée chez des cellules soumises à l'apoptose induite par l'acide acétique (Almeida et al., 2009 ; Giannattasio et al., 2005 ; Ludovico et al., 2002).

L'équipe de Piper (1999) a pu mettre en évidence la nécessité de l'expression du gène *SOD1* pour l'apparition d'une résistance à ce phénomène. Celui-ci code en effet pour une superoxyde dismutase capable de détoxifier les radicaux libres formés. Pour les mêmes raisons, l'activité de la catalase a également été augmentée lors de l'apparition de DRO suite à un stress acétate (Giannattasio et al., 2005). La surexpression de cette enzyme a par ailleurs permis de lever partiellement le stress oxydatif induit par l'ajout d'acide lactique (Abbott et al., 2009).

1415. Cas particulier du dioxyde de carbone

Dans la littérature, le dioxyde de carbone est rarement considéré comme un acide faible. Pourtant, son effet découplant sur la membrane interne des mitochondries a été mis en évidence *in vitro* (Lodeyro et al., 2001). Cette molécule présente également deux constantes de dissociation ($pK_{a1} = 6,37$ et $pK_{a2} = 10,32$). En solution, le CO_2 est spontanément hydraté en H_2CO_3 , censé diffuser librement à travers les membranes. Puis cette molécule se dissocie en HCO_3^- selon le pH. Ce mécanisme libère alors un proton. Dans des milieux de culture de levures (pH 4-5), le CO_2 ne se dissocie que très peu. En revanche, il est plus fortement soumis à cette dissociation dans le milieu intracellulaire, dont le pH est plus élevé (Figure 14).

Les cellules vont alors utiliser leur ATPase pour expulser les protons libérés. Par contre, la membrane plasmique demeure imperméable à la forme dissociée HCO_3^- . Pour éviter ce déséquilibre ionique, *S. cerevisiae* semble capable d'accumuler du K^+ du milieu extracellulaire grâce à un antiport K^+ / H^+ (Peña, 1975). A l'inverse, une sortie d' H_2CO_3 provoque une sortie concomitante de K^+ . *S. cerevisiae* serait également capable

d'accumuler des bicarbonates dans les vacuoles (Lopez et al., 1999). Il faut noter que du dioxyde de carbone (jusqu'à 30 %) peut être expulsé lors d'un ajout d'acide propionique.

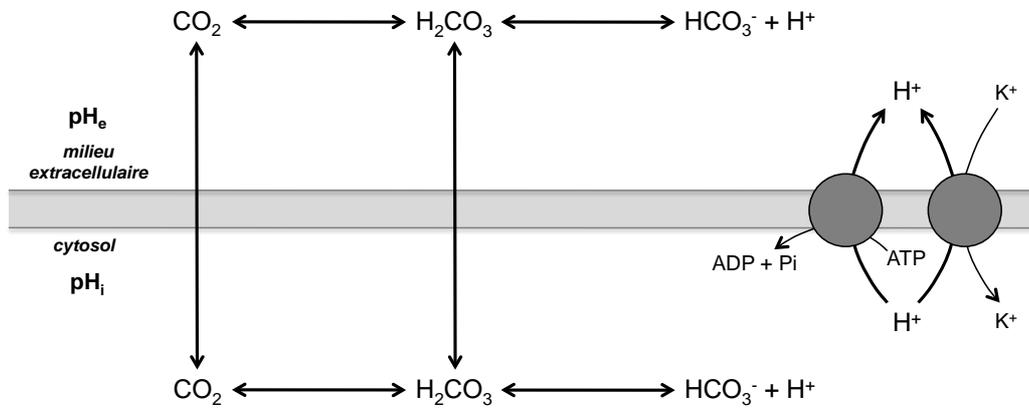


Figure 14 : Equilibre du dioxyde de carbone entre les milieux intra et extracellulaires.

En outre, cette molécule est inhibitrice de la croissance lorsqu'elle est apportée au milieu de culture par aération. Les premiers effets d'inhibition ont été observés à partir de 20 % des gaz d'entrée et celle-ci était totale à 50 %. Ceci représentait 6,4 et 16 mM de CO₂ dissous, respectivement (Chen & Gutmanis, 1976). Ce phénomène semble cependant plus important en aérobiose qu'en anaérobiose. Aguilera *et coll.* (2005) ont en effet observé une chute du rendement en biomasse de 25 % en présence d'oxygène, contre seulement 10 % en son absence. Ces auteurs ont également rapporté une augmentation de l'expression de gènes liés à l'activité mitochondriale.

1416. Concentrations critiques et production de l'acide acétique

L'acide acétique est le plus important parmi les différents acides organiques caractéristiques des métabolismes fermentaire et oxydo-réductif. En outre, des concentrations millimolaires sont suffisantes pour dissiper la force proto-motrice (Fernandes et al., 1997) et son impact est exponentiel en fonction de sa concentration dans le milieu (Fernandes et al., 1997 ; Malfeito Ferreira et al., 1997 ; Narendranath et al., 2001).

Selon plusieurs études menées avec de l'acide acétique exogène, la concentration critique à laquelle l'activité biologique cesse est comprise entre 80 et 167 mM, soit entre 4,8 et 10 g L⁻¹ (Narendranath et al., 2001 ; Piper et al., 2001 ; Taherzadeh et al., 1997 ; Thomas et al., 2002). Il est cependant plus délicat de préciser la limite inférieure à laquelle les premiers signes d'inhibition apparaissent. En effet, 5 mM ne semblent pas affecter le microorganisme, alors qu'une concentration de 8 mM provoque déjà une altération de la croissance (Larsson et al., 1997 ; Narendranath et al., 2001).

Concernant la synthèse d'acétate par les cellules, elle est altérée par différents facteurs environnementaux. Tout d'abord, un pH extracellulaire inférieur à 3,5 ou supérieur à 5,5 augmente cette production. Il en va de même avec l'augmentation du taux de dilution, puisque la concentration en acide acétique passe alors de 0,4 à $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, à 0,9 mM à $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ (Verduyn et al., 1990). En outre, la disponibilité de l'ammoniaque joue un rôle essentiel (Bely et al., 2003 ; Hernandez-Orte et al., 2006). Ainsi, une augmentation de sa concentration de 200 à 500 $\text{mg}_N \text{ L}^{-1}$ favorise la synthèse d'acide acétique, de 0,34 à 1,21 g L^{-1} (Vilanova et al., 2007). Enfin, il semble que le phénomène d'adaptation spontanée des cellules à l'éthanol entraîne un accroissement important de la production de cet acide, de 0,30 à 1,55 g L^{-1} (Stanley et al., 2010).

L'équipe de Smits (Smits et al., 2000) a rapporté des rendements de production en acétate de 0,005 g g^{-1} en anaérobiose et 0,03 g g^{-1} en aérobiose. Avec la souche CEN.PK 113-7D, ces valeurs sont de l'ordre de 0,005 et 0,017 g g^{-1} (Pagliardini, 2010). Avec un taux de dilution égal à 0,05 h^{-1} en aérobiose, la concentration à l'état stationnaire est de 6,6 mg L^{-1} d'après les recherches de Visser et ses collaborateurs (Visser et al., 2004).

142. INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR L'ACIDE ACETIQUE

L'apoptose est un certain type de mort cellulaire que l'on pensait confiné aux cellules animales, chez lesquelles les protéines de maturation post-traductionnelle jouent alors un rôle essentiel. Il est aujourd'hui indiscutable qu'elle existe également chez *S. cerevisiae*. Mais chez cette levure, elle semble plutôt résulter de l'action d'un ou plusieurs effecteurs sur l'exécution de multiples mécanismes de régulation génomique, amenant à une mort cellulaire programmée (Ludovico et al., 2005 ; Madeo et al., 2004).

Cependant, seuls quelques uns de ces effecteurs ont été mis en évidence. Il est donc nécessaire de caractériser les réseaux de régulation de manière fonctionnelle afin de mieux connaître et comprendre la mort cellulaire programmée chez *S. cerevisiae*. L'équipe de Guaragnella (2006) a démontré que le gène *YCA1*, codant pour une métacaspase, joue un rôle important dans le signal de mort cellulaire programmée. Un mutant $\Delta YCA1$ possède en effet une cinétique apoptotique plus faible.

Chez *S. cerevisiae*, l'acide acétique fait partie des inducteurs de l'apoptose, et semble agir de manière similaire que chez les cellules animales (Ludovico et al., 2001 ; Wissing et al., 2004). En présence de 20 à 80 mM, soit 1,2 à 4,8 g L^{-1} , l'induction de cette mort cellulaire provoque la condensation de la chromatine le long de l'enveloppe nucléaire, une fragmentation de l'ADN et une exposition de la membrane cytoplasmique à la phosphatidylsérine. Il faut toutefois noter qu'aucun marqueur apoptotique, comme le phénotype TUNEL-positif, n'a été décelé à des concentrations supérieures à 120 mM, soit 7,2 g L^{-1} . Ceci suggère qu'un mécanisme passif de type nécrotique est la principale cause de mort cellulaire à de hautes concentrations extracellulaires (Ludovico et al., 2001).

Une forte concentration en acétate provoque une diminution importante du pool intracellulaire d'acides aminés due, au moins en partie, au blocage du transport des acides aminés aromatiques à travers la membrane plasmique (Bauer et al., 2003). Cette variation semble être le premier signal du déclenchement de l'apoptose, et va altérer la voie TOR (Target Of Rapamycin) et le système général de contrôle et de régulation du pool d'acides aminés (GAAC).

En réponse, la protéine kinase Gcn2p permet la formation de Gcn4p, un activateur transcriptionnel du système GAAC. Il y a alors synthèse de l'ensemble des acides aminés, qu'ils soient déjà en quantité suffisante ou non. Les mutants $\Delta GCN2,4$ et $\Delta GCN4$ montrent cependant une tolérance accrue à l'acide acétique, prouvant ainsi l'implication de la protéine Gcn4p ou du système GAAC dans le signal déclencheur de l'apoptose (Almeida et al., 2009). Cependant, une diminution de l'apport azoté décuple alors l'effet inducteur de l'acétate sur la mort cellulaire programmée (Hazan et al., 2004).

L'acide acétique altère également un grand nombre de protéines directement ou indirectement liées à la voie TOR. De nombreuses protéines voient leur concentration intracellulaire diminuer, notamment celles relatives au métabolisme des hydrates de carbones, à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle, au turnover des protéines, à la synthèse nucléotidique et à la réponse au stress. L'augmentation de l'activité du protéasome durant l'apoptose renforce l'idée d'une dégradation des protéines, même si la délétion du gène *MG132* permet d'inhiber son activité, et ainsi de prévenir partiellement la mort cellulaire (Almeida et al., 2009 ; Valenti et al., 2008).

Par contre, une majorité des protéines intervenant dans la synthèse d'acides aminés sont produites en plus grande quantité, certainement suite à l'action du système GAAC. En outre, un mutant $\Delta TOR1$ présente une diminution de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et une amélioration de la croissance chez les cellules présentant un phénotype TUNEL-négatif lors de la croissance en présence d'acide acétique (Almeida et al., 2009). Enfin, la même équipe a également montré que deux phosphatases, la Pph21p et la Pph22p, étaient impliquées dans le signal de l'apoptose. Celles-ci sont des médiateurs avals des voies TOR.

D'autres travaux ont également rapporté une apoptose dite « mitochondriale » chez les cellules animales, dans laquelle cet organe joue un rôle prépondérant (Kluck et al., 1997 ; Liu et al., 1996 ; Pham et al., 2000). Lors de cette mort cellulaire programmée également observée chez *S. cerevisiae*, le cytochrome C subit une translocation de la membrane mitochondriale vers le cytosol, rompant ainsi la chaîne d'électrons. Ceux-ci sont alors redirigés vers la formation de DRO. En conséquence, une baisse de la consommation d'oxygène, de la quantité de cytochrome C oxydase et du potentiel mitochondrial a été observée, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (Giannattasio et al., 2005 ; Ludovico et al., 2002). En outre, un dysfonctionnement de l'ATPase mitochondriale a été rapporté chez le mutant $\Delta ASF1/CIA1$ ne possédant pas l'histone chaperone correspondante. Ceci argumente en faveur d'une régulation génomique de l'apoptose chez les levures (Yamaki et al., 2001).

143. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ACIDES ORGANIQUES

1431. Régulation du pH intracellulaire et équilibre ionique

Lors de l'effet découplant induit par un stress acide, l'ATPase Pma1p permet aux cellules d'expulser des protons issus de la dissociation intracellulaire des acides. Toutefois, ce seul phénomène ne permet pas d'expliquer la régulation du pH intracellulaire. La membrane plasmique étant imperméable aux anions, ceci créerait en effet un déséquilibre ionique et potentiellement osmotique. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la régulation du pH_i chez *S. cerevisiae*.

Pdr12p est un transporteur de la famille ABC induit lors d'un stress par des acides de 3 à 8 carbonés. Cette induction est d'autant plus importante que la concentration en acide est importante. Une diminution du pH extracellulaire de 7 à 4,5 a en outre conduit à une expression dix fois plus élevée du gène *PDR12* (Hatzixanthis et al., 2003 ; Holyoak et al., 1999 ; Piper et al., 1998 ; Piper et al., 2001). Bien qu'il ne soit pas surexprimé en présence d'acide acétique, ce gène semble tout de même essentiel pour l'acquisition d'un mécanisme de résistance à cette molécule chez *S. cerevisiae* (Hatzixanthis et al., 2003 ; Piper et al., 2001).

Cette protéine fonctionnerait en parallèle à la Pma1p et de façon similaire, puisqu'elle consomme une molécule d'ATP pour éjecter un anion (Piper et al., 2001) (Figure 15). Si l'on considère les échanges d'un point de vue dynamique, l'excrétion combinée d'anions et de protons peut être considérée comme un cycle futile énergétiquement coûteux. Elle serait en effet contrebalancée par les phénomènes de diffusion passive ou facilitée à travers la membrane plasmique. D'autres mécanismes devraient donc intervenir afin de limiter l'entrée d'acides

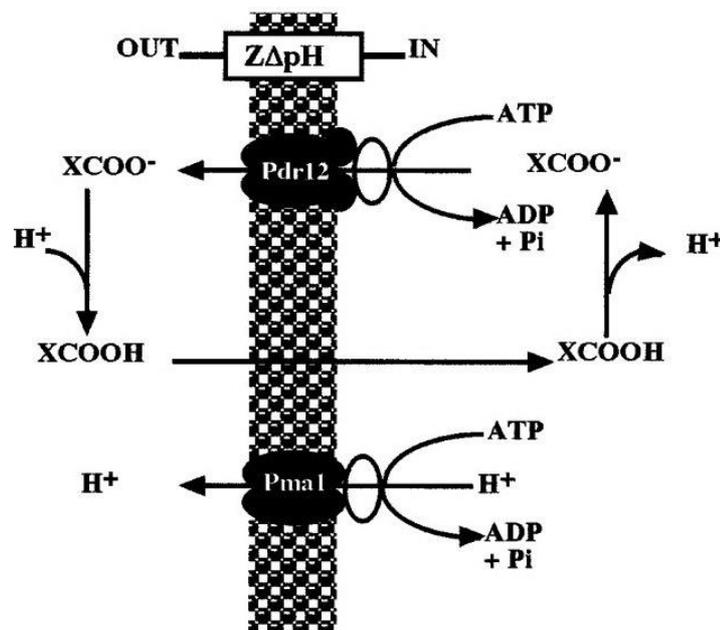


Figure 15 : Mécanisme d'action du transporteur Pdr12p. Piper *et al.*, 2001.

dans la cellule. Mollapour & Piper (2007) ont ainsi montré que Fps1p, une aquaglycéroporine laissant passer l'acide acétique, était endocytée suite à un stress acide.

Une autre hypothèse de mécanisme permettant d'éviter le déséquilibre ionique et potentiellement osmotique de l'accumulation d'anions se rapporte aux flux de cations à travers la membrane plasmique. Les flux de Na^+ et de K^+ ont un impact global sur le métabolisme de la cellule et notamment au niveau de la force ionique, du pH_i, de la pression de turgescence et du volume cellulaire (Rothstein, 1959 ; Tosteson & Hoffman, 1960 ; Yenush et al., 2002). Na^+ étant toxique pour les cellules, il a tendance à être excrété. A l'inverse, le K^+ peut être bénéfique aux cellules et est accumulé lors de la croissance cellulaire (Yenush et al., 2002). Comme pour la résistance au dioxyde de carbone, *S. cerevisiae* pourrait ainsi utiliser des antiports K^+ / H^+ afin d'exporter les protons, plutôt que ses ATPases. Toutefois, l'accumulation intracellulaire de ce cation serait alors très élevée. En outre, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer l'effet découplant (Rodríguez-Navarro, 2000). Les auteurs sont partagés sur l'existence de ce phénomène. Lors d'une culture sur glucose, une accumulation a effectivement été rapportée suite à un pulse de différents acides, dont l'acétique (Peña, 1975 ; Ryan et al., 1971 ; Ryan & Ryan, 1972). Mais les travaux de Lopez *et coll.* (1999) n'ont pas permis d'observer un tel phénomène sur glucose. Le cation Ca^{2+} serait également accumulé en présence de certains acides (Mori et al., 1998).

Chez *S. cerevisiae*, la régulation du pH intracellulaire ne se réalise donc pas uniquement par l'expulsion de protons par les ATPases. Il apparaît en effet qu'un ensemble complexe de différents mécanismes soit mis en œuvre dans cet objectif.

1432. Induction de systèmes de régulations de l'expression de gènes.

Un autre type de mécanisme de défense contre les acides organiques concerne l'activation de systèmes de régulation, qui peuvent prendre différentes formes. Les réseaux génomiques et enzymatiques responsables de ces successions d'événements demeurent généralement extrêmement complexes et ne sont compris que dans une moindre mesure (Abbott et al., 2008 ; Schuller et al., 2004).

En général, la voie HOG est activée en réponse à un stress osmotique. Cependant, elle semble également déclenchée par l'acide acétique. Celui-ci, une fois dans la cellule, génère un signal inconnu permettant d'activer les gènes *HOG1* et *SLT2* transitoirement. Ils œuvrent alors dans la réponse cellulaire au stress. Cependant, seul le premier permet à *S. cerevisiae* d'augmenter sa tolérance vis-à-vis de l'acide acétique, sans pour autant induire la production de glycérol habituelle à la voie HOG (Mollapour & Piper, 2006). L'activation de *HOG1* entraîne celle de la cascade Hog-MAPK (cascade de la protéine kinase activée par le mitogène HOG). Ensuite, cette kinase phosphoryle la Fps1p, forme majeure d'aquaglycéroporines par laquelle peuvent transiter l'acide acétique, l'eau et d'autres solutés de petite taille (Mollapour & Piper, 2007). Sa phosphorylation la rend cependant incapable d'assurer le transport d'une quelconque molécule à travers la membrane, puisqu'elle subit alors une endocytose puis une dégradation. Ce phénomène mène au blocage du transport de l'acide acétique, et permet ainsi d'en améliorer sa tolérance (Mollapour & Piper, 2007). La cible Fps1p semble donc être un élément clef dans

l'apparition d'une tolérance accrue à l'acétate chez *S. cerevisiae* par l'intermédiaire de la voie HOG. Cependant, il se peut également que cette tolérance soit imputable à la cascade de la MAPK, qui pourrait en effet altérer l'expression d'environ 10 % du génome.

Les protéines Haa1p, War1p, Msn2p et Msn4p sont quant à elles des facteurs de régulation transcriptionnelle (Fernandes et al., 2005 ; Kren et al., 2003 ; Schuller et al., 2004). War1p est activée en réponse à un stress acide, et permet notamment la synthèse de Pdr12p et de Fun34p, qui serait un transporteur de l'ammoniaque. Haa1p est également active lors d'une réponse de la cellule à un stress causé par des acides organiques (Abbott et al., 2008), et notamment par les moins lipophiles. Son action cible dix gènes, dont elle en surexprime neuf très rapidement. *TPO2* et *TPO3* codent pour des symports à proton membranaires de la MFS (Fernandes et al., 2005). *YGP1* permet quant à lui la synthèse d'une glycoprotéine peu connue de la membrane, lors de limitations nutritionnelles ou d'autres conditions de stress (Fernandes et al., 2005). La délétion de l'un ou plusieurs de ces gènes provoque une sensibilité accrue à l'acide acétique. Enfin, les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p permettent à la cellule d'enclencher une réponse générale au stress (Gasch et al., 2000).

Outre la Pdr12p, quatre protéines plasma-membranaires de réponse au stress sont également induites lors d'un stress acide. C'est le cas des transporteurs Azr1p et Yrs1p. Le mécanisme exact de ces protéines est mal documenté, mais elles participent à la résistance au stress acétate (Cui et al., 1996 ; Tenreiro et al., 2000). Il est intéressant de noter que deux protéines caractéristiques du stress thermique sont également induites. Hsp30p, un régulateur de l'ATPase à proton, est aussi induite par l'éthanol et des concentrations en glucose élevées (Alexandre et al., 2001 ; Erasmus et al., 2003 ; Gasch & Werner-Washburne, 2002 ; Piper et al., 1997). Hsp26p est quant à elle également induite suite à un choc osmotique. Elle permettrait de préparer les protéines dénaturées des cellules soit pour leur dégradation, soit pour leur renaturation (Carmelo et al., 1997 ; Causton et al., 2001 ; de Nobel et al., 2001 ; Rep et al., 2000 ; Yale & Bohnert, 2001).

La mise en place des différents systèmes de régulation pourrait également avoir un effet sur les réserves intracellulaires en carbone. Ainsi, un stress sorbique (9 mM) a conduit à une accumulation de tréhalose (Cheng et al., 1999). Or la tréhalose synthase est potentiellement activée par le fructose-6-P, qui s'accumule dans la cellule suite à l'inhibition de la phosphofructokinase, lors d'un stress acide sous certaines conditions de culture (François et al., 1986 ; Krebs et al., 1983 ; Pearce et al., 2001). Toutefois, il faut noter qu'aucune inhibition de la phosphofructokinase n'a pu être observée lors d'une phase exponentielle de croissance en culture discontinue (Warth, 1991). Dans ces conditions, et plus précisément pour des taux de croissance anaérobie compris entre 0,05 et 0,1 h⁻¹, une diminution des réserves en tréhalose a été rapportée suite à un stress acétate (30 mM), de l'ordre de 16 à 18 % (Arneborg et al., 1995). Cette observation a également été faite en aérobiose, avec une consommation des réserves en glycogène et tréhalose de l'ordre de 50 % suite à un stress acétate (1,66 mM) (Guillou, 1996 ; Poilpré, 2002). Ce phénomène pourrait permettre à la cellule d'obtenir de l'énergie. Cependant, cette consommation étant largement supérieure aux besoins énergétiques estimés (facteur 26), il se peut que l'activation de la tréhalase soit activée lors d'un stress acide (Valle et al., 1986).

1433. Stratégies d'adaptation des cellules à l'acide acétique

Lors du procédé industriel de production d'éthanol carburant de seconde génération, l'hydrolysât ligno-cellulosique sur lequel croissent les microorganismes contient une quantité non négligeable d'inhibiteurs de l'activité biologique, dont l'acide acétique jusqu'à 10 g L⁻¹. Cette composition, hostile pour les levures, a poussé certains chercheurs à travailler sur l'adaptation de *S. cerevisiae* à la présence d'acide acétique. Différentes stratégies ont alors été adoptées.

L'équipe de Kawahata (2006) a analysé l'altération de l'expression de nombreux gènes lors d'un choc à l'acide et d'une adaptation. Pour réaliser le choc, les cellules ont été prélevées en début de phase exponentielle de croissance, puis inoculées sur milieu riche YNB (Yeast Nitrogen Base) additionné de 0,3 % (P/V) d'acide acétique, à 30 °C pendant 30 minutes. Cette première étape d'adaptation de la cellule a montré une forte induction de gènes impliqués dans la réponse aux stress, comme *YGP1*, *TPS1* ou encore *HSP150*. L'adaptation a été caractérisée par une culture différente. Après une croissance d'environ 12 heures sur YNB, les cellules ont été prélevées, lavées, puis inoculées sur YNB supplémenté de 0,3 % (P/V) d'acide acétique, à 30 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 1. Les gènes induits étaient alors différents, et correspondaient au métabolisme du fer chez *S. cerevisiae* (*FIT2*, *ARN1*, *ARN2*, etc.). Il est intéressant de noter qu'*ALD6* a été légèrement ou fortement réprimé, respectivement lors du choc et de l'adaptation de la cellule à l'acétate. A l'inverse, l'*ALD4* a été légèrement surexprimé au cours de l'adaptation. Le gène *CIT2* est également surexprimé pendant les deux mécanismes (Kawahata et al., 2006). Fernandes et ses collaborateurs (2005) ont également rapporté que l'expression des gènes *TPO2*, *TPO3* et *YCP1* était nécessaire à l'augmentation de la vitesse d'adaptation aux acides organiques.

D'autres travaux ont porté sur un procédé innovant de culture : le cyostat. Ce système couple un cytomètre en flux en série avec un bioréacteur en mode continu et supplémenté en acide acétique (Gilbert et al., 2009). En maîtrisant la concentration de cellules, ce procédé a permis d'isoler des mutants plus tolérants en moins de cinq jours. Ceux-ci étaient capables de croître plus rapidement en présence de fortes concentrations en acide acétique et en éthanol, ainsi que sous des températures élevées. En présence d'une concentration élevée de cet acide, les mutants étaient également capables de produire de l'éthanol plus rapidement et à plus haute température. L'analyse du génome a rapporté une amplification de différents gènes chez tous les mutants. Certains présentent en outre une surexpression des gènes *LPP1*, codant pour une lipide-phosphate phosphatase, et *ENA1*, *ENA2*, *ENA5*, codants pour une ATPase impliquée dans le transport de Na⁺.

L'équipe de Giannattasio (2005) a quant à elle adapté *S. cerevisiae* en l'incubant sur milieu riche à pH 3, pendant 30 minutes et en présence d'acide chlorhydrique. Ceci a ensuite permis de cultiver ces cellules en présence de 80 mM d'acide acétique pendant 200 minutes sans observer de diminution de la viabilité cellulaire. Il est très intéressant de noter que dans ce cas, l'activité de la catalase a augmenté pendant l'activation du mécanisme d'adaptation et lors du maintien de la protection de l'apoptose induite par l'acétate.

Enfin, deux stratégies distinctes d'ingénierie évolutive ont conduit à l'adaptation de *S. cerevisiae* à l'acide acétique lors de cultures sur xylose (Wright et al., 2011). Une succession de 54 cultures discontinues, couplée à une augmentation progressive de la concentration en acide de 0 à 6 g L⁻¹, a ainsi permis de réduire la chute du taux de croissance en fonction de cette concentration, de 0,2 à 0,07 h⁻¹. D'autre part, la conduite d'un bioréacteur continu pendant 225 jours, également couplée à une augmentation progressive de la concentration en acide de 1 à 4,8 g L⁻¹, a permis d'améliorer la vitesse spécifique de consommation de xylose de 1 à 1,7 g g⁻¹ h⁻¹. L'adaptation à l'acide acétique est donc inductible, mais non constitutive. Le transfert des microorganismes ainsi obtenus dans un nouveau bioréacteur en continu n'a effectivement pas permis de conserver les traits physiologiques observés à la fin de la phase d'adaptation.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES	61
21. METHODES DE CULTURE	65
211. SOUCHES ET MILIEU DE CULTURE	65
2111. Souches étudiées	65
2112. Milieux de cultures utilisés	66
212. CULTURES DISCONTINUES ALIMENTÉES EN BIOREACTEUR	67
2121. Précultures	67
2122. Stratégie d'apport carboné	68
2123. Stratégie d'apports en vitamines et oligo-éléments	68
2124. Stratégie d'apports particuliers	69
2125. Stratégie d'apport en dioxygène	70
2126. Dispositif expérimental	70
22. TECHNIQUES ANALYTIQUES	72
221. METHODE D'ECHANTILLONNAGE	72
222. CARACTERISATION DE LA BIOMASSE	72
2221. Estimation par technique spectrophotométrique	72
2222. Dosage de la masse sèche	72
2223. Mesure de la viabilité cellulaire	73
2224. Caractérisation de la composition élémentaire	73
223. DOSAGE DES SUBSTRATS ET METABOLITES	73
2231. Dosages par Chromatographie Liquide à Haute Performance	73
2232. Dosages par Chromatographie en Phase Gazeuse	74
2233. Dosages par technique enzymatique	75
224. ANALYSE DES GAZ	75
225. ESTIMATION DE L'ETHANOL EVAPORE	75
226. DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	76
2261. Préparation des extraits acellulaires	76
2262. Dosage des protéines	76
2263. Dosage des activités enzymatiques	77
227. MESURE DE L'OSMOLALITE	79
23. TRAITEMENT DES DONNEES	80
231. PRETRAITEMENT DES DONNEES BRUTES	80
2311. Calcul des masses cumulées de produits et substrats (hors gaz)	81
2312. Calcul des vitesses de consommation et de production des gaz	81
2313. Calcul des bilans en carbone et des degrés de réduction généralisés	84
232. LISSAGE ET RECONCILIATION DES DONNEES	87
2321. Lissage des données prétraitées	87
2322. Réconciliation des données	87
233. CALCUL DES PARAMETRES CARACTERISANT UNE CULTURE	87
2331. Quotient respiratoire	87
2332. Rendements	88
2333. Vitesses spécifiques	88
234. ESTIMATION DE LA COMPOSITION MACROMOLECULAIRE DE LA BIOMASSE	88
235. ESTIMATION DES FLUX INTRACELLULAIRES	89
2351. Introduction au modèle métabolique	89
2352. Formulation mathématique du modèle	90
2353. Modèle métabolique retenu	91
24. REPRODUCTIBILITE DES CULTURES	93

21. METHODES DE CULTURE

211. SOUCHES ET MILIEU DE CULTURE

2111. Souches étudiées

Quatre souches haploïdes de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées pour la réalisation des différents travaux présentés (Tableau 2).

La souche CEN.PK 113-7D est une souche répandue et considérée comme une référence dans les laboratoires étudiant le métabolisme et la physiologie de *S. cerevisiae* (van Dijken et al., 2000). Elle a été utilisée comme souche témoin vis-à-vis de la souche CIT2+.

La souche CIT2+ est une CEN.PK 113-7D dont le gène *CIT2*, codant pour une citrate synthase peroxysomale, a été surexprimé. Cette surexpression a été réalisée grâce à l'insertion du plasmide pRS425ADHCIT2 (Chen *et al.*, 2002) dans une souche CEN.PK 113-7D auxotrophe pour la leucine (Mouret, 2006). Ce plasmide contient le gène constitutif *LEU2* ainsi que le gène *CIT2*, soumis au promoteur de l'alcool déshydrogénase.

La souche BY4741 est dérivée de la souche S288c (Brachmann et al., 1998) et fait partie des souches références du « *Saccharomyces* Genome Deletion Project » (consultable sur la page Internet http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html). Elle est auxotrophe pour la leucine, l'histidine, la méthionine et l'uracile. Elle a été utilisée comme souche témoin vis-à-vis de la souche Δ ALD6.

Tableau 2 : Récapitulatif des souches étudiées.

Souche	Dénomination	Génotype	Utilisation	Référence
CEN.PK 113-7D	WT	Souche sauvage	Chapitres 3, 4, 5	van Dijken <i>et al.</i> , 2000
CEN.PK 113-7D - pRS425ADHCIT2	CIT2+	pRS425ADHCIT2	Chapitre 5	Chen <i>et al.</i> , 2002 Mouret, 2006
BY4741	WT	<i>MATa his3! 1 ; leu2! 0 ; met15! 0 ; ura3! 0</i>	Chapitre 7	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741 - ! ALD6	! ALD6	<i>MATa his3! 1 ; leu2! 0 ; met15! 0 ; ura3! 0 ALD6! ::KanMX4</i>	Chapitre 7	<i>Saccharomyces</i> Genome Deletion Project

La souche Δ ALD6 est une BY4741 pour laquelle le gène *ALD6*, codant pour un isoforme de l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP⁺ dépendant, a été supprimé. La stratégie d'intégration par recombinaison homologue utilisée par les laboratoires du « *Saccharomyces* Genome Deletion Project » a permis de conserver les mêmes auxotrophies que la souche sauvage (Giaever et al., 2002).

Une banque cellulaire a été réalisée pour chaque souche. Les cellules ont été prélevées en phase de croissance exponentielle lors d'une culture sur milieu riche « Yeast extract Peptone Dextrose » (YPD). Après addition de glycérol stérile à un ratio de 30/70 ($V_{\text{glycérol}} / V_{\text{culture}}$), le mélange a été aliquoté dans des vials d'un millilitre, stockés ensuite à -80°C .

2112. Milieux de cultures utilisés

Plusieurs milieux de culture riches ou chimiquement définis ont été préparés pour assurer les différentes cultures. Leur composition a été définie dans le but d'éviter toute limitation nutritionnelle de la croissance. Les différents composés ont été solubilisés dans de l'eau distillée, sauf précision.

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)

Ce milieu de culture riche a été utilisé pour la réalisation des banques cellulaires. Sa composition pour un litre est la suivante : extrait de levure, 10 g ; peptone bactérienne, 20 g ; glucose, 20 g. Afin d'obtenir un milieu gélosé, de l'agar peut être ajouté à hauteur de 15 g L^{-1} . La stérilisation a été assurée par traitement thermique.

Milieu chimiquement défini – base

Ce milieu chimiquement défini a servi de base pour la réalisation des cultures en bioréacteur et des précultures. Sa composition pour un litre est la suivante :

- Milieu salin (préparé avec l'eau du réseau) :
 KH_2PO_4 , 6 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12 g ; MgSO_4 , 1 g.
- Oligo-éléments :
 EDTA,Na_2 , 0,03 g ; $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$, 0,009 g ; $\text{MnSO}_4,\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g ; $\text{CoCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$, 0,0006 g ;
 $\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$, 0,0006 g ; $\text{Na}_2\text{MoSO}_4,2\text{H}_2\text{O}$, 0,008 g ; $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$, 0,009 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_6,6\text{H}_2\text{O}$, 0,006 g ; H_3BO_3 , 0,002 g.
- Vitamines :
D-biotine, 0,00024 g ; acide D-L-pantothénique, 0,005 g ; acide nicotinique, 0,005 g ;
mésio-inositol, 0,125 g ; thiamine, 0,005 g ; pyridoxine, 0,005 g ; acide para-aminobenzoïque,
0,001 g.
- Source carbonée :
Glucose, 100 g (bioréacteurs) ou 20 g (précultures).

Les sels minéraux et le glucose ont été stérilisés séparément par voie thermique, alors que les solutions stock (concentrées 500 fois) de vitamines et d'oligo-éléments l'ont été par filtration à $0,2\ \mu\text{m}$.

Milieu chimiquement défini – variante carnitine

Ce milieu chimiquement défini a été utilisé pour une culture du chapitre 4. Il est identique au milieu de base, mais supplémenté en L-carnitine. Cette molécule a été ajoutée au milieu de culture afin d'obtenir une concentration intracellulaire de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ (chapitre 2124). La solution stock de carnitine ainsi préparée a été stérilisée par filtration à $0,2 \mu\text{m}$.

Milieu chimiquement défini – variante acide oléique

Ce milieu chimiquement défini a été utilisé pour une culture des chapitres 3 et 4. Il est identique au milieu de base, mais supplémenté en acide oléique à hauteur de 50 g L^{-1} . Cet acide a été stérilisé par filtration à $0,2 \mu\text{m}$.

Milieu chimiquement défini – variante acide oléique + carnitine

Ce milieu chimiquement défini a été utilisé pour une culture du chapitre 4. Il est identique au milieu de base, mais supplémenté en acide oléique à hauteur de 50 g L^{-1} ainsi qu'en carnitine de manière à obtenir une concentration intracellulaire de $0,8 \text{ g L}^{-1}$.

Milieu chimiquement défini – variante BY4741

Ce milieu chimiquement défini a été utilisé pour les cultures du chapitre 6. Il est identique au milieu de base, mais supplémenté en acides aminés et base azotée nécessaires pour compléter les auxotrophies des souches BY4741. Il contient ainsi 2 g L^{-1} d'histidine, de leucine, de méthionine et d'uracile. Les acides aminés ont été préparés à 50 g L^{-1} dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 M, alors que l'uracile a été préparée 50 g L^{-1} dans une solution d'hydroxyde de sodium à 1 M. Leur stérilisation a été assurée par filtration à $0,2 \mu\text{m}$.

212. CULTURES DISCONTINUES ALIMENTÉES EN BIOREACTEUR

Les cultures présentées dans ce manuscrit ont été réalisées en mode discontinu alimenté selon les procédures suivantes.

2121. Précultures

Les précultures ont été réalisées sur milieu chimiquement défini. Après décongélation, un vial du stock a été étalé sur boîte de Petri puis incubé 48 h à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Une colonie isolée a alors été prélevée pour ensemer un tube contenant 5 mL de milieu de culture, incubé 12 heures à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et 100 rpm. Le contenu de ce tube a ensuite servi à la propagation des cellules en deux étapes en fioles d'Erlenmeyer bafflées, contenant 30 puis 300 mL de milieu de culture. Chaque étape a été incubée 10 heures à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et 100 rpm. Les 300 mL de culture ainsi obtenus ont été utilisés pour l'ensemencement d'un bioréacteur.

2122. Stratégie d'apport carboné

Glucose

Les cultures présentées ont été réalisées en mode discontinu alimenté. Le glucose a ainsi été apporté au milieu de culture par ajouts séquentiels à partir d'une solution stock de 650 g L^{-1} . Ils ont été réalisés afin de maintenir la concentration en glucose dans le bioréacteur entre 20 et 100 g L^{-1} en début de culture, puis entre 20 et 50 g L^{-1} en fin de culture, afin de limiter le stress osmotique (Figure 16).

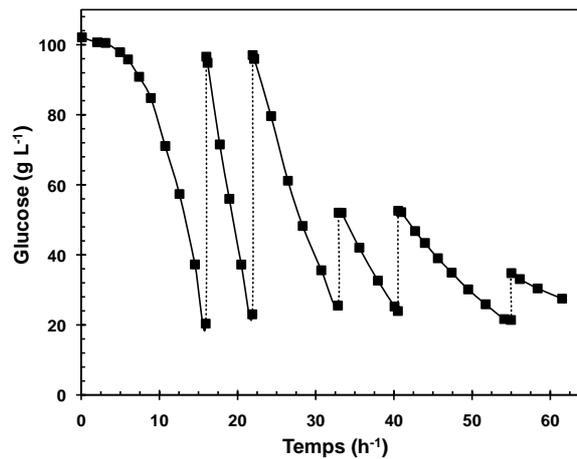


Figure 16 : Exemple d'évolution de la concentration en glucose dans le bioréacteur. Les traits en pointillés correspondent aux ajouts de glucose.

Acide oléique

L'acide oléique a également été apporté au milieu de culture par ajouts séquentiels à partir d'une solution stock pure. Ils ont été réalisés afin de maintenir la concentration en acide oléique dans le bioréacteur à 50 g L^{-1} .

2123. Stratégie d'apports en vitamines et oligo-éléments

La stratégie d'ajouts séquentiels des vitamines est basée sur la croissance cellulaire. Un premier apport a été réalisé avant l'ensemencement du bioréacteur, permettant d'atteindre les concentrations sus-citées (chapitre 2112). Puis des ajouts exponentiels ont été réalisés à chaque doublement de la population cellulaire, de manière à ce que la concentration équivalente en vitamines ajoutées exponentiellement soit identique à la concentration initiale. Cette stratégie a été adoptée car elle permet d'améliorer la production d'éthanol ainsi que le profil de viabilité (Alfenore et al., 2002).

La stratégie d'ajouts séquentiels des oligo-éléments est la même que celle adoptée pour les vitamines. Cependant, aucun apport initial n'a été réalisé. Les concentrations équivalentes en oligo-éléments ajoutés sont celles sus-citées (chapitre 2112)

2124. Stratégie d'apports particuliers

Carnitine

La stratégie d'ajouts séquentiels de la carnitine est identique à celle des oligo-éléments. Elle a été ajoutée afin d'obtenir une concentration intracellulaire en carnitine de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ au moment de chaque apport.

Cette concentration a été fixée suite à la mesure *in-vitro*, sur extrait acellulaire de *S. cerevisiae* CEN.PK 133-7D, de l'activité de la carnityl-acétyl transférase en fonction de ce substrat (Figure 17). En condition saturante en acétyl-coA, la Catp présente en effet une activité spécifique maximale entre $0,3$ et $0,9 \text{ g L}^{-1}$. Pour des valeurs supérieures, la carnitine inhibe la réaction enzymatique. En outre, la constante de Michaelis-Menten (K_m) observée vaut $0,23 \text{ mM}$. Le volume cellulaire retenu pour les calculs d'ajout de carnitine était $1,43 \text{ mL g}^{-1}$ (Mouret, 2006).

Le profil observé est similaire à celui observé par Mouret (2006) avec la même souche et dans les mêmes conditions (Figure 17). Le K_m est également cohérent avec la littérature, qui fournit des valeurs comprises entre $0,17$ et $0,23 \text{ mM}$ (Kispal et al., 1991 ; Mouret, 2006).

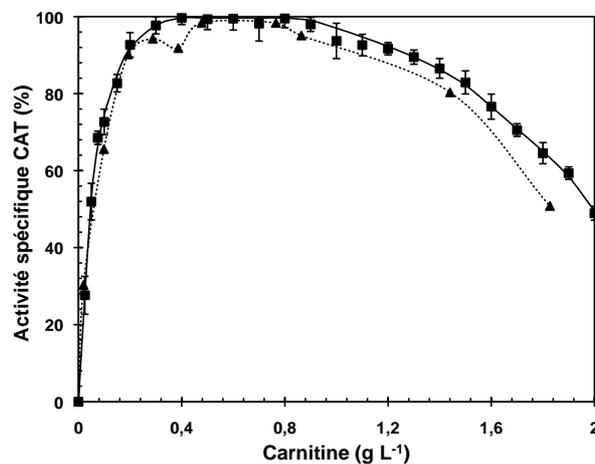


Figure 17 : Profil de l'activité spécifique de la Catp en fonction de la concentration en L-carnitine, en condition *in-vitro* saturante en acétyl-coA (■ ; —). Profil obtenu par Mouret (2008) (▲ ; ⋯).

Acides aminés et base azotée

La stratégie d'ajouts séquentiels des acides aminés et de la base azotée est identique à celle des oligo-éléments. Les concentrations équivalentes en acides aminés et base azotée ajoutés sont les mêmes que celles sus-citées (chapitre 2112).

2125. Stratégie d'apport en dioxygène

L'apport en dioxygène a été assuré par un flux continu d'air ambiant, préalablement stérilisé par filtration à 0,2 μm . Afin de respecter le caractère aérobic des cultures, la gestion du couple débit d'air – agitation a été menée de manière à conserver une pression partielle en oxygène dissous ($p\text{O}_2$) supérieure à 20 % de la valeur maximale (7,71 mg L^{-1} dans ces conditions de culture).

Il est à noter que cette aération par apport d'air ambiant n'a été mise en œuvre qu'entre 3 à 5 heures après ensemencement, afin d'éviter une limitation de la croissance par stripage du CO_2 dissous. L'aération était alors assurée par les échanges à l'interface air – liquide.

2126. Dispositif expérimental

Les cultures ont été réalisées dans des bioréacteurs Biostat B-DCU B.Braun (Sartorius AG). Les cuves en aluminium sont munies de septa sous le niveau de la phase liquide, permettant l'échantillonnage à l'aide d'une seringue en s'affranchissant du volume mort. L'agitation est assurée par deux étages de pales Rushton. La température est régulée à 30 °C grâce à un système de double enveloppe entourant les cuves et à un capteur de température. Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode à pH (Mettler Toledo, 405-DPAS-SC-K8S/325) et régulé à une valeur de 4 par apport automatisé d'une solution d'ammoniaque à 14 % (v/v). La pression est mesurée à l'aide d'un capteur (PMA Prozeß und Maschinen-Automation-GmbH, typ 9404-263-20071). Enfin, la pression partielle en oxygène dissous est mesurée grâce à un capteur ampérométrique (Mettler Toledo, Inpro 6050) (Figure 18). L'isolement stérile de l'intérieur du bioréacteur vis-à-vis de l'environnement du laboratoire est assuré par l'étanchéité des joints et par un système de filtres 0,2 μm sur les entrées et les sorties des gaz.

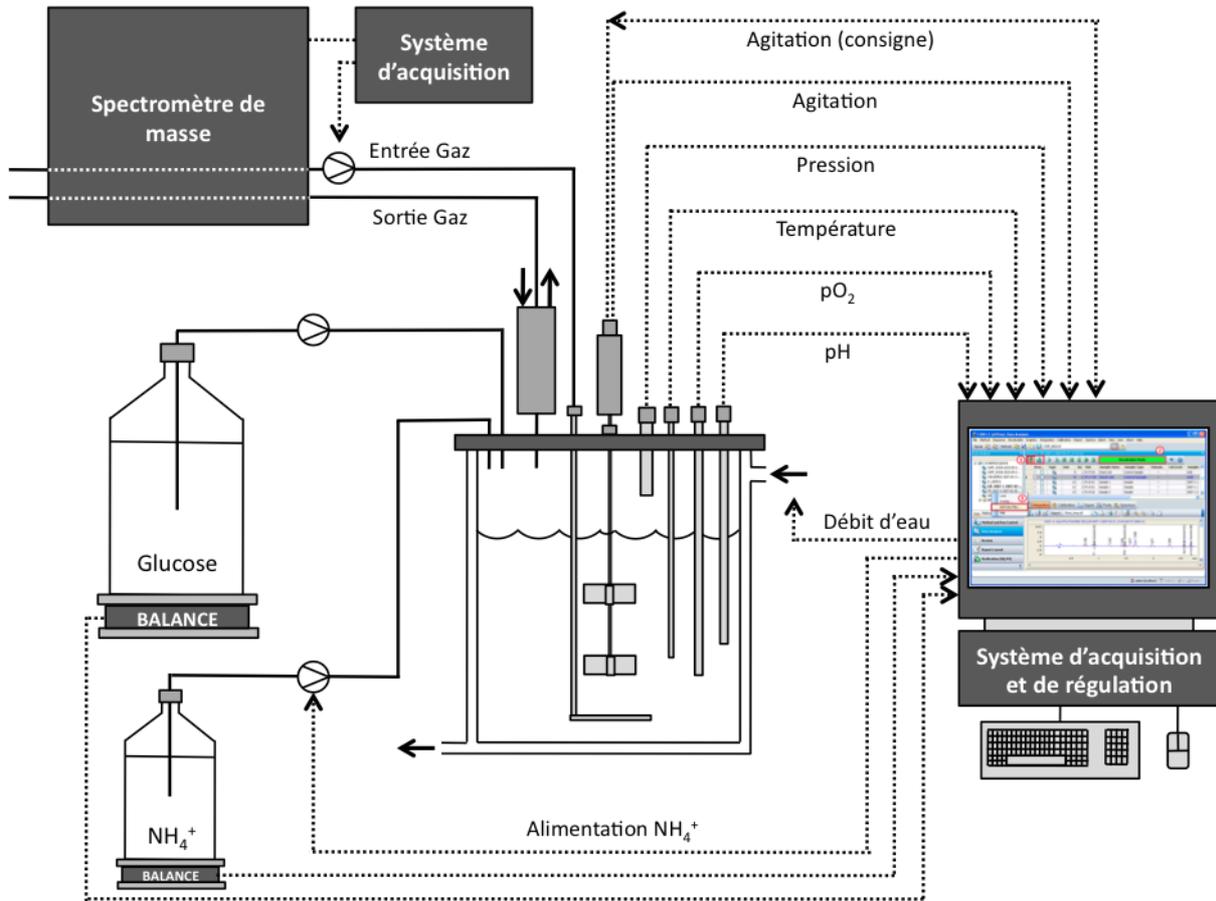


Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental (→ : flux de liquide de refroidissement ; ···> : flux de données).

22. TECHNIQUES ANALYTIQUES

221. METHODE D'ÉCHANTILLONNAGE

Plusieurs types d'échantillonnage ont été utilisés afin de caractériser les différents éléments du milieu de culture. Pour le dosage de la biomasse, les prélèvements ont été réalisés au travers d'un septum, à l'aide d'une seringue.

Pour le dosage des métabolites du milieu de culture, les prélèvements ont été réalisés au travers d'un septum, à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0,45 µm. Ceci permet d'éviter l'évolution hors réacteur des concentrations en métabolites extracellulaires en séparant directement la biomasse du milieu de culture.

Enfin pour le dosage des activités enzymatiques, les prélèvements ont été réalisés au travers d'un septum, à l'aide d'une seringue, pour être ensuite directement centrifugés à 4 000 g pendant 4 minutes à 4 °C, rincés à l'eau physiologique (NaCl à 9 g L⁻¹) à 4 °C, puis centrifugés à nouveau à 4 000 g pendant 4 minutes à 4 °C. Les culots ainsi obtenus ont été conservés à - 20 °C.

222. CARACTERISATION DE LA BIOMASSE

2221. Estimation par technique spectrophotométrique

Cultures sur glucose seul

Afin d'assurer la conduite des cultures, la concentration en biomasse a été estimée par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi High Technologies America Inc., Hitachi U-1100 ou Biochrom, Libra S4). Une corrélation DO / masse sèche a préalablement été établie.

Cultures sur glucose plus acide oléique

En présence d'acide oléique dans le milieu de culture, les échantillons ont subi un traitement préalable afin d'éliminer cette molécule. 500 µL de milieu de culture ont ainsi été mélangés à 500 µL d'isopropanol. Après vortexage pendant une minute et centrifugation à 12 000 g pendant 3 minutes, le culot a été resuspendu dans 500 µL d'eau distillée et utilisé pour la mesure spectrophotométrique à 620 nm.

2222. Dosage de la masse sèche

Cultures sur glucose seul

La détermination de la masse sèche de cellules a été réalisée par méthode gravimétrique. Un échantillon de milieu de culture de volume connu (fixé pour obtenir environ 100 mg de biomasse) a été filtré à l'aide d'une

membrane de porosité 0,45 μm (Sartorius AG). Après rinçage à l'eau distillée, cette membrane a été séchée dans une étuve à 60 °C sous vide partiel (200 mmHg, soit approximativement 26,7 kPa) pendant 48 h. La mesure de la masse sèche de la membrane avant et après filtration a ainsi permis de déterminer la concentration en biomasse dans le bioréacteur.

Cultures sur glucose plus acide oléique

En présence d'acide oléique dans le milieu de culture, la détermination de la masse sèche de cellules a été réalisée par la même méthode. Cependant, la membrane a été rincée à l'hexane puis à l'eau distillée après filtration du milieu de culture. Cette étape a permis d'éliminer l'acide oléique sans endommager les cellules.

2223. Mesure de la viabilité cellulaire

Cultures sur glucose seul

Dans l'ensemble des travaux présentés ici, le terme de viabilité fait référence à l'intégrité de la membrane cellulaire (Postgate, 1967). 100 μL de milieu de culture ont été mélangés à 100 μL de bleu de méthylène (bis-(diméthylamino)-3,7phenazathionium chlorure). Après 20 mn de réaction, un comptage des cellules incolores (« viables ») et bleues (« non viables ») a été réalisé à l'aide d'une cellule de Thoma et d'un microscope optique (Nikon, Eclipse E100). Afin d'assurer une erreur expérimentale inférieure à 10 %, le nombre de cellules doit être compris entre 150 et 300, réparties sur au moins 5 carreaux (Postgate, 1967). La viabilité cellulaire est alors calculée par le ratio (cellules non viables / cellules totales).

Cultures sur glucose plus acide oléique

En présence d'acide oléique dans le milieu de culture, la détermination de la viabilité cellulaire a été réalisée par la même méthode. Cependant, les cellules ont été lavées à l'isopropanol avant l'étape de coloration, comme précédemment expliqué (chapitre 2221).

2224. Caractérisation de la composition élémentaire

La composition élémentaire de la biomasse (carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore et soufre) a été caractérisée *via* le Service Central d'Analyses - Institut des Sciences Analytiques (C.N.R.S., Villeurbanne, 69100).

223. DOSAGE DES SUBSTRATS ET METABOLITES

2231. Dosages par Chromatographie Liquide à Haute Performance

Les concentrations du glucose et des principaux métabolites (éthanol, glycérol, acides acétique, succinique et pyruvique) ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.) (Tableau

3). L'appareil utilisé était un chromatographe (Waters, Alliance 2690) équipé d'une colonne Aminex HPX 87-H⁺ (300 mm × 7,8 mm). La détection des molécules a été assurée par deux détecteurs : l'un à indice de réfraction (réfractomètre Waters 2414) et l'autre à rayonnement UV à 210 nm (barrette de diodes Waters 996). L'éluant était de l'H₂SO₄ à 5 mM à un débit de 0,5 mL mn⁻¹, et la température de la colonne fixée à 50 °C.

2232. Dosages par Chromatographie en Phase Gazeuse

Des concentrations faibles en acide acétique et en éthanol ont pu nécessiter des dosages par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) (Tableau 3). L'appareil utilisé était un chromatographe (Hewlett Packard, 5890A) équipé d'une colonne Poraplot Q (25 m × 0,53 mm). La détection des molécules a été assurée par un détecteur FID à 270 °C. Le gaz vecteur était de l'azote à un débit de 20 mL mn⁻¹ et la gestion des températures la suivante : température initiale de la colonne à 115 °C, température finale à 235 °C, rampe de température de 12 °C mn⁻¹ avec un isotherme final de 10 mn.

Le dosage de l'acide oléique a également été assuré par méthode C.P.G. à partir des surnageants obtenus après lavage à l'isopropanol et centrifugation (chapitre 2221 ; Tableau 3). Les molécules d'acide oléique ont été rendues volatiles par méthylation de leur fonction carboxylique par traitement au triméthylsulphonium hydroxyde (0,2 mol L⁻¹). Puis les échantillons ont été analysés à l'aide d'un chromatogramme (HP 6890 Series GC System) équipé d'une colonne CP-Select CB for FAME fused silica WCOT (50 m × 0,25 mm). La détection de l'acide oléique a été assurée par un détecteur FID à 250 °C. Le gaz vecteur était de l'azote à un débit de 50 mL mn⁻¹ et la gestion des températures la suivante : température d'injecteur à 140 °C, température initiale de la colonne à 50 °C, température finale à 235 °C, rampes de température de 8 °C mn⁻¹ pendant 3 mn, 13 °C mn⁻¹ pendant 5 mn, 1,5 °C mn⁻¹ pendant 27 mn et 5 °C mn⁻¹ pendant 12 mn, avec un isotherme final de 10 mn.

Tableau 3 : Temps de rétention, seuils de détection et de quantification et gammes de linéarité des composés dosés par chromatographie.

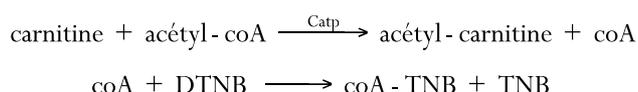
Molécule	Technique	Détecteur	Temps de rétention (mn)	Seuils		Gamme de linéarité considérée g L ⁻¹
				Détection g L ⁻¹	Quantification g L ⁻¹	
Glucose	C.L.H.P	RI	11,08	nd	nd	2,5 - 50
Tréhalose	C.L.H.P	RI	11,03	nd	nd	0,5 - 15
A. oléique	C.P.G.	FID	20,281	nd	nd	0,5 - 2,5
Ethanol	C.L.H.P	RI	26,32	0,069	0,230	0,3 - 50
Ethanol	C.P.G.	FID		0,025	0,083	0,06 - 1,5
Glycérol	C.L.H.P	RI	16,16	0,049	0,163	0,2 - 10
A. acétique	C.L.H.P	PDA 210 nm	18,35	0,046	0,153	0,15 - 10
A. acétique	C.P.G.	FID		0,016	0,053	0,5 - 3
A. succinique	C.L.H.P	PDA 210 nm	14,25	0,024	0,080	0,075 - 5
A. pyruvique	C.L.H.P	PDA 210 nm	11,61	0,015	0,050	0,05 - 2,5

2233. Dosages par technique enzymatique

Une mesure rapide de la concentration en glucose était nécessaire pour assurer la conduite des cultures. Elle a donc également été réalisée par technique enzymatique à l'aide d'un analyseur YSI 27 A (YSI Life Science).

La concentration en acide citrique a également été mesurée par technique enzymatique à l'aide d'un kit de dosage spécifique (Kit Citrate, BioSentec).

La mesure de la concentration en carnitine dans le milieu de culture a été réalisée par suivi de la réaction enzymatique suivante à 30 °C :



Le TNB ainsi libéré est un produit jaune possédant une absorbance caractéristique à 412 nm. Le dosage a donc été réalisé directement dans une cuve adaptée à la mesure spectrophotométrique. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme suit : 825 µL de DTNB 1 g L⁻¹ dilué dans du tampon de dosage (pH 7,7 ; Tris-HCl, 50 mM ; CaCl₂, 100 mM ; EDTA, Na₂, 1 mM ; Benzamidine HCl, 1 mM), 100 µL d'échantillon, 50 µL d'acétyl-coA 5 mM, 25 µL de carnitine-acétyl transférase de muscle de poitrine de pigeon (Sigma-Aldrich) diluée au dixième (soit ≥ 70 mU).

L'évolution de la réaction a été suivie par la mesure de densité optique à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (Hewlett Packard, 8452A) permettant de réguler la température de réaction à 30 °C. La différence entre les DO initiale et finale a ainsi permis de déterminer la concentration en carnitine dans le milieu de culture, à l'aide d'un étalonnage préalable avec de la L-carnitine commerciale (Sigma-Aldrich).

224. ANALYSE DES GAZ

L'analyse de la composition de l'air en entrée et en sortie du bioréacteur a été assurée par un spectromètre de masse Proline Dycor²a (Ametek Process Instruments). Des mesures ont ainsi été effectuées toutes les 5 minutes. La calibration de l'appareil a été réalisée à l'aide d'un air commercial de composition connue.

225. ESTIMATION DE L'ETHANOL EVAPORE

Lors d'une culture aérobie à 30 °C, une part de l'éthanol produit s'évapore et se retrouve dans l'air de sortie. Le système de condensation des gaz en sortie du bioréacteur permet de reliquéfier une partie de cette molécule. Cependant, une fraction non négligeable d'éthanol passe tout de même cette étape de condensation

sous forme gazeuse et n'est donc pas mesurée par la technique de C.L.H.P. L'évaporation de l'éthanol a donc été estimée et prise en compte lors du traitement des données. Une maquette froide a ainsi été réalisée dans les conditions identiques de culture sus-citées, mais sans cellules (Figure 19).

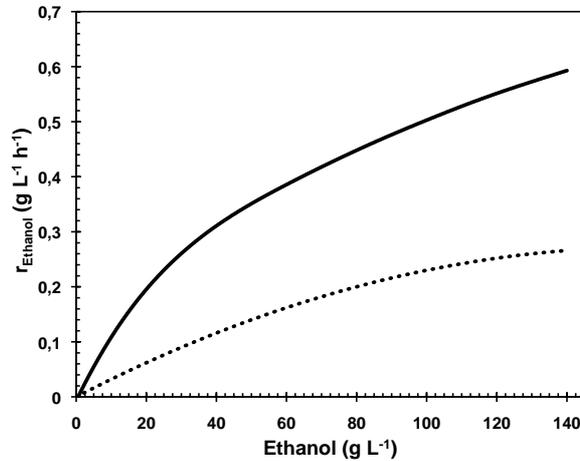


Figure 19 : Estimation de la vitesse volumique d'évaporation de l'éthanol en maquette froide, à un débit d'air entrant d'1 L mn⁻¹ (—) et de 0,5 L mn⁻¹ (···).

226. DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

2261. Préparation des extraits acellulaires

Environ 50 mg de biomasse ont été prélevés comme précédemment expliqué (chapitre 221). Après décongélation du culot, les cellules ont été lysées par voie mécanique. Chaque échantillon a ainsi été mélangé à 1 mL de tampon d'extraction à 4 °C (pH 7,7 ; Tris-HCl, 50 mM ; CaCl₂, 100 mM ; EDTA,Na₂, 1 mM ; Benzamidine HCl, 1 mM) et 2 g de billes de verre d'un diamètre compris entre 425 et 600 μm (Sigma-Aldrich). Le mélange obtenu a ensuite subi quatre fois le cycle suivant : vortexage pendant 30 s, refroidissement dans la glace pendant 30 s. Après centrifugation à 4 000 g pendant 10 mn à 4 °C, le surnageant a été conservé pour la suite du dosage.

2262. Dosage des protéines

La concentration en protéines dans le surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford (1976). Après une dilution nécessaire (gamme de validité de la méthode entre 0,1 et 1,4 mg mL⁻¹), 0,05 mL de surnageant dilué a été mélangé à 1,5 mL de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich). Après incubation 20 mn à température ambiante, la densité optique a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom, Libra S4). L'étalonnage de la mesure a été assuré grâce à de l'albumine de sérum bovin solubilisée dans du tampon d'extraction (Sigma).

2263. Dosage des activités enzymatiques

Plusieurs activités spécifiques enzymatiques ont été dosées lors des différentes expériences, à partir du surnageant obtenu après centrifugation (chapitre 2261). Dans tous les cas, l'évolution de la réaction a été suivie par la mesure de densité optique à une longueur d'onde déterminée, à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (Hewlett Packard, 8452A ou Hach Lange, DR 500) permettant de réguler la température de réaction à 30 °C.

La pente de la droite obtenue dans les premiers temps de la réaction a ainsi permis de calculer l'activité spécifique de chaque enzyme grâce à l'équation suivante :

$$AS = V_i \cdot C_{(A=1)} \cdot \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{cell}}} \cdot \frac{1}{C_{\text{prot}}}$$

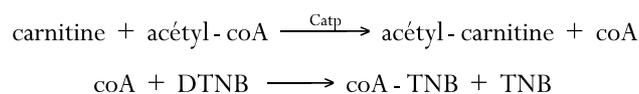
Équation 5

où :

- AS est l'activité spécifique de l'enzyme étudiée ($\text{mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$),
- V_i est la vitesse maximale initiale de la réaction, soit la pente expérimentale (mn^{-1}),
- $C_{(A=1)}$ est la quantité de produit (celui dont la formation est directement mesurée par spectrophotométrie) obtenue dans un millilitre de mélange réactionnel pour une unité de densité optique (nmol mL^{-1}). Elle est déterminée par la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \times C \times l$),
- C_{prot} est la concentration en protéines de l'extrait acellulaire (mg mL^{-1}),
- V_{cell} est le volume d'extrait acellulaire ajouté au mélange réactionnel (mL),
- V_{tot} est le volume total du mélange réactionnel (mL).

Carnitine-acétyl transférase (Catp)

L'activité spécifique de la Catp a été déterminée par suivi de la libération de coenzyme A selon les réactions suivantes :

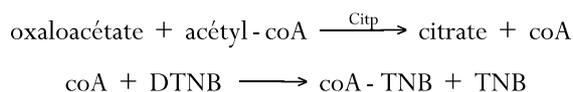


Le produit libéré directement mesuré est le TNB, possédant une absorbance caractéristique à 412 nm. Son coefficient d'extinction molaire (ϵ) à cette longueur d'onde est égal à $14\,150 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme suit : $(930 - x) \mu\text{L}$ de tampon de dosage

(pH 7,7 ; Tris-HCl, 50 mM ; CaCl₂, 100 mM ; EDTA,Na₂, 1 mM ; Benzamidine HCl, 1 mM), 80 µL de DTNB à 1 g L⁻¹ dilué dans du tampon de dosage, x µL d'extrait cellulaire, 20 µL d'acétyl-coA 5 mM, 10 µL de carnitine 10 mM.

Citrate synthase (Citp)

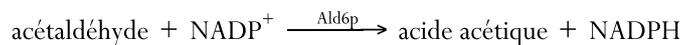
L'activité spécifique de la Citp a été déterminée par suivi de la libération de coenzyme A selon les réactions suivantes :



Le produit libéré directement mesuré est également le TNB, à 412 nm. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme expliqué pour le dosage de l'activité de la Catp. Cependant, la carnitine 10 mM a été remplacée par de l'oxaloacétate 10 mM.

Acétaldéhyde déshydrogénase NADP⁺ dépendante, isoforme 6 (Ald6p)

L'activité spécifique de l'Ald6p a été déterminée par suivi de la libération de NADPH selon la réaction suivante :



Le produit libéré directement mesuré est le NADPH, possédant une absorbance caractéristique à 340 nm. Son coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde est égal à 6 220 L mol⁻¹ cm⁻¹. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme suit : (940 - x) µL de tampon de dosage (pH 8 ; Tris-HCl, 50 mM ; Pyrazole, 15 mM ; Dithiothréitol, 0,5 mM ; MgCl₂, 10 mM), 50 µL de NADP⁺ 8,5 mM dilué dans du tampon de dosage, x µL d'extrait cellulaire, 10 µL d'acétaldéhyde 20 mM.

Acétaldéhyde déshydrogénases NAD⁺ dépendantes (Aldp_{NAD+})

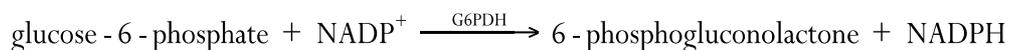
L'activité spécifique des Aldp_{NAD+} a été déterminée par suivi de la libération de NADH selon la réaction suivante :



Le produit libéré directement mesuré est le NADH, possédant une absorbance caractéristique à 340 nm. Son coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde est égal à 6 220 L mol⁻¹ cm⁻¹. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme suit : (940 - x) µL de tampon de dosage (pH 8 ; Tris-HCl, 50 mM ; Pyrazole, 15 mM ; Dithiothréitol, 0,5 mM ; MgCl₂, 10 mM ; KCl, 10 mM), 50 µL de NAD⁺ 8,5 mM dilué dans du tampon de dosage, x µL d'extrait cellulaire, 10 µL d'acétaldéhyde 20 mM.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

L'activité spécifique de la G6PDH a été déterminée par suivi de la libération de NADPH selon la réaction suivante :



Le produit libéré directement mesuré est le NADPH, possédant une absorbance caractéristique à 340 nm. Son coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde est égal à 6 220 L mol⁻¹ cm⁻¹. Les différents composés du milieu réactionnel ont été successivement ajoutés comme suit : (950 - x) µL de tampon de dosage (pH 8 ; Tris-HCl, 50 mM ; MgCl₂, 5 mM), 25 µL de NADP⁺ 20 mM dilué dans du tampon de dosage, x µL d'extrait cellulaire, 25 µL de glucose-6-P 200 mM.

227. MESURE DE L'OSMOLALITE

L'osmolalité du milieu de culture a été mesurée à l'aide d'un osmomètre (Messtechnik, Hermann Roebling type 12/12DR). Le principe de cette mesure repose sur la différence du point de congélation d'une solution en fonction de son osmolalité. L'appareil a préalablement été étalonné à l'aide d'eau « ultra-pure » (résistivité de 18,2 MΩ cm à 25 °C ; zéro mOsm kg_{H₂O}⁻¹) et d'une solution étalon commerciale (300 mOsm kg_{H₂O}⁻¹).

23. TRAITEMENT DES DONNEES

231. PRETRAITEMENT DES DONNEES BRUTES

Les données brutes sont obtenues sous forme de concentrations (substrats et produits du milieu de culture). Afin de s'affranchir des variations de volume et des phénomènes de dilution en découlant, et ainsi permettre les calculs des paramètres de culture, les concentrations en substrats et produits ont été converties sous forme de masses cumulées. Les compositions en gaz ont quant à elles été converties en vitesses nettes. Ces calculs tiennent compte des variations de volume induites par l'ajout de substrats, la prise d'échantillons et l'ajout du liquide régulateur de pH. Il est à noter que le bioréacteur est considéré comme parfaitement agité.

Les équations présentées ci-dessous découlent de l'établissement d'un bilan matière sur le système bioréacteur, dont l'écriture générale est la suivante pour un composé Z :

$$\begin{array}{c} \text{Vitesse} \\ \text{Entrée} \end{array} + \begin{array}{c} \text{Vitesse} \\ \text{Production} \end{array} = \begin{array}{c} \text{Vitesse} \\ \text{Sortie} \end{array} + \begin{array}{c} \text{Vitesse} \\ \text{Consommation} \end{array} + \begin{array}{c} \text{Vitesse} \\ \text{Accumulation} \end{array}$$

$$[Q_Z^E \cdot C_Z^E] + [r_Z^P] = [Q_Z^S \cdot C_Z^S] + [r_Z^C] + \frac{dZ}{dt}$$

Équation 6

où :

- Q_Z^E et Q_Z^S sont les débits de la phase dans laquelle se retrouve le composé Z en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement ($L \cdot h^{-1}$),
- C_Z^E et C_Z^S sont les concentrations du composé Z dans la phase dans laquelle il se retrouve en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement ($g \cdot L^{-1}$),
- r_Z^P et r_Z^C sont les vitesses nettes de production et de consommation du composé Z, respectivement ($g \cdot h^{-1}$),
- $\frac{dZ}{dt}$ est la vitesse d'accumulation du composé Z dans le bioréacteur, positive ou négative ($g \cdot h^{-1}$).

2311. Calcul des masses cumulées de produits et substrats (hors gaz)

Le calcul de la masse consommée d'un substrat à un temps donné « t » doit tenir compte des ajouts préalablement effectués, de la quantité présente dans le bioréacteur et de la quantité déjà prélevée. Pour chaque substrat on obtient ainsi, à un temps donné « t », la masse cumulée $m_{S(t)}$ grâce à l'équation suivante :

$$m_{S(t)} = \int_{t=0}^t (V_{Ajout(t)} \cdot C_{S(stock)} - C_{S(t)} \cdot V_{Liq(t)} - \int_{t=0}^t (V_{éch(t)} \cdot C_{S(t)})$$

Équation 7

Le calcul de la masse produite d'un métabolite à un temps donné « t » doit tenir compte de la quantité présente dans le bioréacteur et de la quantité déjà prélevée. Pour chaque produit on obtient ainsi, à un temps donné « t », la masse cumulée $m_{P(t)}$ grâce à l'équation suivante :

$$m_{P(t)} = C_{P(t)} \cdot V_{Liq(t)} + \int_{t=0}^t (V_{éch(t)} \cdot C_{P(t)})$$

Équation 8

où :

- $m_{S(t)}$ et $m_{P(t)}$ sont les masses cumulées de substrat consommé et de métabolite produit, respectivement, à un temps donné « t » (g),
- $C_{S(t)}$ et $C_{P(t)}$ sont les concentrations en substrat et en produit, respectivement, dans le milieu de culture à un temps donné « t » ($g L^{-1}$),
- $C_{S(stock)}$ est la concentration en substrat dans la solution stock ($g L^{-1}$),
- $V_{Liq(t)}$ est le volume du milieu de culture dans le bioréacteur à un temps donné « t » (L),
- $V_{Ajout(t)}$ est le volume d'ajout d'un substrat à un temps donné « t » (L),
- $V_{éch(t)}$ est le volume de prélèvement d'échantillon à un temps donné « t » (L).

2312. Calcul des vitesses de consommation et de production des gaz

Le bilan matière appliqué aux gaz dans le bioréacteur, scindé en une phase gazeuse et une phase liquide, permet d'obtenir l'équation suivante pour un composé A :

$$\frac{d(A_{\text{dissous}} \cdot V_{\text{Liq}})}{dt} + \frac{d(A_{\text{gaz}} \cdot V_{\text{Gaz}})}{dt} = (Q^E \cdot \frac{A^E}{100} - Q^S \cdot \frac{A^S}{100}) + (r_A^V \cdot V_{\text{Liq}})$$

Équation 9

où :

- A_{dissous} est la concentration en composé A dissous dans le milieu de culture (mol L^{-1}),
- A_{gaz} est la concentration en composé A dans la phase gazeuse du bioréacteur (mol L^{-1}),
- A^E et A^S sont les pourcentages en composé A dans l'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (%),
- Q^E et Q^S sont les débits d'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (mol h^{-1}),
- V_{Liq} et V_{Gaz} sont les volumes de la phase liquide et de la phase gazeuse dans le bioréacteur, respectivement (L),
- r_A^V est la vitesse volumique de production (CO_2 ; positive) ou de consommation (O_2 ; négative) du composé A ($\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Azote

L'azote est un gaz inerte qui n'est ni consommé, ni produit par *S. cerevisiae*. En outre, cette molécule est très peu soluble dans la phase liquide ($0,0134 \text{ L}_{\text{N}_2} \text{ L}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$ à 30°C). Son flux global de transfert a donc pu être négligé. Cette simplification permet ainsi de calculer le débit d'air en sortie du bioréacteur grâce à l'équation suivante :

$$Q^S = Q^E \cdot \frac{N_2^E}{N_2^S}$$

Équation 10

où :

- Q^E et Q^S sont les débits d'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (mol h^{-1}),
- N_2^E et N_2^S sont les pourcentages en azote dans l'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (%).

Dioxygène

La vitesse nette de consommation de dioxygène a été calculée grâce à l'équation suivante, déduite du bilan matière :

$$r_{O_2} = Q^E \cdot \frac{O_2^E}{100} - Q^S \cdot \frac{O_2^S}{100} - \frac{dO_2^S}{100} \cdot \frac{1}{dt} \cdot \frac{V_{Gaz}}{V_M} - \frac{dpO_2^m}{100} \cdot \frac{O_2^*}{M_{O_2}} \cdot \frac{1}{dt} \cdot V_{Liq}$$

Équation 11

où :

- O_2^E et O_2^S sont les pourcentages en dioxygène dans l'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (%),
- V_M est le volume molaire de l'air dans les conditions de température et de pression de l'expérience ($L \text{ mol}^{-1}$),
- pO_2^m est la pression partielle en dioxygène dissous mesurée (%),
- O_2^* est la concentration en dioxygène dissous à saturation dans les conditions de température de l'expérience ($g \text{ L}^{-1}$),
- M_{O_2} est la masse molaire du dioxygène ($g \text{ mol}^{-1}$).

Dioxyde de carbone

La vitesse nette de production de dioxyde de carbone a été calculée grâce à l'équation suivante, déduite du bilan matière :

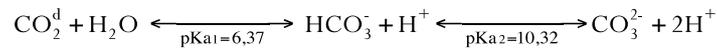
$$r_{CO_2} = Q^S \cdot \frac{CO_2^S}{100} - Q^E \cdot \frac{CO_2^E}{100} - \frac{dCO_2^S}{100} \cdot \frac{1}{dt} \cdot \frac{V_{Gaz}}{V_M} - dCO_2^L \cdot \frac{1}{dt}$$

Équation 12

où :

- CO_2^E et CO_2^S sont les pourcentages en dioxyde de carbone dans l'air en entrée et en sortie du bioréacteur, respectivement (%),
- CO_2^L est la quantité de dioxyde de carbone dans la phase liquide (mol).

Dans le milieu de culture, le dioxyde de carbone se trouve en équilibre entre ses différentes formes selon la réaction chimique suivante :



Cet équilibre est fortement dépendant du pH. Dans les conditions de culture définies ici (pH 4), la forme prépondérante est le dioxyde de carbone dissous CO_2^{d} (> 99 %), puis les ions bicarbonate HCO_3^- (< 1 %). Selon la loi de Henry, la concentration en dioxyde de carbone dissous est directement proportionnelle à la pression partielle de ce gaz dans la phase gazeuse, à l'interface avec la phase liquide. La quantité de dioxyde de carbone dans la phase liquide a donc été calculée grâce à l'équation suivante, déduite de la loi de Henry :

$$\text{CO}_2^{\text{L}} = \text{CO}_2^{\text{d}} + \text{HCO}_3^- = \frac{\text{CO}_2^{\text{S}}}{100} \cdot P_{\text{ferm}} \cdot H_{\text{CO}_2} \cdot \left(1 + \frac{k_{\text{éq}}}{10^{-\text{pH}}} \right) \cdot V_{\text{Liq}}$$

Équation 13

où :

- CO_2^{d} est la quantité de dioxyde de carbone dissous dans la phase liquide du bioréacteur (mol),
- HCO_3^- est la quantité d'ions bicarbonate dans la phase liquide du bioréacteur (mol),
- P_{ferm} est la pression absolue dans le bioréacteur (atmo),
- H_{CO_2} est la constante de Henry pour le dioxyde de carbone ($0,033 \text{ mol L}^{-1} \text{ atmo}^{-1}$),
- $k_{\text{éq}}$ est la constante d'équilibre entre le dioxyde de carbone dissous et les ions bicarbonate

$$(k_{\text{éq}} = \frac{[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{CO}_2^{\text{d}}]} = 4,71 \cdot 10^{-7}).$$

2313. Calcul des bilans en carbone et des degrés de réduction généralisés

La physiologie de *S. cerevisiae*, lors de cultures aérobies en excès de glucose et en mode discontinu alimenté, est bien documentée dans la littérature scientifique. Les principaux métabolites excrétés dans le milieu de culture sont donc relativement bien connus dans ces conditions (Verduyn et al., 1990).

Cependant, les variations des conditions de cultures imposées dans les études présentées ici peuvent conduire à l'excrétion d'autres métabolites dont la concentration n'aurait pas été mesurée. Le calcul des bilans en carbone et des degrés de réduction généralisés, réalisé sur les données prétraitées, permet de valider les données expérimentales en ce sens.

Afin de s'affranchir du nombre d'atomes de carbone composant les différentes molécules prises en compte, l'unité Cmol a été utilisée, qui représente le nombre de mole d'une molécule dont la formule élémentaire a été ramenée à un atome de carbone (Tableau 4). Les vitesses utilisées pour ces bilans ont donc été exprimées en Cmol h⁻¹, en divisant chaque vitesse en g h⁻¹ par la masse molaire correspondante en g Cmol⁻¹.

Tableau 4 : Formules, masses molaires et degrés de réduction généralisés (γ) des composés intervenant dans les calculs de bilan.

Métabolite	MOLE					CMOLE					!
	Formule				M (g mol ⁻¹)	Formule				M (g Cmol ⁻¹)	
	C	H	O	N		C	H	O	N		
Glucose	6	12	6	-	180,157	1	2	1	-	30,026	4
Tréhalose	12	22	11	-	342,299	1	1,833	0,917	-	28,525	4
Oléate	18	34	2	-	282,465	1	1,889	0,111	-	15,693	5,67
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	1	1,748	0,596	0,148	25,381	4,11
Ethanol	2	6	1	-	46,069	1	3	0,5	-	23,034	6
Glycérol	3	8	3	-	92,094	1	2,667	1	-	30,698	4,67
A. acétique	2	4	2	-	60,052	1	2	1	-	30,026	4
A. succinique	4	6	4	-	118,089	1	1,5	1	-	29,522	3,5
A. pyruvique	3	4	3	-	88,063	1	1,333	1	-	29,354	3,33
A. citrique	6	8	7	-	192,125	1	1,333	1,167	-	32,021	3
CO2	1	-	2	-	44,010	1	-	2	-	44,010	0
O2	-	-	2	-	31,999	-	-	2	-	-	-4
H2O	-	2	1	-	18,015	-	2	1	-	-	0
NH3	-	3	-	1	17,030	-	3	-	1	-	0

Bilan en carbone

Le bilan en carbone repose sur la loi de conservation de la matière. Le carbone entrant (substrats) doit donc se retrouver en sortie (produits excrétés, biomasse). Il a été réalisé à l'aide de l'équation suivante, déduite du bilan matière :

$$\dot{a}r_S^{\text{net}} + \dot{a}r_P^{\text{net}} + r_X^{\text{net}} = 0$$

Équation 14

où :

- r_S^{net} est la vitesse nette de consommation d'un substrat S, négative (Cmol h⁻¹),
- r_P^{net} est la vitesse nette d'excrétion d'un produit P (CO₂ et métabolites excrétés), positive (Cmol h⁻¹),
- r_X^{net} est la vitesse nette de synthèse de biomasse, positive (Cmol h⁻¹).

Bilan des degrés de réduction généralisés

Le bilan des degrés de réduction généralisés repose sur la conservation de ces degrés de réduction généralisés entre l'entrée (substrats) et la sortie (produits excrétés, biomasse). Le degré de réduction généralisé d'un composé Z a été calculé d'après sa formule en Cmole comme suit :

$$g_Z = n_C \cdot l_C + n_H \cdot l_H + n_O \cdot l_O + n_N \cdot l_N$$

Équation 15

où :

- g_Z est le degré de réduction généralisé d'un composé Z,
- n_C , n_H , n_O et n_N sont le nombre d'atome d'un composé Z d'après sa formule en Cmole, ou en mole pour les composés ne comportant pas de carbone dans leur structure,
- l_C , l_H , l_O et l_N sont les coefficients appliqués à chaque atome, et dont les valeurs respectives sont 4, 1, -2 et -3 lorsque les ions ammonium sont la seule source d'azote.

Le bilan des degrés de réduction généralisés est ensuite réalisé à l'aide de l'équation suivante, déduite du bilan matière :

$$\dot{a}g_S \cdot r_S^{\text{net}} + \dot{a}g_P \cdot r_P^{\text{net}} + g_X \cdot r_X^{\text{net}} = 0$$

Équation 16

où :

- g_S est le degré de réduction généralisé d'un substrat S,
- g_P est le degré de réduction généralisé d'un produit P (CO_2 et métabolites excrétés),
- g_X est le degré de réduction généralisé de la biomasse,
- r_S^{net} , r_P^{net} et r_X^{net} sont les vitesses nettes exprimées en Cmol h^{-1} pour les composés carbonés et en mol h^{-1} pour les composés ne comportant pas de carbone dans leur structure (négatives pour les substrats, positives pour les produits).

232. LISSAGE ET RECONCILIATION DES DONNEES

2321. Lissage des données prétraitées

L'évolution des données prétraitées est bruitée par les erreurs expérimentales. De plus, l'écart entre deux points expérimentaux est élevé, entre trente minutes et deux heures. Il est donc nécessaire d'appréhender plus finement l'évolution réelle des différents composés en jeu, avec le souci de traduire une réalité biologique.

Les masses cumulées des substrats et des produits ainsi que les vitesses nettes des gaz ont donc été lissées, à l'aide d'un logiciel développé au sein de l'équipe (Lirec). Celui-ci permet d'interpoler les données prétraitées à l'aide de polynômes et ainsi d'obtenir une continuité de dérivées nécessaires au calcul des paramètres de culture.

2322. Réconciliation des données

La réconciliation des données permet de vérifier la cohérence des vitesses lissées, par le calcul des bilans élémentaires du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote. Le logiciel Lirec permet ainsi d'ajuster les taux de conversion dans leur globalité, grâce à une technique de détection des erreurs et d'ajustement des données basée sur les travaux de Heijden *et coll.* (1994a ; 1994b ; 1994c).

Cette technique de calcul matriciel permet ainsi la minimisation des critères d'erreurs sur l'ensemble des variables d'état (composés mesurés), de manière à respecter les bilans élémentaires. Le poids de chaque variable d'état dans le calcul peut être modulé, selon la confiance accordée aux mesures expérimentales. Ce logiciel permet également de calculer des vitesses potentiellement non mesurées, comme la production d'eau.

233. CALCUL DES PARAMETRES CARACTERISANT UNE CULTURE

2331. Quotient respiratoire

Le quotient respiratoire (QR) est le rapport de la vitesse nette de production de dioxyde de carbone (r_{CO_2}) sur la vitesse nette de consommation de dioxygène (r_{O_2}), en mole par heure. Il permet d'obtenir des informations sur la voie de métabolisation d'un substrat donné. Lors d'une culture sur substrats mixtes, il peut également permettre d'obtenir des informations sur les vitesses de consommation des différents substrats. Il a été calculé grâce à l'équation suivante :

$$\text{QR} = \frac{r_{\text{CO}_2}}{r_{\text{O}_2}}$$

Équation 17

2332. Rendements

Les rendements instantanés des différents composés, exprimés en quantité de A par quantité de Z, ont été calculés comme étant le ratio de vitesses nettes de conversion grâce à l'équation suivante :

$$Y_{A/Z} = \frac{r_A}{r_Z}$$

Équation 18

Les rendements globaux des différents composés, lorsqu'ils ne peuvent être obtenus par une régression linéaire satisfaisante, ont été calculés comme étant le ratio de variations de masses grâce à l'équation suivante :

$$Y_{A/Z} = \frac{\Delta m_A}{\Delta m_Z}$$

Équation 19

2333. Vitesses spécifiques

Les vitesses spécifiques présentées ici ne tiennent pas compte de la viabilité cellulaire, qui est supérieure à 95 % pendant la majeure partie d'une culture. Ce sont donc des vitesses spécifiques apparentes qui, par commodité, seront nommées vitesses spécifiques. Elles sont exprimées en quantité de composé A par quantité de biomasse et par heure (sauf le taux de croissance, en h⁻¹), et ont été calculées grâce à l'équation suivante :

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

Équation 20

234. ESTIMATION DE LA COMPOSITION MACROMOLECULAIRE DE LA BIOMASSE

La composition macromoléculaire de la biomasse a été estimée à partir de la composition élémentaire (C, H, O, N) déterminée expérimentalement. Une macro a été codée à l'aide du tableur Excel (Microsoft Office). Celle-ci met en œuvre l'outil Solveur pour estimer une composition macromoléculaire en respectant la composition élémentaire expérimentale fournie ainsi que les limites imposées. Cette composition macromoléculaire prend en compte les protéines, l'ADN, l'ARN, les phospholipides, les triglycérides, les polysaccharides et les cendres. Les données de composition des différentes macromolécules ont été tirées de la littérature (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012 ; Rattray, 1988 ; Watson & Rose, 1980).

235. ESTIMATION DES FLUX INTRACELLULAIRES

2351. Introduction au modèle métabolique

Il existe différents types de modèles métaboliques. Le modèle utilisé ici est basé sur les principes de l'Analyse des Flux Métaboliques (M.F.A.). Ce type d'analyse permet d'obtenir un « descripteur métabolique » qui quantifie les flux intracellulaires (Stephanopoulos, 1998).

La méthodologie de construction d'un modèle métabolique a été théorisée par Vanrolleghem et Heijnen (1998). Elle comporte cinq étapes :

- Regroupement *a priori* des connaissances sur le métabolisme du microorganisme étudié, d'après la littérature scientifique,
- Ecriture des équations stœchiométriques composant le modèle,
- Estimation des paramètres du modèle,
- Vérification de la validité biologique et thermodynamique du modèle,
- Validation expérimentale du modèle.

Un modèle métabolique doit permettre de décrire les phénomènes biologiques souhaités de la manière la plus simple possible, par un ensemble de réactions biochimiques. La sélection de ces réactions doit donc s'effectuer de manière pertinente. En effet, plus leur nombre est élevé, plus le modèle est complexe et difficile à résoudre et plus il nécessitera de mesures expérimentales.

Ainsi, certaines réactions doivent être supprimées. C'est notamment le cas des réactions « cul de sac » menant à la formation de métabolites en apparence non impliqués dans d'autres réactions. C'est également le cas des réactions menant à la formation de métabolites particulièrement minoritaires, dont l'influence sur la résolution du modèle est négligeable.

Les réactions biochimiques intégrées dans un modèle peuvent ainsi être réparties en quatre groupes :

- Réactions anaboliques,
- Réactions cataboliques,
- Transports transmembranaires,
- Dissipation.

Les espèces chimiques considérées dans un modèle peuvent également être réparties en quatre groupes :

- Substrats (espèces consommées),

- Produits (espèces excrétées dans le milieu de culture),
- Métabolites intracellulaires (espèces non excrétées dans le milieu de culture),
- Biomasse (espèce terminale des réactions anaboliques, constituée de macromolécules).

2352. Formulation mathématique du modèle

Les équations stœchiométriques retenues pour l'établissement du modèle doivent être traduites sous forme mathématique pour permettre la résolution du modèle. Pour chaque espèce chimique, un bilan matière est réalisé de la manière suivante :

$$[\text{Accumulation}] = [\text{Production}] + [\text{Consommation}] + [\text{Transport}]$$

Les constantes de temps caractérisant les transitions métaboliques sont de l'ordre de 10^{-4} seconde. Elles sont très faibles devant celles caractérisant la croissance cellulaire et les dynamiques des procédés biotechnologiques, de l'ordre d'une à 10^4 secondes. Les concentrations des différents métabolites s'ajustent donc très rapidement suite à une perturbation du métabolisme ou à l'effet de dilution provoqué par la croissance cellulaire. L'ensemble des concentrations métaboliques peut donc raisonnablement être considéré à l'état stationnaire, permettant ainsi de négliger le terme d'accumulation. Le flux net pour un composé A peut donc être défini par l'équation suivante :

$$R_A = \sum_{i=1}^n a_i \cdot r_i$$

où :

- R_A est le flux net du composé A (mol h^{-1}),
- a_i est le coefficient stœchiométrique du composé A lors de la réaction « i »,
- r_i est la vitesse de la réaction « i » (mol h^{-1}).

L'application de cette équation à l'ensemble des espèces chimiques prises en compte dans le modèle permet d'obtenir un système prenant en compte « m » métabolites, intervenant dans « n » réactions et dont « k » sont échangés avec le milieu extracellulaire. Ce système peut être résolu sous la forme matricielle suivante :

$$S \times \vec{r} = \vec{R}$$

soit :

$$\begin{bmatrix} S_{1,1} & \cdots & \cdots & S_{1,n} \\ \vdots & & & \vdots \\ \vdots & & & \vdots \\ S_{m,1} & \cdots & \cdots & S_{m,n} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r_1 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ r_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_{A,1} \\ \vdots \\ R_{A,k} \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix}$$

où :

- \mathbf{S} est une matrice stœchiométrique représentant le réseau métabolique et possédant « m » lignes et « n » colonnes ($S_{i,j}$ représente donc le coefficient stœchiométrique appliqué au métabolite « i » lors de la réaction « j »),
- \vec{r} est le vecteur représentant les vitesses des « n » réactions,
- \vec{R} est le vecteur représentant les vitesses nettes de conversion des « m » métabolites (nulle pour un métabolite non excrété).

Ce système matriciel est sous déterminé, présentant un degré d'indétermination « d ». Pour le résoudre, il est donc nécessaire de fournir « d » vitesses expérimentales (nettes de conversion ou de réaction) non redondantes. Une solution unique pourra alors être déterminée.

2353. Modèle métabolique retenu

Le modèle utilisé dans les travaux présentés ici a été initialement développé et validé par Bideaux (2000). La compartimentation cellulaire, nécessaire aux problématiques traitées, a ensuite été intégrée au modèle existant par Pagliardini (2010).

Il prend en compte les réactions du métabolisme central (glycolyse, cycle des acides tricarboxyliques, voie fermentaire, cycle des pentose-phosphates, chaîne respiratoire), de la production de biomasse (synthèse des monomères et leur assemblage pour la synthèse des macromolécules), de transport (transmembranaire) et de dissipation (ATP) (Annexe 1). Son degré d'indétermination est ainsi égal à 7.

Ce modèle permet donc de trouver une solution unique et de calculer les vitesses nettes de conversion ainsi que les vitesses des réactions considérées grâce à 7 mesures expérimentales non redondantes. Les vitesses expérimentales choisies pour résoudre le système sont les vitesses de consommation de glucose et de production d'éthanol, de glycérol, d'acétate, de succinate, de pyruvate et de biomasse. Des cartes décrivant les flux métaboliques intracellulaires ont ainsi pu être dessinées. Dans ce dessein, les flux ont été normés vis-à-vis du flux de glucose entrant ou du flux de production de biomasse de la manière suivante :

$$F_A^{\text{normé}} = \frac{F_A}{F_{\text{Glucose}}} \text{ ou } \frac{F_A}{F_{\text{Biomasse}}}$$

où :

- F_A est le flux de conversion du composé A (mol h^{-1}),
- F_{Glucose} et F_{Biomasse} sont les flux de glucose entrant et de production de biomasse, respectivement ($\text{mol}_{\text{Glucose}} \text{ h}^{-1}$; $\text{g}_{\text{Biomasse}} \text{ h}^{-1}$),
- $F_A^{\text{normé}}$ est le flux de conversion normé du composé A ($\text{mol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$; $\text{mol g}_{\text{Biomasse}}^{-1}$).

24. REPRODUCTIBILITE DES CULTURES

La maîtrise de la composition du milieu de culture et de ses caractéristiques physico-chimiques ne permet pas d'éliminer toute variabilité des résultats. Celle-ci est notamment due aux erreurs expérimentales, regroupant les erreurs de mesure et de manipulation. La culture aérobie de la souche CEN.PK 113-7D sur glucose comme seule source de carbone a donc été réalisée deux fois afin d'estimer cette variabilité (Tableau 5). La variabilité entre les résultats des deux expériences, ainsi que l'erreur relative maximale de chaque paramètre caractérisant une culture, ont donc pu être estimées.

Tableau 5 : Paramètres de cultures de deux expériences réalisées dans des conditions identiques.

		CULTURE 1	CULTURE 2	Variabilité des résultats	Erreur relative maximale
VITESSES SPECIFIQUES					
μ_{\max}	h^{-1}	0,35 +/- 0,01	0,36 +/- 0,01	2,9 %	2,9 %
$Q_{\text{éthanol max}}$	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$	1,31 +/- 0,05	1,29 +/- 0,04	1,5 %	3,8 %
$Q_{\text{acétate max}}$	$mg\ g^{-1}\ h^{-1}$	34 +/- 4	33 +/- 4	2,9 %	12 %
RENDEMENTS GLUCOSE					
$Y_{\text{biomasse / glucose}}$	$g\ g^{-1}$	0,174 +/- 0,005	0,171 +/- 0,004	1,4 %	2,7 %
$Y_{\text{éthanol / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,432 +/- 0,008	0,427 +/- 0,005	1,3 %	1,9 %
$Y_{\text{éthanol / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,402 +/- 0,008	0,403 +/- 0,006	0,03 %	2,0 %
$Y_{\text{glycérol / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,0142 +/- 0,0012	0,013 +/- 0,001	8,4 %	9,2 %
$Y_{\text{glycérol / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,021 +/- 0,002	0,020 +/- 0,001	6,3 %	8,7 %
$Y_{\text{acétate / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,0158 +/- 0,0006	0,0154 +/- 0,0005	2,6 %	3,9 %
$Y_{\text{acétate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,0102 +/- 0,0006	0,0097 +/- 0,0002	4,7 %	5,9 %
$Y_{\text{succinate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,002 +/- 0,001	0,0019 +/- 0,0007	1,2 %	50 %
$Y_{\text{pyruvate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,0031 +/- 0,0007	0,0034 +/- 0,0004	10 %	23 %
CONCENTRATIONS FINALES					
Biomasse	$g\ L^{-1}$	13,2 +/- 0,3	13,5 +/- 0,3	2,3 %	2,3 %
Ethanol	$g\ L^{-1}$	126,8 +/- 0,6	124,7 +/- 0,6	1,7 %	0,45 %
Glycérol	$g\ L^{-1}$	4,96 +/- 0,02	4,68 +/- 0,02	5,6 %	0,43 %
Acétate	$g\ L^{-1}$	5,28 +/- 0,04	5,07 +/- 0,04	4,0 %	0,83 %
Succinate	$g\ L^{-1}$	0,53 +/- 0,01	0,56 +/- 0,01	5,7 %	1,9 %
Pyruvate	$g\ L^{-1}$	0,36 +/- 0,01	0,42 +/- 0,01	15 %	2,8 %
P_{critique}	$g\ L^{-1}$	86 +/- 3	87 +/- 3	1,2 %	3,5 %

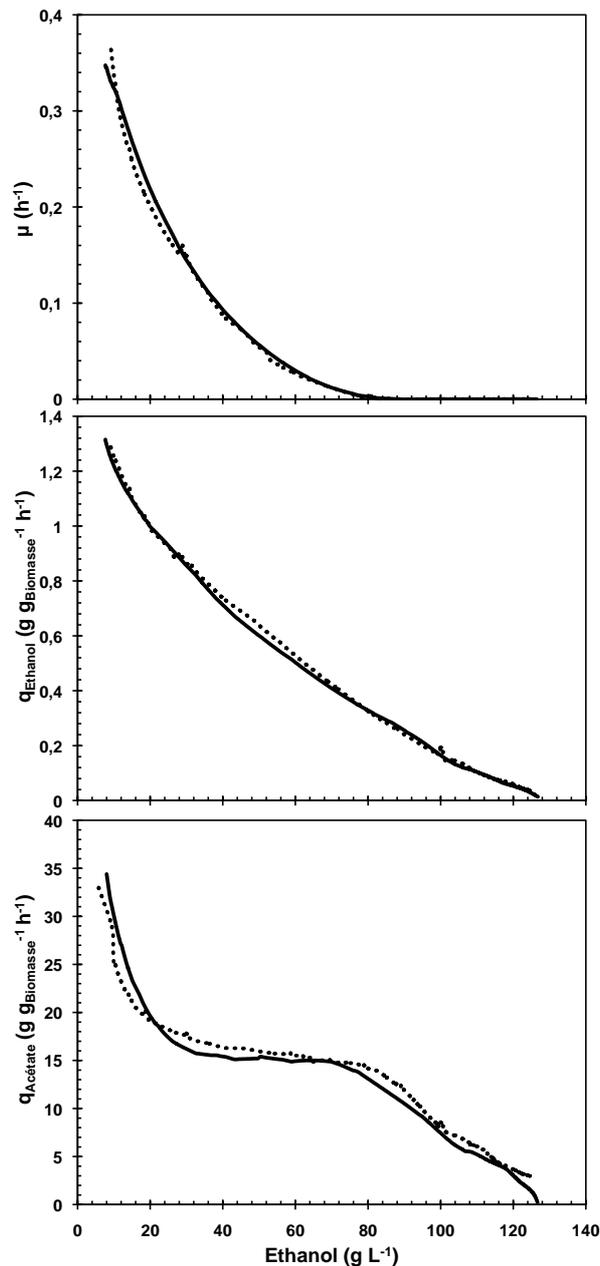


Figure 20 : Evolution du taux de croissance et des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu de culture, lors de deux cultures aérobies de *S. cerevisiae* en excès de glucose (— : culture 1 ; ... : culture 2).

La variabilité entre les deux expériences biologiques est faible ($< 5\%$), permettant de valider la répétabilité d'une culture (Tableau 5). Il faut cependant tenir compte de l'erreur plus élevée sur les rendements en glycérol produit sur glucose consommé (entre 6,3 et 8,4 %).

En revanche, l'erreur relative maximale d'un paramètre est très variable selon le produit considéré (Tableau 5). Elle dépend en effet des erreurs expérimentales appliquées à la mesure de ce produit, mais aussi de sa concentration. Les erreurs relatives sur les rendements en acides succinique et pyruvique sont ainsi particulièrement élevées.

Enfin, l'évolution du taux de croissance et des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en éthanol sont très similaires (Figure 20).

Chapitre 3

Etude de l'impact de l'acide oléique

CHAPITRE 3 ETUDE DE L'IMPACT DE L'ACIDE OLEIQUE	97
31. INTRODUCTION	101
32. PUBLICATION SCIENTIFIQUE	103
321. RESUME	103
322. INTRODUCTION	103
323. MATERIEL ET METHODES	105
324. RESULTATS ET DISCUSSIONS	109
325. REMERCIEMENTS	116
33. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	117
331. PARAMETRES DES CULTURES	117
3311. Evolution des masses cumulées lors de la culture « G » et « GO »	117
3312. Comparaison des rendements des cultures « G » et « GO »	118
3313. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « G » et « GO »	119
3314. Evolution des rendements lors des cultures « G » et « GO »	120
332. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES	122
3321. Répartition intracellulaire du glucose entrant	122
3322. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire	124
34. DISCUSSIONS	126
341. DIMINUTION DES CAPACITES FERMENTAIRES	126
342. REDISTRIBUTION DU CARBONE	127
343. ACCROISSEMENT DE LA CAPACITE RESPIRATOIRE	128

31. INTRODUCTION

Lorsqu'elle est cultivée en mode discontinu alimenté en excès de glucose, *S. cerevisiae* est soumise à l'effet Crabtree à « long terme ». D'après la théorie de la capacité respiratoire limite, l'ensemble regroupant les voies cytosoliques et mitochondriales du catabolisme respiratoire du pyruvate est ainsi saturé pour des flux de glucose entrant trop importants (Beck & von Meyenburg, 1968 ; Käppeli & Sonnleitner, 1986). Le flux de carbone provenant de la glycolyse est alors partiellement redirigé de la mitochondrie vers le by-pass de la pyruvate déshydrogénase et le métabolisme fermentaire. Ceci a pour conséquence une excrétion d'éthanol, de glycérol et d'acides organiques ainsi qu'une chute du rendement en biomasse.

Certaines études ont permis de moduler l'effet Crabtree à « court terme » par des stratégies utilisant le génie génétique. La suppression des gènes *MIG1* et *MIG2*, codant pour un régulateur positif de la répression du glucose a ainsi conduit à une augmentation de 5 % du taux de dilution critique (D_c) lors d'une culture en mode continu, à $0,274 \text{ h}^{-1}$ (Klein et al., 1999). La surexpression du gène *HAP4*, codant pour un régulateur positif des gènes impliqués dans le métabolisme respiratoire, a également augmenté le D_c de 10 %, à $0,33 \text{ h}^{-1}$ (van Maris et al., 2001). Enfin, une augmentation du D_c de 10 %, à $0,32 \text{ h}^{-1}$, a été observée grâce à l'expression du gène hétérologue codant pour une oxydase (AOX1), permettant la diminution du ratio intracellulaire $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ (Vemuri et al., 2007).

En outre, une seconde approche utilisant le génie microbiologique a été employée avec succès. L'utilisation de l'acide oléique comme co-substrat du glucose, à hauteur de 15 % du carbone consommé, a ainsi permis de moduler et de retarder l'apparition de la transition métabolique en culture continue. Suite à un pulse de glucose de 10 g L^{-1} , un retard de 15 mn a été observé pour l'apparition de la transition métabolique, ainsi qu'une diminution de 33 % de la production d'éthanol et une redirection du flux de carbone vers la production de biomasse. Aucune différence significative n'a cependant pu être mise en évidence quant à la production de glycérol et d'acide acétique (Feria-Gervasio et al., 2008).

L'impact de l'acide oléique sur l'effet Crabtree a également été étudié pour l'effet « long terme ». Feria-Gervasio (2008) a ainsi cultivé des cellules sur glucose en mode discontinu, avec ou sans acide oléique. Contrairement aux cultures continues, aucune diminution significative de la production d'éthanol n'a été mise en évidence en présence d'acide oléique. Un retard pour l'apparition de la production d'éthanol allant jusqu'à 2 h a cependant été observé. En outre, l'excrétion du glycérol et de l'acide acétique a été modulée. Les rendements sur glucose consommé de ces deux métabolites étaient de $0,02 \text{ Cmol Cmol}^{-1}$ pour la culture sur glucose seul. Pour les cultures sur glucose plus oléate, ils ont été augmentés à $0,03 \text{ Cmol Cmol}^{-1}$ avec des cellules pré-cultivées sur glucose seul et à $0,04 \text{ Cmol Cmol}^{-1}$ avec des cellules pré-cultivées sur glucose plus oléate. Le taux de croissance maximal a quant à lui été diminué de $0,37 \text{ h}^{-1}$ sur glucose seul à $0,31 \text{ h}^{-1}$ sur glucose plus oléate avec des cellules pré-cultivées sur glucose plus oléate. Ainsi, l'impact de l'acide oléique sur le métabolisme cellulaire pendant la culture discontinue est maximal chez les cellules pré-cultivées sur glucose plus acide oléique.

L'impact de l'acide oléique sur les effets Crabtree à « court » et « long terme » semble donc différent. Cet acide gras est connu pour son rôle d'activateur de l'expression de nombreux gènes (contenant la séquence promotrice O.R.E.) dont certains sont impliqués dans le transport de l'acétyl-coA à travers la membrane mitochondriale. Il a ainsi été montré que les activités spécifiques de la carnitine-acétyl transférase (CAT), de l'isopropyl-malate synthase (IS) et de la citrate synthase (CS) ont été augmentées en culture continue sur glucose en présence d'acide oléique. Ces données d'activité enzymatique ne sont cependant pas disponibles pour les cultures discontinues. La redistribution des flux de carbone en présence d'acide oléique pourrait donc être différente selon le mode de culture.

Dans ce chapitre, l'impact de l'acide oléique sur l'effet « long terme » a été étudié en cultures discontinues alimentées en excès de glucose. Outre une quantification macroscopique de l'impact de l'acide oléique sur les cellules, ce mode de culture pourrait fournir des données supplémentaires permettant d'éclaircir la redistribution des flux intracellulaires de carbone, notamment par l'analyse de la production des acides succinique et pyruvique. En se basant sur les résultats des cultures discontinues, une modulation de la production d'acide acétique devrait également être observée et permettre d'étudier le lien entre la synthèse de cet acide et la croissance cellulaire. Enfin, cette étude permettra de caractériser les capacités maximales de production d'éthanol de *S. cerevisiae* en présence d'acide oléique.

Deux cultures aérobies ont ainsi été menées avec la souche CEN.PK 113-7D. La première a été réalisée sur glucose comme seule source de carbone avec des cellules pré-cultivées sur glucose seul (G). La seconde a été réalisée sur glucose plus acide oléique (GO). Afin de maximiser l'impact de l'acide oléique, les cellules de cette seconde culture ont été pré-cultivées sur tréhalose plus acide oléique afin de mimer une culture oxydative en culture continue (Mouret, 2006).

32. PUBLICATION SCIENTIFIQUE

Les travaux étudiant l'impact de l'acide oléique sur le métabolisme de *S. cerevisiae*, réalisés dans le cadre de ce doctorat ainsi que par David Feria-Gervasio et Jean-Roch Mouret, ont fait l'objet d'une soumission de communication scientifique écrite au journal *Microbial Cell Factories* (2013). Cette publication a pour titre « Impact of oleic acid as co-substrate of glucose on “short” and “long-term” Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae* ».

321. RESUME

We previously demonstrated that oleic acid as a co-substrate in glucose-limited chemostat allowed to delay and modulate the “short-term” Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. Here we further investigated the effect of oleic acid as a modulator of the Crabtree effect. Present study provides important information about i) the strain specificity carrying out the same chemostat cultures with an other strain, ii) the critical dilution rate obtained during aerobic accelerostats, iii) the reversibility of the potential effects with aerobic glucose-excess batches and iv) the durability and maximal capacities under high ethanol stress with glucose-excess fed-batches.

First, the addition of oleate resulted in an increase of the critical dilution rate by 8% and the specific carbon uptake rate by 18%. Furthermore, a delay was observed for the onset of ethanol production when a batch was inoculated with cells previously grown in glucose-oleate chemostat. Finally, the culture of adapted cells in a glucose-oleate fed-batch led to a redirection of the carbon flux toward biomass production, with a 73% increase in biomass yield.

To conclude, the perturbation of the transition by oleic acid clearly resulted in a decrease of the “short-term” and “long-term” Crabtree effects.

322. INTRODUCTION

The repression of oxidative pathways by glycolytic activity resulting in simultaneous fermentation and respiration was named “Crabtree effect” (Crabtree, 1929 ; De Deken, 1966 ; Fiechter et al., 1981). The resulting oxido-reductive metabolism is characterized by a byproduct formation (ethanol, glycerol and weak acids), a loss in biomass yield and a limited oxygen specific uptake rate. It is named “long-term” effect when it appears in glucose excess batch and fed-batch or in glucose-limited chemostat at dilution rates over the critical dilution rate (D_c), involving adaptation of cell metabolism, while it is named “short-term” effect after a glucose pulse in glucose-limited chemostat at dilution rates under D_c (Petrik et al., 1983).

The mostly global accepted theory to explain this mechanism is a limited respiratory capacity in Crabtree-positive cells. This respiratory capacity includes the whole cytosolic and mitochondrial pathways responsible for the respiratory catabolism of pyruvate, including the respiratory chain. It is saturated above a critical threshold of glucose uptake rate. Then, the cell directs the excess of glycolytic flux toward fermentative metabolism with apparition of ethanol production (Beck & von Meyenburg, 1968 ; Käppeli & Sonnleitner, 1986). This theory was supported by studies using genetic engineering approach. However, isolated deletion or over-expression of various genes coding for enzymes within the respiratory capacity did not success to bring out any single limiting reaction (Flikweert et al., 1996 ; van Hoek et al., 1998b ; de Jong-Gubbels et al., 1998 ; Meaden et al., 1997 ; Remize et al., 2000 ; Saint-Prix et al., 2004 ; van Urk et al., 1989b ; Verduyn et al., 1992).

Modulation of the metabolic transition was successfully reported after engineering global regulation functions. The deletion of *MIG1* and *MIG2*, coding for a positive regulator in glucose repression led to a 5% higher D_c , at 0.274h^{-1} (Klein et al., 1999). The over-expression of *HAP4*, coding for a positive regulator of genes involved in respiratory metabolism, led to a 10% higher D_c , at 0.33h^{-1} (van Maris et al., 2001). Decreasing intracellular NADH/NAD⁺ ratio by expressing heterologous gene coding for a mitochondrial oxidase (*AOX1*) led also to a 10% higher D_c , at 0.32h^{-1} (Vemuri et al., 2007). Furthermore, modulation of “short-term” Crabtree effect was also reported through co-substrate feeding. Feeding oleic acid as a co-substrate of glucose enabled to delay and modulate the “short-term” metabolic transition apparition in cells (Feria-Gervasio et al., 2008).

The latter approach was carried out by feeding an aerobic glucose-limited chemostat at $D = 0.16\text{h}^{-1}$ with oleic acid. After a glucose pulse of 10g L^{-1} , a delay up to 15 min in the onset of the metabolic shift, a 33% decrease in the ethanol production, and a redirection of the carbon flux toward biomass production were observed. Moreover, specific activities of carnitine-acetyl transferase, isopropylmalate synthase and citrate synthase were increased. These ones are enzymatic systems involved in the transport of acetyl-coA through the mitochondria membrane (Kal et al., 1999 ; van Roermund et al., 1995). Nevertheless, explanation of oleate effect on the metabolism remained unclear. Indeed, the presence of this acid as co-substrate of glucose may have induced a “substrate effect” (degradation of the oleic acid through the β -oxidation pathway introducing a supplemental carbon flux into the central metabolism with potentially allosteric modifications) and/or a “genetic effect” (induction of the transcription of various genes by the presence of the molecule). The oleic acid could also have an indirect effect at the transcriptional and/or translational level via the regulatory complex system (Feria-Gervasio et al., 2008 ; van Roermund et al., 2003).

These previous efforts led to an overview of the impact of oleic acid on the “short-term” Crabtree effect. Nonetheless, the processes used for industrial applications for which Crabtree effect is unwanted, like starter yeasts or heterologous protein production, could led to “long-term” as well as “short-term” Crabtree effect. Moreover, the range of *S. cerevisiae* strains used in industry is wide and their behavior could largely differ from CEN.PK 113-7D. Based on these observations, previous work of Feria-Gervasio *et al.* (2008) needed to be completed. Thus in the present work, we further investigated the impact of oleic acid including a determination

of its specificity using an industrial strain (*S. cerevisiae* CA10/pCD63), the determination of the critical dilution rate for purely oxidative metabolism (D_c), an investigation of the reversibility of the effect and finally a characterization of the durability of the effect under conditions resulting in “long-term” Crabtree effect onset.

323. MATERIEL ET METHODES

Strain and media

The yeast strain *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D (van Dijken et al., 2000) and CA10/pCD63 (provided by Sanofi Aventis industry) were stored in 30% glycerol at -80°C . The cells were first grown on YPD plates (10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ bactopectone, 20 g L⁻¹ glucose, 15 g L⁻¹ agar) at 30°C . All subsequent pre-cultures and culture experiments were carried out at 30°C in mineral medium as described by Feria-Gervasio *et al.* (2008), except for fed-batch technique. When using the CA10/pCD63 strain the mineral medium was supplemented with adenine and histidine in the reservoir medium at 0.2 g L⁻¹. Medium used for fed-batch experiment contained per litre: KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 12 g; MgSO₄, 1 g. A sequential vitamins and trace elements feeding strategy based on the growth profile was applied (Alfenore et al., 2002) to reach per liter: EDTA, 0.03 g; ZnSO₄.7H₂O, 0.009 g; MnSO₄.H₂O, 0.002 g; CoCl₂.6H₂O, 0.0006 g; CuSO₄.5H₂O, 0.0006 g; Na₂MoSO₄.2H₂O, 0.008 g; CaCl₂.2H₂O, 0.009 g; (NH₄)₂Fe(SO₄)₆.6H₂O, 0.006 g; H₃BO₃, 0.002 g; D-biotin, 0.00024 g; D-L-pantothenic acid, 0.005 g; nicotinic acid, 0.005 g; myo-inositol, 0.125 g; thiamin, 0.005 g; pyridoxin, 0.005 g; para-aminobenzoic acid, 0.001 g.

Batch cultivations with *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D

Batch cultures were performed in a 5 L bioreactor B DCU B.Braun with a working volume of 3 L, managed with the MFCS/win 2.0 software. Temperature was regulated at 30°C and pH at 5.0 by addition of 1 M NaOH. Air flow and stirring rate were adjusted to maintain fully aerobic condition, i.e. a dissolved oxygen concentration above 20% of saturation. Initial glucose concentration was 40 g L⁻¹, supplemented with oleic acid at 30 g L⁻¹ for B_{GO}C_{GO}. Inoculation was carried out with *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D cells harvested at steady state in a glucose-limited chemostat at $D = 0.16\text{ h}^{-1}$ for B_GC_G, or in a glucose-limited chemostat at $D = 0.16\text{ h}^{-1}$ with oleate as co-substrate at $D = 0.0073\text{ h}^{-1}$ for B_GC_{GO} and B_{GO}C_{GO} (Feria-Gervasio et al., 2008) (Table 6).

VHEP fed-batch cultivations with *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D

Fed-batch cultures were performed in a 5 L bioreactor B DCU B.Braun with a working volume of 3 L, managed with the MFCS/win 2.0 software. Temperature was regulated at 30°C and pH at 4.0 by addition of 14% (v/v) NH₃ solution. Air flow and stirring rate were adjusted to maintain fully aerobic condition, i.e. a dissolved oxygen concentration above 20% of saturation. Initial glucose concentration was 100 g L⁻¹ for all experiments, supplemented with oleic acid at 50 g L⁻¹ for the glucose-oleate fed-batch. When glucose

concentration reached 20 g L^{-1} in the bioreactor, pulses of a 700 g L^{-1} glucose solution was achieved to reach 100 g L^{-1} . At the later phase of cultivation, i.e. when ethanol concentration was above 90 g L^{-1} , the targeted glucose fed concentration was 50 g L^{-1} . For glucose-oleate fed-batch ($\text{FB}_{\text{Go}}\text{C}_{\text{Go}}$), oleic acid feeding strategy was also performed to maintain the 50 g L^{-1} . Inoculation was done from YPD plate of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Three steps of propagation were carried out (5 mL, 30 mL and 300 mL) to inoculate the fed-batch cultures. Each preculture was grown for 10 hours at 30°C , 100 rpm and was used to inoculate the next-step at 10% (V/V) ratio. For glucose-oleate fed-batch cultivation, cells were firstly adapted to oleic acid by a growth phase in the bioreactor on 10 g L^{-1} trehalose, supplemented with 50 g L^{-1} of oleic acid. This strategy was carried out in order to mimic oxidative chemostat culture on glucose-oleate (Mouret et al., 2006). When trehalose was fully consumed, glucose was feed to reach 100 g L^{-1} and the culture was done as described above. Ethanol assessment was done as described by Pagliardini *et al.* (2010) and taken into account for further calculations.

Table 6 : Summary of the different experiments carried out in the present study.
Cells were previously prepared in glucose as sole carbon source (non adapted cells) or in glucose plus oleic acid (adapted cells).

PROCESS	SUBSTRATE	CELLS		ACRONYM
		STRAIN	PREPARATION	Culture _{C. source} / Cells _{C. source}
Chemostat	Glucose	CEN.PK 113-7D	Glucose	
Chemostat	Glucose / Oleate	CEN.PK 113-7D	Glucose / Oleate	
Chemostat	Glucose	CA10/pCD63	Glucose	
Chemostat	Glucose / Oleate	CA10/pCD63	Glucose / Oleate	
Accelerostat	Glucose	CEN.PK 113-7D	Glucose	AS _G C _G
Accelerostat	Glucose / Oleate	CEN.PK 113-7D	Glucose / Oleate	AS _{Go} C _{Go}
Batch	Glucose	CEN.PK 113-7D	Glucose	B _G C _G
Batch	Glucose	CEN.PK 113-7D	Glucose / Oleate	B _G C _{Go}
Batch	Glucose / Oleate	CEN.PK 113-7D	Glucose / Oleate	B _{Go} C _{Go}
Fed-batch	Glucose	CEN.PK 113-7D	Glucose	FB _G C _G
Fed-batch	Glucose / Oleate	CEN.PK 113-7D	Glucose / Oleate	FB _{Go} C _{Go}

Chemostat cultivations with *S. cerevisiae* CA10/pCD63

Chemostat cultures with glucose as the sole carbon source and with glucose plus oleate were performed as described by Feria-Gervasio *et al.* (2008). The dilution rate was set at 0.18 h^{-1} for *S. cerevisiae* CA10/pCD63 to maintain the cells under pure oxidative metabolism. The bioreactors were fed with the mineral medium supplemented with glucose at 38 g L^{-1} for glucose chemostat and 39 g L^{-1} for glucose-oleate chemostat. This glucose-oleate chemostat was also fed with a 720 g L^{-1} oleic acid solution at a dilution rate of 0.0041 h^{-1} .

Accelerostat cultivations with *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D

The accelerostat (A-stat) technique consisted of a computer-controlled continuous cultivation procedure with a smooth change of the dilution rate (Paalme et al., 1995). Accelerostat cultures were performed with the CEN.PK 113-7D strain in the same conditions as for chemostat cultures, with a glucose concentration of 37 g L⁻¹ for glucose A-stat and 38 g L⁻¹ for glucose-oleate A-stat. The A-stats were launched when chemostat steady state cultures were stabilized at $D_0 = 0.16 \text{ h}^{-1}$ by increasing linearly the dilution rate with a constant acceleration rate of $\alpha = 0.005 \text{ h}^{-2}$, where D_t changed with time as follow:

$$D_t = D_0 + \alpha \cdot t$$

Where: D_t is the dilution rate for the instant “t”; D_0 represents the initial dilution rate; α is the constant acceleration rate fixed and t the time in hours.

Off-gas analysis

Inlet and outlet gases compositions were analyzed by mass spectrometry. For chemostats and A-stats, analyses were performed every 5 min during the steady state, every 45 s during A-stats acceleration and every 5 s during the pulse dynamic with a PRIMA 600s (VG gas, Manchester, UK). For batches and fed-batches, analyses were performed every 5 min with a Proline Dycor (Ametek Process Instrument, Berwyn, USA). Aeration started 1 hour after inoculation to avoid CO₂ stripping from the medium and then prevent lag phase. CO₂ production rate and O₂ consumption rate were calculated as described by Poilpre *et al.* (2002) for chemostats, A-stats and batches, and considering the liquid and gas volume evolution, the inlet airflow, the temperature and the pressure. The Respiratory Quotient (RQ) was given by the molar ratio between $r\text{CO}_2$ and $r\text{O}_2$.

Glucose pulse experiments

After establishment of the steady state, six independent samples were taken over a period of 40 h to characterize it. Then glucose pulses were performed by injecting a known volume of a 600 g L⁻¹ glucose solution in order to obtain a concentration in the reactor of 10 g L⁻¹. The influent and effluent pumps were running continuously during the experiment. These experiments were carried out twice for each condition in two independent chemostats.

Determination of biomass

In order to conduct experiments, spectrophotometric measurements at 620 nm were performed with spectrophotometers Hitachi U-1100 (Hitachi High Technologies America Inc., Schaumburg, USA) or Libra S4 (Biochrom, Cambridge, UK) after a calibration against cell dry weight measurements to evaluate yeast growth. For cell dry weight determination, culture medium was harvested and filtrated on 0.45 µm pore-size polyamide membranes (Sartorius AG, Göttingen, Germany), which were then dried to a constant weight at 60°C under partial vacuum (200 mmHg, i.e. approximately 26.7 kPa). In presence of oleic acid, 500 µl of culture medium were mixed with 500 µl of iso-propanol to eliminate oleic acid. The mixture was vortexed for 1 min and

centrifuged for 3 min at $12.000\times g$. The pellet was resuspended in 500 μl of water for spectrophotometric measurements. For cell dry weight determination, membranes were washed after filtration with hexane and water to eliminate oleic acid. It was previously checked that iso-propanol and hexane did not damage the cells.

Determination of cell viability

A cell coloration with the methylene blue method (Postgate, 1967) was used as previously described to determine cells viability (Alfenore et al., 2002). In presence of oleate, cell suspension was prepared as described above before staining procedure.

Metabolites analysis

Sampling for metabolite analysis was performed by sampling the broth from bioreactors directly through a sterile 0.45 μm pore-size polyamide membranes (Sartorius AG, Göttingen, Germany). The permeate was then either directly analyzed (chemostats and A-stats) or frozen at -20°C for further analyses (batches and fed-batches).

In order to conduct experiments, glucose concentration was analyzed by enzymatic method with an YSI analyser model 27 A (YSI Life Science, Yellow Springs, USA).

The accurate determination of glucose, ethanol, glycerol and organic acids from the permeate was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Alfenore *et al.* (2002). For chemostats and A-stats, the concentrations of ethanol and acetic acid were determined by gas chromatography as described by Feria-Gervasio *et al.* (2008).

Oleic acid concentration determination was performed by two methods on the filtered supernatant obtained after iso-propanol washing and centrifugation. On the first hand, supernatant was directly injected in a HPLC using a 250*4.6 mm C18 column (Interchim, Montluçon, France). Column temperature was set at 50°C and a 3% (v/v) acetic acid in methanol solution was used as carrier with a flow rate of 1 ml min^{-1} . Detection was done with a refractometer. On a second hand, supernatant was processed with a 0.2 mol L^{-1} trimethylsulphonium hydroxide in methanol solution in order to turn fatty acids into volatile molecule by methylation of their carboxylic function. Then sample was analyzed by gas chromatography using a 50 m*0.25 mm CP-Select CB for FAME fused silica WCOT (Varian, Palo Alto, USA). Injector temperature was set at 140°C and column temperature was initially set at 50°C , then be increased to 240°C with the following profile: $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for 3 min; $13^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for 5 min; $1.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for 27 min; $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for 12 min and a final isotherm of 10 min. Nitrogen gas was used as carrier with a flow rate of 50 ml.min^{-1} and detection was done by a FID set at 250°C .

324. RESULTATS ET DISCUSSIONS

We previously demonstrated that oleic acid as a co-substrate in glucose-limited chemostat ($D=0.16h^{-1}$) allowed to delay and modulate the transition from respiratory to oxido-reductive metabolism, so called “short-term Crabtree effect”, in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D. As a consequence of the modulation of the transition, ethanol production was decreased and the carbon flow was redirected toward the biomass production (Feria-Gervasio et al., 2008). In order to further characterize this effect, the impact of oleic acid was investigated in terms of strain specificity, durability and reversibility of the effect.

The oleic acid impact was not specific to the CEN.PK 113-7D strain

To evaluate the strain specificity of the impact of oleic acid on the transition from oxidative to oxido-reductive metabolism, glucose pulse experiment was carried in the steady state of a glucose-limited chemostat with and without oleic acid with the strain CA10/pCD63. Results were compared with those previously obtained with *S.c.* CEN.PK 113-7D. Figure 21 showed the evolutions of ethanol concentration and the

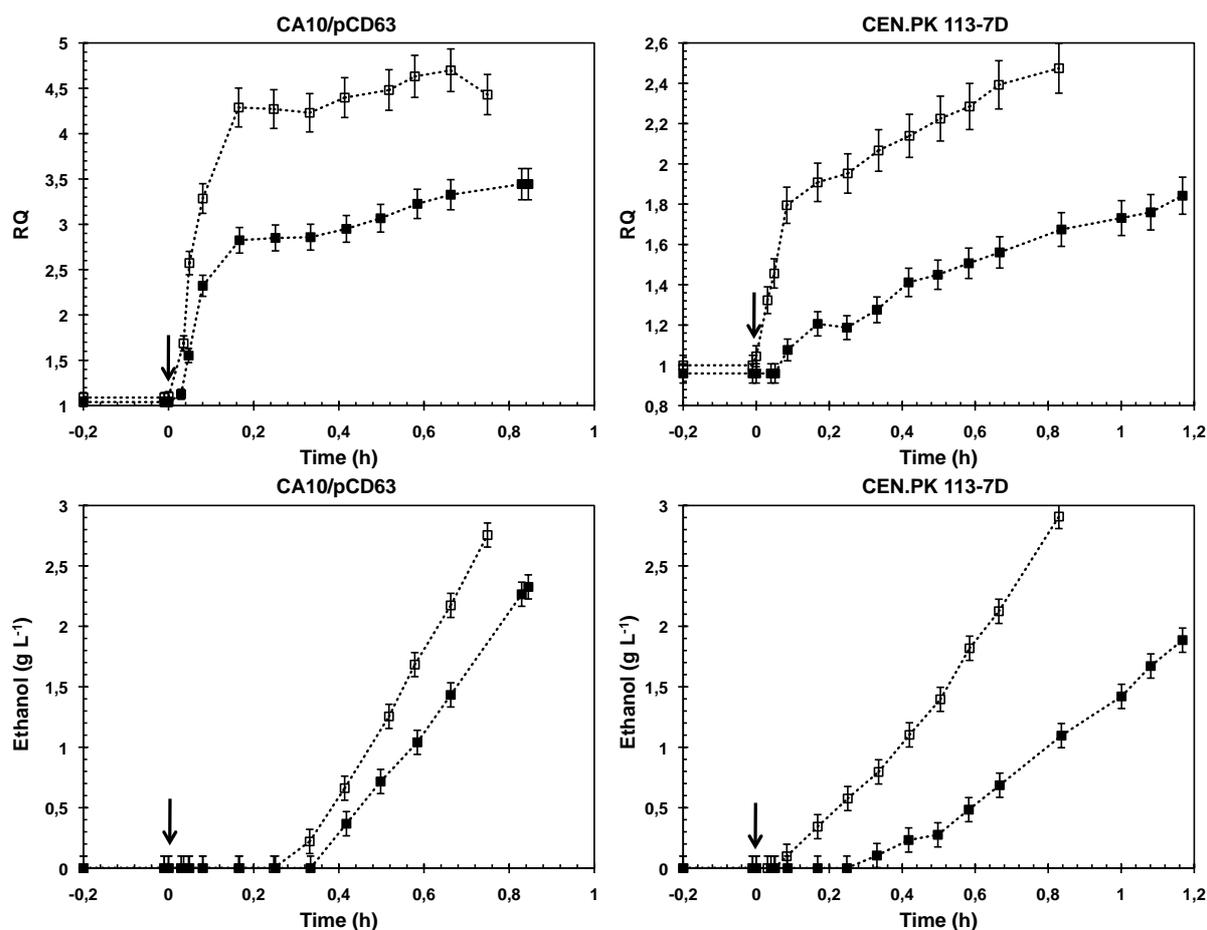


Figure 21 : Changes in the ethanol concentration and RQ upon a glucose pulse (10 g L^{-1} indicated by the arrow) at the steady state of glucose limited chemostat of strain CA10/pCD63 and CEN.PK 113-7D on glucose in absence (open symbols) or in presence of an oleic acid (full symbols) feeding at $D_{ole}=0.004h^{-1}$ (CA10/pCD63) and $D_{ole}=0.0073h^{-1}$ (CEN.PK 113-7D).

Carbon balances were evaluated on the totality of each glucose pulse experiment within the range $100 \pm 2\%$.

Respiratory Quotient after a glucose pulse at 10 g L^{-1} for the two strains. The presence of oleic acid in the chemostat of *S. cerevisiae* CA10/pCD63 led to a decrease in ethanol (16%) and acetate (results not shown) production after the glucose pulse. The RQ profile was also lower in presence of oleic acid. Its maximal value was decreased by 27% and 25% respectively for CA10/pCD63 and CEN.PK 133-7D. Finally, the strain CA10/pCD63 showed a delay of 6 minutes in the onset of the metabolic shift upon the glucose pulse in presence of oleic acid. The delay was found equal to a 15 min for the strain CEN.PK 113-7D under the same conditions.

Thus, the impact of oleic acid on the dynamic profiles of ethanol production and RQ were similar for both strains, however less slightly pronounced for *S. cerevisiae* CA10/pCD63.

Oleic acid impacted also the critical dilution rate (D_c)

In order to determine the critical dilution rate for *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D with and without oleic acid as co-substrate ($D=0.0073\text{h}^{-1}$), accelerostat cultures were carried out by increasing the glucose feeding as a function of time. The dilution rate was increased from an initial value of 0.16 h^{-1} to a final value of 0.30 h^{-1} with a constant acceleration of 0.005 h^{-2} .

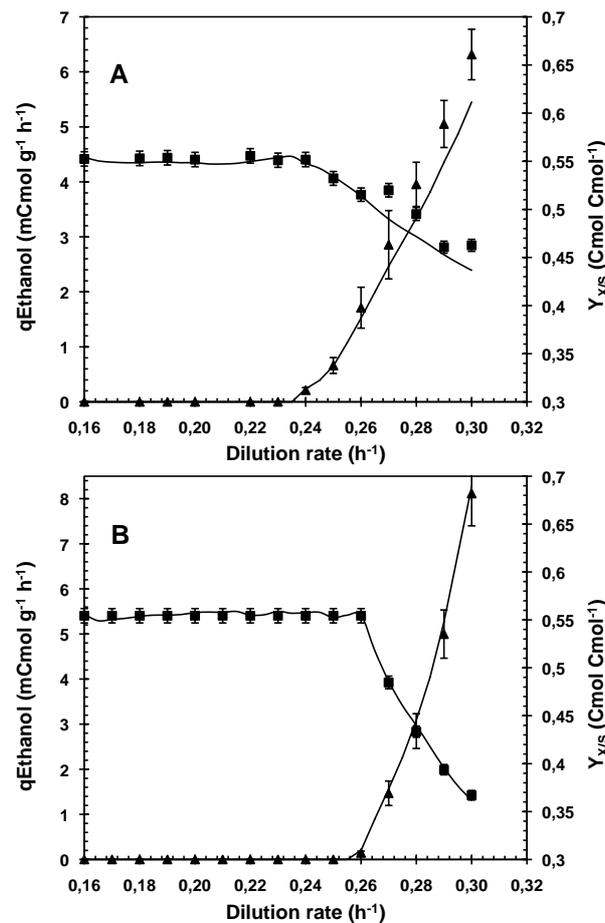


Figure 22 : Specific ethanol production rate (\blacktriangle) and biomass yield (\blacksquare) during A-stat cultivations on glucose in absence ($AS_G C_G$; A) or presence ($AS_G O C_G O$; B) of oleic acid feeding at $D_{ole}=0.0073\text{h}^{-1}$. Lines represented the evolution profile calculated by carbon and degree of reduction balances.

The onset of the transition from respiratory to oxido-reductive metabolism, corresponding to the D_c , was characterized by the increase in the ethanol production and the decrease in the biomass yield ($Y_{X/S}$). This happened at 0.24 h^{-1} on sole glucose (Fig. 2A) but the presence of oleic acid in the fermentation broth led to an 8% increase at 0.26 h^{-1} (Fig 2B). The difference in D_c was in the same order of magnitude as those found in the literature with mutant strains. A first study deleting *MIG1* and *MIG2*, coding for a regulator involved in the glucose repression, led to a 5% increase in the D_c determined with the same technique (Klein et al., 1999). Over-expressing the transcription factor Hap4p led to a 10% increase in D_c estimated in chemostat cultures (van Maris et al., 2001). Finally, Vemuri *et al.* (2007) showed a 10% increased in D_c by expressing a heterologous oxidase during productostat cultures (Moreira dos Santos et al., 2004).

Under cellular metabolism considerations, this 8% increase in D_c corresponded to an 8% higher specific consumption rate of glucose for the onset of the metabolic transition, from 16.5 to 17.8 $\text{mCmol g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 3). Previous study of Feria-Gervasio *et al.* (2008) demonstrated that modulation of this transition was not correlated to the respiratory chain capacity. Thereby, this observation suggested that addition of oleic acid

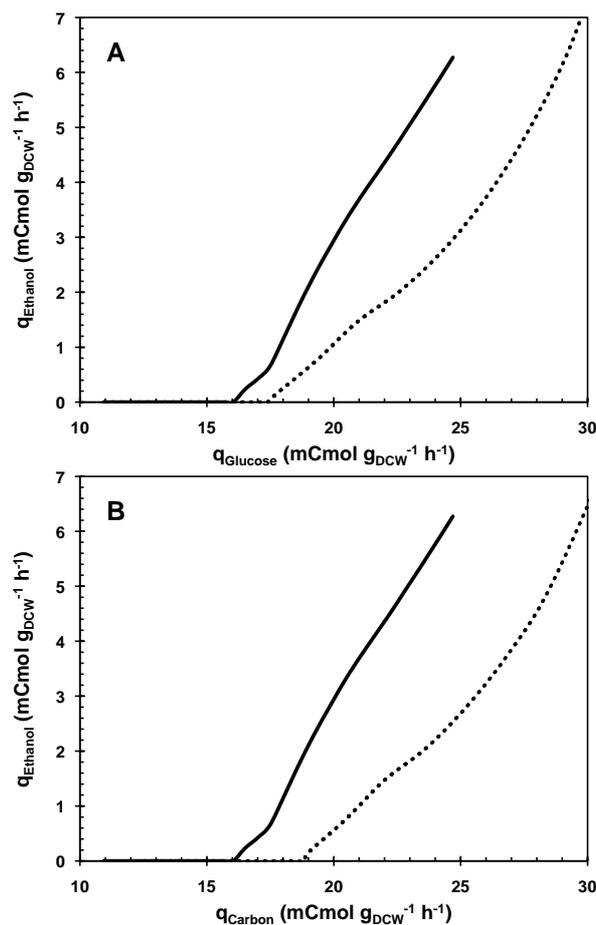


Figure 23 : Specific ethanol production rate is given as a function of the specific consumption rates of glucose (A) and the specific consumption rate of carbon (B) during A-stat cultivations on glucose in absence ($AS_G C_G$; solid lines) or presence ($AS_{GO} C_{GO}$; dotted lines) of oleic acid feeding at $D_{ole}=0.0073 \text{ h}^{-1}$. The A-stat cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D were carried out between $D=0.16 \text{ h}^{-1}$ and $D=0.3 \text{ h}^{-1}$.

resulted in an enhancement of the so-called "respiratory capacity" (black box model including the metabolic cytosolic and mitochondrial pathways responsible for the respiratory catabolism of pyruvate), permitting cells to metabolize glucose at higher rates without employing the fermentative way.

In regard to carbon uptake rate, the D_c corresponds to a 15% higher carbon uptake rate in glucose-oleate A-stat, from 16.5 to 19.0 mCmol gDCW⁻¹ h⁻¹ (Fig. 3). In addition to an 8% higher carbon rate from glucose, cells were thus able to metabolize 7% more carbon from oleic acid when metabolic transition occurred.

Oleic acid effect was at least partially reversible

Batch cultures were performed in order to determine the reversibility of the oleate impact. Pre-grown cells on glucose-oleate carbon source were transferred in glucose batch cultures with or without oleic acid as co-substrate ($B_G C_{GO}$ and $B_{GO} C_{GO}$). Their ethanolic performances were compared to a control glucose batch with cells precultured on glucose only ($B_G C_G$).

Batch cultivations on glucose only showed that cells precultured on glucose + oleic acid as the carbon sources ($B_G C_{GO}$) presented a 1 hour greater delay in the onset of ethanol production than the cells pregrown on glucose only ($B_G C_G$) (Fig 4). Biomass-oriented rearrangement of the metabolism was thus conserved even when oleate was removed from the culture broth. However, cells precultured on glucose + oleic acid as the carbon sources and transferred in a batch containing glucose and oleic acid ($B_{GO} C_{GO}$) presented a 1 hour even greater delay than when growing on glucose alone ($B_G C_{GO}$). As a consequence, a constant oleic acid pressure seemed necessary to conserve for a long period the whole impact on the cell metabolism. Therefore, these observations indicated a partial reversibility of the oleic acid effect in cells once oleic acid was removed.

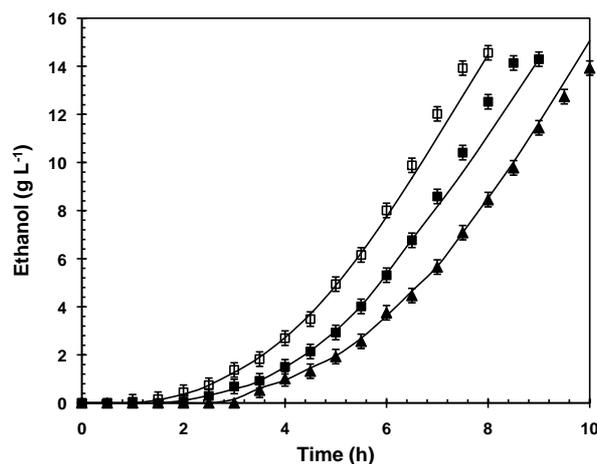


Figure 24 : Concentration of ethanol during aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D. The batch cultivations were inoculated with cells gathered at the steady state of glucose limited chemostat at $D=0.16\text{h}^{-1}$ (Batch glucose ($B_G C_G$); □) or with cells gathered at the steady state of glucose limited chemostats at $D=0.16\text{h}^{-1}$ in presence of oleate at $D_{ole}=0.0073\text{h}^{-1}$ (Batch glucose ($B_G C_{GO}$); ■ and Batch glucose with oleic acid ($B_{GO} C_{GO}$); ▲). Lines represented the evolution profile calculated by carbon and degree of reduction balances.

Oleic acid impact was effective for hours during VHEP fermentation with oleate pressure

The impact of oleic acid on the oxido-reductive metabolism and its durability were further studied during fed-batch conditions. A first glucose-excess aerobic fed-batch cultivation was carried out with glucose as sole carbon source inoculated with cells precultured on glucose (FB_GC_G). A second fed-batch was carried out with cells pregrown on glucose and oleic acid as co-substrate (FB_{GO}C_{GO}) for comparison.

Kinetics of biomass and ethanol produced suggested that the presence of oleic acid in the medium promoted the growth of yeasts to the detriment of ethanol production and led to a shorter fermentation time (Fig. 5). This was confirmed in view of the global yields on glucose consumed (Table 7). Biomass yield was increased by 35% as well as its final concentration by 73%. Ethanol yield was meanwhile decreased by 8% and the final titer of ethanol by 7% (116.2 vs 126.8 g L⁻¹). The maximal production rates of ethanol and glycerol were decreased by 67% and 39%, respectively (Table 7). This clearly confirmed that oleic acid negatively impacted the fermentative capacities of the cells during aerobic fed-batch cultures. Carbon metabolism was thus preferentially directed toward biomass production although no variation was observed for the maximal specific growth rate.

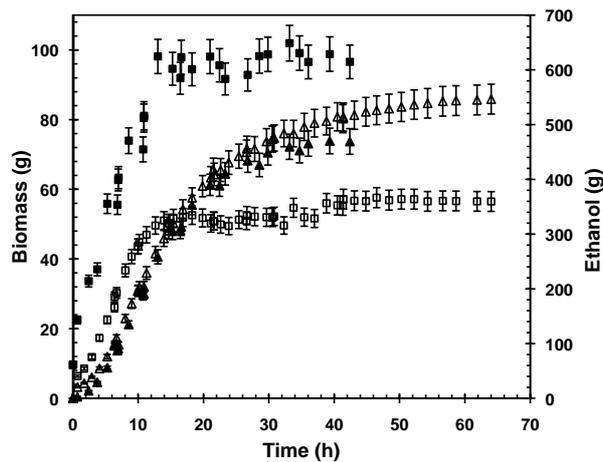


Figure 25 : Evolution of (□) biomass and (△) ethanol cumulated masses during aerobic fed-batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* CENPK 113-7D. *Open symbols* represent the glucose-excess fed-batch with non-adapted cells (FB_GC_G), *full symbols* represent the glucose-oleate-excess fed-batch with adapted cells (FB_{GO}C_{GO}).

Table 7 showed a greater production of succinate in the cells precultured on glucose + oleic acid (FB_{GO}C_{GO}). Final concentration, global yield and maximal specific rate of production of this organic acid were increased respectively by 34%, 67% and 114% when oleate was added in the fermentation broth. Measurements did not reveal any oleate consumption during the fed-batch FB_{GO}C_{GO} experiment and the carbon recovery was close to 100% considering entering carbon only from glucose. Therefore, a succinate synthesis from the catabolism of oleic acid through the β -oxidation and glyoxylate pathways cannot be taken into consideration. The cycle of the tricarboxylic acids was then supposed to be the source of succinate excretion under oxido-reductive metabolism with glucose as sole carbon source, as previously mentioned by Camarasa *et al.* (2003). Moreover,

HCO_3^- was known to inhibit numerous enzymes such as TCA cycle succinate dehydrogenase (Jones & Greenfield, 1982). During our experiments, succinate was produced in the first phase of the fed-batches, corresponding to the slightly extended growth phase, corresponding when the highest rates of CO_2 production occurred (results not shown). Assuming that succinic acid derived from the tricarboxylic cycle, the increased excretion of succinate could be interpreted as a higher activity of the TCA cycle. These observations were strengthened by the increased oxygen consumption observed in presence of oleic acid (data not shown) and previously described by Feria-Gervasio *et al.* (2008) in aerobic chemostat.

Table 7 : Final concentrations, global yields and maximal specific rates obtained during aerobic fed-batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D under glucose-excess (FB_GC_G) or glucose-oleate-excess ($\text{FB}_{G0}\text{C}_{G0}$) conditions. Representative differences are in bold.

			Biomass	Ethanol	Glycerol	Acetate	Succinate	Pyruvate
FINAL	FB_GC_G	g L^{-1}	13.2 ± 0.3	126.8 ± 0.6	4.96 ± 0.02	5.28 ± 0.04	0.53 ± 0.01	0.36 ± 0.01
CONCEN-	$\text{FB}_{G0}\text{C}_{G0}$	g L^{-1}	22.9 ± 0.5	116.2 ± 1.1	4.21 ± 0.05	5.1 ± 0.1	0.71 ± 0.03	0.37 ± 0.06
TRATION	Difference	%	73	-8	-15	3	34	3
	FB_GC_G	g g^{-1}	0.174 ± 0.005	0.432 ± 0.008	0.0142 ± 0.0012	0.0158 ± 0.0006	0.0027 ± 0.0006	0.0013 ± 0.0003
YIELD	$\text{FB}_{G0}\text{C}_{G0}$	g g^{-1}	0.234 ± 0.012	0.40 ± 0.01	0.015 ± 0.002	0.0171 ± 0.0004	0.0045 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0002
	Difference	%	35	-7	6	8	67	0
MAXIMAL	FB_GC_G	$\text{g g}^{-1} \text{L}^{-1}$	0.35 ± 0.01	1.31 ± 0.05	0.074 ± 0.008	0.034 ± 0.004	0.007 ± 0.002	0.013 ± 0.004
SPECIFIC	$\text{FB}_{G0}\text{C}_{G0}$	$\text{g g}^{-1} \text{L}^{-1}$	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.045 ± 0.008	0.047 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.017 ± 0.004
RATE	Difference	%	8	-67	-39	38	114	30

Glycerol production was also decreased in presence of oleic acid. Final concentration and maximal specific rate of production of glycerol were decreased respectively by 15% and 39%. In addition to its role in the stress response, glycerol formation is known to ensure the cytosolic NADH reoxidation when oxido-reductive metabolism occurs for anabolic purpose (Ansell *et al.*, 1997). The decrease in glycerol production was likely the result of the increase in the oxygen consumption rate observed in the presence of oleic acid. Similar correlation between glycerol formation and oxygen consumption rate were reported in the literature either by modulating the aeration regime (Alfenore *et al.*, 2004), by reducing the glycerol production through the control of the RQ (Bideaux *et al.*, 2006) or by metabolic engineering approaches (Pagliardini *et al.*, 2010 ; Vemuri *et al.*, 2007).

Considering the differences on succinate, glycerol production and on oxygen consumption, we can reasonably make the statement that the presence of oleic acid enhanced the global respiratory capacity in *S. cerevisiae*.

Figure 26 presented the gain on biomass yield and the loss on ethanol yield in glucose-oleate fed-batch compared to glucose fed-batch. In these graphics, the diminution of μ and q_{EtOH} can be linked to the experiment progress and permitted an overview on the evolution of the oleate impact strength on the cell metabolism. Gain

on biomass yield decreased during the major part of growth phase, from an initial factor of 3.2 to a lower of 1.5. Moreover, loss on ethanol yield decreased from a factor of 1.57 at the beginning of the culture to 1.04 at the end of the growth phase, i.e. for q_{EtOH} below $0.18 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. When uncoupled ethanol production occurred, i.e. for specific rate of ethanol production below $0.18 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, this factor was between 1 and only 1.04. This clearly revealed a continuous loss of the strength of the oleic acid impact on the cell metabolism with the culture progress. When the growth phase ended, this impact even almost disappeared. Thus, oleic acid impacted cell metabolism mainly when growth happened during VHEP experiments.

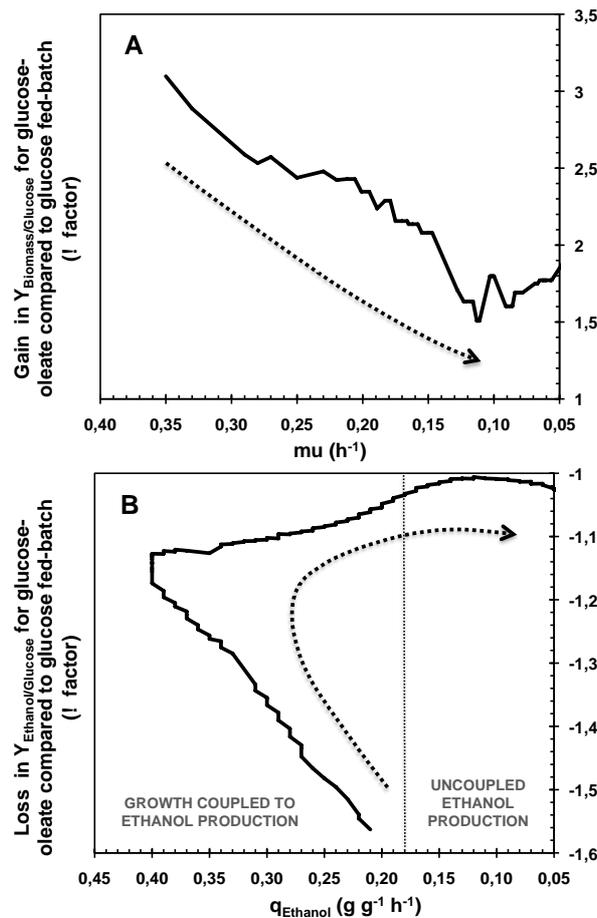


Figure 26 : Evolutions of the gain in biomass yield as a function of the growth rate (A) and the loss in ethanol yield as a function of the specific rate of ethanol production (B) during aerobic fed-batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D.

The gain represents difference on yields obtained with glucose-oleate cultivation against glucose cultivation.

Dotted arrows represent the fermentation progress.

Implication for scale up biomass production process

The understanding and control of biomass production processes present an important interest in an economical point of view. The main microorganism used for these processes is *S. cerevisiae* cause of its utilization in a wide variety of food industries. Van hoek *et al.* (1998) showed that the quality of commercial baker's yeast

(*S. cerevisiae*) was determined by many parameters including storage, stability, osmotolerance, freeze-thaw resistance, rehydration resistance and color.

Under aerobic conditions, the ethanol formation appeared when the residual glucose concentration was higher than 0.1 g L^{-1} for which the specific growth rate exceeded the critical value D_c (Petrik et al., 1983 ; Rieger et al., 1983 ; van Urk et al., 1988 ; Verduyn et al., 1984).

Nevertheless, this particularity is quite undesirable during biomass production since it reduces the biomass yield on the carbon feedstock. For this reason, industrial starter yeast production is performed in aerobic, sugar-limited fed-batch cultures. The optimization of process productivity therefore requires the higher increase as possible of the specific growth rate and/or of the biomass yield. Process optimization has been so far based on strain selection and empirical optimization of the environmental parameters such as pH, temperature, aeration rate and feeding profiles of sugar, nitrogen and phosphorus (Chen & Chiger, 1985 ; Kristiansen, 1994 ; Reed & Nagodawithana, 1991).

Moreover, large tanks used for industrial production lead to scale-up difficulties due to the appearance of heterogeneities, in particular for glucose and oxygen concentrations. Mixing time was estimated between 10 seconds and 250 seconds considering the tank size from 12 to 30 m^3 (Bylund et al., 1998 ; Bylund et al., 1999 ; Enfors et al., 2001 ; Vrabel et al., 1999). Mimicking the cell life in bioreactor was done with complex systems of bioreactors presenting different substrate and oxygen conditions. It revealed onsets of metabolic rearrangements in the order of the second (Bylund et al., 1998 ; Lara et al., 2009). The present study and previous work of Feria-Gervasio *et al.* (2008) showed that addition of oleic acid in the fermentation broth permitted the yeast to present a delay for the metabolic shift onset after a sudden increase of glucose concentration in the range of few minutes.

Thus, an industrial use of oleic acid in such processes could lead to better manage the heterogeneities issues when the Crabtree effect onset is no desirable. Moreover, we demonstrated that the impact of oleate was not strain dependent but reversible. Therefore, starter yeasts prepared with oleate as co-substrate of glucose could be further used in various applications, implementing the Crabtree effect or not.

325. REMERCIEMENTS

This work was partly supported by Sanofi Aventis (French), which provided the strain CA10/pCD63 and partly carried out under the project Futurol. Authors thank OSEO Innovation for its participation in the project Futurol funding, and C.O.N.A.C.Y.T. (Mexico) for financial doctoral support of Mr. Feria-Gervasio.

33. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

331. PARAMETRES DES CULTURES

3311. Evolution des masses cumulées lors de la culture « G » et « GO »

D'après les résultats bruts de cette expérience, les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés bouclent respectivement à 101 % et 101 % sur glucose seul, et à 101 % et 103 % sur glucose plus acide oléique. La culture « G » a duré un total de 59 h pendant lesquelles 1244 g de glucose ont été consommés, pour produire notamment 593 g d'éthanol, 21 g d'acide acétique et 20 g de glycérol. La culture « GO » a quant à elle duré 44 h, pendant lesquelles 1244 g de glucose ont été consommés, pour produire notamment 469 g d'éthanol, 20 g d'acide acétique et 17 g de glycérol (Figure 27).

La phase de croissance de la culture « G », qui a duré 24 h, a permis de produire 53 g de biomasse contre 86 g en 17 h pour la culture « GO ». L'acide succinique a lui été produit au cours des 31 et 28 premières heures, respectivement pour les cultures « G » et « GO ». Dans les deux cas, il a été légèrement reconsommé pour atteindre une masse finale de 2,3 g en l'absence et de 3,1 g en présence d'acide oléique.

La production d'acide pyruvique a suivi un profil similaire en étant produit au cours des 32 et 15 premières heures, respectivement pour les cultures « G » et « GO ». Sa reconsommation a conduit à une masse finale de 2,0 g dans les deux expériences. Enfin, le dosage de l'acide oléique dans la culture « GO » n'a pas permis de mettre en évidence une consommation de ce substrat par les cellules, puisque sa concentration est demeurée stable tout au long de la culture, à $50 \pm 1,2 \text{ g L}^{-1}$.

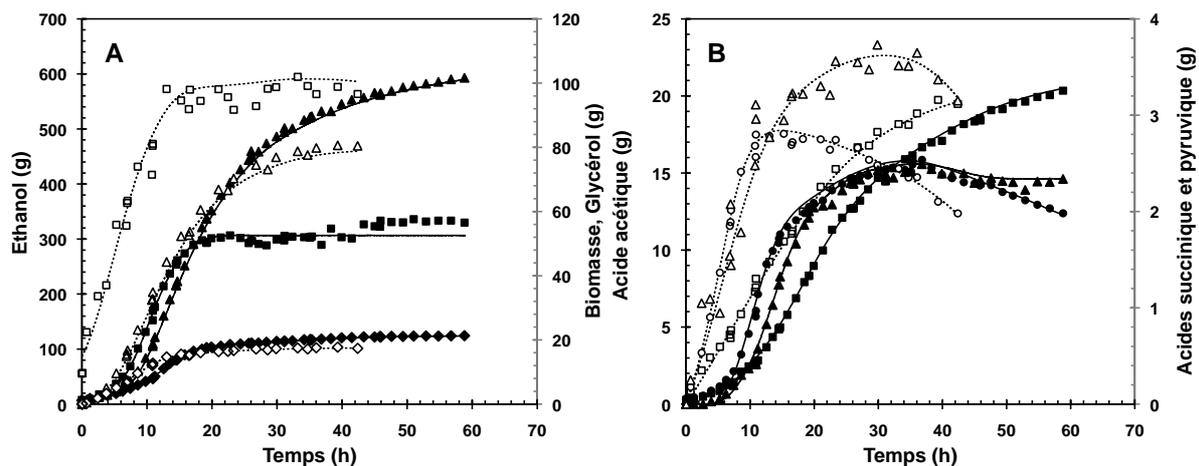


Figure 27 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (symboles pleins) et en excès de glucose plus acide oléique (symboles ouverts). A représente (\square) la biomasse, (\triangle) l'éthanol et (\diamond) le glycérol. B représente (\square) l'acide acétique, (\triangle) l'acide succinique et (\circ) l'acide pyruvique. Les courbes représentent les données réconciliées.

3312. Comparaison des rendements des cultures « G » et « GO »

L'analyse des rendements sur glucose consommé confirme la différence du comportement de *S. cerevisiae* entre les deux expériences observée sur l'évolution des masses cumulées (Tableau 8). Lors de la phase de croissance, le rendement en biomasse est ainsi de 0,234 g g_{Glucose}⁻¹ en présence d'acide oléique, contre seulement 0,174 g g_{Glucose}⁻¹ en l'absence de cette molécule (Tableau 8). L'éthanol et le glycérol présentent quant à eux des rendements de production respectifs de 0,31 et 0,041 g g_{Glucose}⁻¹ avec ajout d'acide oléique, contre 0,402 et 0,021 g g_{Glucose}⁻¹ pour l'expérience témoin. Les acides organiques sont également produits dans des proportions différentes. L'acide acétique est ainsi produit avec un rendement de 10,2 et 12,8 mg g_{Glucose}⁻¹, l'acide succinique

Tableau 8 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose et en excès de glucose plus acide oléique.

		GLUCOSE	GLUCOSE + OLEATE
VITESSES SPECIFIQUES			
μ_{max}	h ⁻¹	0,35 +/- 0,01	0,38 +/- 0,03
q_{éthanol max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	1,31 +/- 0,05	0,43 +/- 0,03
q_{acétate max}	mg g ⁻¹ h ⁻¹	34 +/- 4	47 +/- 2
q_{glucose max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	3,02 +/- 0,07	1,25 +/- 0,05
RENDEMENTS GLUCOSE			
Y_{biomasse / glucose}	g g ⁻¹	0,174 +/- 0,005	0,234 +/- 0,012
Y_{éthanol / glucose global}	g g ⁻¹	0,432 +/- 0,008	0,40 +/- 0,01
Y_{éthanol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,402 +/- 0,008	0,31 +/- 0,01
Y_{glycérol / glucose global}	g g ⁻¹	0,0142 +/- 0,0012	0,015 +/- 0,002
Y_{glycérol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,021 +/- 0,002	0,041 +/- 0,003
Y_{acétate / glucose global}	g g ⁻¹	0,0158 +/- 0,0006	0,0171 +/- 0,0004
Y_{acétate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0102 +/- 0,0006	0,0128 +/- 0,0005
Y_{succinate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,002 +/- 0,001	0,0071 +/- 0,0004
Y_{pyruvate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0031 +/- 0,0007	0,0122 +/- 0,0005
CONCENTRATIONS FINALES			
Biomasse	g L ⁻¹	13,2 +/- 0,3	22,9 +/- 0,5
Ethanol	g L ⁻¹	126,8 +/- 0,6	116,2 +/- 1,1
Glycérol	g L ⁻¹	4,96 +/- 0,02	4,21 +/- 0,05
Acétate	g L ⁻¹	5,28 +/- 0,04	5,1 +/- 0,1
Succinate	g L ⁻¹	0,53 +/- 0,01	0,71 +/- 0,03
Pyruvate	g L ⁻¹	0,36 +/- 0,01	0,37 +/- 0,06
P_{critique}	g L ⁻¹	86 +/- 3	92 +/- 4

de 2 et 7,1 mg $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ et l'acide pyruvique de 3,1 et 12,2 mg $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$, respectivement pour les cultures « G » et « GO » (Tableau 8).

Si l'on considère l'ensemble des cultures, les rendements en éthanol et acide acétique divergent également entre les deux expériences, bien que dans une moindre mesure. Ils atteignent ainsi respectivement 0,432 g $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ et 0,0158 g $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ sur glucose seul, contre 0,40 g $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ et 0,0171 g $\text{g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ sur glucose plus acide oléique (Tableau 8).

3313. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « G » et « GO »

L'analyse des vitesses spécifiques révèle logiquement une diversité de résultats entre les deux cultures. La vitesse spécifique maximale de consommation de glucose est ainsi amoindrie en présence d'acide oléique, à 1,25 g $\text{g}_x \text{h}^{-1}$ contre 3,02 g $\text{g}_x \text{h}^{-1}$ sur glucose seul (Tableau 8).

Le taux de croissance maximal, observé en tout début de croissance et la P_{critique} , concentration en éthanol à partir de laquelle la croissance s'arrête, ne présentent pas de différence significative entre les deux cultures (Tableau 8). Cependant, l'évolution de ce taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol présente un décalage (Figure 28). En présence d'acide oléique, il chute ainsi de la même manière qu'en l'absence de cette molécule, mais pour des concentrations en éthanol plus faible d'environ 10 g L^{-1} . Pour des taux de croissance inférieurs à 0,12 h^{-1} , l'amplitude de ce décalage diminue, jusqu'à devenir nulle pour des valeurs inférieures à 0,05 h^{-1} .

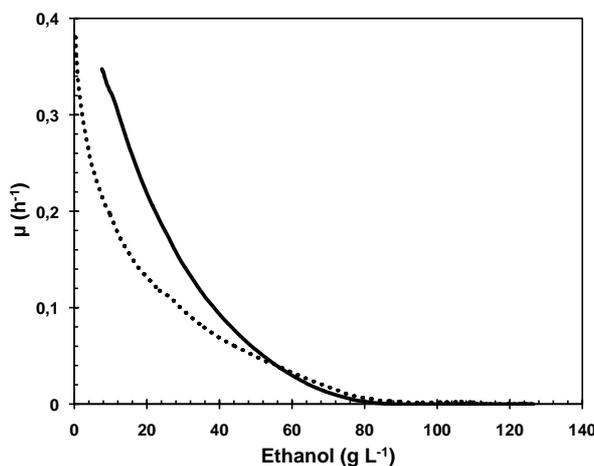


Figure 28 : Evolution du taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose plus acide oléique (···).

La vitesse spécifique maximale de production d'éthanol est quant à elle nettement plus élevée pour la culture « G », à 1,31 g $\text{g}_x \text{h}^{-1}$, que pour la culture « GO », à 0,43 g $\text{g}_x \text{h}^{-1}$ (Tableau 8). L'évolution de cette vitesse spécifique en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique présente également un profil décalé

entre les deux cultures (Figure 29). Pour une concentration en alcool donnée (supérieure à 20 g L^{-1}), cette vitesse est ainsi inférieure d'environ 50 % en présence d'acide oléique. Il en est de même pour des concentrations en acide acétique supérieures à $1,3 \text{ g L}^{-1}$, où q_{Ethanol} est inférieur d'environ 30 % en présence d'acide oléique.

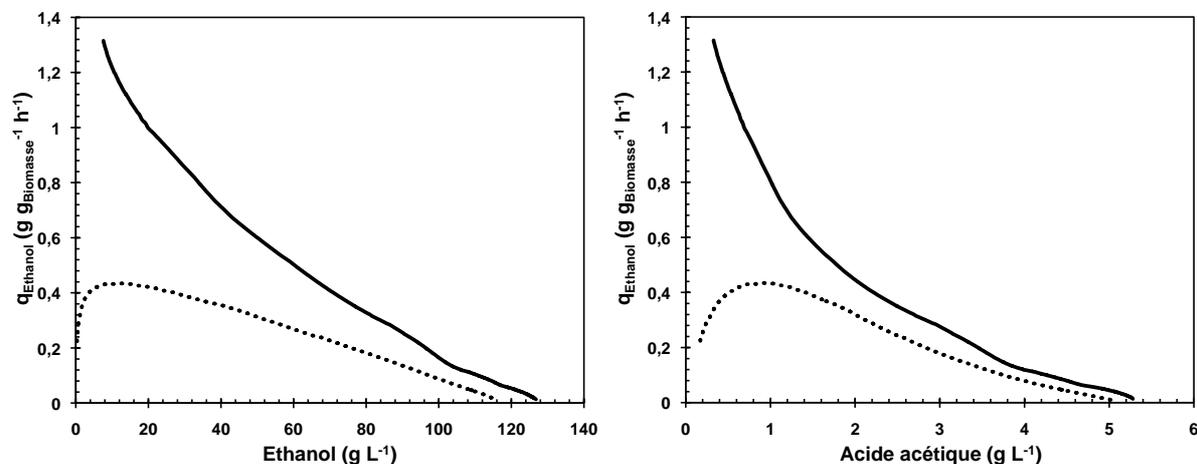


Figure 29 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose plus acide oléique (···).

3314. Evolution des rendements lors des cultures « G » et « GO »

L'analyse de l'évolution des rendements en certains métabolites en fonction du taux de croissance permet de révéler des indices sur les changements métaboliques s'opérant en présence d'acide oléique.

La synthèse d'une mole d'éthanol est couplée à celle d'une mole de dioxyde de carbone. Sur glucose seul, le rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produits est relativement constant, à $1,08 \text{ mol mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$ (Figure 30). En revanche, l'ajout d'acide oléique augmente cette valeur, qui va diminuer avec le taux de croissance. Ce rendement chute alors d' $1,66 \text{ mol mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$ au taux de croissance maximal, à $1,14 \text{ mol mol}_{\text{Ethanol}}^{-1}$ à un taux de croissance nul.

Le rendement en dioxygène consommé sur glucose consommé est lui aussi plus élevé sur glucose plus acide oléique (Figure 30). Sa valeur chute ainsi de $73 \text{ mmol C mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour μ_{max} , à $34 \text{ mmol C mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$, avant de réaugmenter jusqu'à $41 \text{ mmol C mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à un taux de croissance nul. Sur glucose seul, ce rendement est seulement de $17 \text{ mmol C mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à μ_{max} . Il augmente ensuite avec la diminution du taux de croissance, pour atteindre $27 \text{ mmol C mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à un taux de croissance nul.

L'évolution des rendements en coproduits sur glucose consommé semble également impactée par la présence d'acide oléique (Figure 31). Lors de l'expérience « G », le rendement en glycérol est relativement stable pour un taux de croissance supérieur à $0,1 \text{ h}^{-1}$, à une valeur comprise entre 21 et $24 \text{ mC mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$. Il

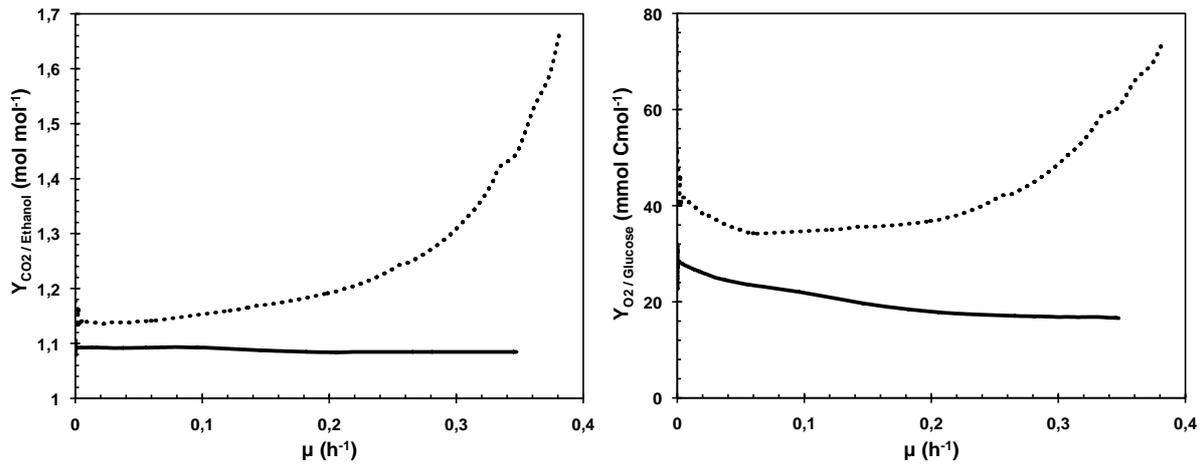


Figure 30 : Evolution du rendement en CO_2 sur éthanol produits et du rendement en O_2 sur glucose consommés en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose plus acide oléique (···).

diminue ensuite pour des taux de croissance inférieurs, jusqu'à $6 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à l'arrêt de la production de biomasse. On peut observer un profil similaire lors de l'expérience « GO » pour ces taux de croissance inférieurs à $0,1 \text{ h}^{-1}$. Le rendement en glycérol est cependant plus élevé à des taux de croissance supérieurs, puisqu'il diminue de manière linéaire de $40 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à μ_{max} , à $22 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Pour un taux de croissance supérieur à $0,08 \text{ h}^{-1}$, le rendement en acide acétique produit est aussi relativement stable sur glucose seul, entre 8 et $12 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ (Figure 31). Par contre en présence d'acide oléique, il chute de $43 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à μ_{max} , à $11 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour $\mu = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Pour des taux de croissance inférieurs, les deux profils sont similaires. La valeur de ce rendement en acide acétique à l'arrêt de la production de biomasse est de $19 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ dans les deux expériences.

Lors de la culture « G », l'acide succinique semble être produit à un rendement relativement stable quelque soit le taux de croissance, à une valeur comprise entre $2,2$ et $3,3 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ (Figure 31). Lors de la culture « GO », il chute en revanche de $13,0$ à $3,3 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ entre μ_{max} et $\mu = 0,08 \text{ h}^{-1}$. Pour des taux de croissance inférieurs, l'évolution du rendement est similaire pour les deux conditions.

Au cours de la croissance dans l'expérience témoin, le rendement en acide pyruvique semble diminuer de manière linéaire de $5,1 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$, à $1,1 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour un taux de croissance nul (Figure 31). Une diminution linéaire de ce rendement est également observable en présence d'acide oléique, de $14,8 \text{ mCmol Cmol}_{\text{Glucose}}^{-1}$ à μ_{max} , à une valeur nulle pour $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$. Dans ces conditions, l'acide pyruvique est donc reconstitué avant la fin de la phase de croissance.

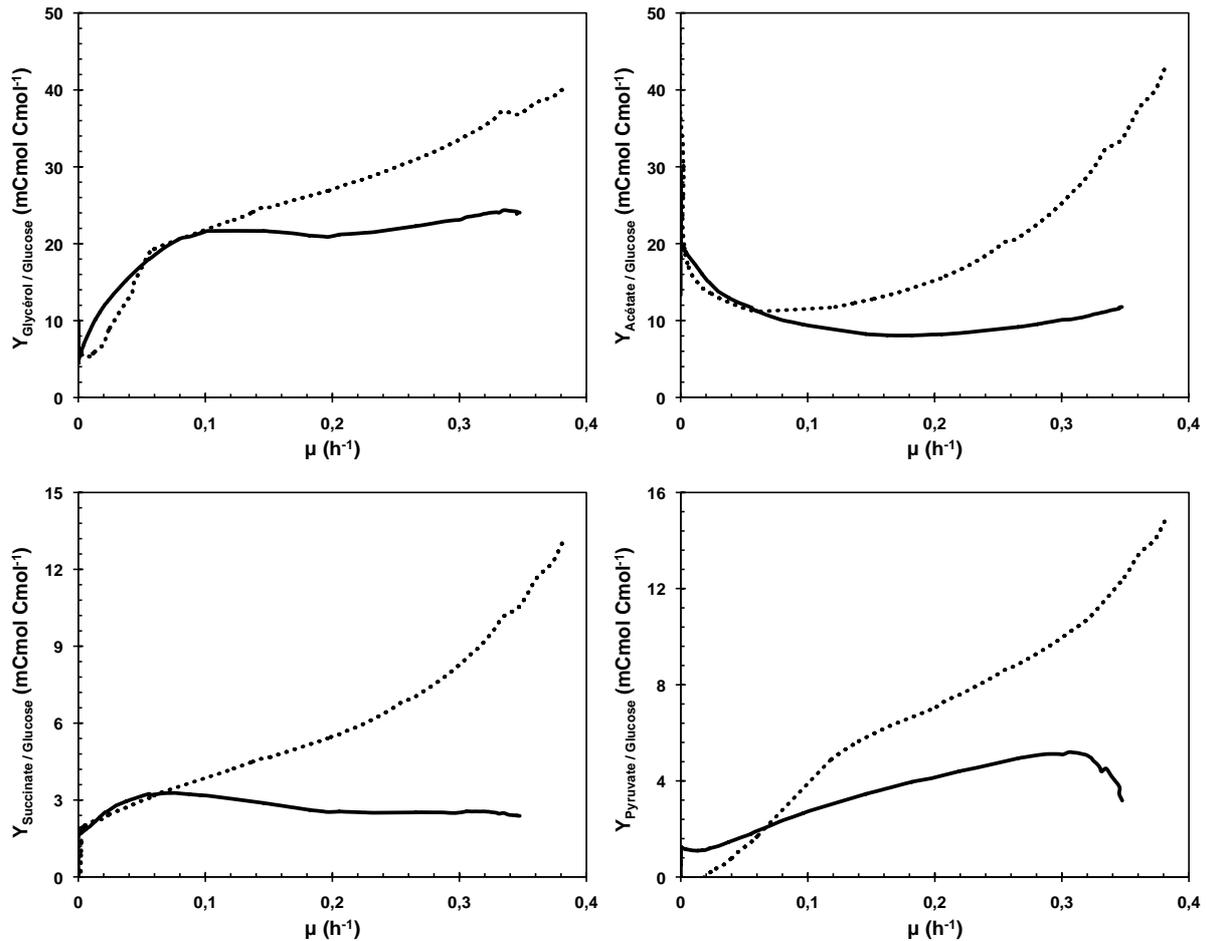


Figure 31 : Evolution des rendements en glycérol, acide acétique, acide succinique et acide pyruvique produits sur glucose consommé en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose plus acide oléique (···).

332. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES

Les flux intracellulaires ont été estimés pour les deux expériences au taux de croissance maximal. Les données ont été obtenues à l'aide du modèle métabolique, puis normées vis-à-vis de la consommation de glucose ($F_{A(\text{normé})} = F_A / F_{\text{Glucose}}$) afin d'être comparées (Figure 32).

3321. Répartition intracellulaire du glucose entrant

En présence d'acide oléique, la part de glucose-6-P envoyée vers la glycolyse est diminuée de 28 % (886 contre 638 mmol mol_{Glucose}⁻¹). Ceci s'explique par une fraction beaucoup plus importante dirigée vers le cycle des pentose-phosphates (85,5 contre 272 mmol mol_{Glucose}⁻¹). Plus bas dans la chaîne glycolytique, la quantité de glycéraldéhyde-3-P transformée en glycérol-3-P est également plus importante de 17 % (53,0 contre 61,8 mmol mol_{Glucose}⁻¹). Lors de la culture « GO », *S. cerevisiae* va ensuite transporter près de trois fois plus de

pyruvate vers la matrice mitochondriale *via* la pyruvate déshydrogénase et la pyruvate carboxylase (76,5 contre 230 mmol mol_{Glucose}⁻¹).

Dans les deux expériences, le cycle des acides tricarboxyliques tourne en sens inverse de l'α-cétoglutarate à l'oxaloacétate. Cet ensemble de réactions recouvre la branche réductrice du cycle (oxaloacétate à succinate), qui est réputée tourner dans le sens réducteur en anaérobiose (Camarasa *et al.*, 2003).

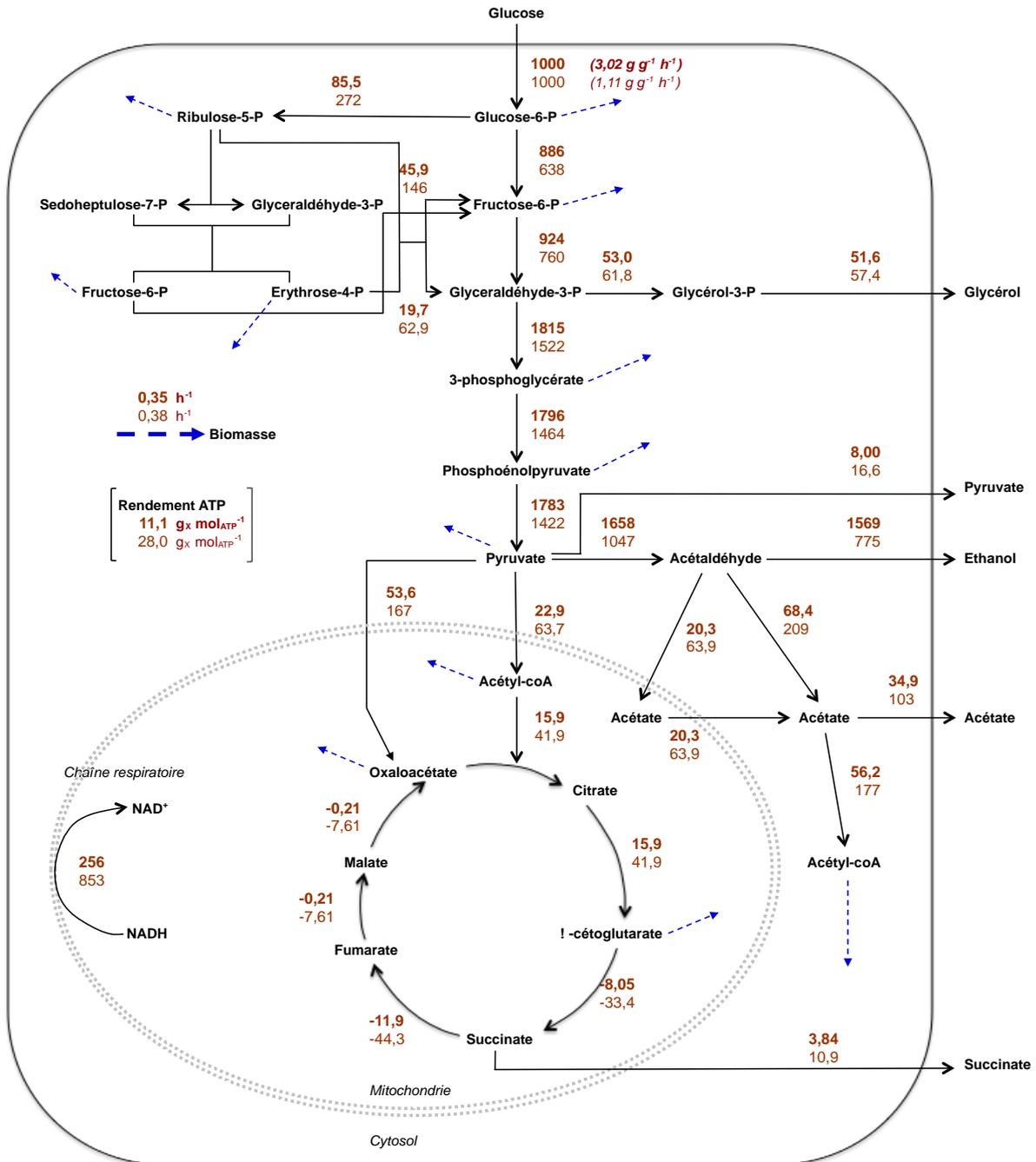


Figure 32 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (nombres gras) et en excès de glucose plus acide oléique (nombres normaux). Les valeurs présentées ont été obtenues à μ_{max} puis normées vis-à-vis de la consommation de glucose ($F_{A(normé)} = F_A / F_{Glucose}$). Elles sont donc exprimées en mmol mol_{Glucose}⁻¹.

Certains auteurs avancent que le cycle des acides tricarboxyliques fonctionnerait également de manière branchée lors de cultures en excès de glucose en mode discontinu ou discontinu alimenté (Blank et Sauer, 2004). Il faut cependant prendre en compte le fait que les flux de ce cycle sont marginaux par rapport au flux de glucose entrant. Des erreurs de mesure minimales des métabolites extracellulaires pourraient donc également expliquer cette observation, et ainsi infirmer la théorie de Blank et Sauer (2004). Dans tous les cas, la réaction de synthèse d' α -cétoglutarate à partir de succinyl-coA est thermodynamiquement impossible. Toujours au niveau de la mitochondrie, la consommation d'oxygène est fortement accrue, permettant la réoxydation de près de 3,3 fois plus de NADH (256 contre 863 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$).

Enfin, on retrouve logiquement une diminution de la synthèse d'éthanol, de moitié, en présence d'acide oléique dans le milieu de culture (1569 contre 775 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). La proportion de glucose dirigée vers les autres coproduits du métabolisme fermentaire est quant à elle plus élevée : acétate, + 195 % (34,9 contre 103 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) ; succinate, + 183 % (3,84 contre 272 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) ; pyruvate, + 107 % (8,00 contre 16,6 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$).

3322. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire

En présence d'acide oléique dans le milieu de culture, les besoins énergétiques de *S. cerevisiae* pour produire de la biomasse sembleraient nettement diminués à μ_{max} , de 60 % (28,0 contre 11,1 $\text{g}_X \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$) (Figure 32).

L'oxydation du NADPH est due uniquement à l'anabolisme. La régénération du NADPH cytosolique se réalise quant à elle par la synthèse d'acide acétique et par le cycle des pentose-phosphates. Cette régénération ne semble pas modulée par la présence d'acide oléique, puisque la formation NADPH cytosolique est assurée par le cycle des pentose-phosphates à hauteur 71 % sur glucose seul, et à 72 % sur glucose plus acide oléique (Figure 33).

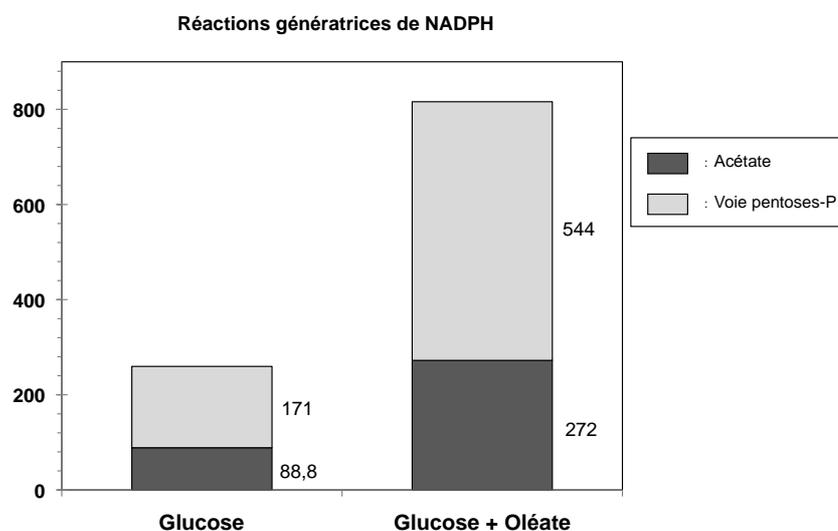


Figure 33 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures sur glucose seul et sur glucose plus acide oléique. Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol^{-1}).

En revanche, il apparaît que l'origine du NADH et du NAD⁺ varient entre les deux cultures (Figure 34). D'un point de vue global, les cellules sur glucose plus acide oléique réoxydent 16 % de NAD⁺ en plus que sur glucose seul.

Sur ce dernier substrat, la cellule produit du NADH à 98 % *via* la glycolyse (2037 mmol mol⁻¹). Cette valeur n'est que de 94 % en présence d'acide oléique (2301 mmol mol⁻¹). Dans ces conditions, une part plus importante du NADH total est transférée vers la mitochondrie *via* de la navette mitochondriale (32 % contre 11 %).

Ce NADH est ensuite réoxydé par la production d'éthanol à hauteur de 88 % pour la culture « G » (1791 mmol mol⁻¹), contre seulement 65 % pour la culture « GO » (1553 mmol mol⁻¹). Lors de cette dernière, la chaîne respiratoire représente alors 35 % du NAD⁺ régénéré (853 mmol mol⁻¹) contre seulement 12 % sur glucose seul (256 mmol mol⁻¹).

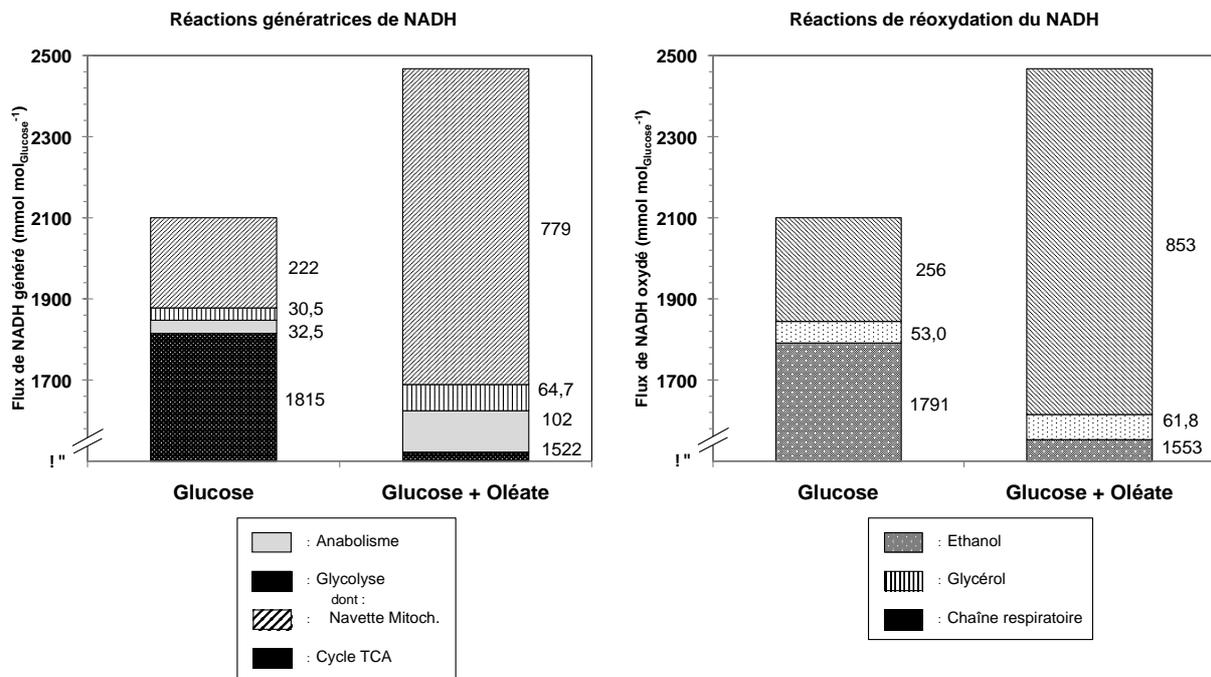


Figure 34 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures sur glucose seul et sur glucose plus acide oléique. Pointillé : réactions cytosoliques ; Hachuré : réactions mitochondriales. Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol⁻¹).

34. DISCUSSIONS

341. DIMINUTION DES CAPACITES FERMENTAIRES

Les cellules cultivées avec ou sans acide oléique dans le milieu de culture ont montré des comportements bien distincts. Bien que les cellules cultivées sur glucose seul aient été capables de consommer ce substrat jusqu'à une vitesse maximale de $3,02 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, cette valeur a chuté de 58 % en présence d'acide oléique. Cette diminution pourrait avoir plusieurs causes possibles. A des concentrations élevées en glucose, la consommation de ce substrat est assurée par le transporteur plasma-membranaire à faible affinité, tandis que l'activité du transporteur à haute affinité est résiduelle (Bisson & Fraenkel, 1984). Le transporteur à faible affinité pourrait ainsi être inhibé par l'acide oléique.

Mais il serait plus probable que cette molécule réprime indirectement l'expression des gènes codant pour ce transporteur, par l'intermédiaire d'une cascade de régulation indéfinie. Il est notamment connu que l'acide oléique peut jouer sur l'expression de nombreux gènes *via* l'O.R.E. (Oleic Response Element), séquence présente au niveau de promoteurs. Lors de cultures continues sur glucose avec ou sans acide oléique, une analyse transcriptomique comparative a permis de mettre en évidence une modification de l'expression de 280 gènes en présence de cette molécule (Feria-Gervasio, 2008). Parmi ceux-ci, 103 gènes avaient une fonction inconnue, et seul un gène codant pour un transporteur des hexose était réprimé (YBR241C, potentiel transporteur de la famille des transporteurs d'oses). Toutefois, l'analyse transcriptomique ne permet pas de donner une image complète des mécanismes de régulation métabolique, qui peuvent exister à d'autres niveaux. Par exemple, l'augmentation des activités spécifiques de la Catp, de la Citp et de l'isopropylmalate synthase observée en présence d'acide oléique ne s'accompagnait par d'une surexpression des gènes correspondant (Feria-Gervasio, 2008). La diminution du flux de glucose-6-P entrant dans la voie de la glycolyse pourrait ainsi être une résultante de cet effet de l'acide oléique.

Il serait également possible que l'acide oléique, présent à hauteur de 50 g L^{-1} dans le milieu de culture, agisse comme une barrière au niveau de la membrane plasma-membranaire. Une agrégation de cet acide à cet endroit pourrait ainsi provoquer un encombrement stérique au niveau des transporteurs du glucose, limitant de fait la capacité des cellules à le transporter du milieu extracellulaire vers le cytosol.

Cette diminution de la vitesse de consommation de glucose se retranscrit de manière logique au niveau de la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol. Celle-ci a ainsi été diminuée de 67 % en présence d'acide oléique, atteignant $0,43 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$. Les cellules sur glucose plus acide oléique n'ont ensuite pas été capables de recouvrer des vitesses de production d'éthanol similaires aux cellules sur glucose seul (Figure 29). De plus, cet acide a impacté négativement le rendement global et le titre final en éthanol, qui ont diminué respectivement de 7 et 8 %, à $0,40 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ et $116,2 \text{ g L}^{-1}$. Le rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produits a aussi augmenté pour la culture « GO », confirmant la redirection du carbone de la production d'éthanol vers d'autres

voies métaboliques productrices de CO₂. Les cellules cultivées sur glucose plus acide oléique présentent donc des capacités de production d'éthanol fortement amoindries.

A l'inverse, le rendement en biomasse produite pendant la phase de croissance de l'expérience « GO » a été nettement amélioré, à 0,0234 g g_{Glucose}⁻¹ (+ 35 %). En raison d'une vitesse de consommation de glucose plus faible, cette augmentation ne se retrouve cependant pas au niveau du taux de croissance, dont l'écart entre les deux conditions n'est pas significatif. Cette observation est en contradiction avec la diminution du taux de croissance observée pour des cellules préparées puis cultivées sur glucose plus acide oléique en mode discontinu, pas rapport à des cellules préparées et cultivées uniquement sur glucose (Feria-Gervasio, 2008). Elle est également à mettre en perspective avec l'amélioration de 12 % du taux de croissance maximal observée en mode discontinu, grâce à la délétion des gènes *MIG1* et *MIG2*, impliqués dans l'apparition de l'effet Crabtree (Klein et al., 1999).

Les cellules présentaient en outre une croissance plus sensible à l'éthanol. La chute du taux de croissance présente ainsi un profil similaire en fonction de la concentration en éthanol, mais pour des concentrations inférieures de 10 g L⁻¹ (Figure 28). L'évolution du profil de viabilité cellulaire en fonction de la concentration en éthanol n'a toutefois pas révélé de différence (résultats non montrés).

En conséquence, la présence d'acide oléique dans le milieu de culture, en tant que cosubstrat du glucose, altère fortement les capacités fermentaire de *S. cerevisiae*, même sans être métabolisé par les cellules.

342. REDISTRIBUTION DU CARBONE

L'acide oléique a perturbé l'organisation du métabolisme cellulaire en profondeur. L'estimation des flux intracellulaires en mmol mol_{Glucose}⁻¹ a permis d'affiner la compréhension de la redistribution du carbone déjà observée à un niveau macroscopique. En premier lieu, le flux de glucose-6-P dirigé vers la glycolyse a été réduit (- 28 %) au profit du cycle des pentose-phosphates (+ 218 %) (Figure 32). Ce dernier va permettre à la cellule de produire plus de NADPH et de précurseurs métaboliques comme le fructose-6-P, le ribulose-5-P et l'erythrose-4-P. La glycolyse produit également des précurseurs métaboliques, comme le glucose-6-P, le fructose-6-P, le 3-phosphoglycérate, le phosphoénolpyruvate et le pyruvate. La ponction de ces intermédiaires de la glycolyse par l'anabolisme est environ trois fois plus importante en présence d'acide oléique.

Le flux de pyruvate entrant dans la mitochondrie par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase et de la pyruvate carboxylase a également été fortement augmentée lors de la culture « GO » (+ 188 %). Cette molécule a alors été métabolisée par le cycle des acides tricarboxyliques, menant à la synthèse de précurseurs essentiels à la synthèse des acides aminés : l'oxaloacétate, l' α -cétoglutarate et l'acétyl-coA mitochondrial. La réoxydation du NADH généré par l'activité de ce cycle a ensuite été assurée par l'accroissement de l'activité de la chaîne respiratoire (+ 237 %) (Figure 32 ; Figure 34).

Le flux envoyé vers le by-pass de la pyruvate déshydrogénase, troisième voie potentielle de métabolisation du pyruvate, a quant à lui été diminué de 37 %. Ceci s'explique par le fait que la synthèse d'éthanol a chuté de 50 %. Ces diminutions sont de proportion différente car la seconde sortie potentielle de ce by-pass, *via* la production d'acétyl-coA, présente un flux un peu plus de 3 fois plus élevé en présence d'acide oléique (Figure 32). La synthèse plus élevée d'acide acétique a ainsi permis de produire plus d'acétyl-coA cytosolique et de NADPH mitochondrial et cytosolique.

Enfin, le flux vers la synthèse du glycérol-3-P a été augmenté de 17 % lors de la culture « GO » (Figure 32). Cette augmentation a permis aux cellules de fournir trois fois plus de cette molécule à leur anabolisme. La réoxydation du NADH cytosolique, associée à cette réaction, a ainsi été accrue de 17 %.

De manière générale, l'activité des voies menant à la synthèse des éléments indispensables à la croissance cellulaire a donc été augmentée au détriment de la synthèse d'éthanol. Ceci permet aux cellules de produire les précurseurs métaboliques et les cofacteurs (NADPH et NAD⁺) nécessaires à la production des macro-molécules (protéines, acides gras, ADN, *etc.*). Il faut cependant noter que cette redistribution du carbone au niveau intracellulaire, décrite à μ_{\max} , tend à s'amenuiser avec la chute du taux de croissance, et donc avec l'avancement de la réaction (Figure 26).

343. ACCROISSEMENT DE LA CAPACITE RESPIRATOIRE

La théorie généralement admise par la communauté scientifique afin d'expliquer l'effet Crabtree est le modèle boîte noire de la capacité respiratoire limite (Käppeli & Sonnleitner, 1986). D'après cette théorie, la capacité du réseau de réactions cytosoliques et mitochondriales permettant la métabolisation du pyruvate est ainsi inhibée d'une façon inconnue. Il semble que la levée de cette inhibition nécessite de moduler des cascades de régulation à un niveau plus global (Blom et al., 2000 ; Klein et al., 1999 ; van Maris et al., 2001). Une amélioration de cette capacité respiratoire se traduit ainsi par une production d'éthanol amoindrie au profit de celle de biomasse, et par une augmentation des vitesses réactionnelles spécifiques de ce réseau métabolique.

En l'absence de consommation d'acide oléique, l'acide succinique, produit presque exclusivement lors de la croissance cellulaire, proviendrait de l'activité du cycle des acides tricarboxyliques (Camarasa et al., 2003). En aérobiose, il serait ainsi excrété en conséquence à un flux de carbone entrant dans le cycle trop important, ou au fonctionnement de ce cycle de manière branchée (Blank et al., 2005). Sa production est donc caractéristique de l'activité du cycle des acides tricarboxyliques. Or en présence d'acide oléique, la production de l'acide succinique a été augmentée d'un point de vue de sa concentration finale (+ 34 %), de son rendement pendant la phase de croissance (+ 255 %) et de sa vitesse spécifique maximale de production (+ 114 %) (Tableau 8 ; Figure 31).

Cette observation est renforcée par l'évolution du rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produits. $Y_{CO_2/Ethanol}$ était ainsi nettement plus élevé lors de la culture « GO », indiquant que des voies métaboliques productrices de dioxyde de carbone, autres que la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol, sont utilisées dans des proportions importantes (Figure 30). Or, le cycle des acides tricarboxyliques, qui permet à la cellule d'oxyder complètement l'acétyl-coA en CO_2 en régénérant le NADH mitochondrial, est une source importante de dioxyde de carbone.

En outre, le rendement en oxygène sur glucose consommé était également plus élevé en présence d'acide oléique (Figure 30). Dans ces conditions, la métabolisation d'une même quantité de glucose a donc nécessité une plus grande quantité de dioxygène. Cette molécule n'étant utilisée par *S. cerevisiae* qu'en tant qu'accepteur final d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire, un $Y_{O_2/Glucose}$ plus élevé signifie donc que les cellules ont dirigé une plus grande fraction de glucose vers leur métabolisme oxydatif. Cette augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire a donc permis aux cellules de réoxyder le NADH produit par le cycle des acides tricarboxyliques. Elle a également permis de prendre le relais de la synthèse d'éthanol, fortement amoindrie (Figure 34).

Cette augmentation de la respiration des cellules pourrait avoir plusieurs origines. L'hypothèse la plus probable serait que *S. cerevisiae* est capable d'adapter l'activité de sa chaîne respiratoire en présence d'acide oléique, de manière contrôlée ou non. Il est en effet connu que la chaîne respiratoire n'est pas la cause directe de l'apparition de l'effet Crabtree, puisque des mesures par respirométrie ont montré que la vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène était supérieure à celle observée sous l'influence de l'effet Crabtree (Mouret, 2006). Cette augmentation de la respiration des cellules serait alors une conséquence directe de l'augmentation de l'activité du cycle des acides tricarboxylique, potentiellement couplée à l'action de l'acide oléique sur l'expression des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire.

En outre, la concentration élevée en acide oléique (177 mM) a fortement augmenté l'acidité du milieu de culture. Des études rapportent un effet découplant des acides gras, dont l'acide oléique, sur la phosphorylation oxydative dans des cellules de foie de rat (Borst et al., 1962 ; Schönfeld et al., 1989 ; Wojtczak & Schönfeld, 1993). Chez *S. cerevisiae*, Viegas et al. (1989 ; 1998) ont également mis en évidence une activation de l'ATPase plasma-membranaire ainsi qu'une diminution du rendement en biomasse et du taux de croissance par l'acide octanoïque. De plus, Pampulha et Loureiro-Dias (Pampulha & Loureiro-Dias, 2000) ont rapporté un effet découplant et une baisse du rendement en biomasse pour une concentration en acide acétique, et donc une acidité du milieu de culture, proche (170 mM). Dans les expériences présentées ici, les cellules pourraient ainsi respirer plus pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de l'ATPase. Il apparaît toutefois que le rendement en biomasse a été, à l'inverse, augmenté en présence d'acide oléique (Tableau 8). Le rendement ATP semble quant à lui avoir été fortement augmenté par cette molécule (Figure 32), rendant peu probable cette hypothèse.

Enfin l'acide oléique, sous forme d'émulsion dans l'eau, permet d'améliorer le transfert d'oxygène vers le milieu de culture (Yoshida et al., 1970). L'augmentation du kLa pourrait ainsi favoriser la consommation

d'oxygène par les cellules. Toutefois, cette hypothèse est écartée par le fait que la pression partielle en oxygène dissous est maintenue à une valeur supérieure à 20 % tout au long des cultures. Dans ces conditions, le transfert d'oxygène n'influe pas sur les capacités des cellules à respirer, puisque cette molécule est constamment disponible en quantité supérieure aux besoins.

La réoxydation du NADH cytosolique peut également être assurée par la production de glycérol. Lors de la phase de croissance, ce métabolite a été produit à un rendement plus important (+ 95 %) en présence d'acide oléique (Tableau 8 ; Figure 31). Les cellules pourraient donc avoir eu besoin d'améliorer la réoxydation du pool de NADH cytosolique. L'augmentation de la respiration serait ainsi insuffisante pour permettre de contrebalancer la diminution de la synthèse d'éthanol. La synthèse de glycérol permettrait alors de combler l'action de la chaîne respiratoire. Il faut cependant prendre en compte le second rôle biologique du glycérol (Ansell et al., 1997). A une concentration en acide oléique de 50 g L⁻¹, il serait en effet possible que *S. cerevisiae* produise plus de glycérol afin de lutter contre un stress osmotique.

De plus en présence d'acide oléique, la production d'acide acétique a été augmentée d'un point de vue de son rendement pendant la phase de croissance (+ 25 %) et de sa vitesse spécifique maximale de production (+ 38 %) (Tableau 8). Cet acide est un intermédiaire de la synthèse cytosolique de l'acétyl-coA et sa formation permet de régénérer les pools cytosolique et mitochondrial de NADPH, nécessaires à la croissance microbienne (Saint-Prix et al., 2004). Il semble donc que les cellules aient accru le flux de carbone dirigé vers la formation d'acide acétique afin d'assurer les besoins en NADPH nécessaires à production de biomasse (Figure 32 ; Figure 31). En parallèle, le flux vers le cycle des pentose-phosphates a également été augmenté pour fournir plus de NADPH cytosolique et de précurseurs métaboliques. La contribution de ces deux sources de NADPH cytosolique demeure cependant équivalente dans les deux cas, avec un ratio PPP / acétate cytosolique de 71 / 29 sur glucose seul, et de 72 / 28 en présence d'acide oléique (Figure 33).

Si l'on fait l'hypothèse raisonnable que l'acide pyruvique est excrété en conséquence d'un déséquilibre entre le flux glycolytique et l'activité du cycle des acides tricarboxyliques, une augmentation de la capacité respiratoire devrait en toute logique diminuer la production d'acide pyruvique. Cependant, ce dernier a également été produit à un rendement plus élevé (+ 293 %) lors de la phase de croissance en présence d'acide oléique (Tableau 8 ; Figure 31). Cette évolution semble donc en contradiction avec les observations précédentes. Il est néanmoins possible que l'excrétion de cet acide ne soit pas, ou seulement partiellement, due à un flux glycolytique trop important mais à une autre cause indéfinie.

Sur glucose seul, la reconsommation de l'acide pyruvique a débuté plusieurs heures après l'arrêt de la croissance, lorsque les cinétiques microbiennes étaient relativement lentes. A l'inverse sur glucose plus acide oléique, ce phénomène a débuté deux heures avant la fin de la phase de croissance, alors que les cinétiques microbiennes étaient encore élevées. Il se pourrait ainsi que les cellules de l'expérience « GO » soient capables de reconsommer l'acide pyruvique plus tôt grâce à une capacité de métabolisation de cette molécule plus élevée, *via* les voies cytosolique et / ou mitochondriales.

Enfin en présence d'acide oléique, la production d'éthanol a été diminuée au profit de celle de biomasse (Tableau 8). Ceci démontre que l'effet Crabtree a été partiellement levé grâce à l'ajout d'acide oléique au milieu de culture. D'après les modulations du comportement de *S. cerevisiae* observées vis-à-vis des différents métabolites et substrats, il semblerait donc que la levée partielle de l'effet Crabtree ait été achevée grâce à l'augmentation de la capacité respiratoire. Sous l'influence de cet effet, la synthèse de l'ensemble des coproduits de fermentation répondrait donc à une logique différente que celle de la synthèse d'éthanol, et semblerait fortement dépendante du métabolisme anabolique.

Chapitre 4

Etude du système CAT

CHAPITRE 4 ETUDE DU SYSTEME CAT	135
41. INTRODUCTION	139
42. RESULTATS	141
421. PARAMETRES DE LA CULTURE GLUCOSE / CARNITINE	141
4211. Evolution des masses cumulées lors de la culture « GC »	141
4212. Comparaison des rendements des cultures « G » et « GC »	142
4213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « G » et « GC »	143
4214. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « G » et « GC »	144
4215. Profil de viabilité lors des cultures « G » et « GC »	146
422. PARAMETRES DE LA CULTURE GLUCOSE – ACIDE OLEIQUE / CARNITINE	147
4221. Evolution des masses cumulées lors de la culture « GOC »	147
4222. Comparaison des rendements des cultures « GO » et « GOC »	148
4223. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « GO » et « GOC »	149
4224. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « GO » et « GOC »	151
4225. Profil de viabilité lors des cultures « GO » et « GOC »	152
43. DISCUSSIONS	153
431. IMPACT DE LA CARNITINE SUR LE METABOLISME	153
4311. Ajout de carnitine et performances fermentaires	153
4312. Ajout de carnitine et modulation du métabolisme	154
432. IMPACT DES METABOLITES SUR L'ACTIVITE DU SYSTEME CAT	155
4321. Transport de la carnitine à travers la membrane cytoplasmique	155
4322. Fonctionnalité de la carnitine-acétyl transférase	156
432. CONCLUSIONS ET RECAPITULATIF	157

41. INTRODUCTION

S. cerevisiae possède plusieurs voies de transport de l'acétyl-coA à travers la membrane mitochondriale, parmi lesquels le système de la carnitine-acétyl transférase (CAT). Pour être fonctionnel, ce système nécessite cependant une molécule particulière que *S. cerevisiae* est incapable de synthétiser : la carnitine (van Roermund et al., 1999). L'ajout de cette molécule dans le milieu de culture, lorsqu'elle est incorporée dans la cellule via la protéine plasma-membranaire Agp2p, permet ainsi de rendre le système fonctionnel. Toutefois, il a été montré que l'expression des gènes codant pour le système CAT (carnitine-acétyl transférases : *YAT1*, *YAT2*, *CAT2* ; translocase : *CRC1*) et le transporteur plasma-membranaire de la carnitine (*AGP2*) est dépendante de plusieurs métabolites caractéristiques de l'effet Crabtree, comme substrat ou produits. Le glucose réprime les gènes *YAT1*, *CRC1*, *CAT2* et *AGP2*. A l'inverse, plusieurs produits de fermentation induisent ou dérèglent ces gènes. C'est le cas de l'éthanol (*YAT1*, *YAT2*), du glycérol (*YAT1*, *CAT2*, *CRC1*, *AGP2*) et de l'acide acétique (*YAT1*, *CAT2*). Enfin, l'acide oléique induit les gènes *CAT2*, *CRC1* et *AGP2* par le biais de l'« oleate response element » (van den Berg et al., 1998 ; Elgersma et al., 1995 ; van Roermund et al., 1999 ; Schmalix & Bandlow, 1993 ; Swiegers et al., 2001).

En outre, la littérature prête à la carnitine un rôle de protection contre différents stress, notamment oxydatif (Franken et al., 2008 ; Franken & Bauer, 2010 ; Palermo et al., 2010). Cette molécule participerait également à la lutte contre l'apoptose et permettrait d'améliorer la viabilité des cellules (Palermo et al., 2010 ; Yano et al., 2008).

Mouret (2006) a étudié ce système de transport lors de deux cultures continues en limitation de glucose. La carnitine a bien été incorporée par les cellules dans ces conditions. Cependant, aucune différence n'a été mise en évidence entre ces cultures en régime permanent. Après un pulse de glucose de 10 g L⁻¹, les profils de production des métabolites extracellulaires étaient également similaires. Deux autres cultures continues en limitation de glucose supplémentées en carnitine ou non ont été menées, avec la présence d'acide oléique comme co-substrat. Bien que l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase ait été augmentée par la présence de l'acide oléique, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux cultures. Le mode de culture choisi restreint cependant le champ de l'étude du système CAT au métabolisme oxydatif pur et à l'effet Crabtree « court terme ».

Le système CAT a ici été étudié sous l'effet Crabtree « long terme », en choisissant un mode de culture discontinu alimenté en excès de glucose. Dans ces conditions, l'activation du transport de l'acétyl-coA à travers ce système pourrait permettre de diminuer la concentration en acétyl-coA cytosolique. L'objectif serait donc de redistribuer les flux de carbone au niveau du by-pass de la pyruvate déshydrogénase, en tirant le flux d'acide acétique vers la synthèse d'acétyl-coA plutôt que vers son excrétion. Cette stratégie pourrait alors permettre de limiter la production d'acide acétique au profit du métabolisme oxydatif, et ainsi moduler le comportement de la cellule face aux stress acétate et éthanol.

Deux cultures aérobies supplémentées en carnitine ont ainsi été menées avec la souche CEN.PK 113-7D. La première a été réalisée sur glucose comme seule source de carbone avec des cellules pré-cultivées sur glucose seul. La seconde a été réalisée sur glucose plus acide oléique. Afin de maximiser l'impact de l'acide oléique, les cellules de cette seconde culture ont été pré-cultivées sur tréhalose plus acide oléique afin de mimer une culture oxydative en culture continue (Mouret et al., 2006).

42. RESULTATS

421. PARAMETRES DE LA CULTURE GLUCOSE / CARNITINE

4211. Evolution des masses cumulées lors de la culture « GC »

D'après les résultats bruts de cette expérience, les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés bouclent respectivement à 107 % et 102 %. La culture a duré un total de 58 h, pendant lesquelles 1340 g de glucose ont été consommés pour permettre aux cellules de produire notamment 583 g d'éthanol, 21 g d'acide acétique et 20 g de glycérol (Figure 35). Les titres finaux de ces métabolites étaient respectivement de $124,2 \text{ g L}^{-1}$, $5,20 \text{ g L}^{-1}$ et $4,48 \text{ g L}^{-1}$ (Tableau 9). Au cours de la phase de croissance, qui a duré 23 h, 54 g de biomasse ont en outre été produits, pour une concentration finale de $13,3 \text{ g L}^{-1}$. L'acide succinique a lui été produit au cours des 26 premières heures, soit jusqu'à deux heures après la fin de la phase de croissance. 2,6 g de ce métabolite ont été produits pour une concentration finale de $0,59 \text{ g L}^{-1}$. De plus, 4,2 g d'acide pyruvique ont été produits entre 0 et 32 h, atteignant $0,68 \text{ g L}^{-1}$. Puis les cellules ont reconsumé cet acide jusqu'à la fin de la culture, portant sa masse cumulée et sa concentration finale à 2,9 g et $0,61 \text{ g L}^{-1}$. Enfin, le dosage de la carnitine dans le milieu de culture a montré une concentration nulle tout au long de la culture.

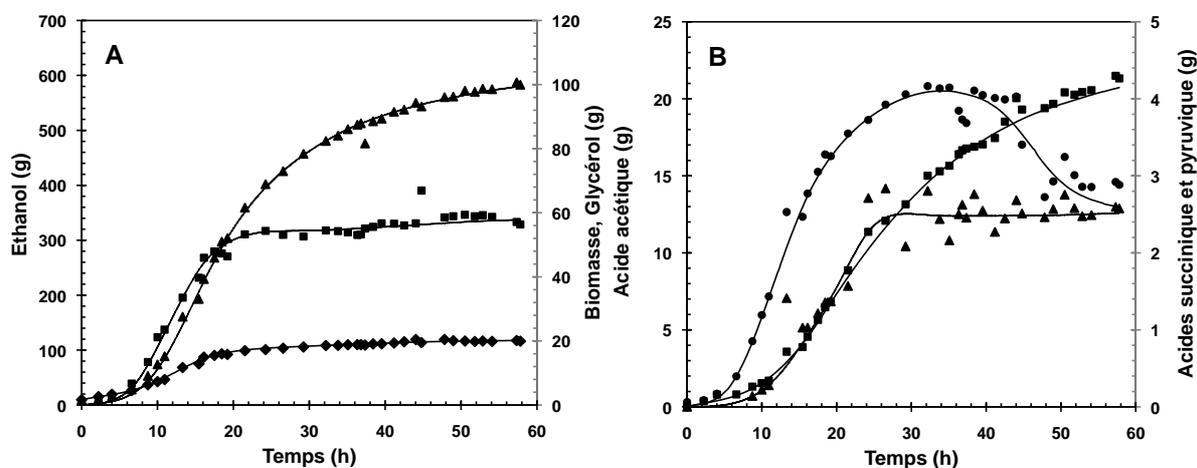


Figure 35 : Evolution des masses cumulées lors de la culture discontinue alimentée en excès de glucose supplémentée en carnitine. A représente (■) la biomasse, (▲) l'éthanol et (◆) le glycérol. B représente (■) l'acide acétique, (▲) l'acide succinique et (●) l'acide pyruvique. Les courbes représentent les données réconciliées.

Ainsi, les données brutes et réconciliées des cinétiques de consommation de glucose et de production de biomasse et des différents composés obtenues lors de la culture sur glucose supplémentée en carnitine (« GC ») (Figure 35) sont très similaires à celles obtenues lors de la culture témoin sur glucose seul (« G ») (chapitre 3).

4212. Comparaison des rendements des cultures « G » et « GC »

Le calcul des rendements sur glucose consommé confirme cette très forte ressemblance du comportement de *S. cerevisiae* dans les deux expériences (Tableau 9). Lors de la phase de croissance, le rendement en biomasse est ainsi de 0,175 g g_{Glucose}⁻¹ en présence de carnitine, contre 0,174 g g_{Glucose}⁻¹ sur glucose seul (Tableau 9). L'éthanol et le glycérol présentent quant à eux des rendements de production respectifs de 0,389 et 0,017 g g_{Glucose}⁻¹ en présence de carnitine, et de 0,402 et 0,021 g g_{Glucose}⁻¹ pour l'expérience témoin. Les rendements en acides organiques ne présentent pas non plus de différence significative. Pendant la culture « GC »,

Tableau 9 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec ou sans carnitine.

		GLUCOSE	GLUCOSE + CARNITINE
VITESSES SPECIFIQUES			
μ_{max}	h ⁻¹	0,35 +/- 0,01	0,38 +/- 0,02
Q_{éthanol max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	1,31 +/- 0,05	1,27 +/- 0,08
Q_{acétate max}	mg g ⁻¹ h ⁻¹	34 +/- 4	23 +/- 3
RENDEMENTS GLUCOSE			
Y_{biomasse / glucose}	g g ⁻¹	0,174 +/- 0,005	0,175 +/- 0,004
Y_{éthanol / glucose global}	g g ⁻¹	0,432 +/- 0,008	0,417 +/- 0,007
Y_{éthanol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,402 +/- 0,008	0,389 +/- 0,005
Y_{glycérol / glucose global}	g g ⁻¹	0,0142 +/- 0,0012	0,012 +/- 0,001
Y_{glycérol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,021 +/- 0,002	0,017 +/- 0,002
Y_{acétate / glucose global}	g g ⁻¹	0,0158 +/- 0,0006	0,0156 +/- 0,0005
Y_{acétate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0102 +/- 0,0006	0,0093 +/- 0,0003
Y_{succinate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,002 +/- 0,001	0,0021 +/- 0,0004
Y_{pyruvate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0031 +/- 0,0007	0,0039 +/- 0,0004
CONCENTRATIONS FINALES			
Biomasse	g L ⁻¹	13,2 +/- 0,3	13,3 +/- 0,3
Ethanol	g L ⁻¹	126,8 +/- 0,6	124,2 +/- 0,6
Glycérol	g L ⁻¹	4,96 +/- 0,02	4,48 +/- 0,02
Acétate	g L ⁻¹	5,28 +/- 0,04	5,20 +/- 0,04
Succinate	g L ⁻¹	0,53 +/- 0,01	0,59 +/- 0,01
Pyruvate	g L ⁻¹	0,36 +/- 0,01	0,61 +/- 0,01
P_{critique}	g L ⁻¹	86 +/- 3	87 +/- 3

ils sont produits à hauteur de 9,3 mg g_{Glucose}⁻¹, 2,1 mg g_{Glucose}⁻¹ et 3,9 mg g_{Glucose}⁻¹ respectivement pour les acides acétique, succinique et pyruvique, contre 10,2 mg g_{Glucose}⁻¹, 2 mg g_{Glucose}⁻¹ et 3,1 mg g_{Glucose}⁻¹ pendant la culture « G ».

Si l'on considère l'ensemble des cultures, le rendement en éthanol semblerait légèrement plus faible, à 0,417 g g_{Glucose}⁻¹ avec carnitine, contre 0,432 g g_{Glucose}⁻¹ sur glucose seul (Tableau 9). Cette observation est cependant à prendre en compte avec précaution car elle est à la limite de la marge d'erreur. Le rendement en glycérol est quant à lui de 12 mg g_{Glucose}⁻¹ et de 14,2 mg g_{Glucose}⁻¹ respectivement pour les cultures « GC » et « G ». Enfin, le rendement en acide acétique atteint 15,6 mg g_{Glucose}⁻¹ avec la carnitine et 15,8 mg g_{Glucose}⁻¹ sur glucose seul. Les rendements sur biomasse produite sont également similaires pour les deux expériences (résultats non montrés).

4213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « G » et « GC »

Si l'on s'intéresse aux vitesses spécifiques, les résultats présentent également de grandes similarités entre les deux expériences. Le taux de croissance maximal est ainsi de 0,38 h⁻¹ en présence de carnitine contre 0,35 h⁻¹ sur glucose seul (Tableau 9). L'évolution de ce taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol présente également un profil semblable (Figure 36). La P_{critique}, concentration en éthanol à partir de laquelle la cellule arrête sa croissance, est de 86 g L⁻¹ avec carnitine et de 87 g L⁻¹ pour l'expérience témoin (Tableau 9). En outre, la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol atteint 1,31 g g_x h⁻¹ et 1,27 g g_x h⁻¹ respectivement lors des culture « GC » et « G » (Tableau 9). Comme pour le taux de croissance, l'évolution de cette vitesse spécifique en fonction de la concentration en éthanol présente un profil très similaire lors des deux expériences (Figure 36).

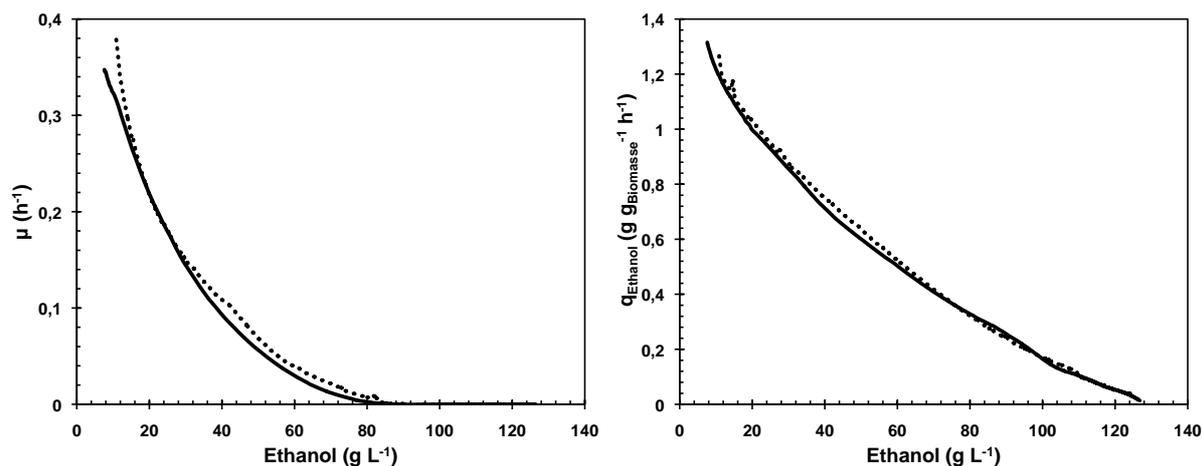


Figure 36 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (···).

La concentration critique en acides organiques totaux pour la croissance est également très proche entre les deux cultures, avec $0,064 \text{ mol L}^{-1}$ et $0,065 \text{ mol L}^{-1}$, respectivement pour les cultures sans et avec carnitine. Concernant la production d'éthanol, celle-ci est stoppée à des concentrations en acides organiques de $0,097 \text{ mol L}^{-1}$ et $0,098 \text{ mol L}^{-1}$ et à des concentrations en éthanol de $126,8 \text{ g L}^{-1}$ et $124,2 \text{ g L}^{-1}$, respectivement pour les cultures « G » et « GC ».

Bien que le taux de croissance et la vitesse spécifique de production d'éthanol soient similaires, l'analyse de la vitesse spécifique de production d'acide acétique révèle quant à elle certaines différences. En effet, la valeur maximale de $q_{\text{Acétate}}$ sur glucose seul est de $34 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$. La présence de carnitine fait chuter cette valeur à $23 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 9). Bien que la vitesse spécifique de production d'acide acétique diminue ensuite lors des deux expériences, elle demeure significativement plus élevée en l'absence de carnitine pour un taux de croissance supérieur à $0,27 \text{ h}^{-1}$ (Figure 37). Cette diminution n'est cependant pas observée sur le rendement en biomasse produite sur glucose consommé (Tableau 9). Les cellules affichent en effet un taux de croissance de $0,27 \text{ h}^{-1}$ à 8,6 et 9,3 h, respectivement pour les cultures « G » et « GC ». Or à ce moment, la masse de glucose consommé ne représente que 13 et 15 % de la masse totale consommée lors de la seule phase de croissance. Le poids de l'acide acétique produit pendant ce temps est donc faible dans le calcul des rendements.

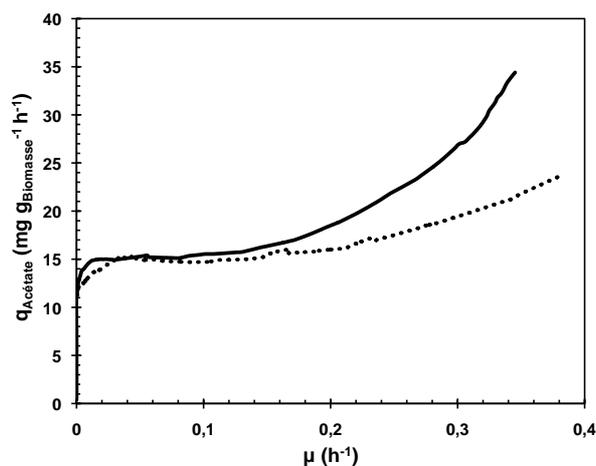


Figure 37 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (—) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (···).

4214. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « G » et « GC »

Des dosages enzymatiques ont été réalisés tout au long de la culture afin de déterminer l'évolution des activités spécifiques de la Catp et de différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase. Les résultats concernant la Catp montrent que cette enzyme est bien synthétisée chez les cellules des deux cultures (Figure 38). En l'absence de carnitine, l'évolution de son activité spécifique présente un plateau jusqu'à 16 h, d'une valeur d'environ $35 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$. Puis elle augmente soudainement jusqu'à $136 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$, avant de chuter

tout aussi brutalement à la fin de la phase de croissance. On observe ensuite un plateau à $15 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ jusqu'à la fin de la culture. En présence de carnitine, l'évolution de l'activité spécifique de la Catp présente de fortes similarités. Après un plateau à environ $41 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ jusqu'à 16 h, elle présente un pic à $149 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ en fin de phase de croissance, avant de chuter à un plateau à $15 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ jusqu'à la fin de la culture. Il est cependant intéressant de noter qu'en présence de carnitine, le pic d'activité spécifique de la Catp chute trois heures plus tard que sur glucose seul, et semblerait atteindre ainsi une valeur maximale plus élevée.

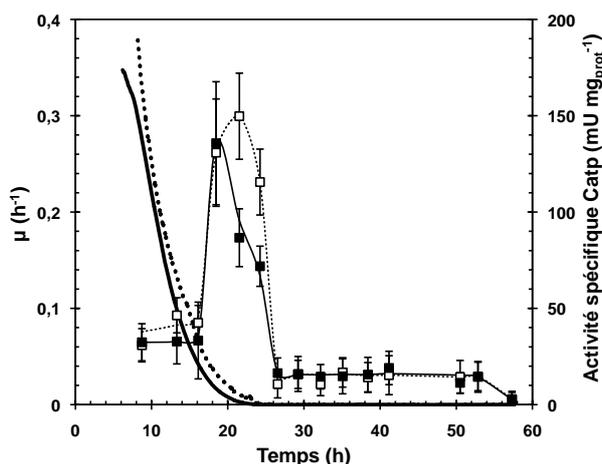


Figure 38 : Evolution du taux de croissance (lignes) et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase (symboles), lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (■ ; —) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (□ ; ···).

Les activités spécifiques de plusieurs isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase ont également été mesurées (Figure 39). Pour l'Ald6p, isoforme majeur NADP^+ dépendant, l'activité spécifique chute de 156 à $53 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ durant la phase de croissance sur glucose seul. Elle augmente ensuite de façon linéaire en fonction du temps jusqu'à atteindre $90 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ en fin de culture. L'Ald6p présente un profil d'activité spécifique sensiblement différent pour la culture supplémentée en carnitine. La chute observée dans l'expérience témoin y paraît ainsi beaucoup moins perceptible. Le lissage des valeurs révélerait cependant une diminution de 113 à $81 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$. Cette activité spécifique semble ensuite augmenter jusqu'à atteindre $108 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ à 50 h, avant de chuter à $43 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ à 57 h.

La mesure de l'activité spécifique des Aldp NAD^+ dépendantes montre par contre de plus grandes ressemblances. Dans les deux cas, cette activité spécifique chute ainsi de façon linéaire en fonction du temps jusqu'à devenir nulle à 18 h, soit quelques heures avant la fin de la phase de croissance. Elle semble cependant, à 9 h, plus élevée sur glucose seul ($120 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$) qu'en présence de carnitine ($92 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$).

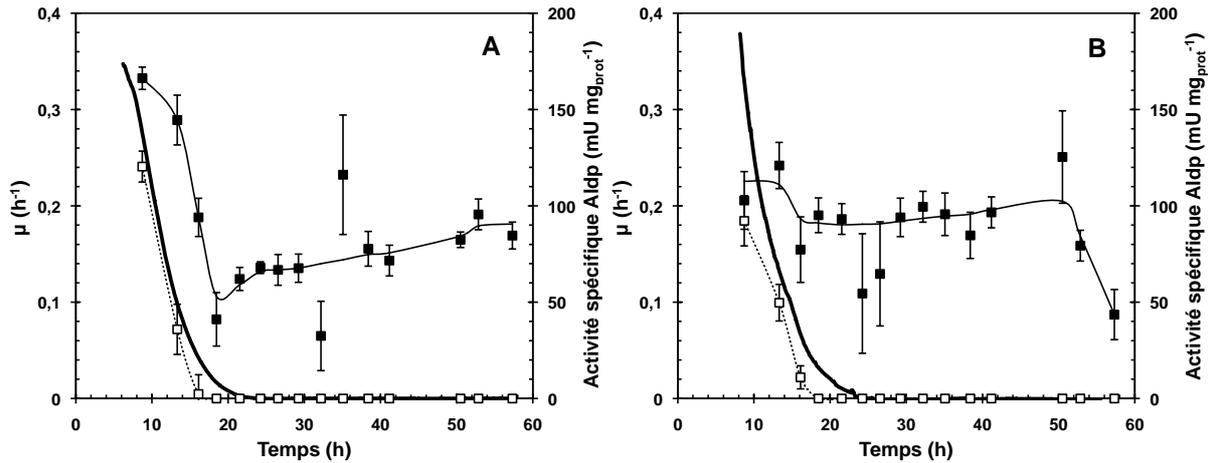


Figure 39 : Evolution du taux de croissance (—) et des activités spécifiques des acétaldéhyde déshydrogénases (■) NAD⁺ dépendante, et (□) NAD⁺ dépendante lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (A) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (B).

4215. Profil de viabilité lors des cultures « G » et « GC »

La viabilité des cellules à également été mesurée tout au long des expériences. L'évolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique lors de la culture supplémentée en carnitine ne rapporte cependant aucune différence avec la culture témoin (Figure 40). Dans les deux cas, l'amorce de la chute de viabilité a ainsi lieu à 95 et 3 g L⁻¹ respectivement pour l'éthanol et l'acide acétique. En fin de culture, le taux de cellules viables est de 40 %.

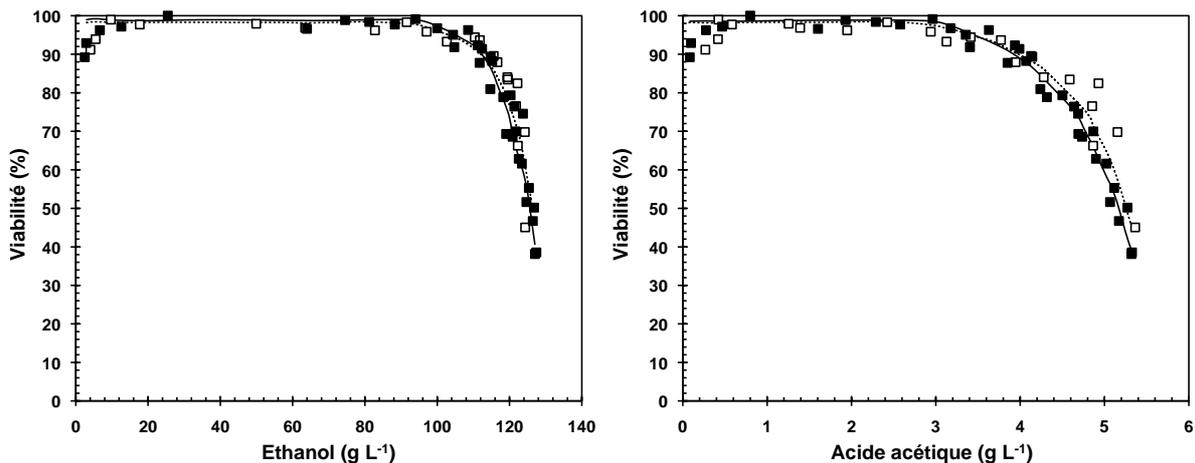


Figure 40 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (■ ; —) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (□ ; ···).

422. PARAMETRES DE LA CULTURE GLUCOSE – ACIDE OLEIQUE / CARNITINE

4221. Evolution des masses cumulées lors de la culture « GOC »

D'après les résultats bruts de cette expérience, les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés bouclent respectivement à 102 % et 104 %. La culture a duré un total de 44 h, pendant lesquelles 1095 g de glucose ont été consommés pour permettre aux cellules de produire notamment 462 g d'éthanol, 19 g d'acide acétique et 17 g de glycérol (Figure 41). Les titres finaux de ces métabolites étaient respectivement de 115,6 g L⁻¹, 5,1 g L⁻¹ et 4,20 g L⁻¹ (Tableau 10). Lors de la phase de croissance, qui a duré 17 h, 83 g de biomasse ont également été produits, pour une concentration finale de 23,6 g L⁻¹. L'acide succinique a lui été produit jusqu'à la 22^e heure, soit cinq heures après la fin de la phase de croissance, pour un total de 3,3 g et une concentration finale de 0,88 g L⁻¹. 0,4 g a ensuite été reconsommé jusqu'à la 38^e heure, soit peu avant la fin de la production d'éthanol. La concentration finale était quant à elle de 0,68 g L⁻¹. De plus, 2,7 g d'acide pyruvique ont été produits entre 0 et 16 h, soit la presque totalité de la phase de croissance, atteignant 0,71 g L⁻¹. Puis les cellules ont reconsommé cet acide jusqu'à la fin de la culture, portant sa masse cumulée et sa concentration finale à 2,0 g et 0,36 g L⁻¹. En outre, le dosage de la carnitine dans le milieu de culture a montré une concentration nulle tout au long de la culture. Enfin, le dosage de l'acide oléique n'a pas permis de mettre en évidence une consommation de ce substrat par les cellules, puisque sa concentration est demeurée stable tout au long de la culture, à 50 ± 1,2 g L⁻¹.

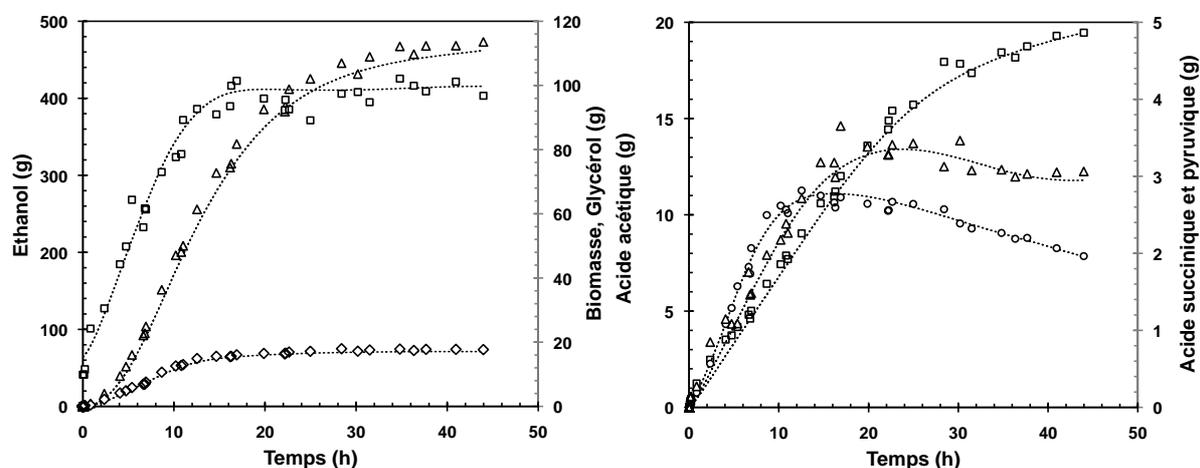


Figure 41 : Evolution des masses cumulées lors de la culture discontinue alimentée en excès de glucose plus acide oléique, supplémentée en carnitine. A représente (□) la biomasse, (△) l'éthanol et (◇) le glycérol. B représente (□) l'acide acétique, (△) l'acide succinique et (○) l'acide pyruvique. Les courbes représentent les données réconciliées.

De la même manière que pour les cultures « G » et « GC », les données brutes et réconciliées des cinétiques de consommation de glucose et de production de la biomasse et des différents composés obtenus lors de la culture sur glucose plus acide oléique supplémentée en carnitine (« GOC ») (Figure 41) sont très similaires à celles obtenues lors de la culture sur glucose plus acide oléique (« GO ») (chapitre 3).

4222. Comparaison des rendements des cultures « GO » et « GOC »

L'analyse des rendements sur glucose consommé confirme cette similarité du comportement de *S. cerevisiae* dans les deux expériences (Tableau 10). Lors de la phase de croissance, le rendement en biomasse est ainsi de 0,21 g g_{Glucose}⁻¹ en présence de carnitine, contre 0,234 g g_{Glucose}⁻¹ en l'absence de cette molécule (Tableau 10). L'éthanol et le glycérol présentent quant à eux des rendements de production respectifs de 0,328 et 0,037 g g_{Glucose}⁻¹ avec ajout de carnitine, et de 0,31 et 0,041 g g_{Glucose}⁻¹ pour l'expérience témoin. Certains acides organiques sont également produits dans des proportions identiques. C'est le cas de l'acide acétique, à 13,1 et 12,8 mg g_{Glucose}⁻¹ et de l'acide pyruvique, à 12,2 et 11,2 mg g_{Glucose}⁻¹, respectivement pour les cultures « GOC »

Tableau 10 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique, avec ou sans carnitine.

		GLUCOSE + OLEATE	GLUCOSE + OLEATE + CARNITINE
VITESSES SPECIFIQUES			
μ_{max}	h ⁻¹	0,38 +/- 0,03	0,39 +/- 0,03
q_{éthanol max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	0,43 +/- 0,03	0,44 +/- 0,04
q_{acétate max}	mg g ⁻¹ h ⁻¹	47 +/- 2	43 +/- 2
RENDEMENTS GLUCOSE			
Y_{biomasse / glucose}	g g ⁻¹	0,234 +/- 0,012	0,21 +/- 0,02
Y_{éthanol / glucose global}	g g ⁻¹	0,40 +/- 0,01	0,40 +/- 0,02
Y_{éthanol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,31 +/- 0,01	0,328 +/- 0,015
Y_{glycérol / glucose global}	g g ⁻¹	0,015 +/- 0,002	0,015 +/- 0,004
Y_{glycérol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,041 +/- 0,003	0,037 +/- 0,005
Y_{acétate / glucose global}	g g ⁻¹	0,0171 +/- 0,0004	0,0171 +/- 0,0005
Y_{acétate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0128 +/- 0,0005	0,0131 +/- 0,0004
Y_{succinate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0071 +/- 0,0004	0,0059 +/- 0,0006
Y_{pyruvate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0122 +/- 0,0005	0,0112 +/- 0,0006
CONCENTRATIONS FINALES			
Biomasse	g L ⁻¹	22,9 +/- 0,5	23,6 +/- 0,5
Ethanol	g L ⁻¹	116,2 +/- 1,1	115,6 +/- 1,1
Glycérol	g L ⁻¹	4,21 +/- 0,05	4,20 +/- 0,05
Acétate	g L ⁻¹	5,1 +/- 0,1	5,1 +/- 0,1
Succinate	g L ⁻¹	0,71 +/- 0,03	0,68 +/- 0,03
Pyruvate	g L ⁻¹	0,37 +/- 0,06	0,39 +/- 0,06
P_{critique}	g L ⁻¹	92 +/- 4	91 +/- 4

et « GO ». Cependant, le rendement en acide succinique présente des différences significatives entre les deux expériences. La carnitine semble en effet diminuer ce paramètre, puisqu'il est de $7,1 \text{ mg g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour la culture « GO », mais seulement de $5,9 \text{ mg g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour la culture « GOC » (Tableau 10). Cette différence n'est cependant pas observable pour le rendement sur biomasse produite. La marge d'erreur est effectivement trop élevée à cause d'un dosage de la biomasse relativement imprécis en présence d'acide oléique dans le milieu de culture.

Si l'on considère l'ensemble des cultures, les rendements en éthanol, glycérol et acide acétique sont rigoureusement identiques. Ils atteignent respectivement $0,40 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$, $0,015 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ et $0,0171 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ pour les deux expériences (Tableau 10). Les rendements sur biomasse produite sont également similaires pour les deux expériences (résultats non montrés).

4223. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « GO » et « GOC »

Lorsque l'on analyse les vitesses spécifiques, les résultats présentent également de grandes similarités entre les deux cultures. Le taux de croissance maximal en tout début de croissance est ainsi de $0,39 \text{ h}^{-1}$ en présence de carnitine contre $0,38 \text{ h}^{-1}$ sur glucose plus oléate (Tableau 10). L'évolution de ce taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol présente également un profil quasiment identique (Figure 42). La P_{critique} , concentration en éthanol à partir de laquelle la cellule arrête sa croissance, est de 92 g L^{-1} avec carnitine et de 91 g L^{-1} pour l'expérience témoin (Tableau 10). En outre, la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol atteint $0,44 \text{ g g}_x \text{ h}^{-1}$ et $0,43 \text{ g g}_x \text{ h}^{-1}$ respectivement lors des cultures « GOC » et « GO » (Tableau 10). L'évolution de cette vitesse spécifique en fonction de la concentration en éthanol présente également un profil très similaire lors des deux expériences (Figure 42).

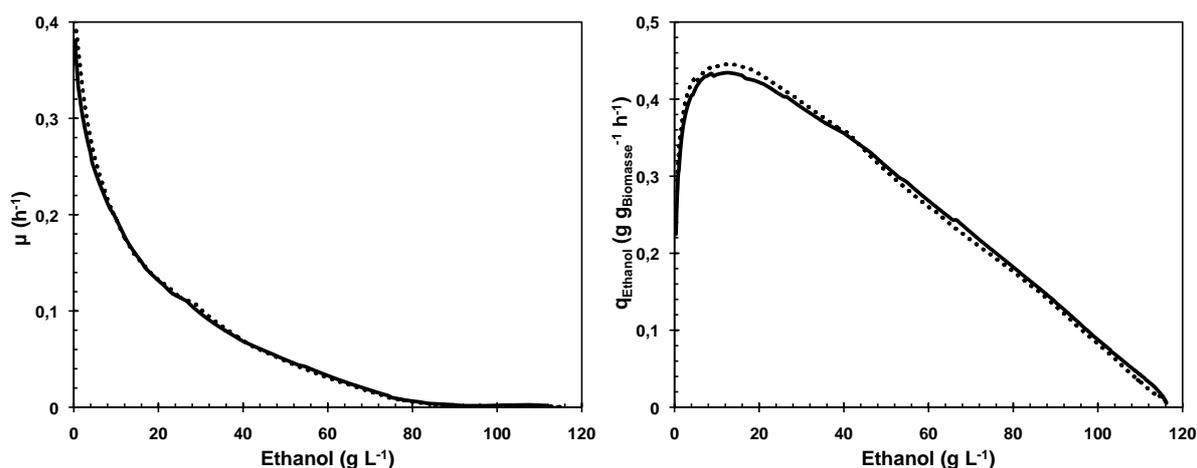


Figure 42 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls (—) ou supplémentée en carnitine (···).

La concentration critique en acides organiques pour la croissance est également très similaire entre les deux cultures, avec $0,068 \text{ mol L}^{-1}$ et $0,067 \text{ mol L}^{-1}$, respectivement pour les cultures sans et avec carnitine. La production d'éthanol est pour sa part stoppée à des concentrations en acides organiques de $0,096 \text{ mol L}^{-1}$ et $0,095 \text{ mol L}^{-1}$ et à des concentrations en éthanol de $116,2 \text{ g L}^{-1}$ et $115,6 \text{ g L}^{-1}$, respectivement pour les cultures « GO » et « GOC ».

L'analyse de la vitesse spécifique de production d'acide acétique semble cependant révéler certaines différences. En effet, la valeur maximale de $q_{\text{Acétate}}$ est de $47 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ sur glucose plus acide oléique et de seulement $43 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ en présence de carnitine. Néanmoins, cet écart est à relativiser car il se situe à la limite de la marge d'erreur (Tableau 10). Toutefois, le profil de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du taux de croissance montre une différence significative entre les deux expériences pour un taux de croissance supérieur à $0,32 \text{ h}^{-1}$ (Figure 43). Le $q_{\text{Acétate}}$ est ainsi inférieur chez les cellules ayant de la carnitine à disposition. Cette diminution n'est cependant pas observée sur le rendement en biomasse produite sur glucose consommé (Tableau 10). De la même manière que pour les expériences « G » et « GC », ceci peut être expliqué par le fait que le taux de croissance des cellules diminue très rapidement jusqu'à $0,32 \text{ h}^{-1}$, atteignant cette valeur à 2,4 et 2,1 h pour les cultures « GO » et « GOC », respectivement. A ce moment, la masse de glucose consommé ne représente que 5 et 6 % de la masse totale consommée lors de la seule phase de croissance. Le poids de l'acide acétique produit pendant ce temps est donc particulièrement faible dans le calcul des rendements.

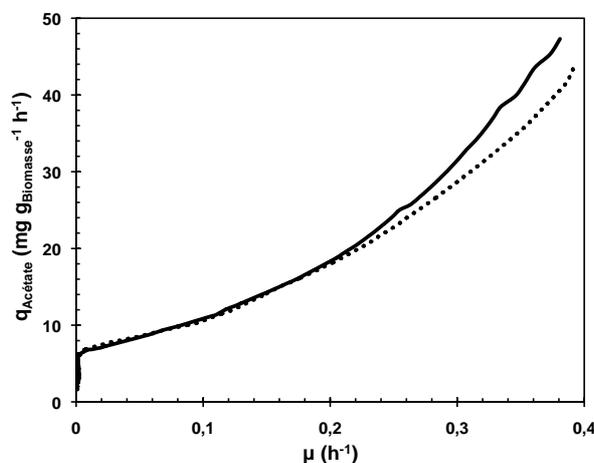


Figure 43 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls (—) ou supplémentée en carnitine (···).

Le calcul des rendements a montré des différences significatives sur la quantité de glucose dirigée vers la production de l'acide succinique (Tableau 10). On retrouve logiquement cette observation sur le profil de la vitesse spécifique de production de cet acide en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose (Figure 44). Ainsi, pour une vitesse de production d'acide succinique donnée, le q_{Glucose} est plus élevé chez les cellules en présence de carnitine. Ce constat n'est cependant vrai que pour des valeurs de vitesse spécifique de

consommation de glucose élevées. Il est à noter que la fin de la phase de croissance correspond à des vitesses de consommation de $0,41$ et $0,40 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les culture « GO » et « GOC », respectivement.

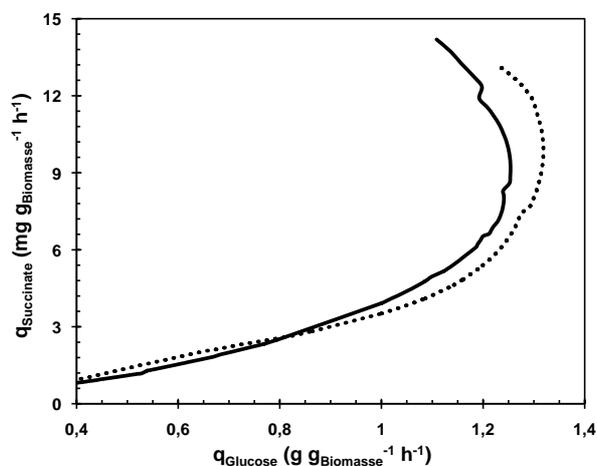


Figure 44 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide succinique en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique seuls (—) ou supplémentée en carnitine (···).

4224. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « GO » et « GOC »

L'activité spécifique de la Catp a été mesurée tout au long de la culture, mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence (Figure 45). Comme pour les cultures « G » et « GC », on retrouve toutefois l'existence d'un pic d'activité en fin de phase de croissance, atteignant $104 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ en l'absence de carnitine et $115 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ en présence de cette molécule. Cette activité chute ensuite à environ $25 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ et conserve cette valeur jusqu'à la fin des deux expériences. Par contre, les profils observés lors de la phase de croissance pendant les deux cultures sur glucose et acide oléique sont différents de ceux observés

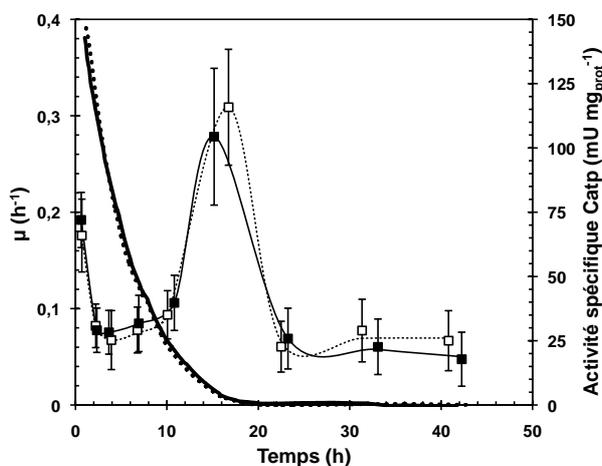


Figure 45 : Evolution du taux de croissance (lignes) et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase (symboles), lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique (■ ; —) et en excès de glucose plus acide oléique supplémentée en carnitine (□ ; ···).

lors des deux cultures sur glucose seul (Figure 38). En effet, l'activité spécifique de la Catp ne présente pas de plateau, mais chute en moins de quatre heures d'environ 72 à 28 mU mg_{protéines}⁻¹ lors de l'expérience « GO » et d'environ 65 à 25 mU mg_{protéines}⁻¹ lors de l'expérience « GOC ». Puis elle semblerait augmenter jusqu'à environ 38 mU mg_{protéines}⁻¹, juste avant le pic de fin de croissance.

4225. Profil de viabilité lors des cultures « GO » et « GOC »

La viabilité des cellules a également été mesurée. Comme pour les expériences « G » et « GC », l'évolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique lors de la culture supplémentée en carnitine n'a montré aucune différence avec la culture sur glucose et acide oléique (

Figure 46). Dans les deux cas, la viabilité semble chuter en deux phase distinctes. De 45 à 110 g L⁻¹ d'éthanol et de 2 à 4,7 g L⁻¹ d'acide acétique, le taux de cellules viable chute d'environ 95 à 88 %. Puis l'amorce d'une chute de viabilité brutale a lieu à 110 et 4,7 g L⁻¹ respectivement pour l'éthanol et l'acide acétique. En fin de culture, le taux de cellules viables est de 50 %.

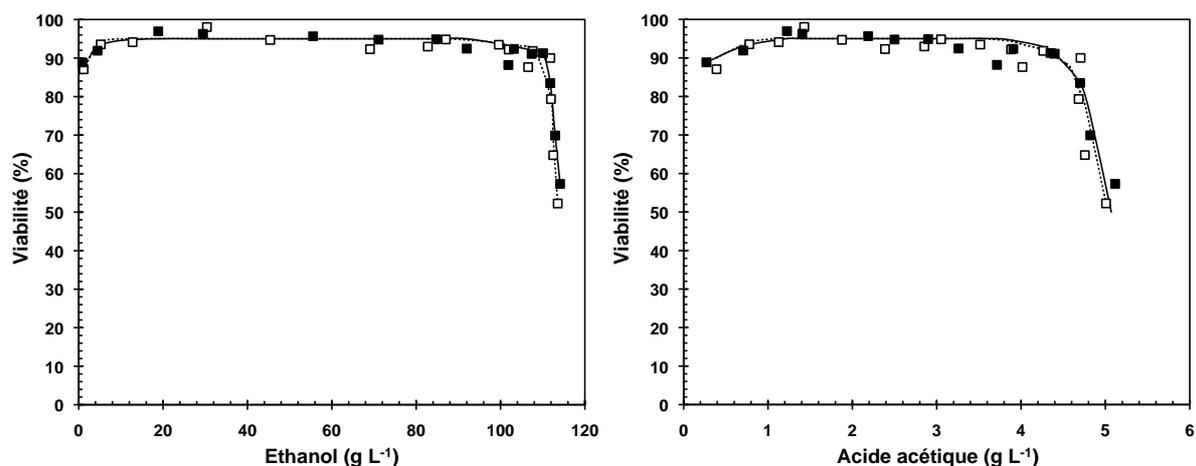


Figure 46 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose plus acide oléique (■ ; —) et en excès de glucose plus acide oléique supplémentée en carnitine (□ ; ···).

43. DISCUSSIONS

431. IMPACT DE LA CARNITINE SUR LE METABOLISME

4311. Ajout de carnitine et performances fermentaires

Que les cellules soient cultivées sur glucose seul ou sur glucose plus acide oléique, aucun changement des performances fermentaires globales n'a pu être mis en évidence suite à l'ajout de carnitine dans le milieu de culture. Dans les deux cas, les rendements en éthanol produit sur glucose consommé ne montraient pas de différence significative, que ce soit au niveau global ou lors de la phase de croissance. Cependant, il faut noter que l'écart entre ces rendements en éthanol est à la limite de la marge d'erreur lors des cultures sur glucose seul. Si l'on soustrait la marge d'erreur aux résultats de l'expérience « G », et qu'on l'ajoute aux résultats de l'expérience « GC », on obtient une même valeur de rendement en éthanol de $0,424 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ g}^{-1}$ sur l'ensemble de la culture et de $0,394 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ g}^{-1}$ pendant la phase de croissance (Tableau 9). Dans ce cas, l'ajout de carnitine pourrait donc réellement diminuer la quantité de glucose dirigée vers l'éthanol, la stratégie de culture adoptée ici ne permettant toutefois pas de l'observer avec certitude.

Néanmoins, l'examen de la vitesse spécifique de production de cet alcool n'a pas révélé ce type de différence entre les cultures « G » et « GC ». Par contre en présence d'acide oléique, le rendement en éthanol est identique sur l'ensemble de la culture, à $0,40 \text{ g}_{\text{Glucose}} \text{ L}^{-1}$, et présente une différence en deçà de la marge d'erreur lors de la phase de croissance (Tableau 10). La concentration intracellulaire en carnitine appliquée, définie d'après des essais *in vitro* (chapitre 2), pourrait au final se révéler insuffisante pour observer un effet significatif sur la phase de croissance.

Les profils du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol ne présentent pas non plus de différences significatives en présence de carnitine, que les cellules soient cultivées sur glucose seul (Figure 36) ou sur glucose plus acide oléique (Figure 42). Il en va de même pour les profils de ces vitesses en fonction de la concentration en acide acétique (résultats non montrés). De plus, les concentrations critiques de ces deux molécules pour l'arrêt de la croissance sont similaires entre les expériences « G » et « GC » et entre les expériences « GO » et « GOC ». L'apport de carnitine ne permet donc pas aux cellules de lever les stress éthanol ou acétate impactant les vitesses de croissance et de production d'éthanol, lors de cultures aérobies discontinues alimentées en excès de glucose seul, ou en excès de glucose et d'acide oléique.

La littérature rapporte pourtant qu'elle améliore la croissance cellulaire en présence de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Franken et al., 2008 ; Franken & Bauer, 2010). Or *S. cerevisiae* produit ce type de molécules en aérobiose, notamment *via* la mitochondrie. Cette production augmente d'ailleurs fortement lors de l'apoptose déclenchée par l'acide acétique (Almeida et al., 2009 ; Giannattasio et al., 2005 ; Ludovico et al., 2002). Plusieurs explications permettraient cependant de justifier la divergence entre ces observations. Dans les

conditions de culture utilisées ici, la concentration équivalente en DRO produits pourrait ainsi être plus faible que celle d'H₂O₂ ajoutée lors des essais de stress oxydatifs menés dans les travaux sus-cités, soit jusqu'à 2 mM. En effet pour la souche BY4741, 23 % des cellules récoltées en phase exponentielle contiennent des DRO en présence de 3 % d'H₂O₂, contre seulement 3 % dans l'expérience témoin. Cet écart est encore plus important avec la souche CML39-11A (Palermo et al., 2010). L'ajout d'acétyl-carnitine dans le milieu de culture a cependant permis de n'obtenir aucune cellule DRO-positive dans l'expérience témoin, et d'en faire chuter drastiquement la fraction en présence d'H₂O₂. Dans nos conditions de culture, les mécanismes de défense de *S. cerevisiae* contre les dérivés réactifs de l'oxygène seraient donc suffisants pour lever le stress oxydatif. Il est également possible que ce stress soit tout simplement négligeable face au stress éthanol et / ou acétate. Aucune donnée de la littérature ne permet cependant de discuter cette hypothèse.

La littérature prête également à la carnitine et à l'acétyl-carnitine un rôle de lutte contre l'apoptose. Cette observation a été rapportée chez les cellules humaines (Yano et al., 2008) et plus récemment chez *S. cerevisiae* (Palermo et al., 2010). Cette molécule permettrait également une amélioration de la viabilité cellulaire lors d'un stress oxydatif (Palermo et al., 2010). L'ajout de carnitine et sa potentielle fixation à l'acétyl-coA, sous l'effet de la Catp, auraient ainsi pu limiter la perte de viabilité cellulaire de *S. cerevisiae* lors des cultures présentées ici. De ce fait, les performances fermentaires auraient pu être améliorées, notamment concernant le titre final en éthanol. L'évolution des profils de viabilité montre cependant une grande similarité en l'absence ou en présence de carnitine, lors des cultures sur glucose seul (Figure 40) ou sur glucose plus acide oléique (Figure 46). Les concentrations en éthanol ou en acide acétique pour lesquelles la chute de viabilité est amorcée sont ainsi comparables entre les expériences « G » et « GC » et entre les expériences « GO » et « GOC », tout comme la chute elle-même. L'ajout de carnitine au milieu de culture n'a donc pas permis d'améliorer la viabilité cellulaire dans ces conditions de culture. Il faut toutefois noter que la définition de la viabilité cellulaire diffère selon les différents travaux de par la méthode de mesure utilisée. Cette viabilité pouvait ainsi correspondre à la capacité des cellules à former des colonies sur milieu solide (Palermo et al., 2010) ou à un relargage de lactate déshydrogénase (Yano et al., 2008).

4312. Ajout de carnitine et modulation du métabolisme

Si l'on s'intéresse aux seuls rendements de production obtenus lors des quatre expériences, l'ajout de carnitine ne semble pas avoir d'impact sensible sur le métabolisme de *S. cerevisiae*. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les cultures « G » et « GC » (Tableau 9), et seul le rendement en acide succinique a été diminué de 7,1 à 5,9 mg g_{Glucose}⁻¹ entre les cultures « GO » et « GOC » (Tableau 10).

L'étude des vitesses spécifiques de production a cependant révélé des différences significatives. Pour des taux de croissance élevés, le q_{Acétate} est ainsi diminué en présence de carnitine lors des cultures sur glucose seul (Figure 37) et sur glucose plus acide oléique (Figure 43). Les activités spécifiques des différents isoformes de l'Aldp mesurées lors des cultures sur glucose sont en outre diminuées lors de la phase de croissance en présence de carnitine (Figure 39). Ceci est en partie concordant avec une observation faite par Franken (2009). Ce dernier

a effectivement mis en évidence un impact de la carnitine sur l'expression de certains gènes chez *S. cerevisiae*, et notamment une diminution de l'expression de l'*ALD4*.

La plus faible vitesse spécifique de production d'acide acétique pourrait ainsi s'expliquer par une synthèse et donc une disponibilité limitées des acétaldéhyde déshydrogénases en présence de carnitine. Le flux d'acétaldéhyde dirigé vers la synthèse cytosolique d'acide acétique serait alors réduit. Cependant lors de ces deux expériences, la vitesse spécifique de production d'acide acétique n'est significativement différente en fonction du taux de croissance que jusqu'à 8,6 et 9,3 h, respectivement pour « G » et « GC », alors que le premier dosage enzymatique n'a pu être réalisé qu'à 8,7 h. Une prospective de l'évolution des activités enzymatiques est donc nécessaire sur les premières heures de culture afin de confirmer l'hypothèse précédemment proposée.

Une autre explication possible est que l'acide acétique, en présence de carnitine, serait redirigé du cytosol vers la mitochondrie sous forme d'acétyl-coA, *via* le système CAT, pour être métabolisé dans le cycle des acides tricarboxyliques. Cependant, aucune augmentation de la consommation d'oxygène ni de la production de dioxyde de carbone n'ont été mises en évidence pour appuyer cette hypothèse.

Lors des cultures sur glucose plus acide oléique, la présence de carnitine a également diminué la vitesse spécifique de production d'acide succinique pour des taux de croissance élevés (Figure 44), outre son rendement sur glucose consommé pendant la phase de croissance. La littérature ne rapporte aucune information concernant un quelconque lien direct entre la production de cet acide organique et la carnitine. Cependant, l'acide oléique est connu pour favoriser la prolifération des peroxyosomes, de certains gènes du cycle du glyoxylate associé (*MDH3*, *CIT2*), du gène codant pour l'isocitrate déshydrogénase peroxyosomale (*IDP3*) et des gènes codant pour les diverses carnitine-acétyl transférases (*CAT2*, *YAT1*, *YAT2*). En présence d'acide oléique, l'acide succinique excédentaire pourrait ainsi être partiellement métabolisé plutôt qu'excrété.

432. IMPACT DES METABOLITES SUR L'ACTIVITE DU SYSTEME CAT

4321. Transport de la carnitine à travers la membrane cytoplasmique

Au cours des deux cultures supplémentées en carnitine, la concentration extracellulaire de celle-ci s'est avérée être nulle. La stabilité de cette molécule dans ces conditions expérimentales a été confirmée *in vitro* jusqu'à 32 heures (chapitre 2). Elle a donc bien été transportée à l'intérieur des cellules. La carnitine ne pouvant pas traverser la membrane plasmique de manière passive, *S. cerevisiae* doit l'importer *via* le transporteur plasma-membranaire Agp2p (van Roermund et al., 1999). Celui-ci est donc bien actif lors des expériences « GC » et « GOC ».

Cette observation, inédite vis-à-vis de la littérature, est très intéressante. En effet, les conditions de culture confrontent ici les cellules à des concentrations très élevées en glucose, entre 20 et 100 g L⁻¹. Or l'équipe

de van Roermund (1999) a reporté une répression du transport de la carnitine par le glucose à une concentration de seulement 3 g L⁻¹. Cependant, les essais réalisés lors de ces travaux ne plaçaient les cellules dans un milieu de culture supplémenté en carnitine que pour une durée de 10 mn. Il semble donc que *S. cerevisiae* soit capable de lever cette répression par le glucose pour des temps de contact supérieurs.

Une autre explication peut également être envisagée. En effet, la même équipe a rapporté une dérépression du transport de la carnitine par une concentration en glycérol dans le milieu de culture de 30 g L⁻¹. Cette dernière est bien supérieure à celles rencontrées par les cellules lors de nos expériences, inférieures à 5 g L⁻¹. Toutefois, le glycérol est soumis à des phénomènes d'accumulation intracellulaire permettant de réguler la pression de turgescence, sous l'influence de la voie H.O.G. (High Osmolarity Glycerol) (Ferreira et al., 2005 ; Hohmann, 2002 ; Oliveira, 2003 ; Tamás et al., 1999). Or la composition du milieu de culture utilisé ici (notamment le glucose à 100 g L⁻¹), ainsi que les hautes concentrations extracellulaires en produits de fermentation amènent à une pression osmotique extracellulaire supérieure que lors des travaux de van Roermund *et al.* (1999) (glycérol, 30 g L⁻¹ ; peptone plus extrait de levure, 8 g L⁻¹ ; tampon phosphate, 5 g L⁻¹). Il est donc envisageable que, dans ces conditions de culture, la concentration en glycérol intracellulaire soit suffisante pour lever la répression par le glucose.

Les données expérimentales ne permettent toutefois pas de déterminer si ces mécanismes, qu'ils soient indépendants ou concomitants, interviennent sur la régulation du transport de la carnitine au niveau de l'expression du gène *AGP2* ou de l'activité de la protéine elle-même.

4322. Fonctionnalité de la carnitine-acétyl transférase

Les dosages enzymatiques ont permis de mettre en évidence la présence d'un pool intracellulaire de carnitine-acétyl transférase tout au long d'une culture en excès de glucose, indépendamment d'une supplémentation en acide oléique et / ou en carnitine. Cette observation est très intéressante car les conditions de cultures imposent aux cellules des concentrations très élevées en glucose, entre 20 et 100 g L⁻¹. Or la littérature rapporte une répression par ce substrat des trois gènes codant pour des acétyl-carnitine transférases, *YAT1*, *YAT2* et *CAT2* (de Jong-Gubbels et al., 1998 ; Schmalix & Bandlow, 1993). Les concentrations en glucose des milieux de culture utilisés lors de ces travaux étant inférieurs à celles appliquées ici, *S. cerevisiae* devrait donc être soumise à cette répression. L'explication de la synthèse de carnitine-acétyl transférase pourrait cependant s'expliquer par la synthèse d'éthanol et de coproduits par les cellules. Schmalix & Bandlow (1993) et van den Berg *et al.* (1998) ont en effet démontré que ces trois gènes étaient à l'inverse induits par l'éthanol, le glycérol et l'acide acétique. Or ces molécules ont été produites à des concentrations très élevées lors des expériences présentées ici, et supérieures ou équivalentes à celles observées ou déduites de la littérature. La production de ces métabolites par les cellules aurait ainsi pu lever la répression par le glucose.

Ces dosages enzymatiques ont en outre et surtout permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation de l'activité spécifique de la Catp, non encore décrite dans la littérature. Le point le plus intrigant de ce

mécanisme de régulation est l'apparition d'un pic d'activité à la fin de la phase de croissance. Celui-ci est observé quels que soient les substrats apportés. Le fait que cette enzyme soit impliquée dans le transport de l'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie pourrait indiquer que *S. cerevisiae* tente d'augmenter le flux de carbone transporté à travers la membrane mitochondriale. Ce mécanisme serait ainsi un moyen d'envoyer plus de carbone vers le métabolisme mitochondrial afin de fournir des précurseurs de la biomasse et indirectement de l'ATP. De cette manière, les cellules essaieraient d'endiguer l'arrêt de la production de biomasse causée par un flux trop faible de carbone entrant dans la mitochondrie. A l'inverse, *S. cerevisiae* pourrait également chercher à évacuer le carbone mitochondrial. L'activité du cycle des acides tricarboxyliques est en effet très amoindrie lorsque la croissance devient nulle. L'arrêt de la croissance créerait alors un surplus de carbone sous l'effet dynamique de son transport vers la mitochondrie. Les cellules activeraient donc leurs transporteurs mitochondriaux afin d'être en mesure de métaboliser ce carbone excédentaire *via* les voies cytosoliques.

Ce pic d'activité révèle également une capacité de régulation de l'activité de la Catp extrêmement rapide. Les dosages lors de la culture « GC » montrent effectivement une augmentation de 41 à 149 mU mg_{protéines}⁻¹ en l'espace de seulement 2 heures peu avant la fin de la phase de croissance. Des travaux en culture continue ont rapporté une augmentation de l'expression des gènes *YAT2* et *CAT2* pour des taux de croissance proches de zéro (Boender et al., 2011). D'après les auteurs, il apparaîtrait que cette variation ne s'explique pas tant par l'abaissement du taux de croissance que par une concentration en glucose résiduel plus faible avec cet abaissement. Lors de nos expériences, la concentration en glucose demeure toujours supérieure à 20 g L⁻¹, soit une valeur bien supérieure à celles citées dans les travaux de Boender (2011), inférieures au gramme par litre. Nos résultats pourraient donc contredire leurs conclusions. Cependant, les levures sont également capables de réguler la fonctionnalité d'une enzyme à différents niveaux, notamment protéique (modification covalente de la structure, régulation allostérique). Or ces phénomènes de régulation sont généralement plus rapides (10⁻⁵ à 10² secondes) que ceux impliquant l'expression de gènes (> 10³ secondes) (Harder & Roels, 1982). Le pic d'activité spécifique observé en fin de phase de croissance correspondrait donc plutôt à une régulation d'un pool protéique déjà formé, bien qu'une régulation de l'expression des gènes codant pour la Catp ne puisse être écartée.

432. CONCLUSIONS ET RECAPITULATIF

En conclusion, aucun changement significatif des performances fermentaires globales n'a pu être mis en évidence par l'ajout de carnitine. Les titres finaux et rendements de production sont ainsi très similaires. Cependant, un ou plusieurs gènes codant pour la carnitine-acétyl transférase sont bien exprimés, ainsi que celui codant pour le transporteur plasma-membranaire de la carnitine. La présence de cette molécule semble également diminuer la synthèse ou l'activation des acétaldéhyde déshydrogénases. Ce phénomène pourrait ainsi expliquer la modulation de la vitesse spécifique de production de l'acide acétique observée pour des taux de croissance élevés.

Enfin, la carnitine n'a, semble-t-il, pas joué de rôle positif sur les phénomènes d'apoptose et de perte de viabilité cellulaire.

La participation effective et significative du complexe enzymatique de la carnitine-acétyl transférase dans le métabolisme cellulaire est donc remise en doute lors de cultures discontinues alimentées, en excès de glucose et en excès de glucose plus acide oléique. Il est néanmoins possible que la concentration intracellulaire en carnitine appliquée ici, définie d'après des essais *in vitro*, ne soit pas suffisante pour observer un effet durable sur la phase de croissance.

Chapitre 5

Etude de la surexpression du gène *CIT2*

CHAPITRE 5 ETUDE DE LA SUREXPRESSON DU GENE <i>CIT2</i>	161
51. INTRODUCTION	165
52. RESULTATS	167
521. PARAMETRES DE LA CULTURE « CIT2+ »	167
5211. Evolution des masses cumulées lors de la culture « CIT2+ »	167
5212. Comparaison des rendements des cultures « WT » et « CIT2+ »	168
5213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « WT » et « CIT2+ »	169
5214. Evolution des rendements en O ₂ et CO ₂ lors des cultures « WT » et « CIT2+ »	171
5215. Mesure de l'activité spécifique de Citp lors des cultures « WT » et « CIT2+ »	172
5216. Profil de viabilité lors des cultures « WT » et « CIT2+ »	172
522. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES	173
5221. Répartition intracellulaire du glucose entrant	173
5222. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire	175
53. DISCUSSIONS	177
531. EVOLUTION DES CAPACITES FERMENTAIRES	177
5311. Impact de la surexpression de <i>CIT2</i> sur les produits de fermentation	177
5312. Impact de la surexpression de <i>CIT2</i> sur la croissance	178
5313. Evolution de l'impact de la surexpression de <i>CIT2</i>	179
532. REDISTRIBUTION DU CARBONE	179
5321. Transport du carbone vers la mitochondrie	179
5322. Régénération des pools de cofacteurs	181

51. INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae possède plusieurs voies de transport de l'acétyl-coA à travers la membrane mitochondriale, parmi lesquels le système de la citrate synthase (Cit2p). Le gène *CIT2* code pour une citrate synthase initialement considérée comme extra-mitochondriale (Rickey & Lewin, 1986). Plus précisément, cette enzyme serait localisée au niveau des peroxysomes (Lewin et al., 1990). Cependant, certaines études la place également dans le cytosol (Kispal et al., 1988) ou aussi potentiellement dans la mitochondrie (Lee et al., 2006).

Elle est étroitement liée à la consommation des acides gras *via* le cycle peroxysomale du glyoxylate. Le gène codant possède d'ailleurs la séquence ORE et est ainsi induit en présence d'acide oléique (Chelstowska & Butow, 1995). Il est également le seul gène du cycle peroxysomale du glyoxylate dont l'expression soit soumise à la régulation mitochondriale rétrograde RTG2 (Liu & Butow, 2006). *ICL1*, *MDH3* et *MLS1* n'y sont pas sujets. Chez les cellules montrant une déficience respiratoire (cellules ρ^-), les gènes des voies anaplérotiques sont induits, et *CIT2* est ainsi surexprimé 30 fois. Ceci permet aux cellules ρ^- de synthétiser des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques et du cycle du glyoxylate (citrate, malate, succinate). Wiebe *et al.* (2008) ont également montré une augmentation d'ARN messager correspondant à ce gène avec l'augmentation de l'apport en dioxygène, en culture continue limitée en glucose. De plus, il faut noter qu'un stress acétate a conduit à une surexpression de ce gène (Kawahata et al., 2006).

En outre, la délétion de ce gène ne semblerait pas impacter la croissance et la production d'éthanol lors de cultures discontinues sur glucose, à une concentration initiale de 20 g L⁻¹ (Chen et al., 2012). Mais selon cette même étude, la croissance d'un mutant Δ *CIT2* est réduite sur substrats non fermentescibles (dont l'acide acétique). Lorsque le glucose est totalement consommé par ces cellules en réacteur discontinu, seul l'éthanol est alors reconstitué, sans permettre la croissance cellulaire, alors que l'acide acétique continu à être produit.

Lors de cultures en bioréacteur avec glucose comme seule source de carbone, la surexpression de *CIT2* pourrait ainsi permettre de mimer partiellement une déficience respiratoire, et ainsi transporter une partie de l'acétyl-coA cytosolique vers la mitochondrie sous forme de citrate. Cit2p étant capable d'interagir normalement avec la malate déshydrogénase mitochondriale (Mdh1p) en condition *in vitro* (Vélot et al., 1999), le citrate serait alors métabolisé *via* le cycle des acides tricarboxyliques. Etant donné que ce gène est induit en présence d'acide oléique, sa surexpression pourrait également mener à une levée partielle de l'effet Crabtree comme celle observée lors des cultures sur glucose plus acide oléique.

Mouret (2006) a étudié la souche CEN.PK 133.7D surexprimant ce gène (*CIT2+*) en culture continue. Une augmentation de 50 % des vitesses de consommation d'O₂ et de production de CO₂ a été observée en régime permanent par rapport à la souche sauvage, traduisant une augmentation du flux de carbone vers le cycle des acides tricarboxyliques. Le rendement en biomasse a cependant été diminué de 15 %, ce qui pourrait être expliqué par une limitation de la disponibilité en acétyl-coA cytosolique pour la synthèse de biomasse. Suite à un

pulse de glucose de 10 g L⁻¹, les productions de glycérol et d'acide acétique ont été diminuées de 68 et 38 %, respectivement, au profit de l'éthanol. Le QR demeurant sensiblement identique chez les deux souches, la surexpression ciblée de *CIT2* n'a donc pas permis de lever l'effet Crabtree « court terme ». En outre, une surexpression du gène *RTG2*, impliquant une induction de *CIT2*, a permis de limiter la production d'acide acétique chez *S. cerevisiae* (Yoshida & Yokoyama, 2012).

L'impact de la surexpression de *CIT2* a ici été étudié sous l'effet Crabtree « long terme », en choisissant un mode de culture discontinu alimenté en excès de glucose. Cette stratégie pourrait permettre de redistribuer les flux de carbone au niveau du by-pass de la pyruvate déshydrogénase, en tirant le flux d'acide acétique vers la synthèse d'acétyl-coA plutôt que vers son excrétion. Ceci pourrait alors limiter la production d'acide acétique au profit du métabolisme oxydatif, et ainsi moduler le comportement de la cellule face aux stress acétate et éthanol.

La souche *CIT2+* a donc été cultivée en aérobiose en mode discontinu alimenté en excès de glucose. Les résultats de cette culture ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec la souche sauvage.

52. RESULTATS

521. PARAMETRES DE LA CULTURE « CIT2+ »

5211. Evolution des masses cumulées lors de la culture « CIT2+ »

D'après les résultats bruts de cette expérience, les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés bouclent respectivement à 100 % et 101 %. La culture a duré un total de 68 h, pendant lesquelles 1175 g de glucose ont été consommés pour permettre aux cellules de produire notamment 535 g d'éthanol, 25 g d'acide acétique et 21 g de glycérol (Figure 47). Les titres finaux de ces métabolites étaient respectivement de 125,5 g L⁻¹, 6,69 g L⁻¹ et 5,06 g L⁻¹ (Tableau 11). La phase de croissance a duré 26 h, pendant laquelle 50 g de biomasse ont en outre été produits, pour une concentration finale de 12,5 g L⁻¹. L'acide succinique a pour sa part été produit au cours des 31 premières heures. 2,6 g de ce métabolite ont alors été produits pour atteindre une concentration de 0,67 g L⁻¹. Il semble ensuite avoir été légèrement reconsommé jusqu'à la fin de l'expérience, atteignant une concentration finale de 0,57 g L⁻¹ pour une masse cumulée de 2,4 g. De plus, 2,2 g d'acide pyruvique ont été produits entre 0 et 35 h, atteignant 0,54 g L⁻¹. Puis les cellules ont reconsommé cet acide jusqu'à la fin de la culture, portant sa masse cumulée et sa concentration finale à 1,7 g et 0,37 g L⁻¹. Le dosage de l'acide citrique pas technique enzymatique n'a en revanche pas permis de mettre en évidence une quelconque excrétion de cette molécule dans le milieu de culture.

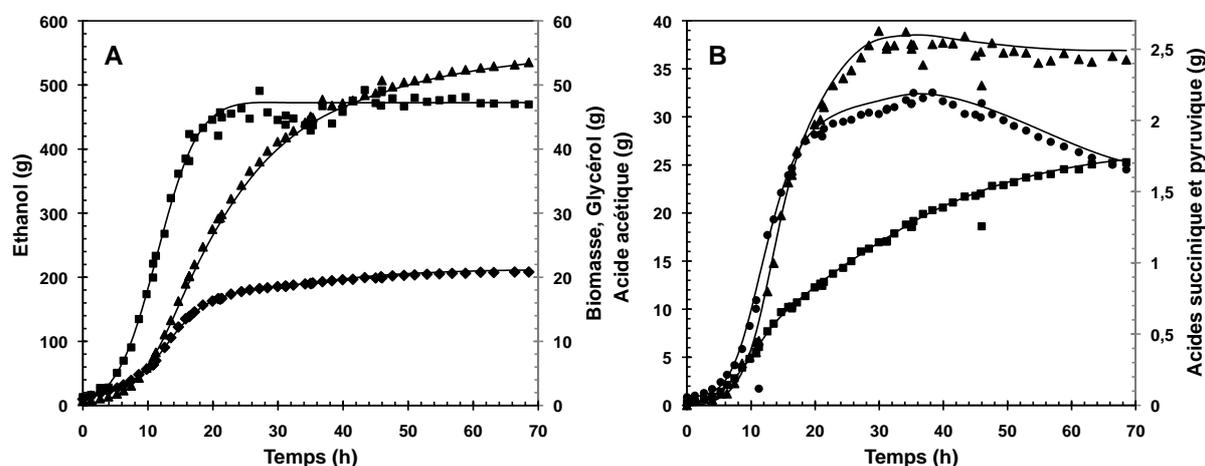


Figure 47 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose de la souche CIT2+. A représente (■) la biomasse, (▲) l'éthanol et (◆) le glycérol. B représente (■) l'acide acétique, (▲) l'acide succinique et (●) l'acide pyruvique. Les courbes représentent les données réconciliées.

5212. Comparaison des rendements des cultures « WT » et « CIT2+ »

Le calcul des rendements sur glucose consommé rapporte des différences significatives du comportement de *S. cerevisiae* dans les deux expériences (Tableau 11). Lors de la phase de croissance, le rendement en éthanol est ainsi de 0,402 g g_{Glucose}⁻¹ pour la souche WT, contre seulement 0,350 g g_{Glucose}⁻¹ pour la souche CIT2+. A l'inverse, le rendement en acide acétique est augmenté de 0,0102 g g_{Glucose}⁻¹ à 0,0187 g g_{Glucose}⁻¹. Aucune différence significative n'a en revanche pu être mise en évidence en ce qui concerne les rendements en biomasse, glycérol et en acides succinique et pyruvique.

Tableau 11 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D et CIT2+.

		WT	CIT2+
VITESSES SPECIFIQUES			
μ_{max}	h ⁻¹	0,35 +/- 0,01	0,33 +/- 0,01
Q_{éthanol max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	1,31 +/- 0,05	1,12 +/- 0,04
Q_{acétate max}	mg g ⁻¹ h ⁻¹	34 +/- 4	105 +/- 6
Q_{glucose max}	g g ⁻¹ h ⁻¹	3,02 +/- 0,04	2,88 +/- 0,04
RENDEMENTS GLUCOSE			
Y_{biomasse / glucose}	g g ⁻¹	0,174 +/- 0,005	0,174 +/- 0,003
Y_{éthanol / glucose global}	g g ⁻¹	0,432 +/- 0,008	0,402 +/- 0,008
Y_{éthanol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,402 +/- 0,008	0,350 +/- 0,008
Y_{glycérol / glucose global}	g g ⁻¹	0,0142 +/- 0,0012	0,016 +/- 0,001
Y_{glycérol / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,021 +/- 0,002	0,024 +/- 0,002
Y_{acétate / glucose global}	g g ⁻¹	0,0158 +/- 0,0006	0,021 +/- 0,001
Y_{acétate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0102 +/- 0,0006	0,0187 +/- 0,0012
Y_{succinate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,002 +/- 0,001	0,002 +/- 0,001
Y_{pyruvate / glucose croissance}	g g ⁻¹	0,0031 +/- 0,0007	0,0031 +/- 0,0008
CONCENTRATIONS FINALES			
Biomasse	g L ⁻¹	13,2 +/- 0,3	12,5 +/- 0,3
Ethanol	g L ⁻¹	126,8 +/- 0,6	125,5 +/- 0,6
Glycérol	g L ⁻¹	4,96 +/- 0,02	5,06 +/- 0,02
Acétate	g L ⁻¹	5,28 +/- 0,04	6,69 +/- 0,04
Succinate	g L ⁻¹	0,53 +/- 0,01	0,58 +/- 0,01
Pyruvate	g L ⁻¹	0,36 +/- 0,01	0,35 +/- 0,01
P_{critique}	g L ⁻¹	86 +/- 3	86 +/- 3

Ces différences se retrouvent également si l'on considère l'ensemble des cultures. Le rendement en éthanol est ainsi plus faible chez CIT2+, à $0,402 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$, que chez WT, à $0,432 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ (Tableau 11). Le rendement en acide acétique est quant à lui plus élevé et atteint $21 \text{ mg g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ chez la souche modifiée, contre $15,8 \text{ mg g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ chez la sauvage.

5213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « WT » et « CIT2+ »

Les résultats des deux expériences présentent également certaines dissemblances concernant les profils des vitesses spécifiques. Le taux de croissance maximal demeure équivalent, à $0,35 \text{ h}^{-1}$ pour la souche sauvage contre $0,33 \text{ h}^{-1}$ pour CIT2+ (Tableau 11). Le profil de ce taux de croissance présente une évolution similaire en fonction de la concentration en éthanol (Figure 48), mais avec un léger décalage. Pour une même concentration en éthanol, CIT2+ présente ainsi un taux de croissance légèrement inférieur à celui de WT, jusqu'à $0,06 \text{ h}^{-1}$. La P_{critique} , concentration en éthanol à partir de laquelle la cellule arrête sa croissance, demeure cependant rigoureusement identique, à 86 g L^{-1} (Tableau 11).

La concentration critique en acides organiques totaux pour la croissance est cependant plus élevée pour la souche CIT2+, à $0,072 \text{ mol L}^{-1}$, que pour la souche sauvage, à $0,064 \text{ mol L}^{-1}$. Cette différence se confirme au vu de l'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration en acide acétique (Figure 48). Celui-ci chute effectivement plus rapidement chez la souche sauvage.

En outre, la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol atteint $1,31 \text{ g g}_x \text{ h}^{-1}$ contre seulement $1,12 \text{ g g}_x \text{ h}^{-1}$ respectivement pour les souches WT et CIT2+ (Tableau 11). Comme pour le taux de croissance, le profil de cette vitesse spécifique en fonction de la concentration en éthanol présente une évolution similaire mais décalée lors des deux expériences (Figure 48). Pour une même concentration en éthanol, CIT2+ présente ainsi une vitesse spécifique de production d'éthanol inférieure à celui de WT, jusqu'à $0,3 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La production d'éthanol est stoppée à des concentrations en acides organiques de $0,097 \text{ mol L}^{-1}$ et $0,120 \text{ mol L}^{-1}$ et à des concentrations en éthanol de $126,8 \text{ g L}^{-1}$ et $125,8 \text{ g L}^{-1}$, respectivement pour les souches WT et CIT2+.

Enfin, la vitesse spécifique maximale de production d'acide acétique se révèle être plus élevée chez CIT2+, à $105 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, que chez WT, à $34 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 11). Cette vitesse est par d'ailleurs nettement supérieure chez la souche génétiquement modifiée pour des concentrations en acides acétique inférieures à $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (Figure 48). Dans cet intervalle de concentrations, la vitesse spécifique de production d'acide acétique chute ainsi de 105 à $17 \text{ mg g}_x \text{ h}^{-1}$ chez CIT2+ et de seulement 34 à $14 \text{ mg g}_x \text{ h}^{-1}$ chez WT. Pour des concentrations supérieures, $q_{\text{Acétate}}$ diminue jusqu'à atteindre une valeur quasiment nulle dans les deux cultures. Cette chute est cependant plus rapide chez la souche sauvage chez laquelle elle s'arrête à $5,25 \text{ g L}^{-1}$, contre $6,69 \text{ g L}^{-1}$ chez CIT2+.

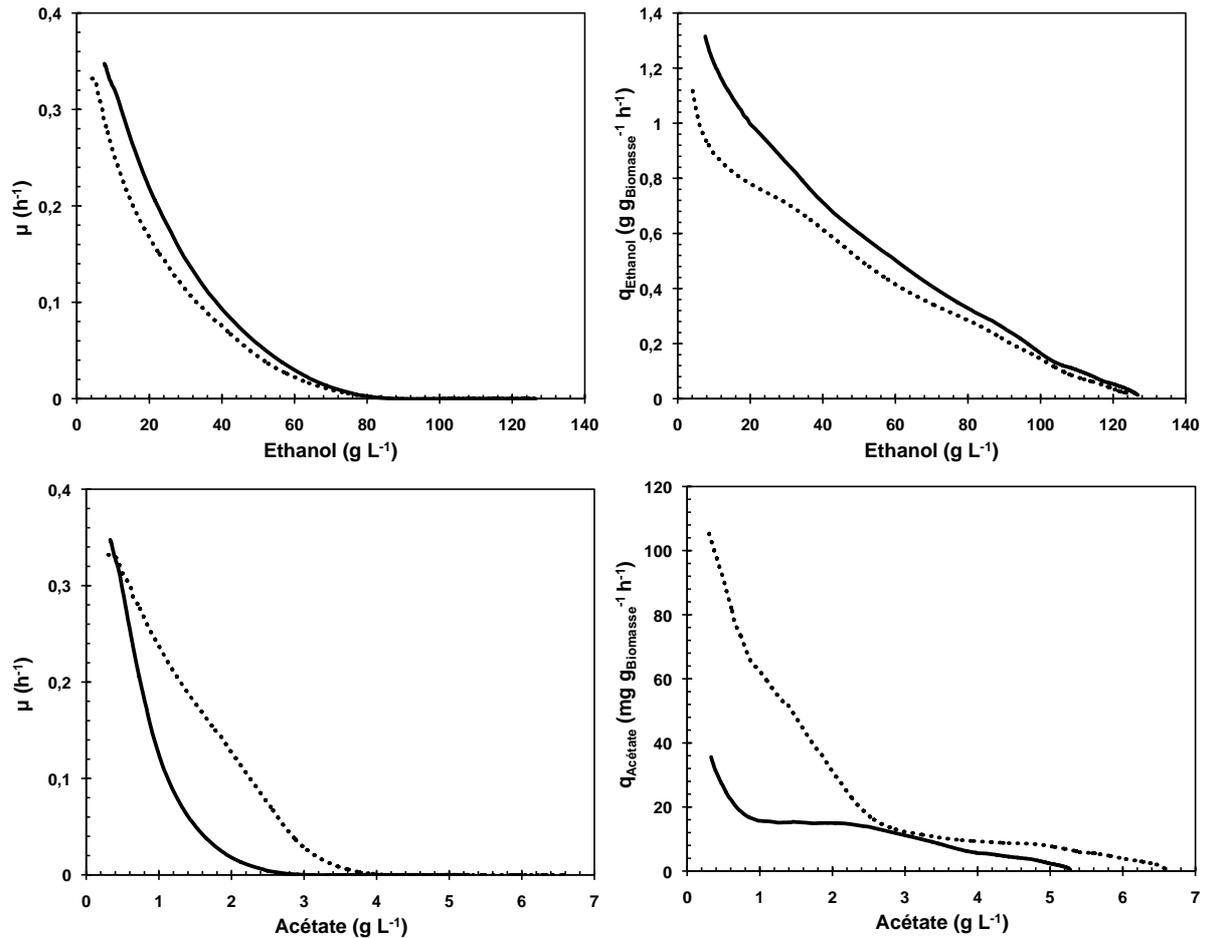


Figure 48 : Evolution du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol, et du taux de croissance et de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction de la concentration en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D (—) et CIT2+ (···).

Les vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique évoluent également de manière différente en fonction de la production de biomasse (Figure 49). q_{Ethanol} est ainsi significativement plus élevé chez WT que chez CIT2+ pour des taux de croissance supérieurs à $0,12 h^{-1}$ ($0,80$ contre $0,72 g_x h^{-1}$). $q_{\text{Acétate}}$ est quant à lui clairement plus élevé chez CIT2+ pour des taux de croissance supérieurs à $0,10 h^{-1}$ (24 contre $15 mg g_x h^{-1}$). Il faut noter que l'écart entre les deux souches s'amenuise avec la diminution du taux de croissance.

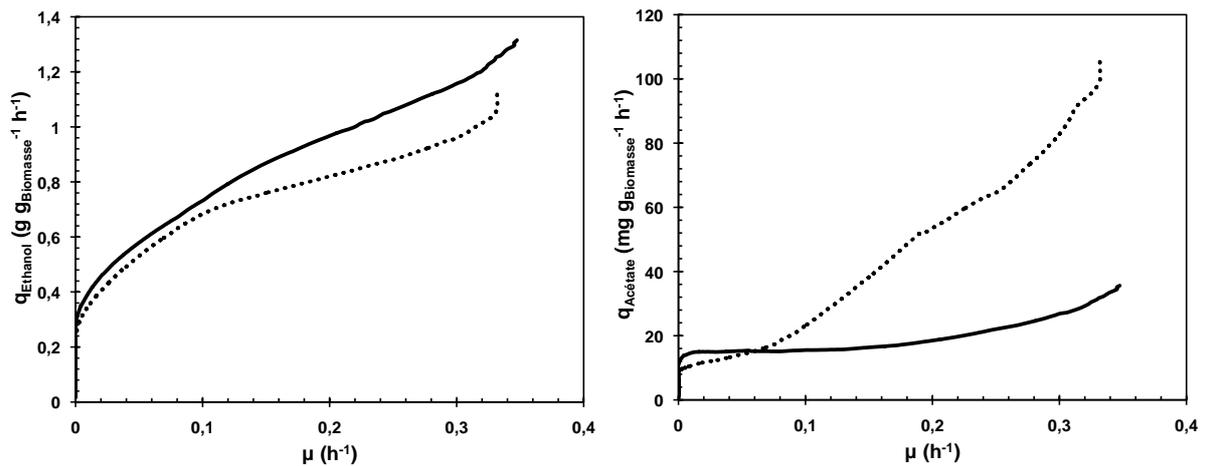


Figure 49 : Evolution des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D (—) et CIT2+ (···).

5214. Evolution des rendements en O₂ et CO₂ lors des cultures « WT » et « CIT2+ »

La synthèse d'une mole d'éthanol est couplée à celle d'une mole de dioxyde de carbone. Le rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produits est relativement constant en fonction du taux de croissance pour les deux souches, mais s'établit autour de 1,08 mol mol_{Ethanol}⁻¹ chez WT contre 1,11 mol mol_{Ethanol}⁻¹ chez CIT2+ (Figure 50).

La vitesse spécifique de consommation d'oxygène est elle aussi plus élevée chez la souche surexprimant *CIT2* que chez la sauvage, pour vitesses spécifiques de consommation de glucose supérieures à 0,5 g g_x⁻¹ h⁻¹ (Figure 50). Chez WT, sa valeur diminue ainsi de 1,67 mmol g_x⁻¹ h⁻¹ pour $q_{\text{Glucose,max}}$, à 0,48 mmol g_x⁻¹ h⁻¹ pour $q_{\text{Glucose}} = 0,5 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$. Il diminue plus rapidement chez CIT2+, passant de 1,92 à 0,53 mmol g_x⁻¹ h⁻¹.

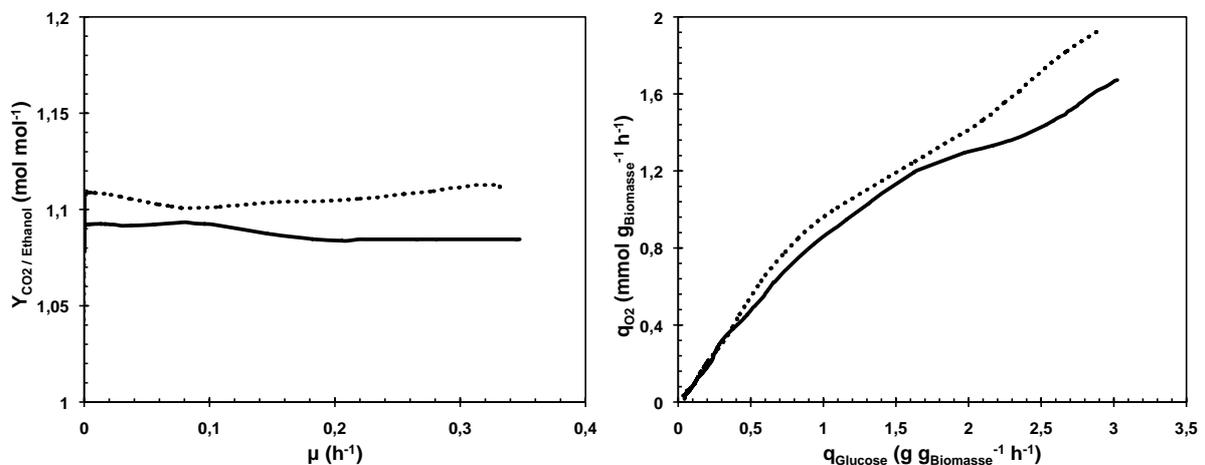


Figure 50 : Evolution du rendement en CO₂ sur éthanol produits et de la vitesse spécifique de consommation d'O₂ en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches CEN.PK 113-7D (—) et CIT2+ (···).

5215. Mesure de l'activité spécifique de Citp lors des cultures « WT » et « CIT2+ »

Des dosages enzymatiques ont été réalisés tout au long de la culture afin de déterminer l'évolution de l'activité spécifique de la Citp (Figure 51). Chez la souche sauvage, elle chute pendant les 30 premières heures d'environ 149 à 50 mU mg_{protéines}⁻¹. Puis elle présente un plateau autour de 50 mU mg_{protéines}⁻¹ jusqu'à la toute fin de la culture, ou elle chute à environ 34 mU mg_{protéines}⁻¹. L'évolution du profil de l'activité spécifique de la Citp est différente chez CIT2+. Elle est nettement plus élevée et ne semble pas chuter durant la phase de croissance, s'établissant ainsi entre 256 et 293 mU mg_{protéines}⁻¹.

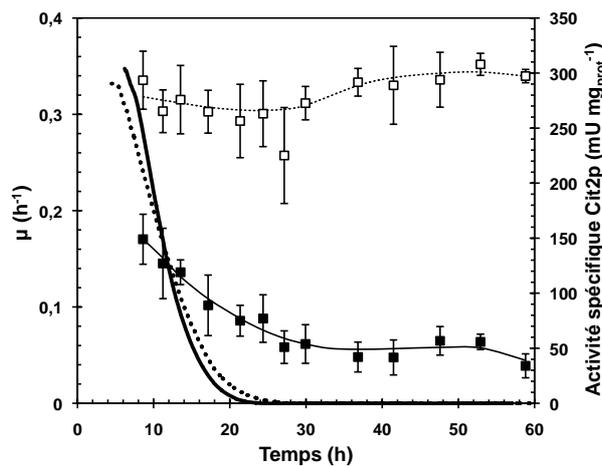


Figure 51 : Evolution du taux de croissance (lignes) et de l'activité spécifique de la citrate synthase (symboles), lors des cultures discontinues alimentées de la souche WT (■ ; —) et de la souche CIT2+ (□ ; ···).

Il faut noter que l'activité spécifique de la Citp représente l'activité globale de la citrate synthase, et regroupe donc les isoformes mitochondriaux et non mitochondriaux. Cependant, il a déjà été montré dans la littérature que la fraction de l'activité spécifique correspondant à la Cit2p est très faible par rapport à celle de la Cit1p lors de cultures sur glucose (Liao *et al.*, 1991).

5216. Profil de viabilité lors des cultures « WT » et « CIT2+ »

La viabilité des cellules a également été mesurée tout au long des expériences (Figure 52). L'évolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol ne présente aucune différence entre les deux souches. L'amorce de la chute de viabilité a ainsi lieu à 95 g L⁻¹ dans les deux cas. En revanche, ce profil est dissemblable en fonction de la concentration en acide acétique. L'amorce de la chute de viabilité a ainsi lieu à 3 et 4 g L⁻¹, respectivement pour les souches WT et CIT2+. Puis cette viabilité chute jusqu'à 40 % pour une concentration en acide acétique de 5,28 g L⁻¹ chez la souche sauvage, contre 50 % pour 6,69 g L⁻¹ chez CIT2+.

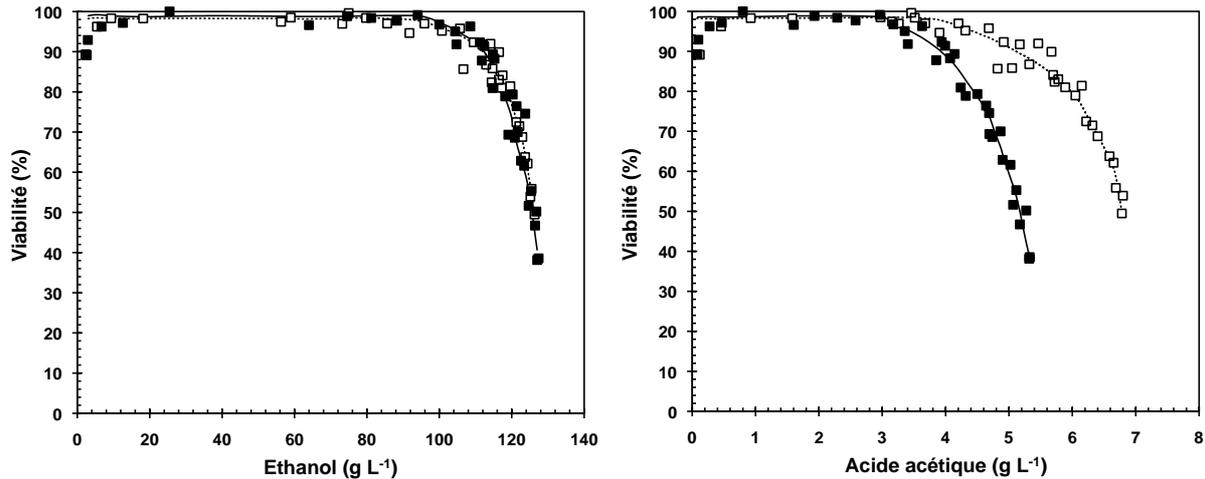


Figure 52 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose seul (■ ; —) et en excès de glucose supplémenté en carnitine (□ ; ···).

522. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES

Les flux intracellulaires ont été estimés pour les deux expériences au taux de croissance maximal. Les données ont été obtenues à l'aide du modèle métabolique, puis normées vis-à-vis de la consommation de glucose ($F_{A(\text{normé})} = F_A / F_{\text{Glucose}}$) afin d'être comparées (Figure 53).

5221. Répartition intracellulaire du glucose entrant

Plusieurs différences notables entre les deux souches sont observables sur la répartition des flux intracellulaires. La répartition du flux de glucose-6-P entre le cycle des pentose-phosphates et la glycolyse est ainsi fortement modifiée. Chez la souche CIT2+, la part de glucose-6-P envoyée vers le cycle des pentose-phosphates est ainsi diminuée de 77 % (19,5 contre 85,5 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). En parallèle, la part de ce métabolite dirigée vers la glycolyse augmente de 7,8 % chez CIT2+ (955 contre 886 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$).

En outre, l'activité du cycle des acides tricarboxyliques est considérablement augmentée chez la souche mutante. Celle-ci envoie effectivement plus de carbone du cytosol vers la mitochondrie. Bien que les flux de pyruvate dirigé vers la mitochondrie *via* la pyruvate carboxylase et la pyruvate déshydrogénase diminuent de 13 % (46,6 contre 53,6 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) et 44 % (12,8 contre 22,9 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$), respectivement, 42 % de l'acétyl-coA cytosolique formé, soit 35,7 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$, est envoyé vers la matrice mitochondriale sous forme de citrate. Ces phénomènes conduisent à un cycle des acides tricarboxyliques fonctionnant de manière cyclique chez CIT2+ et ce à des vitesses relativement élevées, contrairement à WT (chapitre 3321).

5222. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire

Chez la souche génétiquement modifiée, les besoins énergétiques de *S. cerevisiae* pour produire de la biomasse sont augmentés à μ_{\max} , de 27 % (8,7 contre 11,1 $\text{g}_X \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$) (Figure 53). Ceci traduit, pour un rendement en biomasse sur glucose identique, une production plus importante d'ATP chez CIT2+ *via* le flux glycolytique (87 contre 75 $\text{mmol}_{\text{ATP}} \text{g}_X^{-1}$) et la chaîne respiratoire (28 contre 15 $\text{mmol}_{\text{ATP}} \text{g}_X^{-1}$).

La régulation de la balance en cofacteurs NADH / NAD⁺ est également affectée par la surexpression du gène *CIT2* (Figure 54). Pour les deux souches, la majorité du NADH est produit par la glycolyse, à 98 % chez WT, contre 95 % chez CIT2+. Celle-ci régénère cependant plus de NADH *via* le cycle des acides tricarboxyliques (4,7 contre 1,5 %).

Le réoxydation du NADH est ensuite principalement assurée par la synthèse d'éthanol chez les deux souches, à 85 % pour la sauvage contre seulement 80 % pour la mutée. CIT2+ réoxyde alors plus de NADH *via* sa chaîne respiratoire (17 contre 12 %). La part de glycérol est par contre similaire, à 2,5 et 2,6 %.

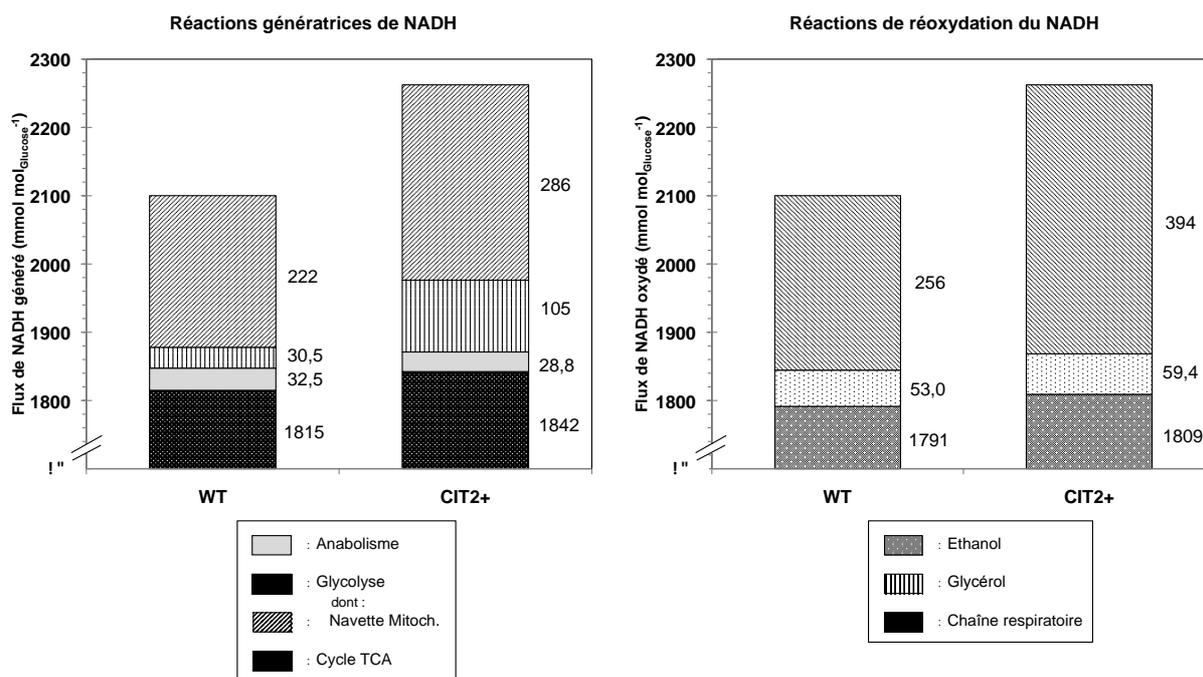


Figure 54 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures des souches CEN.PK 113-7D et CIT2+. Pointillé : réactions cytosoliques ; hachuré : réactions mitochondriales. Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol^{-1}).

En outre, la régulation de la balance NADPH / NADP⁺ est fortement impactée. L'oxydation du NADPH est due uniquement à l'anabolisme. Par contre, la régénération du NADPH se réalise de façon différente radicalement chez les deux souches (Figure 55).

La souche sauvage produit ainsi 66 % de NADPH *via* la synthèse d'acide acétique et 33 % *via* le cycle des pentose-phosphates. A l'inverse, la souche génétiquement modifiée produit ainsi seulement 17 % de NADPH *via* la synthèse d'acide acétique contre 83 % *via* le cycle des pentose-phosphates.

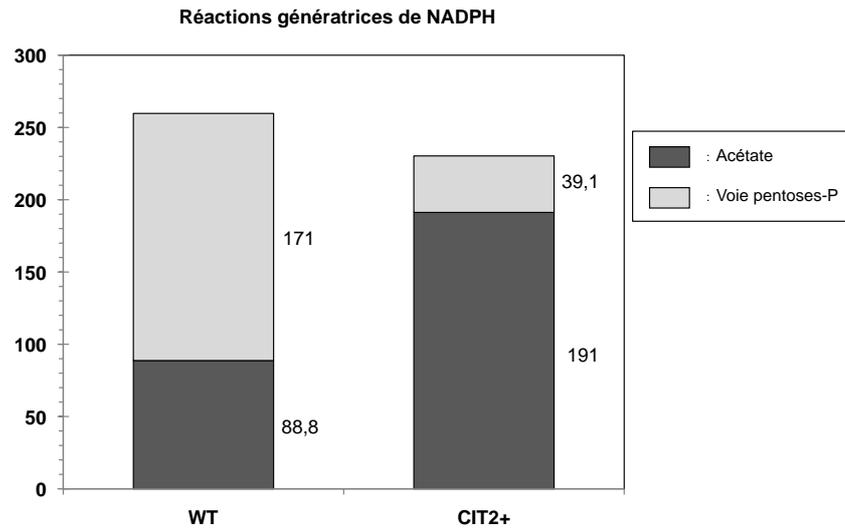


Figure 55 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures des souches CEN.PK 113-7D et CIT2+. Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol⁻¹).

53. DISCUSSIONS

531. EVOLUTION DES CAPACITES FERMENTAIRES

Dans la littérature, une seule étude a étudié la modulation de l'activité d'une citrate synthase en bioréacteur continu (Mouret, 2006), mais aucune n'a estimé l'impact de la surexpression du gène *CIT2* lors d'une culture discontinue alimentée en excès de glucose. Les études, qui impliquent la surexpression ou la suppression d'un seul ou des deux gènes (*CIT1* et *CIT2*) codant pour les deux isoformes de cette enzyme, se limitent en effet à des cultures discontinues avec des concentrations initiales en glucose faibles (inférieures à 20 g L⁻¹). Les expériences présentées ici apportent donc des informations sur le comportement d'une souche de *S. cerevisiae* surexprimant le gène *CIT2* en conditions de production intensive d'éthanol.

5311. Impact de la surexpression de *CIT2* sur les produits de fermentation

La culture en excès de glucose d'une souche de *S. cerevisiae* surexprimant le gène *CIT2* a pu mettre en évidence une modulation des capacités fermentaires globales des cellules. La vitesse spécifique de production d'éthanol a ainsi été impactée de manière négative chez CIT2+ (Tableau 11 ; Figure 49). Une partie de cette diminution peut s'expliquer par un flux de substrat carboné entrant dans la cellule amoindri chez CIT2+. La vitesse spécifique maximale de consommation de glucose a ainsi chuté de 3,02 à 2,88 g g⁻¹ h⁻¹, soit - 4,6 %, lorsque la vitesse spécifique maximale de production d'éthanol a diminué de 1,31 à 1,12 g g⁻¹ h⁻¹, soit - 14,5 %. La réduction du rendement en éthanol de 7 %, à 0,402 g g⁻¹, permet d'expliquer la part restante de la diminution de la vitesse spécifique de production d'éthanol (Tableau 11).

Cette minimisation de la production d'éthanol ne semble toutefois pas avoir affecté le titre final de manière drastique, puisqu'il perd seulement 1 %, à 125,5 g L⁻¹ (Tableau 11). En conséquence, le temps de culture a été logiquement plus long pour la souche CIT2+, de 9 heures. Et la productivité volumique du procédé a ainsi chuté de 21 %, passant de 2,44 g L⁻¹ h⁻¹ en utilisant la souche sauvage à 1,92 g L⁻¹ h⁻¹ en utilisant la souche CIT2+.

A l'inverse de l'éthanol, la production d'acide acétique a été fortement augmentée chez CIT2+. Une vitesse spécifique très nettement supérieure (Figure 49) a permis aux cellules de produire cet acide jusqu'à une concentration finale de 6,69 g L⁻¹, soit un gain de 27 % (Tableau 11). De cette façon, son rendement global de production par rapport au substrat consommé a augmenté de 33 % chez CIT2+.

Aucun impact significatif de la surexpression de *CIT2* n'a en revanche pu être mis en évidence sur la production du troisième indicateur important du métabolisme fermentaire, le glycérol. La concentration finale de ce métabolite a été très légèrement accrue chez CIT2+, à 5,06 g L⁻¹ (Tableau 11). Les rendements de production semblent également légèrement supérieurs chez cette souche.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés par Mouret (2006) lors d'une culture continue de la même souche. Après un pulse de glucose de 10 g L^{-1} , ce mutant présentait effectivement une diminution de la production de glycérol et d'acide acétique, respectivement de 68 et 38 %, au profit de l'éthanol. Il semblerait donc que la surexpression de *CIT2* provoque une modulation très différente du métabolisme de la levure, selon qu'elle soit soumise à l'effet Crabtree à court ou long terme.

5312. Impact de la surexpression de *CIT2* sur la croissance

La croissance microbienne a également été négativement impactée par la surexpression du gène *CIT2*. Il semblerait que la souche *CIT2+* présente un taux de croissance maximal 6 % plus faible que WT, à $0,33 \text{ h}^{-1}$. Mais l'écart entre les deux souches est à la limite de la marge d'erreur. En outre, *CIT2+* paraîtrait plus sensible à l'éthanol d'un point de vue de son taux de croissance (Figure 48). L'analyse de l'évolution du rendement en biomasse en fonction de la concentration en éthanol n'a toutefois rapporté aucune différence significative entre les deux souches (résultats non montrés). Ainsi, la diminution du taux de croissance résulterait plutôt de la diminution de la vitesse spécifique de consommation de glucose. En outre dans les deux expériences, la croissance a été stoppée à une P_{critique} identique de 86 g L^{-1} (Figure 48). Couplée à un taux de croissance plus faible, il en découle logiquement une concentration finale en biomasse inférieure de 5 %, à $12,5 \text{ g L}^{-1}$.

A l'inverse, l'effet inhibiteur de l'acide acétique sur la croissance microbienne semblerait partiellement levé chez *CIT2+*. Cet acide est connu pour son effet inhibiteur vis-à-vis du taux de croissance (Narendranath et al., 2001 ; Taherzadeh et al., 1997 ; Wright et al., 2011). Celui-ci est affecté par l'ajout de seulement $0,05 \text{ g L}^{-1}$ d'acide acétique au milieu de culture, et devient nul à une concentration comprise entre 6 et $6,6 \text{ g L}^{-1}$. Or dans les expériences présentées ici, *CIT2+* présente un taux de croissance nettement supérieur quelque soit la concentration en acide acétique considérée (Figure 48). La concentration critique pour la croissance a également été améliorée de 3 à 4 g L^{-1} , soit une augmentation de 25 %. Le rendement ATP a enfin chuté de 22 % chez la souche mutée ($8,7 \text{ g}_X \text{ mol}_{\text{ATP}}^{-1}$), en conséquence d'un flux de dissipation de l'ATP plus important révélé par l'estimation des flux intracellulaires.

D'après la littérature, la présence d'acide acétique dans le milieu de culture impliquerait l'activation d'une ou plusieurs ATPases plasma-membranaires. Ceci permettrait de réguler le pH intracellulaire en excréant notamment le surplus de protons et potentiellement celui d'ions acétate (Holyoak et al., 1999 ; Piper et al., 1998 ; Piper et al., 2001 ; Russell, 1992). *CIT2+* pourrait ainsi être capable de limiter l'impact négatif de l'acide acétique par l'utilisation accrue d'ATPases plasma-membranaires.

D'après la littérature, l'acide acétique exogène participe en outre à l'induction de l'apoptose. Chez la souche W303-1A, il provoque ainsi une chute de la viabilité (en terme de capacité à croître sur milieu solide) dès $1,2 \text{ g L}^{-1}$ (Ludovico et al., 2001). Ici, l'amorce de la chute de la viabilité s'est produite à une concentration en acide acétique 25 % plus élevée chez *CIT2+* (Figure 52). La surexpression du gène *CIT2* pourrait donc avoir permis de réduire la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par l'acide acétique.

5313. Evolution de l'impact de la surexpression de *CIT2*

La surexpression du gène *CIT2* a donc diminué les capacités fermentaires de *S. cerevisiae*. Il faut toutefois noter que l'amplitude de cet impact varie avec l'avancement de la culture. De la même façon que lors de la culture de la souche sauvage en présence d'acide oléique (chapitre 3), cet impact chute avec la diminution de la production de biomasse. Le gain observé sur la vitesse spécifique de production d'acide acétique, ainsi que la perte observée sur la vitesse spécifique de production d'éthanol, diminuent ainsi de manière concomitante avec le taux de croissance (Figure 49). Ce phénomène s'observe également à un niveau plus global, puisque la variation des rendements de production de ces deux métabolites est moindre sur l'ensemble de la culture que sur la phase de croissance (Tableau 11).

Les dosages enzymatiques ont montré une forte augmentation de la quantité de citrate synthase totale chez *CIT2+*. Celle-ci représente le cumul des isoformes Cit1p et Cit2p. D'après la littérature, le niveau basal de la citrate synthase extra-mitochondriale (Cit2p) est particulièrement faible comparé à celui de la forme mitochondriale (Cit1p) sur glucose comme seule source de carbone (Liao et al., 1991 ; Rickey & Lewin, 1986 ; Rosenkrantz et al., 1986). L'augmentation de l'activité spécifique totale observée chez *CIT2+* peut ainsi être assimilée à la synthèse de Cit2p. Contrairement à la souche sauvage, où l'activité spécifique chute durant les 30 premières heures, soit un temps plus long que la phase de croissance, *CIT2+* montre un niveau élevé tout au long de la culture (Figure 51).

Les mécanismes menant à une différence de comportement des cellules surexprimant le gène *CIT2* seraient donc directement liés à la synthèse de biomasse, puisque l'isoforme extra-mitochondriale de la citrate synthase est toujours disponible lorsque l'impact sur les capacités fermentaires cesse.

532. REDISTRIBUTION DU CARBONE

5321. Transport du carbone vers la mitochondrie

L'évolution du rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produits indique que la souche *CIT2+* a utilisé des voies métaboliques productrices de dioxyde de carbone autres que la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol (Figure 50). Le cycle des acides tricarboxyliques, qui permet à la cellule d'oxyder complètement l'acétyl-coA en CO₂ en régénérant le NADH mitochondrial, est une source importante de dioxyde de carbone.

La vitesse spécifique de consommation de dioxygène était également plus élevée chez *CIT2+* pour une même vitesse spécifique de consommation de glucose (Figure 50). Ces cellules ont donc du consommer plus de dioxygène pour métaboliser une même quantité de glucose. Cette molécule n'est utilisée par *S. cerevisiae* qu'en tant qu'accepteur final d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Un rendement plus élevé signifie donc que ce microorganisme a dirigé une plus grande partie du glucose vers le métabolisme oxydatif. En outre, l'activité de

la chaîne respiratoire réoxyde le pool de NADH mitochondriale, lui-même résultant notamment de l'activité du cycle des acides tricarboxyliques.

Le métabolisme mitochondriale semble donc avoir été favorisé chez la souche CIT2+, ce qui nécessiterait un apport de carbone plus important dans cet organite. *S. cerevisiae* dirige l'acide pyruvique vers le cycle des acides tricarboxyliques par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase et de la pyruvate carboxylase. Mais la Cit2p fait également partie d'un système de transport du carbone au travers de la membrane mitochondriale, sous l'influence de la régulation rétrograde (RTG2) (Liao et al., 1991 ; Liu & Butow, 2006).

D'après la littérature, le gène *CIT2* code pour une citrate synthase extra-mitochondriale. Cette enzyme est localisée dans les peroxyosomes (Lewin et al., 1990), bien que certaines études la place dans le cytosol ou encore la mitochondrie (Kispal et al., 1988 ; Lee et al., 2006). En excès de glucose, les peroxyosomes sont considérés comme absents chez *S. cerevisiae*, car les gènes responsables de leur prolifération sont réprimés par le glucose. Cependant, les travaux de Veenhuis *et al.* (1987) tendraient à montrer qu'ils sont bien présents dans ces conditions, mais de petite taille. En outre, les cellules ρ^- , qui présentent une déficience des mitochondries, présentent bien une activité Cit2p lorsqu'elles sont cultivées sur glucose.

Le modèle métabolique a donc été adapté afin d'estimer les flux intracellulaires. En l'absence présumée de peroxyosome sur glucose comme seule source de carbone, la Cit2p a ainsi été considérée comme cytosolique. Le carbone du citrate ainsi formé peut être envoyé *via* plusieurs transporteurs vers la mitochondrie, sous différentes formes correspondant aux intermédiaires du cycle du glyoxylate : citrate, succinate, malate, *etc.* (Palmieri et al., 2006). Etant donné que la souche CIT2+ n'excrète pas d'acide citrique et qu'elle n'a pas été configurée pour surexprimer les autres gènes du cycle du glyoxylate peroxyosomale, il est donc raisonnable de faire l'hypothèse que le citrate cytosolique, formé par la Cit2p, a été transporté vers la matrice mitochondriale *via* un transporteur membranaire, comme par exemple Yhm2p, en échange de l' α -cétoglutarate (Castegna et al., 2010) (Annexe 1).

L'analyse des flux intracellulaires semble confirmer les observations macroscopiques faites sur $Y_{CO_2/Ethanol}$ et $Y_{O_2/Glucose}$ (Figure 53). La réoxydation du NADH par la chaîne respiratoire a ainsi été augmentée de 54 % chez CIT2+. En revanche, le flux total de pyruvate entrant dans la mitochondrie a été réduit de 22 % (59,4 contre 76,5 mmol mol_{Glucose}⁻¹). Mais le transport du citrate cytosolique vers la mitochondrie a été réalisé à hauteur de 35,7 mmol mol_{Glucose}⁻¹ chez CIT2+. Cette molécule possédant six carbones, soit deux fois plus que le pyruvate, le flux de carbone dirigé vers la matrice mitochondriale a donc bien été accru chez la souche mutante. Les travaux de Mouret (2006) ont mené au même type d'observations lors d'une culture continue sur glucose en régime permanent. Il faut cependant tenir compte de la non compartimentation du modèle alors utilisé.

Cependant, il faut noter que l'excrétion d'acide acétique a parallèlement été augmentée chez CIT2+ (Figure 53). En outre, l'excrétion d'acide succinique n'a pas été affectée par la surexpression du gène *CIT2* (Tableau 11). Cet acide, considéré comme provenant du cycle des acides tricarboxyliques, avait pourtant été

produit dans des proportions plus importante en présence d'acide oléique, alors que l'activité mitochondriale était également augmentée. La cellule génétiquement modifiée semblerait donc incapable d'envoyer la totalité du flux supplémentaire d'acide acétique vers la mitochondrie. La surexpression de *CIT2* ne permettrait donc pas d'augmenter la capacité respiratoire, comme il a été observé en présence d'acide oléique.

5322. Régénération des pools de cofacteurs

Chez la souche sauvage, le NADPH nécessaire à l'anabolisme est principalement fourni par le cycle des pentose-phosphates (66 %), puis par la synthèse d'acide acétique (33 %). En revanche, la souche *CIT2+* assure cette régénération de cofacteur de manière totalement inversée (17 contre 83 %) (Figure 55).

D'après les observations précédentes chez la souche modifiée, l'activité accrue de la *Cit2p* semble avoir tiré le flux de carbone vers le by-pass de la pyruvate déshydrogénase. La cellule étant incapable d'envoyer la totalité de ce flux supplémentaire vers la mitochondrie, le surplus a été excrété vers le milieu de culture sous forme d'acide acétique. La régénération du NADPH cytosolique, par l'intermédiaire de la synthèse de cet acide, a donc été fortement augmentée chez *CIT2+* (191 contre 88,8 mmol mol_{Glucose}⁻¹).

Or les besoins anaboliques en ce cofacteur n'ont pas augmenté de manière concomitante (Figure 53 ; Tableau 11). Afin de respecter la balance NADPH / NADP⁺, *CIT2+* a donc du diminuer le flux de glucose-6-P dirigé vers le cycle des pentoses-phosphates à son minimum requis pour fournir les précurseurs métaboliques spécifiques à ce cycle, comme semblent l'indiquer le flux inversé de glycéraldéhyde-3-P et celui très réduit de fructose-6-P renvoyés vers la glycolyse (Figure 53). Cette réduction de l'activité du cycle des pentose-phosphates a également été calculée lors d'une culture continue sur glucose, en régime permanent (Mouret, 2006).

Ce phénomène pourrait expliquer la légère diminution du taux de croissance. En effet, le cycle des pentose-phosphates étant réduit, il ne pourrait supporter une fourniture suffisante des précurseurs anaboliques qui lui sont spécifiques (ribose-5-P, érythrose-4-P).

En conséquence de cette réduction de l'importance du cycle des pentose-phosphates, le flux vers la glycolyse a été induit de 8 % chez *CIT2+* (955 contre 886 mmol mol_{Glucose}⁻¹) (Figure 53). Cette observation est étonnante, car l'acide citrique et l'ATP sont connus pour leur rôle inhibiteur de la phosphofructokinase, une enzyme clef du contrôle de la glycolyse. Or, outre la quantité de citrate, la quantité d'ATP générée a également été augmentée. Le rendement en ATP formé sur glucose consommé a ainsi gagné 13 %, à 2,25 mol_{ATP} mol_{Glucose}⁻¹ pour *CIT2+* contre 1,99 mol_{ATP} mol_{Glucose}⁻¹ pour WT.

Ce flux de glycolyse plus important ne se répercute cependant pas au niveau de la synthèse d'éthanol. Son flux est effectivement réduit de 3 % (Figure 53). L'acétaldéhyde semble donc être préférentiellement transformé en acide acétique, certainement sous l'influence de la *Cit2p* qui tire le flux de carbone en aval de cet acide. La perte en NAD⁺ formé parallèlement à l'éthanol est alors principalement compensée par une activité accrue de la chaîne respiratoire (Figure 54).

Chapitre 6

Etude de la suppression du gène *ALD6*

CHAPITRE 6 ETUDE DE LA SUPPRESSION DU GENE <i>ALD6</i>	185
61. INTRODUCTION	189
62. RESULTATS	190
621. PARAMETRES DES CULTURES	190
6211. Evolution des masses cumulées lors des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »	190
6212. Comparaison des rendements des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »	191
6213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »	192
6214. Evolution des rendements des souches « BY4741 » et « Δ ALD6 »	194
6215. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »	195
6216. Profil de viabilité lors des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »	196
622. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES	198
6221. Répartition intracellulaire du glucose entrant	198
6222. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire	200
6224. Répartition intracellulaire du glucose normée vis-à-vis de la biomasse	201
63. DISCUSSIONS	203
631. IMPACT SUR LES CAPACITES FERMENTAIRES	203
632. MODULATION DE LA SYNTHESE D'ACIDE ACETIQUE	203
633. IMPACT SUR LA BIOMASSE	205
6331. Impact sur la croissance cellulaire	205
6332. Impact sur viabilité cellulaire	207

61. INTRODUCTION

Lorsqu'elle est soumise à l'effet Crabtree, *S. cerevisiae* produit de l'acide acétique extracellulaire dont la majeure partie provient du by-pass de la pyruvate déshydrogénase (Saint-Prix et al., 2004). La délétion d'un ou plusieurs gènes codant pour les différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALD) a cependant permis de limiter l'excrétion d'acide acétique dans le milieu de culture (Saint-Prix et al., 2004). Il apparaît suite à cette étude que l'Ald6p, qui est NADP⁺ dépendante, est le principal isoforme à l'origine de la synthèse d'acide acétique. Dans la littérature, cet acide est considéré à la fois comme indésirable et nécessaire.

La présence d'acide organique est d'abord indésirable vis-à-vis du métabolisme cellulaire car il provoque un effet découplant entre la production de biomasse et d'énergie. Il existe un certain équilibre de cet acide entre les milieux intra et extracellulaires, régit par la différence de pH entre ces deux milieux. Au niveau intracellulaire, l'acide acétique est présent sous forme dissociée et non dissociée, selon un équilibre régit par le pH intracellulaire. Afin de limiter l'acidification du milieu intracellulaire, la cellule va alors utiliser son ATPase pour lui permettre d'expulser les protons ainsi libérés (Holyoak et al., 1999 ; Piper et al., 1998 ; Piper et al., 2001 ; Russell, 1992 ; Sigler & Höfer, 1991). Il semble en outre participer à l'induction de l'apoptose cellulaire à partir de 1,2 g L⁻¹ (Ludovico et al., 2001 ; Wissing et al., 2004).

A l'inverse, l'acide acétique serait également nécessaire au bon fonctionnement du métabolisme de la cellule puisqu'il est une source importante d'acétyl-coA (Stanley et al., 2010). Cette molécule est en effet le précurseur de nombreuses voies anaboliques cytosoliques ou mitochondriales, comme la lipogenèse ou encore la synthèse de protéines. En outre, la synthèse d'acide acétique à partir d'acétaldéhyde permet de régénérer les cofacteurs NADH ou NADPH selon l'isoforme de l'Aldp utilisé. Le NADPH est ensuite utilisé notamment pour la synthèse des acides gras. En condition de production intensive d'éthanol, la régénération du NADPH est donc d'autant plus importante que l'alcool produit un stress altérant l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule. Ce phénomène provoque en effet l'apparition d'une lipogenèse découplée de la croissance, dont le but est d'adapter le profil de phospholipides membranaires (Piper *et al.*, 1995 ; Stanley *et al.*, 2010).

La modulation directe de la synthèse d'acide acétique a été étudiée ici par la délétion du gène *ALD6* sous l'effet Crabtree « long terme », en choisissant un mode de culture discontinu alimenté en excès de glucose. Cette stratégie devrait permettre d'étudier d'une part le lien entre la synthèse de lipides et d'acide acétique au niveau de la fourniture d'acétyl-coA et de NADPH, et la diminution de l'effet découplant d'autre part.

Deux cultures aérobies ont ainsi été menées sur glucose comme seule source de carbone avec les souches BY4741 sauvage et BY4741 dont le gène *ALD6* a été délété (Δ ALD6).

62. RESULTATS

621. PARAMETRES DES CULTURES

6211. Evolution des masses cumulées lors des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »

D'après les résultats bruts de cette expérience, les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés bouclent respectivement à 97 % et 96 % pour la souche sauvage, et à 96 % et 96 % pour la souche mutée.

Les deux cultures ont duré un total de 61 h, pendant lesquelles 1015 g de glucose ont été consommés par BY4741, contre 848 g par Δ ALD6. Les cellules sauvages ont notamment produit 448 g d'éthanol et 50 g de glycérol, contre 385 g d'éthanol et 60 g de glycérol chez Δ ALD6 (Figure 56). Les titres finaux de ces métabolites étaient respectivement de 107,0 g L⁻¹ et 11,83 g L⁻¹ pour la culture « BY4741 », et de 96,6 g L⁻¹ et 14,94 g L⁻¹ pour la culture « Δ ALD6 » (Tableau 12).

Au cours de la phase de croissance de la souche BY4741, qui a duré 28 h, 43 g de biomasse ont en outre été produits, pour une concentration finale de 9,7 g L⁻¹. La phase de croissance de la souche Δ ALD6 a elle aussi duré 28 h, pour 34 g de biomasse produits et une concentration finale de 8,8 g L⁻¹ (Figure 56).

L'acide acétique a lui été produit de manière différente entre les deux expériences (Figure 56). Les cellules BY4741 en ont ainsi produit 5,9 g tout au long de la culture, pour une concentration finale de 1,46 g L⁻¹. Les cellules Δ ALD6 en ont quant à elles produit seulement 1,5 g, seulement à partir de la 26^e heure, pour une concentration finale de 0,41 g L⁻¹.

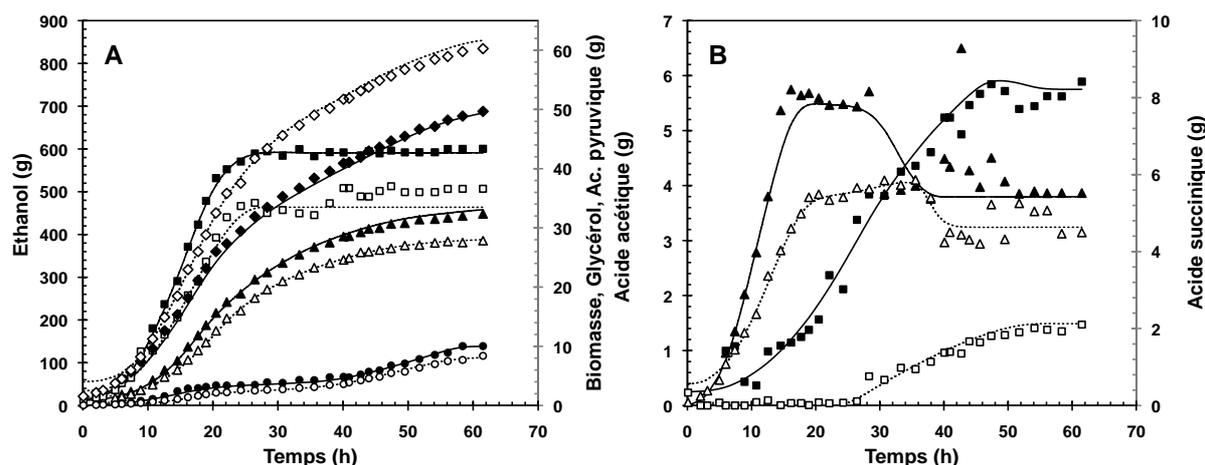


Figure 56 : Evolution des masses cumulées lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose des souches BY4741 (symboles pleins) et Δ ALD6 (symboles ouverts). A représente (\square) la biomasse, (\triangle) l'éthanol, (\diamond) le glycérol et (\circ) l'acide pyruvique. B représente (\square) l'acide acétique et (\triangle) l'acide succinique. Les courbes représentent les données réconciliées.

Les autres acides organiques ont été produits de façon plus similaire entre les deux souches (Figure 56). Chez BY4741, 8 g d'acide succinique ont ainsi été produit au cours des 17 premières heures. Puis son excrétion semble stoppée jusqu'à la 28^e heure, avant d'être partiellement reconstituée pendant dix heures, pour une concentration finale de 1 g L⁻¹. Chez Δ ALD6, ce métabolite a été principalement produit au cours des 19 premières heures, jusqu'à 5,4 g. Puis sa production a été fortement réduite jusqu'à la 36^e heure, atteignant 5,7 g, avant d'être partiellement reconstituée pendant six heures, pour une concentration finale de 0,91 g L⁻¹.

L'acide pyruvique a lui été produit en trois phases distinctes (Figure 56). Chez BY4741, 3,4 g ont été excrétés jusqu'à 20 h, puis seulement 1,4 g entre 20 et 41 h et enfin 5,2 g de 41 h à la fin. Les cellules Δ ALD6 en ont produit 2,2 g entre 0 et 22 h, puis seulement 1,7 g entre 22 et 40 h et enfin 8,4 g entre 40 h et la fin. Les concentrations finales en acide pyruvique étaient ainsi de 2,62 et 2,36 g L⁻¹, respectivement pour les souches BY4741 et Δ ALD6.

Enfin, des dosages enzymatiques sur l'ensemble de la culture n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque production d'acide citrique.

6212. Comparaison des rendements des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »

L'analyse des rendements sur glucose consommé confirme la différence du comportement des deux souches observée sur l'évolution des masses cumulées (Tableau 12).

Lors de la phase de croissance, le rendement en biomasse était ainsi de 0,129 g g_{Glucose}⁻¹ pour BY4741, contre seulement 0,112 g g_{Glucose}⁻¹ pour Δ ALD6. Le rendement en éthanol produit ne présentait quant à lui pas de différence significative, à 0,36 et 0,345 g g_{Glucose}⁻¹ respectivement pour les souches sauvage et mutée. Le rendement en glycérol a lui été augmenté de 0,078 g g_{Glucose}⁻¹ pour BY4741, à 0,124 g g_{Glucose}⁻¹ pour Δ ALD6. En revanche les acides succiniques et pyruviques présentaient des rendements moindres chez la souche mutée, respectivement à 0,08 et 0,088 g g_{Glucose}⁻¹, que chez la souche sauvage, à 0,013 et 0,0135 g g_{Glucose}⁻¹. Enfin, la production d'acide acétique était négligeable chez Δ ALD6, alors qu'elle a atteint un rendement de 0,0037 g g_{Glucose}⁻¹ chez BY4741 (Tableau 12).

Si l'on considère l'ensemble des cultures, les mêmes divergences ont été observées pour les coproduits de fermentation (Tableau 12). Le rendement en glycérol a ainsi été augmenté pour la culture « Δ ALD6 », de 0,056 à 0,077 g g_{Glucose}⁻¹. Celui en acide acétique a lui été réduit à 0,002 g g_{Glucose}⁻¹ pour la souche mutée, contre 0,0055 g g_{Glucose}⁻¹ pour la sauvage. Par contre le rendement global en éthanol semblerait supérieur pour la souche mutée, à 0,406 contre 0,39 g g_{Glucose}⁻¹. Il faut toutefois considérer cette différence avec précaution, puisqu'elle est à la limite des marges d'erreur de ces deux résultats.

Tableau 12 : Paramètres des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 et Δ ALD6.

		WT	Δ ALD6
VITESSES SPECIFIQUES			
μ_{\max}	h^{-1}	0,29 +/- 0,01	0,19 +/- 0,01
$q_{\text{éthanol max}}$	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$	1,02 +/- 0,06	0,82 +/- 0,06
$q_{\text{acétate max}}$	$mg\ g^{-1}\ h^{-1}$	9,3 +/- 0,8	2 +/- 1
$q_{\text{glucose max}}$	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$	2,86 +/- 0,06	2,16 +/- 0,07
RENDEMENTS GLUCOSE			
$Y_{\text{biomasse / glucose}}$	$g\ g^{-1}$	0,129 +/- 0,008	0,112 +/- 0,007
$Y_{\text{éthanol / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,39 +/- 0,01	0,406 +/- 0,007
$Y_{\text{éthanol / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,36 +/- 0,01	0,345 +/- 0,008
$Y_{\text{glycérol / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,056 +/- 0,007	0,077 +/- 0,004
$Y_{\text{glycérol / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,078 +/- 0,008	0,124 +/- 0,006
$Y_{\text{acétate / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,0055 +/- 0,0007	0,002 +/- 0,001
$Y_{\text{acétate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,0037 +/- 0,0005	! 0
$Y_{\text{succinate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,013 +/- 0,003	0,008 +/- 0,002
$Y_{\text{pyruvate / glucose global}}$	$g\ g^{-1}$	0,010 +/- 0,001	0,0097 +/- 0,0011
$Y_{\text{pyruvate / glucose croissance}}$	$g\ g^{-1}$	0,0135 +/- 0,0013	0,0088 +/- 0,0008
CONCENTRATIONS FINALES			
Biomasse	$g\ L^{-1}$	9,7 +/- 0,3	8,8 +/- 0,3
Ethanol	$g\ L^{-1}$	107,0 +/- 0,6	96,6 +/- 0,6
Glycérol	$g\ L^{-1}$	11,83 +/- 0,07	14,94 +/- 0,07
Acétate	$g\ L^{-1}$	1,46 +/- 0,06	0,41 +/- 0,06
Succinate	$g\ L^{-1}$	1,00 +/- 0,02	0,91 +/- 0,02
Pyruvate	$g\ L^{-1}$	2,62 +/- 0,03	2,36 +/- 0,03
P_{critique}	$g\ L^{-1}$	78 +/- 3	69 +/- 3

6213. Comparaison des vitesses spécifiques des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »

L'analyse des vitesses spécifiques a également révélé une diversité de résultats entre les deux cultures. Tout d'abord, la vitesse spécifique maximale de consommation de glucose a été réduite de 2,86 à 2,16 $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ chez la souche mutée (Tableau 12).

De plus le taux de croissance maximal, observé en tout début de croissance, a chuté de 0,29 h^{-1} chez BY4741 à seulement 0,19 h^{-1} chez Δ ALD6 (Tableau 12). Le taux de croissance de cette souche mutée est ainsi

toujours inférieur à celui de la sauvage en fonction de la concentration en éthanol (Figure 57). Toutefois, lorsque la viabilité est prise en compte dans le calcul de cette vitesse, appelée alors μ_{viable} , l'écart entre les deux souches est moins flagrant. Ce taux de croissance viable est alors supérieur chez BY4741 uniquement pour des concentrations faibles en éthanol, ou supérieures à 58 g L⁻¹ (Figure 57). Mais dans les deux cas la P_{critique} , concentration en éthanol à partir de laquelle la croissance s'arrête, a été diminuée chez ΔALD6 de 78 à 69 g L⁻¹.

En ce qui concerne l'éthanol, sa vitesse spécifique maximale de production a été nettement diminuée chez la souche mutée, de 1,02 à 0,82 g g⁻¹ h⁻¹ (Tableau 12). En revanche, cet écart est moins clair si l'on considère l'évolution de cette vitesse en fonction de la concentration en éthanol (Figure 57). Elle est alors réduite chez ΔALD6 pour des concentrations faibles en éthanol, ou supérieures à 88 g L⁻¹.

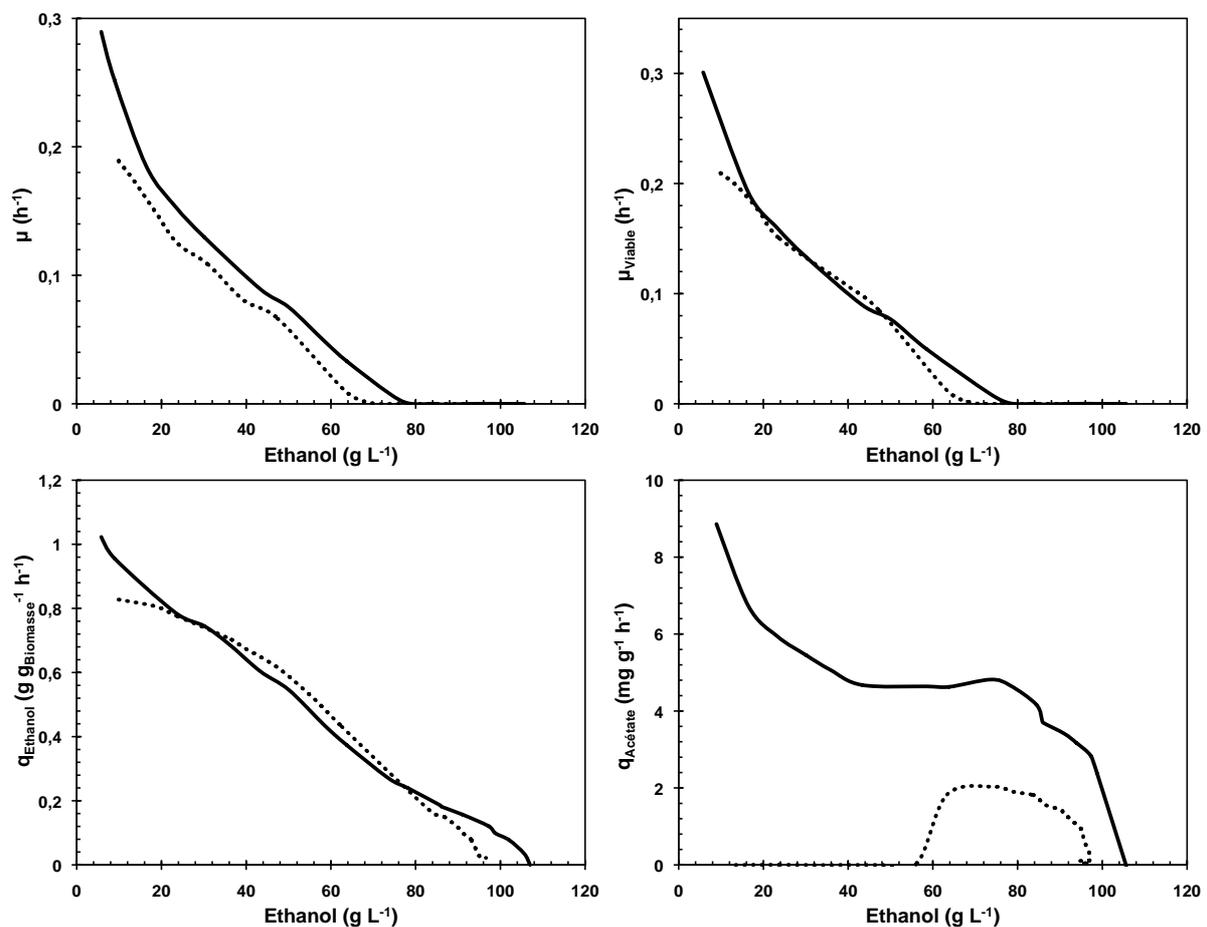


Figure 57 : Evolution des taux de croissance viable et apparent et des vitesses spécifiques de production d'éthanol et d'acide acétique en fonction de la concentration en éthanol, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 (—) et ΔALD6 (···).

Enfin, l'évolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique a été profondément modifiée. Les cellules génétiquement modifiées n'ont ainsi produit ce métabolite que pour des concentrations en éthanol

supérieures à 56 g L^{-1} et avec une vitesse moindre (Figure 57). La vitesse spécifique maximale de production d'acide acétique a ainsi chuté de $9,3$ à $2 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ chez ΔALD6 (Tableau 12).

La représentation des vitesses spécifiques en fonction du taux de croissance permet également de rapporter des différences importantes entre les deux cultures. La souche sauvage présente une vitesse spécifique de production d'acide acétique qui diminue avec le taux de croissance, de $9,3 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour μ_{max} , à $4,7 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour $\mu=0,9 \text{ h}^{-1}$ (Figure 58). $q_{\text{Acétate}}$ semble ensuite stagner autour de cette valeur pour des taux de croissance inférieurs. Par contre pour la souche mutée, la vitesse spécifique de production d'acide acétique passe d'une valeur nulle à $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$, à $2,0 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ à l'arrêt de la croissance, soit sa valeur maximale.

A l'inverse, la vitesse spécifique de production de glycérol est plus importante en fonction du taux de croissance chez ΔALD6 (Figure 58). Pour cette souche, il chute ainsi de $215 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour μ_{max} , à $34 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ à l'arrêt de la croissance. Chez BY4741, il diminue de $224 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour μ_{max} , à seulement $20 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour $\mu=0$.

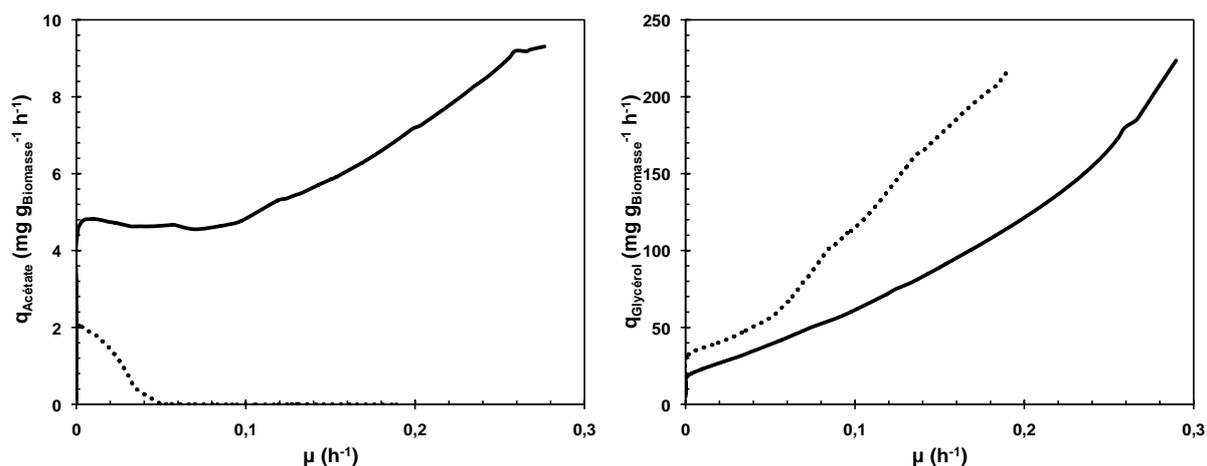


Figure 58 : Evolution des vitesses spécifiques de production d'acide acétique et de glycérol en fonction du taux de croissance, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 (—) et ΔALD6 (···).

6214. Evolution des rendements des souches « BY4741 » et « ΔALD6 »

La diminution du rendement en biomasse produite sur glucose consommé pendant la phase de croissance (Tableau 12) se retrouve également sur son évolution en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose (Figure 59). Ce rendement est ainsi significativement réduit quelque soit la vitesse de consommation de glucose des cellules. En outre, il devient nul pour un q_{Glucose} de $0,57 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour ΔALD6 , contre $0,46 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour BY4741.

De la même façon, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène était globalement réduite chez la souche mutée, notamment pour un q_{Glucose} supérieur à $1,5 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figure 59). A l'inverse, la vitesse spécifique de production de glycérol était plus élevée chez ΔALD6 que chez WT. Le profil de cette vitesse était similaire, bien que décalé pour un q_{Glucose} inférieur à $1,5 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mais pour un q_{Glucose} supérieur à cette valeur, la vitesse spécifique de production de glycérol chutait plus rapidement avec le q_{Glucose} chez ΔALD6 . Chez les deux souches, un « point de flexibilité » a pu être observé. Au delà de ce point, la q_{O_2} est maximale et indépendante de la vitesse spécifique de consommation de glucose. Dans cette zone, une participation plus importante de la synthèse de glycérol a ainsi pu être observée avec l'augmentation du q_{Glucose} (Figure 59).

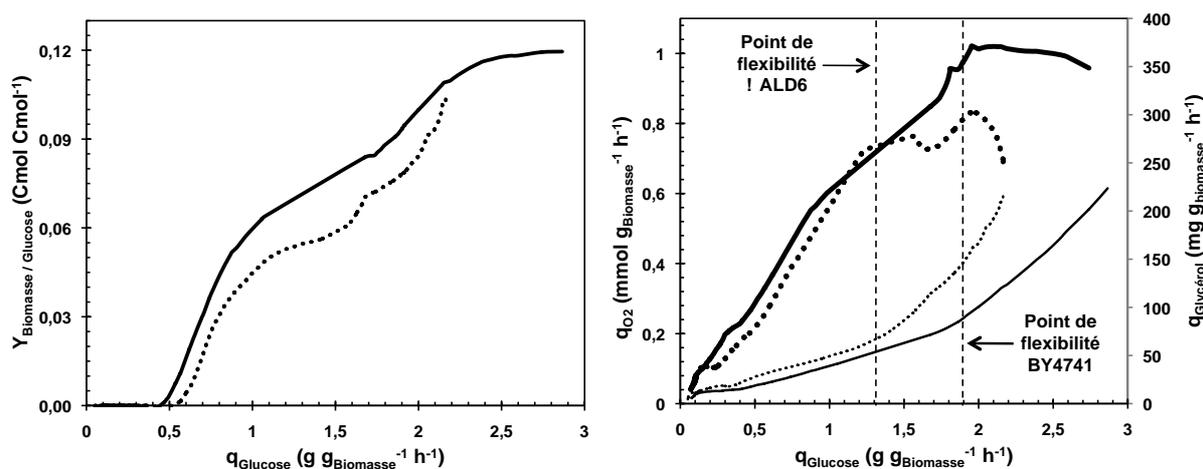


Figure 59 : Evolution du rendement en biomasse produite sur glucose consommé ainsi que des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène (trait épais) et de production de glycérol (trait fin), en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 (—) et ΔALD6 (···).

6215. Mesure des activités spécifiques lors des cultures « BY4741 » et « ΔALD6 »

Des dosages enzymatiques ont été réalisés tout au long de la culture afin de déterminer l'évolution des activités spécifiques de la G6pdh et de différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase. L'analyse de l'Ald6p rapporte des résultats très différents entre les deux expériences (Figure 60). Chez la souche BY4741, son activité spécifique a chuté de 105 à environ $25 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ entre la 9^e et la 19^e heure. Puis elle semble avoir présenté un plateau jusqu'à la 41^e heure, entre 17 et $25 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$. En revanche chez la souche ΔALD6 , l'activité spécifique de l'Ald6p semble s'être réduite à un plateau entre la 9^e et la 41^e heure, entre 10 et $17 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$. Dans les deux cas, un pic d'activité a eu lieu à la 44^e heure, à environ $41 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$.

A l'inverse, l'activité spécifique des Aldp NAD^+ dépendante ne semble pas avoir été significativement modifiée par la délétion du gène ALD6 (Figure 60). Elle a ainsi chuté de 22 à $0 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ entre la 9^e et la 18^e heure chez BY4741, contre une diminution de 27 à $0 \text{ mU mg}_{\text{protéines}}^{-1}$ entre la 9^e et la 19^e heure chez ΔALD6 . Puis elle est demeurée nulle tout le reste des cultures.

Le profil de l'activité spécifique de la G6pdh au cours du temps a également été modifié par la délétion du gène *ALD6* (Figure 60). Elle est demeurée relativement faible chez la souche sauvage. Elle semble ainsi avoir chuté entre la 9^e et la 16^e heure de 60 à 14 mU mg_{protéines}⁻¹, puis semble augmenté jusqu'à 31 mU mg_{protéines}⁻¹ jusqu'à la 19^e heure, avant de se stabiliser entre 31 et 42 mU mg_{protéines}⁻¹. En revanche chez la souche mutée, l'activité spécifique de la G6pdh a fortement augmenté entre la 9^e et la 30^e heure, passant ainsi de 36 à 164 mU mg_{protéines}⁻¹. Puis elle s'est stabilisée pendant la phase de production d'éthanol découplée de la croissance, à environ 170 mU mg_{protéines}⁻¹.

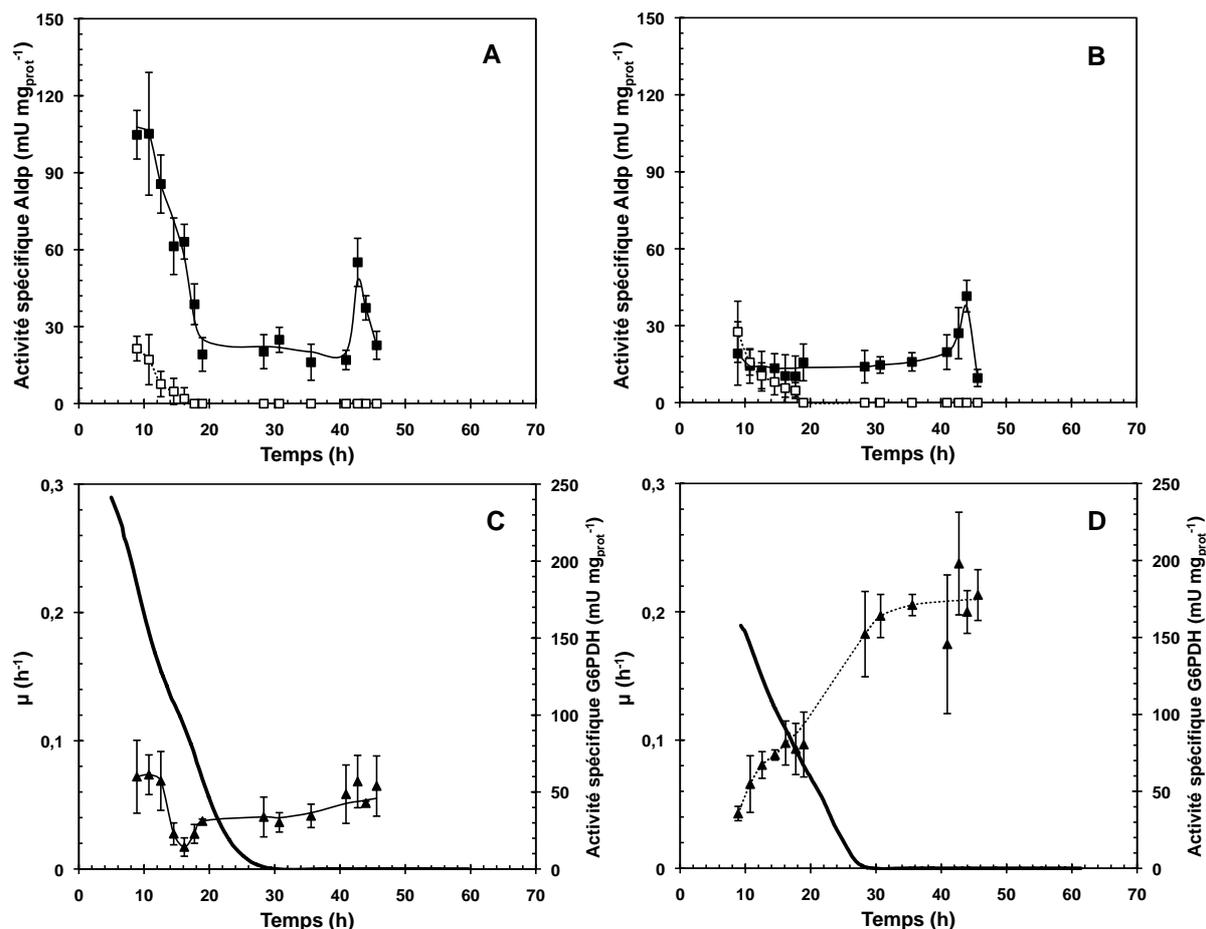


Figure 60 : Evolution des activités spécifiques des acétaldéhyde déshydrogénases NADP⁺ dépendante (■), et NAD⁺ dépendante (□), ainsi que du taux de croissance (—) et de l'activité spécifique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (▲) chez les souches BY4741 (A ; C) et Δ ALD6 (B ; D).

6216. Profil de viabilité lors des cultures « BY4741 » et « Δ ALD6 »

L'évolution du profil de viabilité en fonction du temps présente de grandes différences entre les deux souches (Figure 61). La souche sauvage avait ainsi une viabilité supérieure à 95 % la majeure partie de la culture. Puis celle-ci a commencé à chuter à des concentrations en éthanol de 85 g L⁻¹ et en acide acétique de 1,15 g L⁻¹. A l'arrêt de la production d'éthanol, les cellules BY4741 présentaient encore une viabilité de 70 %.

En revanche, la viabilité des cellules mutées a diminué dès le début de la culture et ce jusqu'à 75 % pour une concentration en éthanol d'environ 40 g L⁻¹. Puis elle semble avoir augmenté jusqu'à 80 % entre 40 et 60 g L⁻¹, avant de chuter à nouveau jusqu'à 35 % à la fin de la culture. Si l'on considère la viabilité en fonction de la concentration en acide acétique, elle a alors constamment diminué de 85 à 35 %.

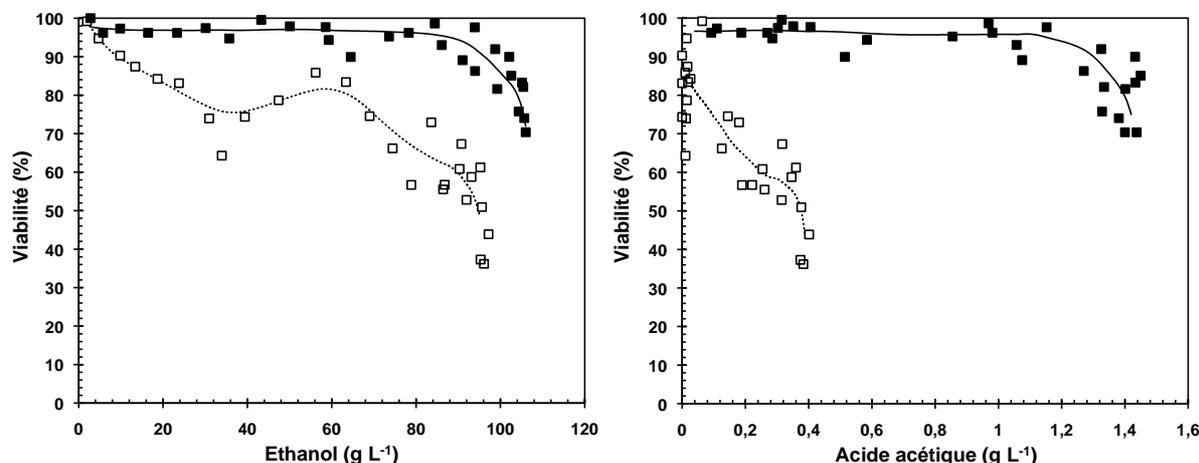


Figure 61 : Evolution du profil de viabilité en fonction de la concentration en éthanol et en acide acétique, lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose des souches BY4741 (■ ; —) et Δ ALD6 (□ ; ...).

Il est à noter que chez la souche Δ ALD6, la fin de la première phase de chute de viabilité (75 %) correspondait au pic de dioxyde de carbone dissous (calculé) dans le milieu de culture (13,7 mmol L⁻¹), à une concentration en éthanol d'environ 40 g L⁻¹ (Figure 62). L'excrétion d'acide acétique a quant à elle débuté au milieu de la phase de remontée de viabilité, soit une concentration en éthanol de 50 g L⁻¹. Sa vitesse spécifique de production a ensuite atteint sa valeur maximale (2 mg g_x⁻¹ h⁻¹) au début de la seconde phase de chute de viabilité, soit environ 65 g L⁻¹ d'éthanol. En revanche, aucune chute de la viabilité n'a été observée chez la souche sauvage à l'apparition du pic de CO₂ dissous (13,9 mmol L⁻¹). Il faut noter que le pourcentage de phospholipides composant les cellules, estimé d'après une analyse de la composition élémentaire de la biomasse, était plus élevé chez WT. La proportion de ces molécules a ainsi augmenté de 6 à 10,8 % chez les cellules sauvages, contre de seulement 3,5 à 9,5 % chez Δ ALD6.

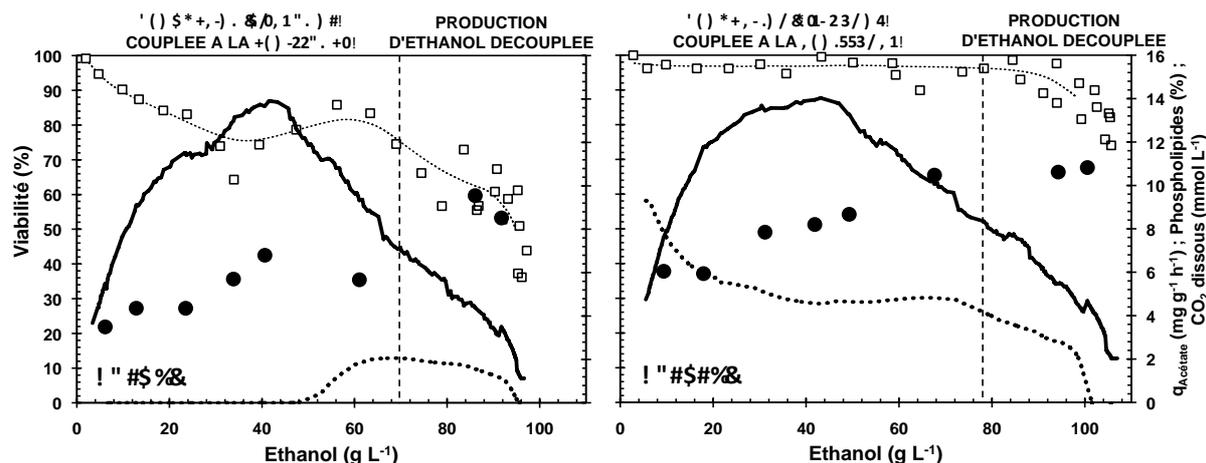


Figure 62 : Evolution du (\square) profil de viabilité, de la (\cdots) vitesse spécifique de production d'acide acétique, ainsi que du (---) CO_2 dissous et du (\bullet) pourcentage en phospholipides des cellules calculé, en fonction de la concentration en éthanol, chez BY4741 et ΔALD6 .

622. ESTIMATION DES FLUX METABOLIQUES

Les flux intracellulaires ont été estimés pour les deux expériences au taux de croissance maximal. Les données ont été obtenues à l'aide du modèle métabolique, puis normées vis-à-vis de la consommation de glucose ($F_{A(\text{normé})} = F_A / F_{\text{Glucose}}$) afin d'être comparées (Figure 63). Les paramètres du modèle ont été adaptés de manière à prendre en compte le changement de composition de la biomasse, calculée à partir des analyses élémentaires chez la souche ΔALD6 .

6221. Répartition intracellulaire du glucose entrant

Chez la souche ΔALD6 la part de glucose-6-P envoyée vers le cycle des pentose-phosphates, seule source de NADPH cytosolique, est diminuée de 11 % (70,6 contre 79,8 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). Le flux entrant dans la glycolyse est par contre légèrement augmenté (908 contre 897 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). Plus bas dans la chaîne glycolytique, la quantité de glycéraldéhyde-3-P transformée en glycérol-3-P est en revanche nettement plus importante de 27 % chez la souche mutée (195 contre 154 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$).

En fin de glycolyse, le pyruvate est envoyé dans des proportions similaires chez ΔALD6 et BY4741 vers le by-pass de la pyruvate déshydrogénase (1506 et 1507 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). En revanche, les flux de ce métabolite alimentant la mitochondrie sont modulés. L'entrée du pyruvate *via* la pyruvate déshydrogénase est ainsi augmentée de 38 % chez ΔALD6 (62,4 contre 45,1 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$), alors que celle *via* la pyruvate carboxylase est diminuée de 29 % (71,2 contre 100 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$). Dans cet organe, la réoxydation du NADH par la chaîne respiratoire y est similaire chez les deux souches. En outre, le cycle des acides tricarboxyliques se comporte de façon branchée chez la souche sauvage, mais de manière cyclique chez la mutante.

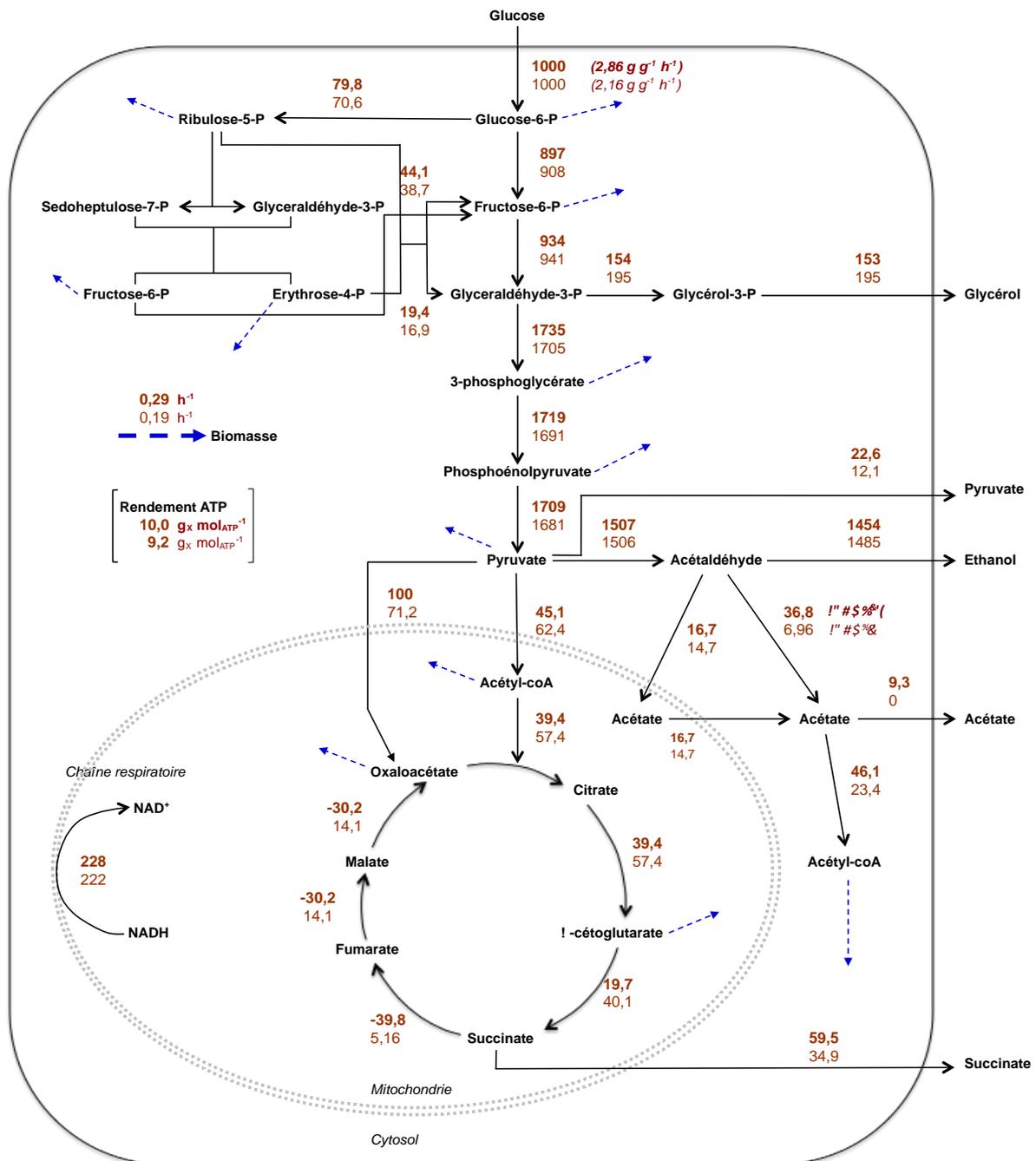


Figure 63 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 (nombres gras) et Δ ALD6 (nombres normaux). Les valeurs présentées ont été obtenues à μ_{max} puis normalisées vis-à-vis de la consommation de glucose ($F_{A(normé)} = F_A / F_{Glucose}$). Elles sont donc exprimées en $mmol mol_{Glucose}^{-1}$.

Enfin, le flux d'acétaldéhyde dirigé vers la synthèse d'acide acétique cytosolique est réduit de 81 % chez la souche génétiquement modifiée (6,96 contre 36,8 $mmol mol_{Glucose}^{-1}$). Il faut noter que cette réaction met en œuvre une Aldp NADP⁺ dépendante pour BY4741, mais une Aldp NAD⁺ dépendante pour Δ ALD6. La différence d'acétaldéhyde est alors envoyée vers l'éthanol chez la souche mutée.

6222. Balance de cofacteurs et énergétique cellulaire

Chez la souche génétiquement modifiée, les besoins énergétiques pour produire de la biomasse semblent supérieurs à μ_{\max} (9,2 contre 10,0 $\text{g}_X \text{ mol}_{\text{ATP}}^{-1}$) (Figure 63).

L'oxydation du NADPH est due uniquement à l'anabolisme. La régénération du NADPH se réalise quant à elle par la synthèse d'acide acétique (26 %) et par le cycle des pentose-phosphates (74 %) chez la souche sauvage, contre respectivement 9 et 91 % chez la souche ΔALD6 (Figure 64).

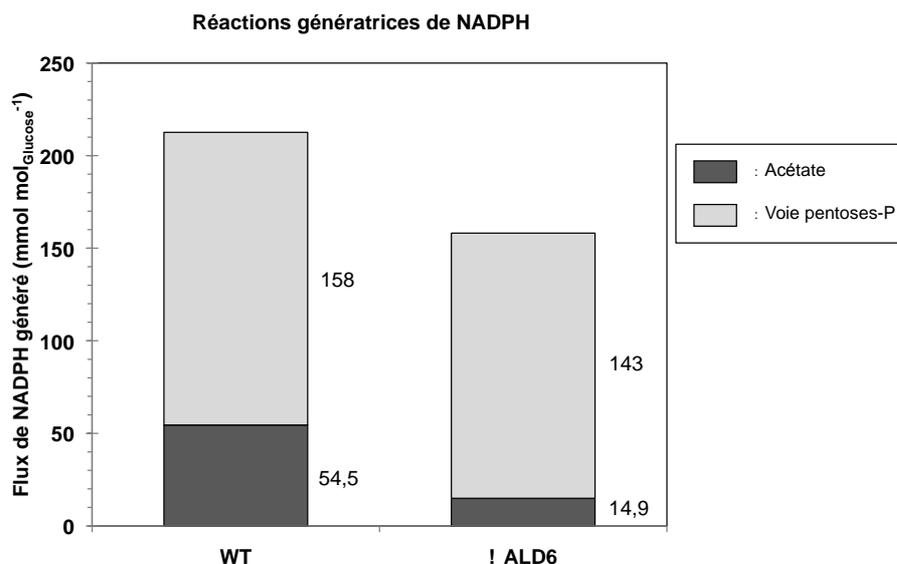


Figure 64 : Répartition des réactions génératrices de NADPH au taux de croissance maximal lors des cultures des souches BY4741 et ΔALD6 . Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol^{-1}).

En outre, la redirection des flux intracellulaires observée chez la souche ΔALD6 a perturbé la balance entre les cofacteurs NADH et NAD^+ (Figure 65). D'un point de vue global, ces cellules réoxydent 4 % de NAD^+ en moins que la souche sauvage.

Chez ΔALD6 , cette réoxydation se réalise à 10 % par la synthèse de glycérol-3-P et à 11 % par la chaîne respiratoire, contre respectivement 7 et 12 % chez BY4741. La production d'éthanol permet quant à elle de réoxyder 81 % du NADH chez BY4741 contre 78 % chez ΔALD6 .

Ce NADH provient principalement de la glycolyse chez BY4741 et ΔALD6 (95 et 90 %). Cette dernière envoie cependant une part moins importante de ce pouvoir réducteur vers la mitochondrie, via la navette mitochondriale (2,6 % contre 8,8 %). Mais elle produit plus de NADH que BY4741 par l'activité de son cycle des acides tricarboxyliques, qui fonctionne de manière cyclique (3,9 % contre 8,9 %). Enfin, du NADH provient de la synthèse cytosolique d'acide acétique chez ΔALD6 , à hauteur de 0,4 %.

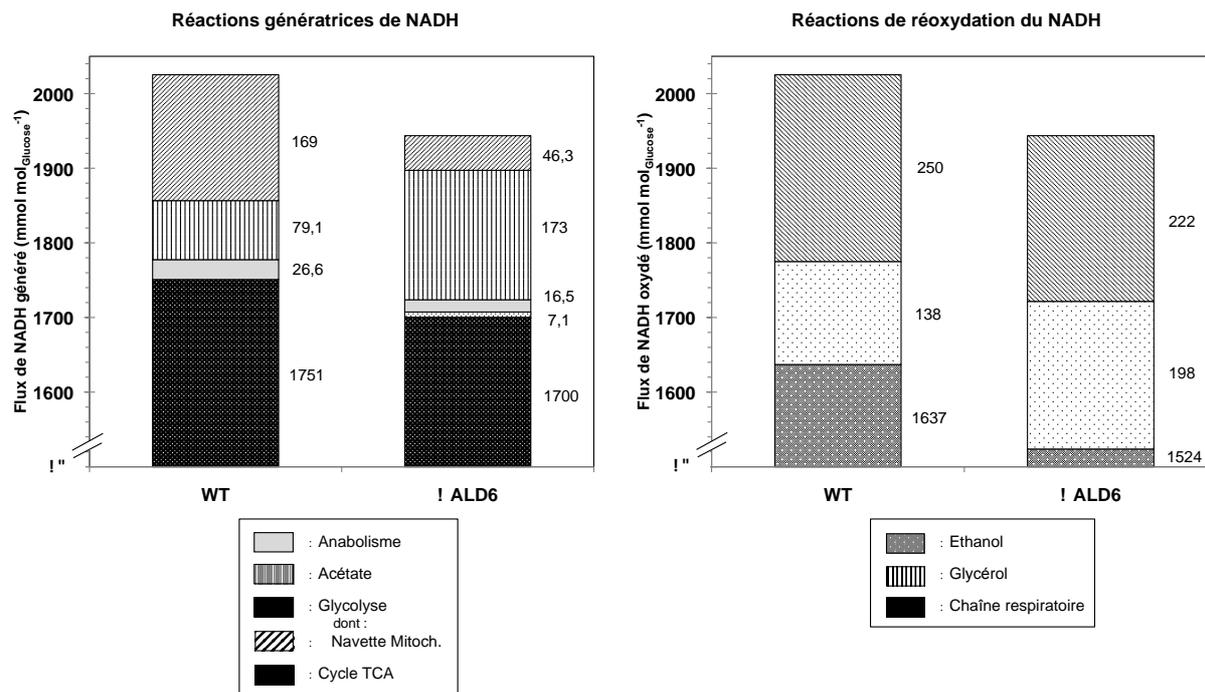


Figure 65 : Répartition des réactions génératrices de NADH et de NAD⁺ au taux de croissance maximal lors des cultures des souches BY4741 et Δ ALD6. Pointillé : réactions cytosoliques ; hachuré : réactions mitochondriales. Les chiffres représentent les flux normés en fonction de la consommation de glucose (mmol mol^{-1}).

6224. Répartition intracellulaire du glucose normée vis-à-vis de la biomasse

De la même manière que vis-à-vis de la consommation de glucose, les données obtenues à l'aide du modèle métabolique ont été normées vis-à-vis de la production de biomasse ($F_{A(\text{normé})} = F_A / F_{\text{Biomasse}}$) afin de s'affranchir de la différence de taux de croissance entre les deux souches (Figure 66).

Pour un flux de production de biomasse identique, celui du glucose entrant est 14 % plus important chez Δ ALD6. En revanche, le ratio des flux entrant dans la voie des pentose-phosphates / glycolyse est de 8 %, contre 9 % chez la souche sauvage. Au niveau de la glycéraldéhyde-3-P, une quantité plus grande de ce métabolite est dirigé vers la synthèse de glycérol, soit 43 %.

En fin de glycolyse, la quantité de pyruvate transformé en acétaldéhyde est également plus élevée de 16 % chez Δ ALD6. Ce métabolite est ensuite oxydé en acétate dans des proportions similaires dans la mitochondrie. En revanche, le flux d'acétate cytosolique formé est réduit de 78 %, ainsi que celui d'acétyl-coA de 41 %.

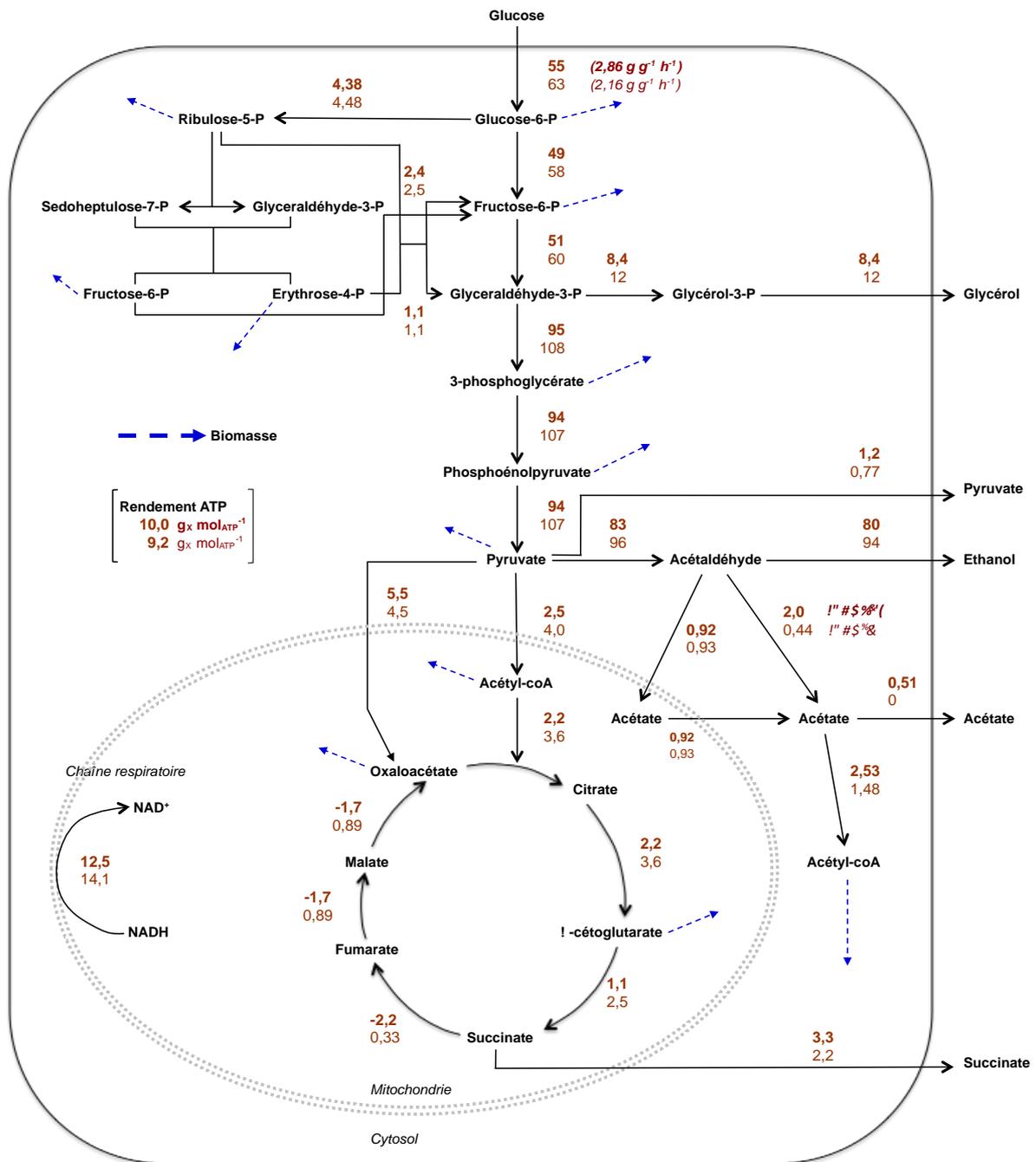


Figure 66 : Répartition des flux métaboliques dans le métabolisme central du carbone lors des cultures discontinues alimentées en excès de glucose avec les souches BY4741 (nombres gras) et Δ ALD6 (nombres normaux). Les valeurs présentées ont été obtenues à μ_{max} puis normalisées vis-à-vis de la production de biomasse ($F_{\text{A(normé)}} = F_{\text{A}} / F_{\text{Biomasse}}$). Elles sont donc exprimées en $\text{mmol g}_{\text{Biomasse}}^{-1}$.

63. DISCUSSIONS

631. IMPACT SUR LES CAPACITES FERMENTAIRES

Les capacités fermentaires ont été partiellement affectées par la délétion du gène *ALD6*. En fin de culture, la souche génétiquement modifiée a ainsi permis d'atteindre une concentration en éthanol de 96,6 g L⁻¹, soit une diminution de 10 % par rapport à BY4741, à 107 g L⁻¹ (Tableau 12). En outre, la vitesse spécifique maximale de production d'alcool a été réduite de 20 %, à 0,86 g g_x⁻¹ h⁻¹ contre 1,02 g g_x⁻¹ h⁻¹. Ceci est à mettre en relief avec la diminution de 24 % de la vitesse spécifique maximale de consommation du glucose, à 2,16 contre 2,86 g g_x⁻¹ h⁻¹.

Cependant, cette vitesse spécifique de production d'éthanol semble avoir été affectée uniquement pour des concentrations en alcool faibles, où l'on observe sa valeur maximale, ou supérieures à 88 g L⁻¹ (Figure 57). Ceci correspond au début et à la fin des cultures. Elle était effectivement équivalente pour des concentrations intermédiaires. Le rendement en éthanol produit n'a pas non plus été altéré de manière significative lors de la phase de croissance, puisqu'il était de 0,345 g g_{Glucose}⁻¹ chez Δ ALD6, contre 0,36 g g_{Glucose}⁻¹ chez BY4741 (Tableau 12). Le rendement global en éthanol était ainsi de 0,406 g g_{Glucose}⁻¹ chez Δ ALD6, contre 0,39 g g_{Glucose}⁻¹ chez BY4741. De la même façon qu'en anaérobiose (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Remize et al., 2000), la délétion du gène *ALD6* semble donc ralentir les cinétiques fermentaires des cellules en présence d'oxygène, sans affecter le rendement de production en éthanol.

Ces observations concernant les rendements sont confirmées par l'absence de différences significatives sur l'évolution du rendement en dioxyde de carbone sur éthanol produit (résultats non montrés). Néanmoins, l'analyse de l'évolution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène a rapporté une valeur globalement plus faible chez la souche mutée que chez la sauvage, pour une vitesse spécifique de consommation de glucose donnée (Figure 59), couplée à une production d'acide succinique réduite (Tableau 12).

Ces résultats tendraient à montrer que la cellule mutée métabolise moins le glucose par voie oxydative, sans toutefois accroître le flux de carbone dirigé vers la production d'éthanol. Ceci peut s'expliquer par une production de glycérol accrue chez Δ ALD6, discutée plus bas.

632. MODULATION DE LA SYNTHÈSE D'ACIDE ACÉTIQUE

L'analyse des résultats macroscopiques révèle une redistribution du carbone suite à la délétion du gène *ALD6*. Ces observations sont confirmées par l'estimation des flux intracellulaires. Outre une nette augmentation de la production de glycérol, discutée plus bas, la souche Δ ALD6 présente des profils de production différents pour les acides organiques.

Une synthèse d'acide acétique fortement réduite a ainsi pu être remarquée suite à la délétion du gène *ALD6*. Son rendement global de production a ainsi chuté de 64 % chez la souche mutée, à $0,002 \text{ g g}_{\text{Glucose}}^{-1}$ (Tableau 12). En outre, celle-ci n'a commencé à excréter de l'acide acétique qu'en toute fin de phase de croissance, pour des taux de croissance inférieurs à $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Figure 58). La vitesse spécifique maximale de production de cette molécule a été atteinte en tout début de culture pour la souche sauvage, mais seulement en début de phase de production d'éthanol découplée de la croissance chez ΔALD6 . Sa valeur a donc logiquement chuté, de 78 %, à seulement $2 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 12). Il est à noter que, de manière constante, elle demeure inférieure chez la souche génétiquement modifiée.

Une réduction de la production d'acide acétique a également été reportée chez de nombreux mutants ΔALD6 lors de cultures anaérobies (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Remize et al., 2000 ; Saint-Prix et al., 2004). Dans ces conditions, une diminution du rendement global de production du même ordre de grandeur a pu être observée, de - 55 à - 77 %. Plus particulièrement, des souches de vinification semblent avoir montré un profil de production similaire (Cambon et al., 2006 ; Remize et al., 2000). Contrairement aux cellules sauvages, les mutants ΔALD6 n'ont ainsi commencé à excréter de l'acide acétique qu'aux environs de la fin de la phase de croissance.

Ici, la délétion du gène *ALD6* a clairement permis de réduire l'activité spécifique acétaldéhyde déshydrogénase Mg^{2+} - NADP^+ dépendante, lors de la croissance microbienne (Figure 60). Contrairement aux observations faites chez la souche sauvage, l'évolution de cette activité spécifique ne paraissait ainsi pas couplée à la production de biomasse chez ΔALD6 . Ce couplage apparent chez BY4741 est en contradiction avec la classification de Navarro-Aviño *et al.* (1999), qui avance une expression constitutive de ce gène. Toutefois, il est en accord avec l'estimation des ARN messagers par Saint-Prix *et al.* (2004), qui décrit une évolution similaire. Ma et Liu (2010) ont en outre rapporté une expression du gène *ALD6* réduite avec l'augmentation de la concentration en éthanol.

En revanche, il est étonnant de constater que le plateau atteint par la suite, lors de la phase de production d'éthanol découplée de la croissance, ne semblait pas significativement différent entre les deux souches (Figure 60). D'après la littérature, l'isoforme Ald6p est en effet le seul à présenter une dépendance au cofacteur NADP^+ et à l'ion Mg^{2+} (Dickinson, 1996 ; Jacobson & Bernofsky, 1974). Les autres isoformes potentiellement NADP^+ dépendants (Ald4p et Ald5p) sont en outre inhibés en présence de Mg^{2+} et lors de la croissance sur glucose (Ald4p), mais activés en ajoutant des ions K^+ (non ajoutés lors des dosages enzymatiques) (Jacobson & Bernofsky, 1974 ; Navarro-Aviño et al., 1999). Chez ΔALD6 , l'activité spécifique acétaldéhyde déshydrogénase Mg^{2+} - NADP^+ dépendante devrait donc être nulle. L'activité résiduelle, également observée en anaérobiose (Remize et al., 2000), pourrait s'expliquer de plusieurs façons. Dans un premier cas, la présence d'ions Mg^{2+} et l'absence de K^+ ne permettrait pas de s'affranchir totalement des autres isoformes NADP^+ dépendants. D'autres enzymes intracellulaires pourraient également utiliser le NADP^+ et l'acétaldéhyde (substrats ajoutés lors des dosages) comme substrats réactionnels. Il est à noter qu'aucune autre enzyme de la sorte n'a été mise en évidence

dans la littérature. Enfin, il pourrait exister un isoforme d'Aldp supplémentaire et non encore décelé. La recherche par analogie de séquence d'un gène codant pour une telle enzyme n'a cependant pas permis d'étayer cette hypothèse.

A l'inverse, l'analyse de l'activité spécifique des isoformes NAD⁺ dépendants n'a pas rapporté de différence entre les deux souches (Figure 60). Cette activité est demeurée très faible comparée à l'Ald6p lors de la phase de croissance, avant de chuter à une valeur nulle pour le reste de la culture. Elle regroupe les isoformes Ald2p et Ald3p, exclusivement NAD⁺ dépendants et considérés comme particulièrement mineurs et Ald4p, NAD(P)⁺ dépendant (Navarro-Aviño et al., 1999 ; Saint-Prix et al., 2004).

La diminution de la production d'acide acétique chez Δ ALD6 peut donc être directement imputable à la perte de l'isoforme Ald6p. Mais la cellule ne semble pas avoir réorganisé son pool d'acétaldéhyde déshydrogénases pour combler cette perte.

633. IMPACT SUR LA BIOMASSE

La suppression du gène *ALD6* a fortement altéré la biomasse, aussi bien d'un point de vue de la croissance que de la viabilité cellulaire.

6331. Impact sur la croissance cellulaire

Chez la souche mutée, le taux de croissance maximal a chuté de 35 %, à 0,19 h⁻¹, pour une vitesse spécifique maximale de consommation de glucose réduite de seulement 25 % (Tableau 12). Cette vitesse semblait plus sensible à l'éthanol chez Δ ALD6, puisqu'elle était inférieure à BY4741 quelle qu'en soit la concentration (Figure 58). Il en a logiquement résulté un rendement en biomasse produite sur glucose consommé plus bas, de 13 % à 0,112 g g⁻¹. L'analyse de l'évolution de ce rendement en fonction du taux de croissance μ , en outre, permis de montrer que les cellules mutées n'étaient pas capables de compenser cette diminution avec l'avancement de la culture (Figure 59). De plus la P_{Critique} , concentration en éthanol pour laquelle la croissance s'arrête, a été nettement réduite de 78 à 69 g L⁻¹, traduisant également une plus grande sensibilité des cellules Δ ALD6 à la présence d'éthanol.

La littérature semble divisée sur l'impact de la délétion du gène *ALD6* sur les capacités de croissance de *S. cerevisiae*. En effet, plusieurs travaux ne rapportent aucune altération de cette croissance en l'absence de ce seul isoforme (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Remize et al., 2000 ; Saint-Prix et al., 2004). L'Ald4p serait alors capable de prendre le relais de l'Ald6p (Saint-Prix et al., 2004). A l'inverse, les études de Meaden et al. (1997) et Navarro-Aviño et al. (1999) ont rapporté une chute du taux de croissance maximal comprise entre 56 et 81 %. Il est à noter que les premières études citées ont été réalisées en anaérobiose, alors que

Navarro-Aviño *et al.* (1999) ont cultivé un mutant en bioréacteur en présence d'oxygène. La méthode de culture utilisée par Meaden *et al.* (1997) est moins claire, mais ne paraît pas mettre en œuvre d'anaérobiose stricte.

La diminution de la croissance cellulaire chez un mutant Δ ALD6 semble donc conditionnée au métabolisme des cellules vis-à-vis de l'oxygène. La quantité intracellulaire d'Ald6p et d'ARN correspondant diminue avec l'apport en oxygène (Rintala *et al.*, 2009). Cet isoforme serait ainsi essentiel à la croissance aérobie, mais dispensable en anaérobiose.

Cette diminution de la production de biomasse pourrait avoir plusieurs origines, distinctes ou conjointes. L'acide acétique cytosolique est en effet une source majeure d'acétyl-coA chez *S. cerevisiae*. La réduction importante de sa production chez Δ ALD6 a donc limité l'apport en acétyl-coA cytosolique, essentiel pour la synthèse de la biomasse, notamment des lipides et des protéines (Figure 66). Ces cellules sont cependant capables d'assurer une certaine fourniture de ce métabolite, puisqu'elles croissent. La totalité de l'acide acétique synthétisé en début de croissance ($\mu > 0,05 \text{ h}^{-1}$) aurait ainsi été envoyé vers l'acétyl-coA et non vers le milieu extracellulaire (Figure 58). A un taux de croissance inférieur à $0,05 \text{ h}^{-1}$, des besoins anaboliques devenus inférieurs à la synthèse d'acide acétique provoqueraient alors l'excrétion d'une partie de cet acide. Il est à noter qu'aucune augmentation de l'activité spécifique des isoformes NAD⁺ dépendants n'a été observée, qui pourrait montrer une tendance des cellules à combler ce déficit en acétyl-coA par la synthèse d'acide acétique.

La production d'acide acétique par l'Ald6p permet également aux cellules de régénérer une grande partie du pool de NADPH cytosolique, conjointement à la voie des pentose-phosphates (Grabowska & Chelstowska, 2003 ; Minard & McAlister-Henn, 2005 ; Miyagi *et al.*, 2009). La délétion du gène *ALD6* a donc également dérégulé la balance NADPH / NADP⁺. L'activité spécifique de la G6PDH a été continuellement augmentée lors de la croissance de la souche Δ ALD6 (Figure 60). D'après ces résultats, les cellules auraient ainsi utilisé la voie des pentose-phosphates pour contrebalancer la perte de l'Ald6p lors de la phase de croissance. Mais ce profil peut être interprété de deux manières différentes. Dans un premier cas, cette augmentation continue pourrait signifier que la voie des pentose-phosphates suffit à combler la perte de l'Ald6p, mais que la G6PDH subit un effet d'inhibition croissant avec l'avancement de la culture ou qu'une autre étape de la voie des pentose-phosphates est limitante (Heux *et al.*, 2008). Dans un autre cas, elle pourrait par contre montrer que la quantité supplémentaire de G6PGH est insuffisante pour combler la perte de l'activité Ald6p et que les cellules continuent à synthétiser cette protéine. Cette observation est en accord avec plusieurs études, qui avancent une expression régulée du gène *ZWF1*, codant pour la G6PDH (Nogae & Johnston, 1990 ; Thomas *et al.*, 1991).

D'après la littérature, l'augmentation de 11 à 17 % ($\text{PPP}/\text{Glucose}$) du flux des pentose-phosphates par ingénierie évolutive permet de limiter la production d'acide acétique tout en améliorant les cinétiques fermentaires (Cadière *et al.*, 2011). Cependant, la délétion du gène *ALD6* a ici eu des conséquences inverses sur ces cinétiques. En outre chez la souche mutée, le flux d'entrée dans voie des pentose-phosphates est augmenté par rapport à la biomasse produite (Figure 66), bien qu'il soit diminué par rapport au glucose entrant (Figure 63).

Cette faible augmentation ne semble donc pas avoir permis de compenser complètement la perte de l'Ald6p. D'après l'estimation des flux intracellulaires normés vis-à-vis de la production de biomasse, la souche génétiquement modifiée synthétise environ une millimole d'acétyl-coA et régénère environ deux millimoles de NADPH en moins au niveau du by-pass de la pyruvate déshydrogénase (Figure 66). Toutefois, aucune augmentation sensible du flux dirigé vers le cycle des pentose-phosphates n'a été mise en évidence. Suite à l'observation de l'activité spécifique de la G6PDH (Figure 60), il semble donc qu' Δ ALD6 a bien tenté de combler la perte de l'Ald6p en tant que régénérateur du NADPH. Cependant, la limitation concomitante de la fourniture d'acétyl-coA n'aurait pas pu être comblée par la cellule, rendant ainsi ce métabolite limitant pour la synthèse des acides gras, contrairement au NADPH. La régénération du NADPH par la voie des pentose-phosphates aurait ainsi été limitée par le ratio $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$.

Ce phénomène pourrait également avoir eu des conséquences sur les protéines. En effet, le NADPH est important pour la réalisation des ponts disulfures lors de la formation des structures tertiaires (Minard et al., 2007). Le manque de NADPH cytosolique altérerait ainsi la fonctionnalité des protéines, en dénaturant leur site fonctionnel ou en les empêchant de former des structures quaternaires. Toutefois, il est également possible que la quantité de NADPH fournie par la voie des pentose-phosphates soit suffisante, mais que la synthèse d'acétyl-coA limitée chez Δ ALD6 soit inférieure à celle chez Cadière *et al.* (2011), en faisant l'élément limitant.

6332. Impact sur viabilité cellulaire

La biomasse a également été impactée par la perte de l'Ald6p d'un point de vue de la viabilité cellulaire. Celle-ci a en effet chuté rapidement et fortement chez Δ ALD6, contrairement à BY4741 (Figure 61). Cette chute présentait un profil troublant en trois phases, avec une première chute jusqu'à $40 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ L}^{-1}$, puis une remontée entre 40 et $60 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ L}^{-1}$ et enfin une nouvelle chute jusqu'à la fin de la culture.

La correction du taux de croissance par cette viabilité a rapporté un taux de croissance viable (μ_{Viable}) très similaire entre les deux souches, pour des concentrations en éthanol inférieures à 58 g L^{-1} (Figure 57). Les cellules génétiquement modifiées semblaient donc capables de se reproduire normalement lorsqu'elles étaient viables. Mais elles présentaient une sensibilité accrue aux stress environnementaux puisque leur viabilité a chuté pendant la croissance (Figure 62).

Plusieurs causes paraissent probables pour expliquer ce phénomène. Les cellules sont confrontées à de hautes concentrations en éthanol lors des deux cultures. Or le stress éthanol provoque une adaptation du métabolisme de *S. cerevisiae*. Dans ces conditions, ce microorganisme va effectivement mettre en place deux mécanismes de défense : une modulation de la composition en acides gras et en protéines de la membrane plasmique, ainsi qu'une régénération du pool d'acides gras plasma-membranaires (Chandler et al., 2004). Or la synthèse de ces molécules est fortement dépendante de la disponibilité en NADPH et en acétyl-coA.

La perte de l'Ald6p ne permettrait donc pas d'assurer la fourniture d'au moins l'une de ces molécules de manière suffisante pour lutter contre les stress environnementaux. Si l'on rapproche cette analyse de l'observation du taux de croissance viable, il semblerait donc que les cellules Δ ALD6 dirigent l'acétyl-coA et / ou le NADPH prioritairement vers la croissance, et non vers l'adaptation et la régénération de leur membrane. L'apparition d'une production d'acide acétique en fin de phase de croissance expliquerait ainsi l'augmentation de la viabilité. La cellule ayant des besoins moindres pour sa croissance, elle augmenterait son mécanisme de défense contre le stress éthanol. Toutefois, l'augmentation de l'activité spécifique de la G6PDH observée chez Δ ALD6 lors de la croissance tendrait à montrer que c'est principalement l'acétyl-coA qui serait limitant.

D'autres causes, conjointes ou distinctes, peuvent également être avancées. La littérature prêche en effet un rôle antioxydant au NADPH cytosolique (Larochelle et al., 2006 ; Minard & McAlister-Henn, 2001). Les cellules Δ ALD6 perdraient ainsi leur capacité à traiter les dérivés réactifs de l'oxygène, produit par la respiration oxydative. En outre, la plus faible disponibilité de NADPH pourrait provoquer une altération des structures tertiaires et quaternaires des protéines en modulant les ponts disulfures (Minard et al., 2007). Une dernière possibilité serait une accumulation de l'acétaldéhyde, composé toxique pour les cellules, dans leur cytosol. Cette molécule est en effet la source carbonée de l'acide acétique. Cependant, Cambon *et al.* (2006) n'a rapporté aucune augmentation de cette molécule dans le milieu de culture chez un mutant Δ ALD6.

Enfin, il est intéressant de noter que chez Δ ALD6, la fin de la première chute de viabilité ($40 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \text{ L}^{-1}$) correspondait au pic de concentration en dioxyde de carbone dissous dans le milieu de culture (Figure 62). Cette viabilité a ensuite de nouveau augmenté avec la diminution de cette concentration. Lors de cultures aérobies en limitation de substrat, une altération de la croissance a été observée à partir de $6,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de CO_2 dissous (Chen & Gutmanis, 1976). Or la valeur maximale atteinte pendant la culture de Δ ALD6 était de $13,7 \text{ mmol L}^{-1}$. L'éthanol ne serait donc pas le principal facteur de la perte de viabilité des cellules lors de la phase de croissance. Le dioxyde de carbone produit pourrait ainsi affecter *S. cerevisiae* de manière prépondérante à des taux de production élevés, potentiellement par son effet acide. La souche sauvage serait toutefois capable de mettre en œuvre des mécanismes de résistance à ce phénomène, puisqu'aucune chute de viabilité n'a été observée pour des concentrations en CO_2 dissous équivalentes.

Outre une diminution plus importante de la viabilité, le mutant Δ ALD6 présentait une production de glycérol plus importante (Tableau 12). Son rendement a ainsi été augmenté de 59 % lors de la phase de croissance et de 37 % sur l'ensemble de la culture. Cette explication serait explicable par deux mécanismes. Tout d'abord, il faut noter que la consommation d'oxygène a été diminuée en parallèle (Figure 59). Par ailleurs, ces écarts entre les souches au niveau du glycérol et de l'oxygène étaient d'autant plus marqués pour des vitesses spécifiques de consommation de glucose supérieures à $1,5 \text{ g g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, correspondant environ aux 20 premières heures des phases de croissance des deux souches. Or à ce moment, les Aldp NAD^+ dépendantes étaient encore présentes dans les cellules (Figure 60). Chez Δ ALD6, celles-ci ont donc pu prendre partiellement le relais de l'Ald6p pour fournir

de l'acétyl-coA nécessaire à la croissance. Cependant, l'activité de ces enzymes régénère le pool de NADH, diminuant ainsi le ratio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$.

Vemuri *et al.* (2007) ont inséré une version mitochondriale (AOX) et une cytosolique (NOX) d'oxydases hétérologues chez *S. cerevisiae*, permettant ainsi d'augmenter le ratio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$. Lors de cultures discontinues, aucune modulation de la production de glycérol n'a été observée chez le mutant AOX. En revanche, NOX a diminué sa production de glycérol de 80 %, tout en augmentant sa consommation d'oxygène. Or le mutant ΔALD6 a montré ici une réponse inverse. D'après ces observations, il semblerait donc que les Aldp NAD^+ dépendantes ayant pris le relais de l'Ald6p soient situées dans le cytosol. Outre cette dernière, seules Ald2p et Ald3p sont situées dans ce compartiment (Navarro-Aviño *et al.*, 1999). Des travaux ont rapporté que ces isoformes n'étaient pas requis pour la production d'acide acétique en métabolisme fermentaire, alors considérés comme mineurs (Saint-Prix *et al.*, 2004). En revanche, d'autres études leur prêtent un rôle dans la balance oxydo-réductive en conditions de stress de stress osmotique (Blomberg & Adler, 1989 ; Navarro-Aviño *et al.*, 1999).

Toutefois chez la souche mutée, l'estimation des flux intracellulaires a révélé une augmentation plus importante du flux de glycérol (+ 60 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) que de celui d'acétate produit par la régénération du NADH cytosolique (+ 7 $\text{mmol mol}_{\text{Glucose}}^{-1}$) (Figure 65). Celle-ci semble donc produire une partie du glycérol supplémentaire afin de répondre à d'autres besoins. Or sa vitesse spécifique de production de glycérol à un taux de croissance nul était supérieure de 70 % à celle de BY4741, à 34 contre 20 $\text{mg g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figure 58). ΔALD6 aurait donc également augmenté sa production de glycérol pour répondre aux stress environnementaux, et plus particulièrement osmotiques (Albertyn *et al.*, 1994). La chute de viabilité et la proportion estimée de phospholipides plus faible dans la composition de ces cellules mutées suggèrent qu'elles étaient effectivement soumises à de tels stress.

La combinaison de l'activité des Ald NAD^+ dépendantes et de la réponse à des stress environnementaux semble donc responsable de l'augmentation de la production de glycérol chez ΔALD6 , associée à une diminution de la vitesse de consommation d'oxygène.

Discussion générale

&

Perspectives

Sous certaines conditions de culture, de nombreuses levures sont capables de convertir des substrats osidiques en éthanol. Au sein de celles-ci, *Saccharomyces cerevisiae* s'avère être l'une des plus performantes pour produire cet alcool à partir de glucose. Cette levure, Crabtree positive, convertit ainsi principalement ce sucre en éthanol, en dioxyde de carbone et en biomasse en utilisant son métabolisme fermentaire ou oxydo-réductif. En outre, cette production conduit à l'excrétion de coproduits, parmi lesquels le glycérol et les acides organiques.

De nombreuses études portant sur la synthèse de glycérol ont permis d'identifier les rôles essentiels de cette molécule. Elle joue un rôle primordial dans la balance oxydo-réductive de la cellule en menant à la réoxydation du NADH cytosolique et permet aux cellules de lutter contre les stress environnementaux et notamment osmotique. De plus, la modulation de la synthèse de ce polyol influe fortement sur la synthèse d'éthanol. Une diminution de sa synthèse a ainsi pu conduire à une amélioration du rendement en éthanol produit de 5 à 10 % selon la disponibilité en oxygène. En revanche, cette diminution a impacté de manière négative la croissance des cellules et plus particulièrement leur résistance aux stress.

A l'inverse, la synthèse des acides organiques est un sujet relativement peu exploré dans la littérature, même chez des levures modèles comme *Saccharomyces cerevisiae*. Certains travaux ont tout de même permis d'identifier les acides excrétés par ce microorganisme lors des métabolismes fermentaire et oxydo-réductif, parmi lesquels se trouve principalement l'acide acétique, mais aussi dans une moindre mesure les acides succinique, pyruvique, malique et fumarique. L'acide acétique est une source importante d'acétyl-coA et de NADPH, deux molécules nécessaires à l'anabolisme. Il provient essentiellement de l'oxydation de l'acétaldéhyde par l'action des différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase. Les acides pyruvique et succinique occupent également une place incontournable dans le métabolisme central du glucose, respectivement en fin de glycolyse et dans le cycle des acides tricarboxyliques. Ils sont aussi impliqués dans l'anabolisme, notamment dans la synthèse d'acides aminés. Les acides malique et fumarique sont également situés dans le cycle des acides tricarboxyliques, mais ne sont pas excrétés chez la souche CEN.PK 113-7D dans les conditions d'étude définies ici.

Sous forme exogène, ces molécules peuvent cependant causer un « stress acide ». Les mécanismes qui régissent ce stress ne sont pas clairement définis, mais il se traduit principalement par un effet découplant entre les productions de biomasse et d'énergie du à la régulation du pH intracellulaire. En outre, l'acide acétique est connu pour déclencher l'apoptose cellulaire, bien que cette mort cellulaire n'ait pas été étudiée en condition de production d'éthanol.

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont donc été menés afin d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- L'acide acétique endogène présente-t-il un effet inhibiteur sur le métabolisme oxydo-réductif chez *Saccharomyces cerevisiae* ? Est-il ainsi possible de moduler sa production dans le but d'améliorer les capacités de production d'éthanol ainsi que sa tolérance aux stress ?

- Quels sont les principaux facteurs commandant la synthèse d'acide acétique et plus généralement celle des acides organiques ? Permettent-ils une flexibilité du métabolisme à ce niveau ?

L'acide acétique endogène présente-t-il un effet inhibiteur sur le métabolisme oxydo-réductif chez *Saccharomyces cerevisiae* ? Est-il ainsi possible de moduler sa production dans le but d'améliorer les capacités de production d'éthanol ainsi que sa tolérance aux stress ?

Suite aux travaux portant sur les acides faibles exogènes, la littérature attribue généralement aux acides organiques un rôle négatif sur le métabolisme de *S. cerevisiae* et plus particulièrement sur la croissance cellulaire (Pampulha & Loureiro-Dias, 2000). En revanche, l'ajout d'acide acétique a pu conduire à une augmentation de la vitesse spécifique de consommation de glucose ainsi que du rendement en éthanol (Pampulha & Loureiro-Dias, 2000 ; Taherzadeh et al., 1997). Toutefois, ces conséquences physiologiques n'ont été que très peu étudiées vis-à-vis des acides synthétisés par la levure.

Des stratégies de modulation de la production d'acide acétique diversifiées

Dans le but de les explorer, une modulation de la production d'acide acétique a donc été réalisée en conditions de métabolisme oxydo-réductif. Les différentes expériences effectuées lors de ces travaux de thèse ont ainsi permis de moduler la production d'acide acétique par deux approches différentes de génie génétique et de génie microbiologique. Concernant la première approche, la délétion de l'isoforme majeur de l'acétaldéhyde déshydrogénase, directement impliquée dans la synthèse d'acide acétique à partir d'acétaldéhyde, a logiquement mené à une diminution de la production d'acide acétique. Cette observation est en accord avec des études semblables menées en anaérobiose (Cambon et al., 2006 ; Eglinton et al., 2002 ; Saint-Prix et al., 2004). A l'inverse la surexpression du gène *CIT2*, qui n'est pas impliqué dans la synthèse de cet acide mais dans un mécanisme de résistance (Kawahata et al., 2006 ; Paiva et al., 2004), a entraîné une augmentation de la production d'acide acétique.

En outre, l'approche par génie microbiologique a permis de moduler la synthèse d'acide acétique sans avoir recours à la manipulation du génome. L'ajout d'acide oléique, un agent modulateur du métabolisme, a mené à une levée partielle de l'effet Crabtree « long terme ». Le rendement en acide acétique produit sur biomasse formée a ainsi été réduit de 7 %, à 55 contre 59 mg g_{biomasse}⁻¹ (Tableau 13). Il faut toutefois noter que le rendement sur glucose consommé était plus élevé en présence d'acide oléique. En revanche l'ajout de carnitine, nécessaire à la fonctionnalité du système de transport mitochondrial de la carnitine-acétyl transférase, n'a pas provoqué de modulation significative du rendement de production d'acide acétique. Une diminution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique a tout de même pu être mise en évidence sur les premières heures de culture.

La synthèse de l'acide acétique et plus largement des acides organiques peut donc être sensiblement modulée par différentes stratégies. Une approche par génie microbiologique peut ainsi être envisagée afin de s'affranchir de l'utilisation de techniques génétiques.

Tableau 13 : Récapitulatif des rendements et des vitesses spécifiques de production d'acide acétique obtenus lors des différentes cultures.

Souche (et agent modulateur)	Rendements			$q_{\text{Acétate max}}$ mg g ⁻¹ h ⁻¹
	Croissance		Global	
	$Y_{\text{acétate/Biomasse}}$ mg g ⁻¹	$Y_{\text{acétate/Glucose}}$ mg g ⁻¹	$Y_{\text{acétate/Glucose}}$ mg g ⁻¹	
WT	59	10,2	15,8	34
WT-carnitine	53	9,3	15,6	23
CIT2+	107	18,7	21	105
WT-oléate	55	12,8	17,1	47
WT-oléate / carnitine	62	13,1	17,1	43
BY4741	29	3,7	5,5	9,3
! ALD6	0	0	2	2

Un effet inhibiteur de l'acide acétique endogène remis en question

D'après la littérature, l'acide acétique exogène présente un effet inhibiteur du métabolisme à des concentrations inférieures au gramme par litre. L'activité biologique est en outre totalement stoppée à des valeurs comprises entre 4,8 et 10 g L⁻¹ (Larsson et al., 1997 ; Narendranath et al., 2001 ; Piper et al., 2001 ; Taherzadeh et al., 1997 ; Thomas et al., 2002).

Afin de faire ressortir un éventuel effet inhibiteur de l'acide acétique synthétisé par *S. cerevisiae*, sa synthèse a été limitée par la suppression du gène *ALD6*. La physiologie de la souche génétiquement modifiée a alors été étudiée lors de cultures en métabolisme oxydo-réductif menées jusqu'à l'arrêt de la production d'éthanol. Lors de cette expérience, aucune levée d'un potentiel effet inhibiteur de cet acide endogène n'a pu être mise en évidence. Au contraire, la réduction de la synthèse d'acide acétique a mené à une chute importante de la viabilité cellulaire par rapport à la souche sauvage. En outre, les concentrations critiques pour la production de biomasse et d'éthanol ont été diminuées de 11 et 10 %, respectivement. Les mécanismes de résistance au stress éthanol mis en place par les cellules nécessitent une synthèse importante de lipides et de composés membranaires. *S. cerevisiae* n'est donc pas capable de pallier le manque de NADPH et / ou d'acétyl-coA nécessaire à la synthèse des acides gras, faisant de l'acide acétique un élément essentiel de la lutte contre le stress éthanol.

En revanche, sa participation dans la lutte contre les autres stress environnementaux, supputée dans la littérature, n'a pas pu être décelée (Akhtar et al., 1997 ; Blomberg & Adler, 1989 ; Navarro-Aviño et al., 1999 ; Norbeck & Blomberg, 1997 ; Norbeck & Blomberg, 2000).

Au vu de ces résultats, il serait raisonnable de penser qu'une augmentation de la synthèse d'acide acétique pourrait alors améliorer la résistance de *S. cerevisiae* au stress éthanol, par un approvisionnement plus important de NADPH et d'acétyl-coA. La surexpression du gène *CIT2* a permis d'augmenter le rendement en acide produit sur biomasse formée de 83 % (Tableau 13). Toutefois, cette production d'acide acétique accrue n'a pas conduit à une amélioration de la résistance des cellules au stress éthanol. En effet, les concentrations critiques pour la production de biomasse et d'éthanol étaient similaires à celles observées chez la souche sauvage, tout comme le profil de viabilité en fonction de la concentration en alcool. En outre, la culture de la souche CIT2+ a mené à des concentrations en acide acétique plus élevées, dont la valeur finale a été augmentée de 27 % (6,69 contre 5,28 g L⁻¹). Or la viabilité a commencé à chuter à une concentration plus élevée que chez la souche WT. Cette chute était également plus lente en fonction de la concentration en acide.

Enfin, le rapprochement des résultats des différentes expériences a permis de mettre en évidence une corrélation entre les vitesses spécifiques maximales de production d'acide acétique et de consommation d'oxygène (Figure 67). L'augmentation du $q_{\text{Acétate}}$ semble ainsi avoir provoqué une augmentation de la respiration. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence d'un effet découplant déjà observé dans la littérature suite à l'ajout d'acide acétique exogène (Russell, 1992). Toutefois, cette corrélation ne permet pas d'englober les résultats des cultures sur glucose plus acide oléique. La production de biomasse étant fortement accrue dans ces conditions, les cellules ont en effet été amenées à consommer plus d'oxygène afin d'assurer la réoxydation des cofacteurs réduits par l'anabolisme.

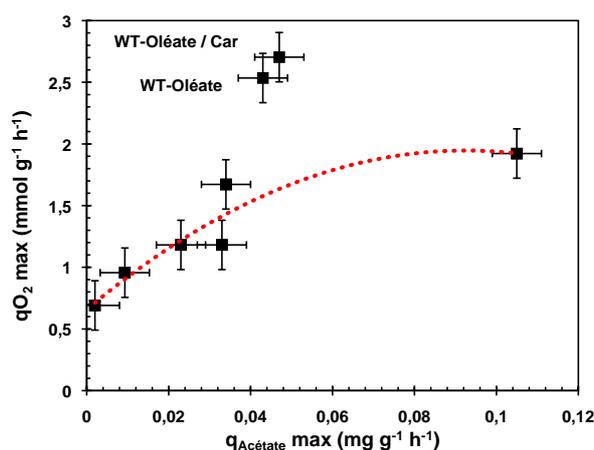


Figure 67 : Vitesse spécifique de consommation d'oxygène en fonction de la vitesse spécifique de production d'acide acétique pour les différentes expériences.

En conclusion, aucun effet inhibiteur de l'acide acétique endogène sur le métabolisme de *S. cerevisiae* n'a pu être mis en évidence, bien qu'un effet découplant ait pu être observé. Il est possible qu'un tel phénomène existe réellement, mais qu'il soit négligeable par rapport à l'impact du stress éthanol sur les cellules. Une autre hypothèse est que la forme endogène de cet acide n'impacte pas le métabolisme de la même façon que sa forme exogène. En effet, sa concentration augmente graduellement d'environ zéro à quelques grammes par litre lorsqu'il est synthétisé, ce qui peut laisser le temps aux levures de mettre en place et d'adapter leurs mécanismes de résistance. Quoi qu'il en soit, l'acide acétique est essentiel aux cellules afin de lutter contre le stress éthanol, puisqu'il est un fournisseur incontournable de NADPH et d'acétyl-coA nécessaires à la synthèse des lipides, induite par cet alcool.

Modulation de la production d'acide acétique et capacités de production d'éthanol

Une augmentation de la vitesse spécifique de consommation de glucose ainsi que du rendement en éthanol a été observé dans certaines études, suite à l'ajout d'acide acétique exogène (Pampulha & Loureiro-Dias, 2000 ; Taherzadeh et al., 1997). Cette molécule, lorsqu'elle est ajoutée, peut donc avoir un impact positif sur les capacités de *S. cerevisiae* à produire de l'éthanol. Lors des différentes cultures menées lors de ces travaux de thèse, la modulation de la synthèse d'acide acétique a ainsi impacté ces capacités, que ce soit au niveau du rendement, du titre final ou de la vitesse spécifique de production.

La surexpression du gène *CIT2* a permis d'augmenter fortement la production d'acide acétique. Lors de cette culture, les capacités de production d'éthanol n'ont cependant pas été améliorées. Au contraire, le rendement global en éthanol produit sur glucose consommé et la vitesse spécifique de production ont été réduits de 7 et 14 %, respectivement (Tableau 14). En outre, la productivité a chuté de 19 %. Cette diminution importante est notamment imputable à un temps de culture plus long chez *CIT2+* que chez WT (68 contre 59 h). Néanmoins, le titre final n'a pas été affecté.

Tableau 14 : Récapitulatif des principaux paramètres de production d'éthanol.

Souche (et agent modulateur)	Rendements			Concentrations finales		$q_{\text{Ethanol max}}$	Productivité
	Global		Croissance	[Ethanol]	[A. acétique]		
	$Y_{\text{éthanol/ Glucose}}$ g g ⁻¹	$Y_{\text{glycérol/ Glucose}}$ g g ⁻¹	$Y_{\text{biomasse/ Glucose}}$ g g ⁻¹	g L ⁻¹	g L ⁻¹		
WT	0,432	0,0142	0,174	126,8	5,28	1,31	2,16
WT-carnitine	0,417	0,012	0,175	124,2	5,20	1,27	2,19
<i>CIT2+</i>	0,402	0,016	0,174	125,5	6,69	1,12	1,75
WT-oléate	0,40	0,015	0,234	116,2	5,1	0,43	2,17
WT-oléate / car.	0,40	0,015	0,21	115,6	5,1	0,44	2,13
BY4741	0,390	0,056	0,129	107,0	1,46	1,02	1,49
! ALD6	0,406	0,077	0,112	96,6	0,41	0,82	1,34

Une diminution du rendement global en éthanol et du titre final de l'ordre de 7 et 8 %, respectivement, a également été observée lors des cultures en présence d'acide oléique (Tableau 14). Dans ces conditions, les cellules ont effectivement envoyé plus de carbone vers la production de biomasse, au détriment de la synthèse d'alcool. En revanche, cette augmentation de la biomasse a permis de conserver une productivité similaire à celle observée sur glucose comme seule source de carbone.

Dans le même sens, une diminution de la production d'acide acétique par la suppression du gène *ALD6* n'a pas conduit à une amélioration significative du rendement en éthanol produit (Tableau 14). De plus, la concentration en éthanol atteinte en fin de culture et la productivité étaient 10 % inférieures à celles obtenues avec la souche BY4741. Ces capacités de production d'éthanol amoindries peuvent s'expliquer par une sensibilité accrue des cellules génétiquement modifiées au stress éthanol, les empêchant de résister à des concentrations plus hautes.

En outre, une corrélation linéaire a été observée entre les concentrations en acide acétique et en éthanol en fin de phase de croissance (Figure 68). Le titre en éthanol atteint est ainsi d'autant plus important que la concentration en acide acétique est élevée. Cette corrélation a également été observée sur les titres finaux (résultats non montrés). Ainsi, les stratégies d'amélioration de la production d'éthanol par la diminution de la synthèse de glycérol, menées avec succès dans la littérature (Nissen et al., 2000b ; Pagliardini, 2010), ne sont pas extrapolables à l'autre coproduit majeur qu'est l'acide acétique. Les cellules semblent en effet incapables d'assurer une fourniture de NADPH et d'acétyl-coA convenable afin de répondre aux besoins anaboliques des cellules soumises au stress éthanol.

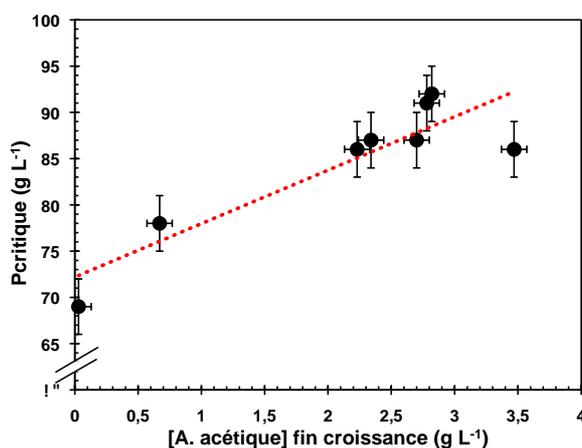


Figure 68 : Concentration en éthanol en fin de croissance (Pcritique) en fonction de la concentration en acide acétique en fin de croissance pour les différentes expériences.

La modulation de la synthèse de l'acide acétique ne semble donc pas être une stratégie viable pour l'amélioration des capacités de production d'éthanol chez *S. cerevisiae*. Cependant, elle peut permettre de répondre à d'autres impératifs que la production d'alcool, comme la maîtrise de l'acidité ou de la saveur d'un

moût de fermentation, tout en conservant certaines des capacités fermentaires. L'intérêt d'une telle approche lors de la production d'alcool serait donc à relativiser en fonction des besoins industriels, qui prennent en compte le côté économique de la modulation de ces capacités. Celui-ci dicte ainsi généralement la nécessité ou non de conserver le titre en alcool, la productivité ou encore le rendement en éthanol produit.

Quels sont les principaux facteurs commandant la synthèse d'acide acétique et plus généralement celle des acides organiques ? Permettent-ils une flexibilité du métabolisme à ce niveau ?

Les mécanismes biologiques contrôlant la synthèse des acides organiques demeurent flous, car encore peu étudiés. Lorsqu'elle traite du sujet des acides organiques, la littérature l'aborde en effet le plus souvent en analysant l'effet des acides faibles exogènes. Certaines équipes ont cependant travaillé sur cette problématique, mais généralement lors du métabolisme fermentaire. Toutefois, celui-ci est moins flexible que le métabolisme oxydo-réductif. C'est pourquoi la modulation de la synthèse d'acide acétique et plus généralement des acides organiques a été étudiée ici lors de cultures aérobies en excès de glucose.

Le rôle des acétaldéhydes déshydrogénases diffère selon la disponibilité en oxygène

Chez toutes les cellules, le métabolisme général est organisé de manière différente en présence ou en l'absence d'oxygène. Chez certaines levures comme *S. cerevisiae*, la production d'éthanol permet ainsi de pallier l'inactivité de la chaîne respiratoire en réoxydant le NADH généré par l'activité glycolytique. Cependant, les travaux concernant l'acide acétique endogène tendent à considérer des mécanismes identiques menant à la synthèse de cet acide quelque soit la disponibilité en oxygène.

L'Ald6p, NADP⁺ dépendant, est l'isoforme majeur de l'acétaldéhyde déshydrogénase. Suite à la délétion du gène codant pour cette enzyme, aucune modification de la croissance n'a pu être observée en anaérobiose, bien que la production d'acide acétique ait été très nettement diminuée (Saint-Prix et al., 2004). Or lors des cultures aérobies menées au cours de ces travaux de thèse, la croissance a été fortement altérée. Le taux de croissance maximal et le rendement en biomasse produite sur glucose consommé ont ainsi été réduits de 34 et 13 %, respectivement. Les autres isoformes ne paraissent ainsi pas capables de prendre le relais en présence d'oxygène, contrairement aux observations faites par Saint-Prix *et al.* (2004) en anaérobiose. Les différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase semblent ainsi présenter des rôles divergents en aérobiose, l'Ald6p étant alors essentielle à la croissance cellulaire. Cette conséquence de la suppression du gène *ALD6* en aérobiose confirme ainsi les résultats présentés par Navarro-Aviño *et al.* (1999) lors de cultures discontinues aérobies.

Rôle biologique de la synthèse d'acide acétique et flexibilité du métabolisme

La synthèse d'acide acétique permet aux cellules de régénérer une partie du pool de NADPH et de fournir de l'acétyl-coA nécessaires à l'anabolisme. Toutefois, le rôle biologique de l'excrétion de cette molécule demeure inconnu. En effet, une surexpression des gènes codant pour les deux isoformes de l'acétyl-coA synthase

n'a pas conduit à une diminution de la production d'acide acétique, démontrant que l'étape de transformation de ce métabolite en acétyl-coA n'est pas limitante (de Jong-Gubbels et al., 1998). Suite à cette expérience, cette équipe a alors avancé l'hypothèse de l'existence d'une ou de plusieurs étapes limitantes en aval de cette réaction.

Régénération du pool de NADPH

La synthèse d'acide acétique à partir d'acétaldéhyde a été fortement diminuée chez la souche dont le gène *ALD6* a été supprimé. La régénération du NADPH inhérente à cette réaction a donc été réduite en conséquence. *S. cerevisiae* semble alors avoir essayé d'augmenter le flux au travers de la voie des pentose-phosphates afin de fournir le NADPH nécessaire à la production de biomasse. L'activité spécifique de la G6PDH, stable chez la souche sauvage, a en effet été continuellement augmentée lors de la croissance cellulaire chez la souche mutée. Néanmoins, l'estimation des flux intracellulaires n'a pas permis de mettre en évidence une telle augmentation de l'activité du cycle des pentose-phosphates. La raison de ce phénomène serait à chercher dans la réduction concomitante de l'apport en acétyl-coA en l'absence de l'Ald6p, limitant alors la production de biomasse et en particulier d'acides gras. La cellule tenterait donc d'accroître le flux à travers le cycle des pentose-phosphates, mais le maintien du ratio $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ bloquerait ce phénomène.

Une analyse dynamique de la répartition du glucose entrant au cours de la croissance a en outre rapporté une évolution du ratio Acétate / PPP pour la régénération du NADPH (Figure 69). Cette répartition était stable pour un taux de croissance supérieur à $0,1 \text{ h}^{-1}$, la voie des pentoses phosphates fournissant alors environ 80 % du NADPH cytosolique. En revanche en deçà de $0,1 \text{ h}^{-1}$, la répartition entre les deux sources de NADPH s'est inversée. A un taux de croissance quasiment nul, la synthèse d'acide acétique fournissait alors la presque totalité du NADPH cytosolique.

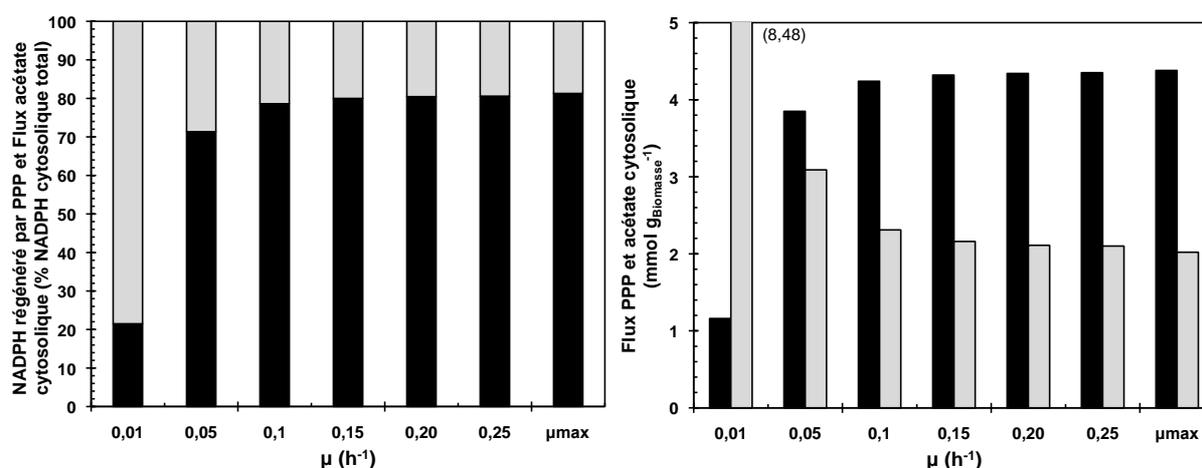


Figure 69 : Evolution des flux normés des réactions régénératrices du NADPH cytosolique et de leur importance relative chez la souche BY4741. Noir : voie des pentoses phosphate (PPP) ; Gris : synthèse d'acide acétique cytosolique. Les valeurs présentées ont été normalisées vis-à-vis de la production de biomasse ($F_{A(\text{normé})} = F_A / F_{\text{Biomasse}}$). Elles sont donc exprimées en $\text{mmol g}_{\text{Biomasse}}^{-1}$.

L'origine de la régénération du NADPH cytosolique semble donc flexible chez *S. cerevisiae*, apparemment capable de moduler l'activité de son cycle des pentose-phosphates en réponse à l'évolution de la synthèse d'acide acétique. Toutefois, celle-ci est soumise à d'autres facteurs liés à la croissance cellulaire comme la disponibilité en acétyl-coA.

Apport en acétyl-coenzyme A

Outre le NADPH, l'acide acétique permet de fournir de l'acétyl-coA grâce à l'acétyl-coA synthase. Les cultures des souches BY4741 et Δ ALD6 ont rapporté une incapacité de *S. cerevisiae* à pallier la diminution de la disponibilité d'acétyl-coA en l'absence de l'Ald6p. Toutefois, certaines observations tendent à montrer que la levure est capable de gérer son pool intracellulaire d'acétyl-coA par différents mécanismes. En effet, l'évolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique en fonction de celle de consommation de glucose présentait un profil particulier observé seulement pour ce métabolite (Figure 70). Celle-là a logiquement diminué lors de la première partie de la phase de croissance. Puis elle présentait un plateau lors de la deuxième partie, avant de chuter à nouveau lorsque la croissance devient nulle. Ce phénomène de plateau correspond à une excrétion plus importante d'acide dans le milieu de culture. Or les besoins anaboliques chutent en fin de phase de croissance. Confrontées à une augmentation du pool intracellulaire en acétyl-coA, les cellules excrèteraient alors une part plus importante de l'acide acétique formé afin de ne pas produire plus d'acétyl-coA que nécessaire. Ce mécanisme semblerait logique d'un point de vue énergétique et signalétique. La transformation d'une mole d'acétate en acétyl-coA nécessite en effet l'utilisation de l'équivalent de deux moles d'ATP, tandis que l'acétyl-coA est connu pour être effecteur de nombreuses réactions.

Il faut cependant noter que si *S. cerevisiae* semble réduire sa production d'acétyl-coA, il n'en va pas de même pour la régénération du NADPH, liée à la synthèse de l'acide acétique. Cette différence pourrait s'expliquer par l'évolution des besoins anaboliques des levures. Pour des taux de croissance élevés, correspondant à des concentrations en éthanol relativement faibles, l'anabolisme permet principalement d'assurer la multiplication cellulaire, donc principalement la synthèse de protéines (environ 50 % de la biomasse). Ensuite, plus la culture avance et plus le taux de croissance diminue, alors que la concentration en éthanol augmente. Petit à petit, les besoins anaboliques nécessaires aux mécanismes de résistance au stress éthanol deviennent alors plus importants que ceux de la multiplication cellulaire. Or, ces mécanismes se traduisent principalement par la synthèse d'acides gras dirigés vers la membrane plasmique (Chandler et al., 2004). Chez les levures, la production d'un acide gras nécessite $(n + 1)$ moles d'acétyl-coA pour $2n$ moles de NADPH, soit près de deux fois plus de cofacteur réduit que d'acétyl-coA. Pour des taux de croissance faibles, *S. cerevisiae* semble donc capable de réduire la synthèse de cette molécule par rapport à la régénération du pool de NADPH. Ce mécanisme lui permettrait ainsi d'assurer ses besoins en acides gras pour la résistance au stress éthanol, tout en gérant la concentration intracellulaire en acétyl-coA et le ratio $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ afin d'assurer le bon fonctionnement de son métabolisme.

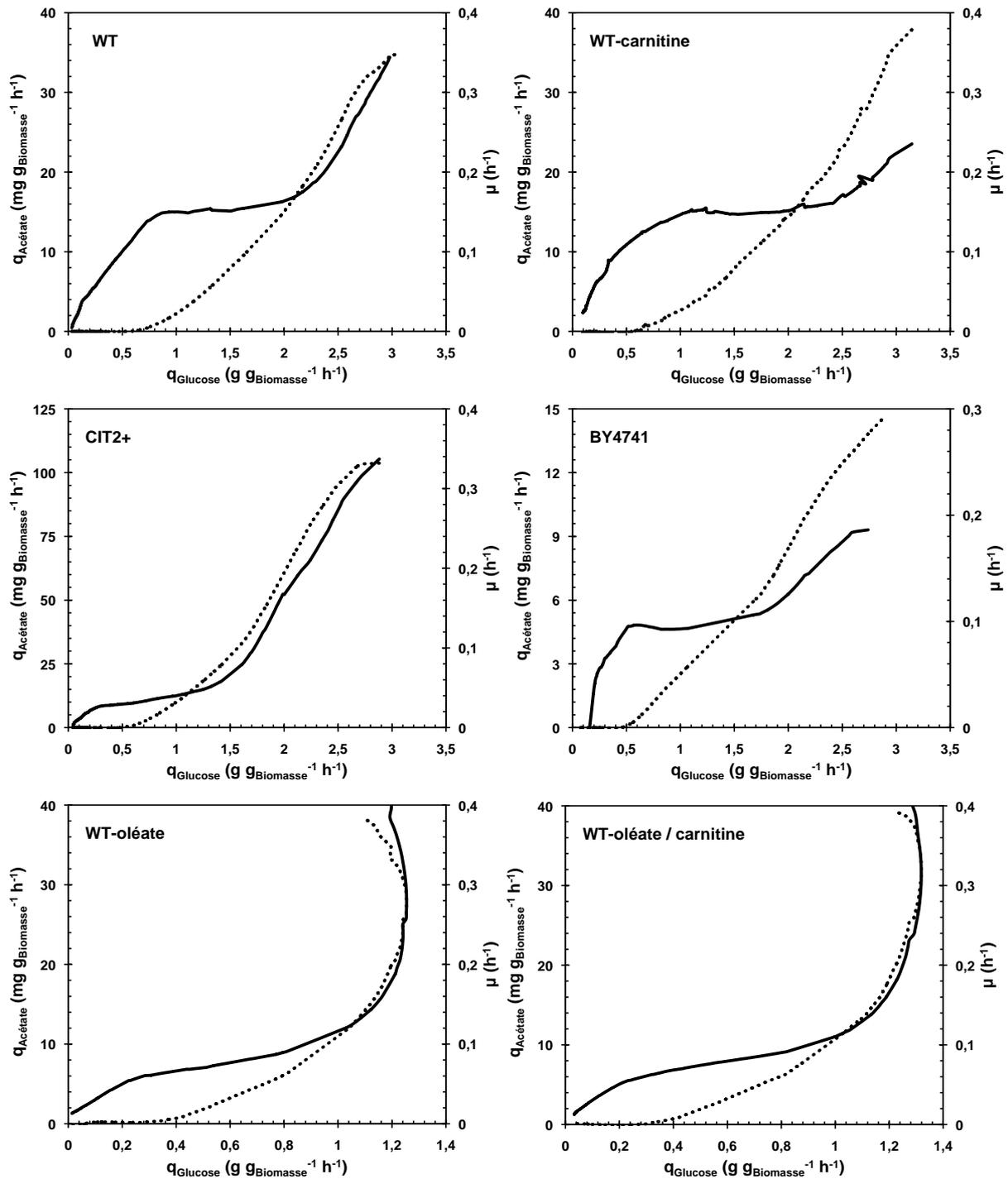


Figure 70 : Evolution de la (—) vitesse spécifique de production d'acide acétique et du (···) taux de croissance en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose pour les différentes cultures.

Le profil du rendement en acide acétique produit sur glucose consommé présentait également un profil particulier en fonction du taux de croissance (Figure 71). Chez les souches sauvages, ce rendement était stable lors de la première partie de la phase de croissance. Puis, la stabilisation de la vitesse spécifique de production d'acide acétique lors de la seconde partie s'est traduite par une augmentation importante du rendement en acétate. Un profil similaire a été observé chez la souche mutée pour le gène *ALD6*, bien que décalé. Le rendement

en acide acétique produit était en effet nul lors de la première partie. D'après ces résultats, il semble donc que l'isoforme majeur de l'acétaldéhyde déshydrogénase ne soit pas responsable de l'augmentation relative de la production d'acide acétique en fin de croissance, ce qui renforce l'hypothèse d'une flexibilité de la synthèse de l'acétyl-coA.

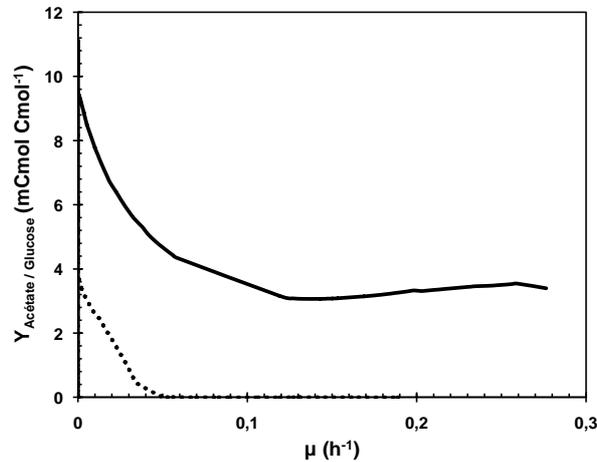


Figure 71 : Evolution du rendement en acide acétique produit sur glucose consommé en fonction du taux de croissance chez les souches BY4741 (—) et ΔALD6 (···).

De plus, un pic d'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase a été observé à la fin de la phase de croissance chez WT, correspondant au plateau de la vitesse spécifique de production d'acide acétique (Figure 72). Cette enzyme fait partie du système enzymatique du même nom, qui est un transporteur mitochondrial de l'acétyl-coA. Outre une augmentation de l'excrétion d'acide acétique, *S. cerevisiae* semble donc également chercher à métaboliser le surplus d'acide acétique formé par une voie alternative. Ce mécanisme permettrait ainsi

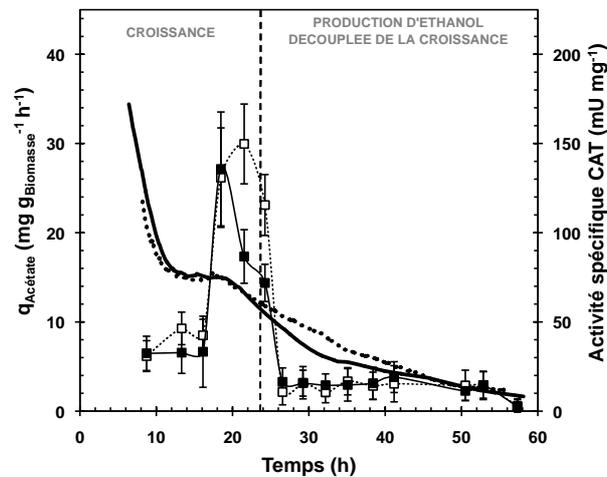


Figure 72 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide acétique (lignes) et de l'activité spécifique de la carnitine-acétyl transférase (symboles), lors des cultures discontinues alimentées de WT en excès de glucose seul (— ; ■) et en excès de glucose supplémentée en carnitine (··· ; □).

aux cellules de limiter une excrétion pouvant être considérée comme un gaspillage de source de carbone. Cependant, aucune réduction de la production d'acide acétique n'a pu être mise en évidence en présence de carnitine, la molécule nécessaire pour rendre le système CAT fonctionnel.

S. cerevisiae a également régulé la quantité d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide acétique. En effet, le calcul de la vitesse d'accumulation intracellulaire de l'Ald6p a révélé une valeur négative chez les souches sauvages (Figure 73). Non seulement les cellules ne synthétisent pas cette enzyme, mais la diminution de sa quantité est plus rapide que le simple mécanisme de dilution dû à la croissance cellulaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une dénaturation de l'Ald6p qui ne serait pas remplacée, ou par une protéolyse ou une désactivation contrôlée de cette protéine. Ceci traduirait ainsi une adaptation de la capacité des cellules à synthétiser l'acide acétique et donc à fournir le NADPH et l'acétyl-coA.

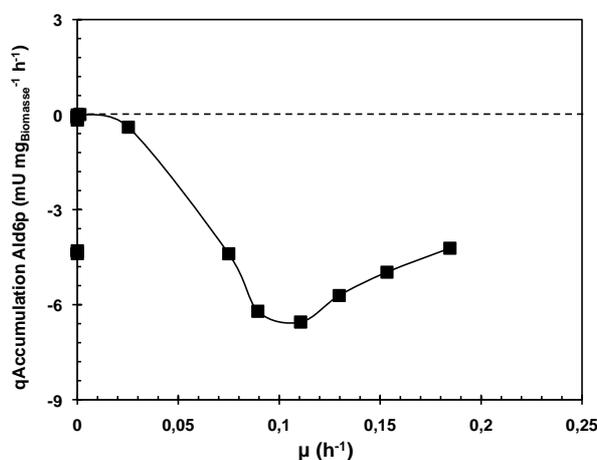


Figure 73 : Evolution de la vitesse d'accumulation intracellulaire en fonction du taux de croissance chez la souche BY4741.

Toutefois, la seule adaptation du métabolisme microbien à l'évolution des besoins anaboliques en acétyl-coA et en NADPH ne permet pas d'expliquer toute la régulation de la synthèse d'acide acétique. En effet, le ratio des flux Acétyl-coA / NADPH_{total} à μ_{max} est variable selon les souches. Chez CEN.PK 113-7D, ce ratio a été augmenté par la surexpression du gène *CIT2*, de 0,13 à 0,37. En revanche, la suppression du gène *ALD6* chez BY4741 a conduit à une diminution de ce ratio, de 0,22 à 0,15. En outre, une corrélation intéressante et inattendue a été rapportée chez ces quatre souches ainsi que lors de la culture en présence d'acide oléique. La production d'acide acétique semblait ainsi corrélée à la distribution de l'acide pyruvique entre la pyruvate déshydrogénase et la pyruvate carboxylase, soit les deux voies possible de transport de cette molécule vers la mitochondrie (Figure 74). Les mécanismes biologiques responsables de la production d'acide acétique semblent donc être plus complexes qu'une simple adaptation à l'anabolisme ou qu'un flux limitant en aval de l'acétyl-coA synthase.

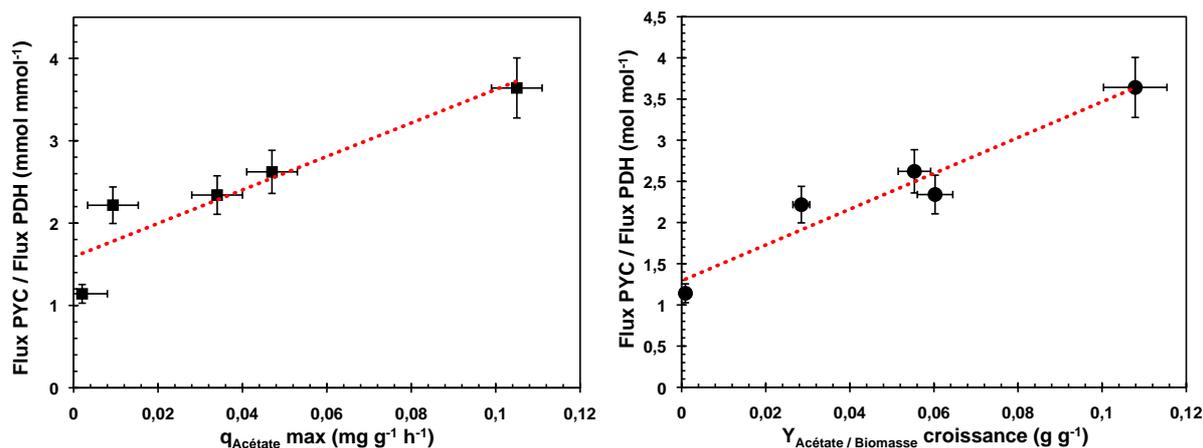


Figure 74 : Répartition du pyruvate entre les flux de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la pyruvate carboxylase (PYC) en fonction de la vitesse spécifique de production d'acide acétique et du rendement en acide acétique produit sur biomasse formée, chez les souches WT, CIT2+, BY4741, Δ ALD6 et WT en présence d'acide oléique.

Des facteurs très incertains contrôlant la synthèse des acides pyruvique et succinique

Les mécanismes biologiques à l'origine de la production des acides pyruvique et succinique ont été très peu étudiés chez *S. cerevisiae*. En effet, cette levure produit de faibles quantités de ces métabolites comparativement aux autres coproduits. Les erreurs de mesures, bien que correctes en absolu, sont ainsi relativement élevées en relatif, rendant délicate l'observation d'une faible variation de la production de ces acides. En outre, un lien potentiel entre la production de ces métabolites et la balance redox serait difficile à mettre en évidence, puisque le poids de ces molécules dans la gestion de l'équilibre redox est négligeable par rapport à d'autres produits comme le glycérol ou l'éthanol. Bien que des modulations de leur production aient pu être observées lors des expériences menées pour ces travaux de thèse, elles n'ont ainsi pas permis d'élucider la question de l'origine biologique de ces molécules. Toutefois, certaines observations d'intérêt ont apporté certains indices.

Acide pyruvique

D'après les travaux de Flikweert *et al.* (1996), la production d'acide pyruvique pourrait découler d'un flux glycolytique trop important. La cellule, incapable de métaboliser la totalité de l'acide produit, excréterait donc le surplus. Toutefois, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la vitesse spécifique de production d'acide pyruvique et les flux intracellulaires estimés à différents niveaux de la glycolyse lors des différents travaux présentés ici. Par contre, cette vitesse semblerait fortement liée à la croissance des levures. En effet, la représentation graphique d'une vitesse en fonction de l'autre a rapporté une corrélation linéaire pour toutes les expériences, excepté la souche Δ ALD6 (Figure 75). La production de cette molécule a été stoppée juste après la

fin de la phase de croissance, excepté en présence d'acide oléique : juste avant la fin de cette phase. Outre le « nœud du pyruvate » en fin de glycolyse, l'acide pyruvique est impliqué dans l'anabolisme et notamment la synthèse de certains acides aminés. Une origine potentielle de sa production serait donc à chercher à ce niveau. Néanmoins, ce métabolite peut être considéré comme substrat carboné (par exemple la leucine) aussi bien que comme produit (par exemple la méthionine) dans les voies de biosynthèses de ces acides aminés. La production accrue de cet acide observée chez les souches BY4741 et Δ ALD6, hétérotrophes pour la leucine, la méthionine et l'histidine, ne peut donc pas s'expliquer simplement par ce lien avec l'anabolisme.

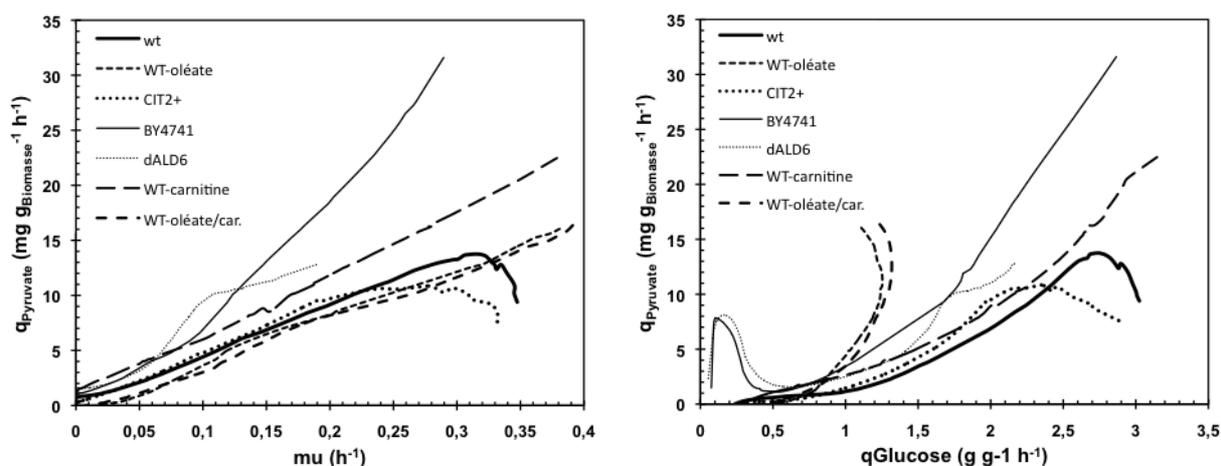


Figure 75 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide pyruvique en fonction du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation de glucose lors des différentes cultures.

Des travaux précédents portant sur la modulation de la synthèse de glycérol en anaérobiose ont rapporté une diminution du rendement en acide pyruvique sur glucose en parallèle d'une diminution du rendement en biomasse (Pagliardini, 2010). En aérobiose le même auteur n'a par ailleurs observé aucune modulation sensible de la production d'acide pyruvique ni de biomasse.

Cet acide est ensuite nettement reconstitué lors de la phase de production d'éthanol découplée de la croissance. Un phénomène similaire mais brusque a également été rapporté suite à l'ajout d'éthanol en fin de culture (Doi et al., 1974). Or une induction des gènes *PYC1* et *PDX1*, codant respectivement pour la pyruvate carboxylase et une sous-unité du complexe de la pyruvate déshydrogénase, a été observée lors d'un stress éthanol (Chandler et al., 2004). En parallèle, les gènes *PDC1* et *PDC5* ont été réprimés. Le phénomène de reconstituration de l'acide pyruvique pourrait donc avoir un lien avec l'établissement des mécanismes de résistance au stress éthanol chez *S. cerevisiae*. Le métabolisme mitochondrial est en effet une source importante de précurseurs métaboliques des protéines, ainsi que d'énergie en présence d'oxygène. La reconstituration de l'acide pyruvique *via* cette voie permettrait donc aux cellules de produire des protéines sans avoir à réoxyder le NADH associé à la synthèse de pyruvate à partir de glucose.

Acide succinique

La place que tient l'acide succinique dans le métabolisme, au niveau du cycle des acides tricarboxyliques, complexifie la compréhension de sa production. Bien que cette voie métabolique soit généralement effectivement considérée comme un cycle, certains auteurs ont montré qu'elle pouvait fonctionner de manière branchée en anaérobiose (Camarasa et al., 2003). D'autres ont également avancé un tel fonctionnement sous métabolisme oxydo-réductif. Lors des expériences présentées ici, l'estimation des flux intracellulaires a effectivement rapporté un fonctionnement cyclique ou branché selon les cultures. Néanmoins, il est délicat de se baser uniquement sur ces observations pour essayer de comprendre les mécanismes conduisant à la production de cet acide. En effet, les flux au niveau de ce cycle sont particulièrement faibles comparativement à ceux de la glycolyse et du by-pass de la pyruvate déshydrogénase. Une légère erreur expérimentale peut ainsi mener à une estimation erronée de ces flux.

Une analyse des cinétiques de culture a cependant rapporté une corrélation linéaire chez la souche sauvage sur glucose seul ou sur glucose plus acide oléique supplémenté ou non en carnitine (Figure 76). Cette observation est intéressante car la succinate déshydrogénase fait partie du complexe de la chaîne respiratoire. Toutefois si un lien direct existait, une diminution de la respiration devrait plutôt conduire à une accumulation de l'acide succinique par le ralentissement de l'activité de la succinate déshydrogénase, si l'on considère un fonctionnement cyclique du cycle des acides tricarboxyliques. En revanche dans l'hypothèse d'un fonctionnement branché, une diminution conjointe de ces vitesses pourrait traduire un besoin moindre des cellules en cofacteurs oxydés (FAD et NAD⁺) suite à une réduction de l'activité anabolique. Comme déjà proposé par Camarasa *et al.* (2003) en anaérobiose, la synthèse d'acide succinique permettrait ainsi de réoxyder du pouvoir réducteur. Ceci a été conforté par les travaux de Pagliardini (2010), qui ont rapporté une augmentation de la production d'acide succinique chez des souches génétiquement modifiées produisant moins d'alcool.

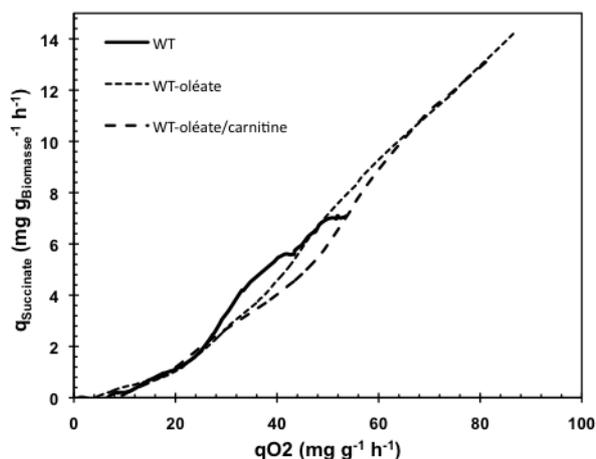


Figure 76 : Evolution de la vitesse spécifique de production d'acide succinique en fonction de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène chez la souche WT, cultivée sur glucose seul, glucose plus acide oléique et glucose plus acide oléique supplémenté en carnitine.

Conclusions & Perspectives

Les différentes expériences menées lors de ces travaux de thèse ont donné lieu à une modulation de la synthèse des acides organiques et plus particulièrement de l'acide acétique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les stratégies mises en place ont ainsi permis d'apporter des éléments de réponse aux problématiques scientifiques posées suite à l'analyse de l'état de l'Art. En résumé de la discussion générale, les principales informations dégagées suite à cette étude sont les suivantes :

- Lors de cultures aérobies discontinues alimentées en excès de glucose, il est possible de moduler la synthèse des acides organiques par des stratégies variées mettant en œuvre des approches microbiologique aussi bien que génétique.
- Aucun effet inhibiteur de l'acide acétique endogène sur le métabolisme microbien n'a pu être mis en évidence lors de la production d'éthanol en métabolisme oxydo-réductif. Cet effet est donc inexistant ou particulièrement négligeable devant le stress éthanol.
- La modulation de la synthèse d'acide acétique ne semble pas être une stratégie envisageable pour l'amélioration des capacités de production d'éthanol de *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, le titre en éthanol est corrélé à la concentration en acide acétique.
- L'isoforme 6 de l'acétaldéhyde déshydrogénase présente un rôle biologique différent selon la disponibilité en oxygène. Cette enzyme est essentielle pour assurer la croissance cellulaire ainsi que les mécanismes de résistance au stress éthanol, alors qu'il est dispensable en anaérobiose d'après la littérature. Plus largement, l'interrelation entre les différents isoformes ne paraît pas aussi flexible qu'en anaérobiose.
- *Saccharomyces cerevisiae* semble présenter un métabolisme flexible en réponse à une modulation de la synthèse d'acide acétique. La voie des pentose-phosphates serait ainsi capable de prendre le relais de l'Ald6p pour régénérer le NADPH cytosolique, bien que le flux de carbone à travers ce cycle semble dépendant du ratio $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. En outre, la cellule paraît capable de réguler la synthèse de l'acétyl-coA à partir d'acide acétique en réaction à une évolution des besoins anabolique lors de la fin de la phase de croissance. Toutefois, elle serait incapable de pallier le manque d'acétyl-coA suite à la suppression du gène *ALD6*.

- Une corrélation entre le taux de croissance et la vitesse spécifique de production d'acide pyruvique a pu être très clairement identifiée dans l'ensemble des cultures, sauf pour la souche Δ ALD6. Par contre, aucun résultat n'a corroboré l'hypothèse d'un flux glycolytique trop important à l'origine de l'excrétion de cet acide.

Dans l'objectif de saisir plus précisément les mécanismes biologiques commandant la synthèse des acides organiques ainsi que d'approfondir la compréhension des phénomènes de flexibilité du métabolisme, il serait intéressant de compléter ces travaux de thèse.

La suppression du gène *ALD6* a montré une flexibilité différente de l'interrelation des différents isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase entre les métabolismes aérobie et anaérobie. La suppression des gènes codant pour les autres isoformes, basée sur la stratégie développée lors des travaux de Saint-Prix *et al.* (2004), permettrait ainsi de mieux appréhender cette flexibilité ainsi que le rôle métabolique de chaque isoforme en aérobiose.

Cette suppression du gène *ALD6* a en outre conduit à une limitation de l'apport en acétyl-coA et en NADPH. *Saccharomyces cerevisiae* a alors adapté son métabolisme afin d'augmenter la concentration intracellulaire en G6PDH, mais le flux à travers le cycle des pentose-phosphates a été indirectement limité par le manque d'acétyl-coA. L'insertion d'une réaction permettant d'approvisionner cette cellule en acétyl-coA cytosolique pourrait lever la limitation de la voie des pentose-phosphates et ainsi confirmer la flexibilité de cette voie en l'absence de l'Ald6p. Un apport plus conséquent d'acétyl-coA devrait également permettre aux levures d'améliorer leur résistance au stress éthanol. Le gène *mhpF* code pour une acétaldéhyde déshydrogénase NAD⁺ dépendante chez *Escherichia coli*. Il serait un bon candidat pour développer cette stratégie, puisqu'il permet de transformer l'acétaldéhyde directement en acétyl-coA et a déjà été inséré avec succès chez *Saccharomyces cerevisiae* (Guadalupe Medina *et al.*, 2010). Toutefois, une activité trop importante de cette enzyme pourrait mener à une accumulation intracellulaire d'acétyl-coA, connu pour être un effecteur de nombreuses voies métaboliques, ainsi qu'à une diminution du ratio NAD⁺ / NADH, entraînant probablement une augmentation de la production de glycérol et donc une perte du rendement en éthanol. L'expression de ce gène devrait ainsi être finement régulée afin de limiter ces phénomènes. L'adaptation de la stratégie développée par Pagliardini (2010), consistant à utiliser une banque de promoteur TEF mutés, pourrait permettre de gérer l'expression du gène *mhpF* en ce sens.

Des expériences exploratoires ont été menées en flacons agités afin d'estimer l'impact de plusieurs stratégies développées dans ce manuscrit lors de cultures anaérobies (CIT2+, carnitine, acide oléique). Les résultats (non présentés) ont montré des comportements sensiblement différents avec ceux présentés dans ce manuscrit. Toutefois, l'environnement physico-chimique n'était pas maîtrisé. La répétition de ces expériences en bioréacteur permettrait ainsi de valider ou d'infirmer ces observations.

La surexpression du gène *CIT2* n'a pas conduit aux résultats attendus, notamment une diminution de la production d'acide acétique. Ce gène est une cible caractéristique du mécanisme de régulation rétrograde RTG2,

qui induit en outre les gènes du métabolisme mitochondrial. Des travaux ont en outre rapporté une diminution de la production d'acide acétique suite à la surexpression du gène *RTG2* (Yoshida & Yokoyama, 2012). Une surexpression de ce gène plutôt que de *CIT2* pourrait ainsi mener à une levée partielle de l'effet Crabtree. Cette stratégie s'ajouterait alors à celles de la délétion de *MIG1* et *MIG2*, de la surexpression de *HAP4*, de l'expression d'une oxydase hétérologue et de l'ajout d'acide oléique.

La mise en place de stratégies permettant de comprendre les mécanismes menant à la production des acides pyruvique et succinique en condition de production aérobie d'éthanol est en revanche plus complexe. Toutefois, le marquage du glucose au ^{13}C pourrait donner des informations intéressantes. Ceci permettrait par exemple de savoir si le pyruvate provient du métabolisme principal, de la synthèse des acides aminés ou des deux à la fois ; et dans ce cas dans quelle proportion. La voie utilisée (oxydative ou réductive) par *Saccharomyces cerevisiae* pour synthétiser l'acide succinique pourrait également être déterminée de cette manière. Il faut noter que cette stratégie a déjà été utilisée avec succès pour comprendre la production d'acide succinique en anaérobiose en conditions œnologiques (Camarasa et al., 2003).

Bibliographie

A

- Abbott D, Suir E, Duong G-H, de Hulster E, Pronk JT, & van Maris AJ. 2009. Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **75**:2320–5.
- Abbott D, Suir E, van Maris AJ, & Pronk JT. 2008. Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **74**:5759–68.
- Aguilera J, Petit T, de Winde JH, & Pronk JT. 2005. Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS yeast research* **5**:579–93.
- Akhtar N, Blomberg A, & Adler L. 1997. Osmoregulation and protein expression in a *pbs2* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. *FEBS letters* **403**:173–180.
- Akita O, Nishimori C, Shimamoto T, Fujii T, & Iefuji H. 2000. Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**:980–984.
- Albers E, Larsson C, Lidén G, Niklasson C, & Gustafsson L. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and environmental microbiology* **62**:3187–95.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, & Prior B. 1994. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology* **14**:4135–44.
- Aldiguié S, Alfenore S, Cameleyre X, Goma G, Uribelarrea JL, Guillouet SE, & Molina-Jouve C. 2004. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and biosystems engineering* **26**:217–22.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, & Blondin B. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **498**:98–103.
- Alexandre H, Rousseaux I, & Charpentier C. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS microbiology letters* **124**:17–22.
- Alfenore S, Cameleyre X, Benbadis L, Bideaux C, Uribelarrea J-L, Goma G, Molina-Jouve C, & Guillouet SE. 2004. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied microbiology and biotechnology* **63**:537–42.
- Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribelarrea J-L, Goma G, & Benbadis L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied microbiology and biotechnology* **60**:67–72.
- Almeida B, Ohlmeier S, Almeida AJ, Madeo F, Leão C, Rodrigues F, & Ludovico P. 2009. Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* **9**:720–32.

- Alper H, Fischer C, Nevoigt E, & Stephanopoulos G. 2005. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:12678–83.
- Anand S, & Prasad R. 1989. Rise in intracellular pH is concurrent with “start” progression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* **135**:2173–9.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, & Adler L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺ - dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal* **16**:2179–2187.
- Arikawa Y, Kobayashi M, Kodaira R, Shimosaka M, Muratsubaki H, Enomoto K, & Okazaki M. 1999. Isolation of sake yeast strains possessing various levels of succinate- and/or malate-producing abilities by gene disruption or mutation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**:333–339.
- Arneborg N, Jespersen L, & Jakobsen M. 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Archives of microbiology* **174**:125–128.
- Arneborg N, Moos MK, & Jakobsen M. 1995. The effect of acetic acid and specific growth rate on acetic acid tolerance and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **17**:1299–1304.
- Atzpodien W, Gancedo J, Duntze W, & Holzer H. 1968. Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **7**:58–62.

B

- Bakker BM, Bro C, Kötter P, Luttk M, van Dijken JP, & Pronk JT. 2000. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **182**:4730–7.
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, Kötter P, Luttk M, van Dijken JP, & Pronk JT. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **25**:15–37.
- Barnett JA. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **32**:125–234.
- Bauer BE, Rossington D, Mollapour M, Mamnun Y, Kuchler K, & Piper PW. 2003. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *European Journal of Biochemistry* **270**:3189–3195.
- Beck C, & von Meyenburg HK. 1968. Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *Journal of bacteriology* **96**:479–86.
- Bely M, Rinaldi A, & Dubourdieu D. 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering* **96**:507–12.
- Van den Berg M, de Jong-Gubbels P, & Steensma HY. 1998. Transient mRNA responses in chemostat cultures as a method of defining putative regulatory elements: application to genes involved in *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-coenzyme A metabolism. *Yeast (Chichester, England)* **14**:1089–104.
- Van den Berg MA, & Steensma HY. 1995. ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase essential for growth on glucose. *European Journal of Biochemistry* **231**:704–713.

- Berk PD, & Stump DD. 1999. Mechanisms of cellular uptake of long-chain free fatty acids. *Molecular and cellular biochemistry* **192**:17–31.
- Bideaux C. 2000. Modélisation stœchiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle Kluyveromyces; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Bideaux C, Alfenore S, Cameleyre X, Molina-jouve C, Uribelarrea J, & Guillouet E. 2006. Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and environmental microbiology* **72**:2134–2140.
- Bisson LF, & Fraenkel DG. 1984. Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **159**:1013–7.
- Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L, & Liden G. 1997. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **63**:128–132.
- Blank LM, Kuepfer L, & Sauer U. 2005. Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome biology* **6**:R49.
- Blom J, De Mattos MJ, & Grivell L a. 2000. Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Applied and environmental microbiology* **66**:1970–3.
- Blomberg A, & Adler L. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **171**:1087–1092.
- Boender LGM, van Maris AJ, de Hulster EF, Almering MJH, van der Klei IJ, Veenhuis M, de Winde JH, Pronk JT, & Daran-Lapujade P. 2011. Cellular responses of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero growth rates: transcriptome analysis of anaerobic retentostat cultures. *FEMS yeast research* **11**:603–20.
- Bojunga N, Kötter P, & Entian KD. 1998. The succinate/fumarate transporter Acr1p of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the gluconeogenic pathway and its expression is regulated by Cat8p. *Molecular & general genetics* : *MGG* **260**:453–61.
- Borst P, Loos JA, Christ EJ, & Slater EC. 1962. Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **62**:509–518.
- Boyd D, Cvitkovitch D, & Hamilton I. 1995. Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* **177**:2622–2627.
- Brachmann CB, Davies a, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, & Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)* **14**:115–32.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9483801>.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**:248–54.
- Brierley GP, Settlemyre CT, & Knight VA. 1968. Ion transport by heart mitochondria: XI. The spontaneous and induced permeability of heart mitochondria to cations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **126**:276–288.

- Briquet M. 1977. Transport of pyruvate and lactate in yeast mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **459**:290–299.
- Bro C, Regenbreg B, Förster J, & Nielsen J. 2006. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic engineering* **8**:102–11.
- Bruinenberg PM, Van Dijken JP, & Scheffers W a. 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *Microbiology* **129**:953–964.
- Bylund F, Collet E, Enfors S-O, & Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Engineering* **18**:171–180.
- Bylund F, Guillard F, Enfors S-O, Trägårdh C, & Larsson G. 1999. Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. *Bioprocess Engineering* **20**:377.

C

- Cadière A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, & Dequin S. 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic engineering* **13**:263–71.
- Calahorra M, Martínez G, Hernández-Cruz A, & Peña A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast (Chichester, England)* **14**:501–15.
- Camarasa C, Faucet V, & Dequin S. 2007. Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by OSM1 and FRDS1. *Yeast (Chichester, England)* **24**:391–401.
- Camarasa C, Grivet J-P, & Dequin S. 2003. Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* **149**:2669–2678.
- Cambon B, Monteil V, Remize F, Camarasa C, & Dequin S. 2006. Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. *Applied and environmental microbiology* **72**:4688–94.
- Cao H, Yue M, Li S, Bai X, Zhao X, & Du Y. 2011. The impact of MIG1 and/or MIG2 disruption on aerobic metabolism of succinate dehydrogenase negative *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* **89**:733–8.
- Cao L, Zhang A, Kong Q, Xu X, Josine TL, & Chen X. 2007. Overexpression of GLT1 in *fps1Delta**gpdDelta* mutant for optimum ethanol formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomolecular engineering* **24**:638–42.
- Carmelo V, Bogaerts P, & Sa-Correia I. 1996. Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. *Archives of microbiology* **166**:315–320.
- Carmelo V, Santos H, & Sá-Correia I. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1325**:63–70.
- Casal M, Cardoso H, & Leão C. 1996. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)* **142**:1385–90.

- Casal M, Cardoso H, & Leão C. 1998. Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **64**:665.
- Casal M, Paiva S, Queirós O, & Soares-Silva I. 2008. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS microbiology reviews* **32**:974–94.
- Casalone E, Barberio C, Cavalieri D, & Polsinelli M. 2000. Identification by functional analysis of the gene encoding a-isopropylmalate synthase II (LEU9) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **16**:539–545.
- Cassio F, Leao C, & van Uden N. 1987. Transport of Lactate and Other Short-Chain Monocarboxylates in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **53**:509–513.
- Cássio F, & Leño C. 1993. A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: Evidence for a general organic acid permease. *Yeast (Chichester, England)* **9**:743–752.
- Castegna A, Scarcia P, Agrimi G, Palmieri L, Rottensteiner H, Spera I, Germinario L, & Palmieri F. 2010. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **285**:17359–17370.
- Del Castillo Agudo L. 1992. Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied microbiology and biotechnology* **37**:647–651.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, & Young R. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell* **12**:323–37.
- Ben Chaabane F, Aldiguier A, Alfenore S, Cameleyre X, Blanc P, Bideaux C, Guillouet S, Roux G, & Molina-Jouve C. 2006. Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **29**:49.
- Chandler M, Stanley GA, Rogers P, & Chambers P. 2004. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* **54**:427–454.
- Chapman C, & Bartley W. 1968. The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *The Biochemical journal* **107**:455–65.
- Chattopadhyay S, Muzaffar NE, Sherman F, & Pearce DA. 2000. The yeast model for batten disease : mutations in *btn1*, *btn2*, and *hsp30* alter pH homeostasis. *Journal of bacteriology* **182**:6418–6423.
- Chelstowska A, & Butow RA. 1995. RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**:18141–18148.
- Chen OS, Hemenway S, & Kaplan J. 2002. Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: implications for mammalian iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:16922–7.
- Chen SL, & Chiger M. 1985. Production of baker's yeast, comprehensive biotechnology, vol. 3 Pergamon P. Oxford.

- Chen SL, & Gutmanis F. 1976. Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* **18**:1455–1462.
- Chen Y, Siewers V, & Nielsen J. 2012. Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **7**:e42475.
- Cheng L, Moghraby J, & Piper PW. 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS microbiology letters* **170**:89–95.
- Choi J-Y, & Martin CE. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene encodes an acyl-coA synthetase that is required for maintenance of very long-chain fatty acid levels. *Journal of Biological Chemistry* **274**.
- Crabtree HG. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical journal* **23**:536–45.
- Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, & Miyakawa T. 1996. The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *The Journal of biological chemistry* **271**:14712–14716.
- D**
- Darley C, van Wuytswinkel O, van der Woude K, Mager W, & de Boer A. 2000. Arabidopsis thaliana and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochemical Journal* **351**:241–249.
- Dasari G, Roddick F, Connor M, & Pamment N. 1983. Factors affecting the estimation of intracellular ethanol concentrations. *Biotechnology Letters* **5**:715.
- De Deken RH. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology* **44**:149–56.
- Dickinson FM. 1996. The purification and some properties of the Mg²⁺-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* **399**:393–399.
- Dickinson JR, Dawes IW, Boyd A S, & Baxter RL. 1983. ¹³C NMR studies of acetate metabolism during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**:5847–51.
- Van Dijken J, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois J, Gancedo C, Giuseppin M, Heijnen J, Hoare M, Lange H, Madden E, Niederberger P, Nielsen J, Parrou J, Petit T, Porro D, Reuss M, van Riel N, Rizzi M, Steensma H, Verrips C, Vindeløv J, & Pronk J. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and microbial technology* **26**:706–714.
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane IDI, Cregg IJM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel D, Jan AKW, Kunau W, Lazarow PB, Mannaerts GP, Moser HW, Osumi T, Rachubinski RA, Roscher A, Subramani S, Tabak HF, Tsukamoto T, Valle D, Klei I Van Der, Veldhoven PP, & van Marten VI. 1996. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *The Journal of Cell Biology* **135**:1–3.
- Doi K, Miyauchi S, & Kawamoto M. 1974. Conversion of pyruvic acid to acetaldehyde during mashing-process after the alcoholic fortification in sake brewing. *Journal of Fermentation Technologies* **52**:416–422.
- Dombek K, & Ingram L. 1986. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and environmental microbiology* **51**:197–200.

Dombek K, & Ingram L. 1987. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and environmental microbiology* **53**:1286–1291.

Drain P, & Schimmel P. 1986. Yeast LEU5 is a PET-like gene that is not essential for leucine biosynthesis. *Molecular and General Genetics* **204**:397–403.

E

Eglinton JM, Heinrich AJ, Pollnitz AP, Langridge P, Henschke P, & de Barros Lopes M. 2002. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast (Chichester, England)* **19**:295–301.

Elgersma Y, van Roermund CW, Wanders RJ, & Tabak HF. 1995. Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *The EMBO journal* **14**:3472–9.

Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O’Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, & Manelius A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology* **85**:175–85.

Erasmus D, Vandermerwe G, & Vanvuuren H. 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of to high sugar stress. *FEMS Yeast Research* **3**:375–399.

Eraso P, & Gancedo C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS letters* **224**:187–92.

Eraso P, Mazon MJ, & Gancedo JM. 1987. Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **165**:671–674.

F

Faergeman NJ, DiRusso CC, Elberger A, Knudsen J, & Black PN. 1997. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **272**:8531–8538.

Feria-Gervasio D. 2008. Analyse systemique de la modulation de la bascule respiro-fermentaire par l’acide oleique chez *Saccharomyces cerevisiae*; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Feria-Gervasio D, Mouret J-R, Gorret N, Goma G, & Guillouet SE. 2008. Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess. *Applied microbiology and biotechnology* **78**:319–31.

Fernandes L, Côte-Real M, Loureiro V, Loureiro-Dias MC, & Leão C. 1997. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. *Letters in applied microbiology* **25**:249–53.

Fernandes R, Mira NP, Vargas RC, Canelhas I, & Sá-Correia I. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochemical and biophysical research communications* **337**:95–103.

- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-brandt MC, Lucas C, & Brandt A. 2005. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol / H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**:2068–2076.
- Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, & Nicaud J-M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research* **5**:527–543.
- Fiechter A, Fuhrmann GF, & Käppeli O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in Microbial Physiology* **22**:123–183.
- Flikweert MT, de Swaaf M, van Dijken JP, & Pronk JT. 1999. Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters* **174**:73–9.
- Flikweert M, van der Zanden L, Janssen WMTM, Yde SH, van Dijken JP, & Pronk J. 1996. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast (Chichester, England)* **12**:247–257.
- François J, Van Schaftingen E, & Hers HG. 1986. Effect of benzoate on the metabolism of fructose 2,6-bisphosphate in yeast. *European journal of biochemistry / FEBS* **154**:141–5.
- Franken J, & Bauer FF. 2010. Carnitine supplementation has protective and detrimental effects in *Saccharomyces cerevisiae* that are genetically mediated. *FEMS yeast research* **10**:270–81.
- Franken J, Kroppenstedt S, Swiegers JH, & Bauer FF. 2008. Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection. *Current genetics* **53**:347–60.
- Fukui S, & Tanaka A. 1979. Yeast peroxisomes. *Trends in Biochemical Sciences* **4**:246–249.

G

- Gasch AP, & Werner-Washburne M. 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & integrative genomics* **2**:181–92.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Michael D, Eisen B, Storz G, Botstein D, & Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* **11**:4241–4257.
- Geertman J-M, van Maris A, van Dijken J, & Pronk J. 2006. Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production. *Metabolic Engineering* **8**:532.
- Ghose TK, & Tyagi RD. 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and bioengineering* **21**:1401–1420.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, et al. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387–391.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Corte-Real M, Passarella S, & Marra E. 2005. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* **354**:93–8.
- Gilbert A, Sangurdekar DP, & Srieenc F. 2009. Rapid strain improvement through optimized evolution in the cytostat. *Biotechnology and bioengineering* **103**:500–12.

- Gille L, & Nohl H. 2001. The Ubiquinol/bc1 Redox Couple Regulates Mitochondrial Oxygen Radical Formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **388**:34–38.
- Gillies RJ, Ugurbil K, Hollander JA den, & Shulman RG. 1981. ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **78**:2125–2129.
- Gilvarg C, & Bloch K. 1951. The utilization of acetic acid for amino acid synthesis in yeast. *The Journal of biological chemistry* **193**:339–346.
- Grabowska D, & Chelstowska A. 2003. The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *The Journal of biological chemistry* **278**:13984–8.
- Grauslund M, & Rønnow B. 2000. Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology* **46**:1096–1100.
- Grobler J, Bauer F, Subden RE, & van Vuuren HJJ. 1995. The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C₄ dicarboxylic acids. *Yeast (Chichester, England)* **11**:1485–1491.
- De Groot MJL, Daran-Lapujade P, van Breukelen B, Knijnenburg T, de Hulster EF, Reinders MJT, Pronk JT, Heck AJR, & Slijper M. 2007. Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. *Microbiology (Reading, England)* **153**:3864–78.
- Guadalupe Medina V, Almering MJH, van Maris AJ, & Pronk JT. 2010. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor. *Applied and environmental microbiology* **76**:190–5.
- Guaragnella N, Pereira C, Sousa MJ, Antonacci L, Passarella S, Côrte-Real M, Marra E, & Giannattasio S. 2006. YCA1 participates in the acetic acid induced yeast programmed cell death also in a manner unrelated to its caspase-like activity. *FEBS letters* **580**:6880–4.
- Guijarro J, & Lagunas R. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *Journal of bacteriology* **160**:874–878.
- Guillou V. 1996. Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dans la région oxydative des taux de croissance; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Van Gulik WM, & Heijnen JJ. 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering* **48**:681–698.
- Gustafsson L, & Larsson C. 1990. Energy budgetting in studying the effect of environmental factors on the energy metabolism of yeasts. *Thermochimica Acta* **172**:95–104.

H

- Hallsworth J. 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85**:125–137.
- Hamilton JA. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy ? *Journal of Lipid Research* **39**:467–481.
- Harder A, & Roels J. 1982. Application of simple structured models in bioengineering. *Microbes and Engineering Aspects* **21**:55–107.

- Hatzixanthis K, Mollapour M, Seymour I, Bauer BE, Krapf G, Schüller C, Kuchler K, & Piper PW. 2003. Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter. *Yeast (Chichester, England)* **20**:575–85.
- Hazan R, Levine A, & Abeliovich H. 2004. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **70**:4449–4457.
- Van der Heijden R, Heijnen J, Hellinga C, Romein B, & Luyben K. 1994a. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:3–10.
- Van der Heijden R, Romein B, Heijnen J, Hellinga C, & Luyben K. 1994b. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:11–20.
- Van der Heijden R, Romein B, Heijnen J, Hellinga C, & Luyben K. 1994c. Linear constrain relations in biochemical reaction systems III. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors. *Biotechnology and Bioengineering* **44**:781–791.
- Hernandez-Orte P, Bely M, Cacho J, & Ferreira V. 2006. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**:150–160.
- Hettema EH, van Roermund CWT, Distel B, Berg M Van den, Vilela C, Roderigues-Pousada C, Wanders RJA, & Tabak J. 1996. The ABC transporters Pat1 and Part2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **15**:3813–3822.
- Heux S, Cadiere A, & Dequin S. 2008. Glucose utilization of strains lacking PGI1 and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS yeast research* **8**:217–24.
- Heux S, Sablayrolles J-M, Cachon R, & Dequin S. 2006. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Applied and environmental microbiology* **72**:5822–8.
- Hildyard JCW, & Halestrap AP. 2003. Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* **611**:607–611.
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, & Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:35–64.
- Van Hoek PIM, van Dijken JP, & Pronk JT. 1998a. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and environmental microbiology* **64**:4226–4233.
- Van Hoek P, Flikweert MT, van der Aart QJ, Steensma HY, van Dijken JP, & Pronk JT. 1998b. Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **64**:2133–40.
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:300–372.

- Den Hollander J, Behar KL, & Shulman RG. 1981. ^{13}C NMR study of transamination during acetate utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:2693–7.
- Holyoak CD, Bracey D, Piper PW, Kuchler K, & Coote PJ. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *Journal of bacteriology* **181**:4644–52.
- Holyoak CD, Stratford M, McMullin Z, Cole MB, Crimmins K, Brown AJ, & Coote PJ. 1996. Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and environmental microbiology* **62**:3158.
- Hou J, Lages NF, Oldiges M, & Vemuri GN. 2009. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering* **11**:253–61.
- Huet C, Menendez J, Gancedo C, & Francois JM. 2000. Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **267**:6817–6823.
- Huh WK, Falvo J V., Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, & O’Shea EK. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**:737–741.

J

- Jacobson MK, & Bernofsky C. 1974. Mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology* **350**:277–291.
- Von Jagow K. 1970. Hydrogen pathways in the mitochondrion of *Saccharomyces carlsbergensis*. *European Journal of Biochemistry* **12**:583–832.
- James AG, Cook RM, West SM, & Lindsay JG. 1995. The pyruvate dehydrogenase complex of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by phosphorylation. *FEBS letters* **373**:111–114.
- Jia YK, Becam AM, & Herbert CJ. 1997. The *CIT3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase. *Molecular microbiology* **24**:53–59.
- Jones RP, & Greenfield PF. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **4**:210–223.
- Jones R, Pamment N, & Greenfield P. 1981. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. *Process biochemistry* **16**:42–49.
- De Jong-Gubbels P, van den Berg M, Luttik M, Steensma HY, van Dijken JP, & Pronk JT. 1998. Overproduction of acetyl-coenzyme A synthetase isoenzymes in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells does not reduce acetate production after exposure to glucose excess. *FEMS microbiology letters* **165**:15–20.
- De Jong-Gubbels P, Bauer J, Niederberger P, Stückrath I, Kötter P, van Dijken JP, & Pronk JT. 1992. Physiological characterisation of a pyruvate-carboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant in batch and chemostat cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**:253–263.

K

- Kal AJ, Zonneveld AJ Van, Benes V, Berg M Van Den, Koerkamp MG, Albermann K, Strack N, Ruijter JM, Richter A, Dujon B, Ansoorge W, & Tabak HF. 1999. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression different carbon sources. *Molecular Biology of the Cell* **10**:1859–1872.
- Kaplan RS, Mayor JA, Gremse DA, & Wood DO. 1994. High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* **270**:4108–4114.
- Käppeli O, & Sonnleitner B. 1986. Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*-type yeast: experimental and conceptual considerations. *Critical Reviews in Biotechnology* **4**:299–325.
- Karpichev I V, & Small GM. 1998. Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **18**:6560–70.
- Kawahata M, Masaki K, Fujii T, & Iefuji H. 2006. Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS yeast research* **6**:924–36.
- Kell DB, Peck MW, Rodger G, & Morris JG. 1981. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **99**:81–88.
- Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, & Sychrova H. 2000. The Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **6**:792–800.
- Kisfal G, Cseko J, Alkonyi I, & Attila S. 1991. Isolation and characterization of carnitine acetyltransferase from *S. cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1085**:217–222.
- Kisfal G, Dietmeiry K, Bock I, Gajdosl G, Tomcsanyiii T, & Sandor A. 1993. Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding *Saccharomyces cerevisiae* Carnitine Acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **268**:1824–1829.
- Kisfal G, Rosenkrantz M, & Srere PA. 1988. Metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking citrate synthases. *The Journal of biological chemistry* **263**:11145–11149.
- Klein CJ, Rasmussen JJ, Rønnow B, Olsson L, & Nielsen J. 1999. Investigation of the impact of MIG1 and MIG2 on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology* **68**:197–212.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, & Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**:1132–1136.
- Kong Q-X, Cao L-M, Zhang A-L, & Chen X. 2007a. Overexpressing GLT1 in *gpd1Delta* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* **73**:1382–6.
- Kong Q-X, Gu J-G, Cao L-M, Zhang A-L, Chen X, & Zhao X-M. 2006. Improved production of ethanol by deleting FPS1 and over-expressing GLT1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters* **28**:2033–8.
- Kong Q-X, Zhang A-L, Cao L-M, & Chen X. 2007b. Over-expressing GLT1 in a *gpd2Delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to improve ethanol production. *Applied microbiology and biotechnology* **75**:1361–6.

- Kotyk A, & Georghiou G. 1991. Protonmotive force in yeasts - pH, buffer and species dependence. *Biochemistry international* **24**:641–647.
- Kratzer S, & Schüller H-J. 1995. Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACSI from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **161**:75–79.
- Krebs H, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, & Bedoya F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *The Biochemical journal* **214**:657–63.
- Kren A, Mamnun YM, Bauer BE, Schüller C, Wolfger H, Hatzixanthis K, Mollapour M, Gregori C, Piper P, & Kuchler K. 2003. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Molecular and cellular biology* **23**:1775–1785.
- Kresnowati MTP, Suarez-Mendez CM, van Winden W, van Gulik WM, & Heijnen JJ. 2008. Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metabolic engineering* **10**:39–54.
- Kristiansen B. 1994. Integrated design of a fermentation plant: the production of baker's yeast Weinheim. New-York.
- Kurita O, & Nishida Y. 1999. Involvement of mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALD5 in maintenance of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters* **181**:281–7.
- ## L
- Lages F, & Lucas C. 1997. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* **1322**:8–18.
- Lambert RJ, & Stratford M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of applied microbiology* **86**:157–64.
- Lara AR, Taymaz-Nikerel H, Mashego MR, van Gulik WM, Heijnen JJ, Ramírez OT, & van Winden W. 2009. Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnology and bioengineering* **104**:1153–61.
- Larochelle M, Drouin S, Robert F, & Turcotte B. 2006. Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Molecular and cellular biology* **26**:6690–701.
- Larsson C, Nilsson A, Blomberg A, & Gustafsson L. 1997. Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *Journal of bacteriology* **179**:7243–50.
- Larsson C, Pählman IL, Ansell R, Rigoulet M, Adler L, & Gustafsson L. 1998. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **14**:347–57.
- Larsson K, Ansell R, Eriksson P, & Adler L. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **10**:1101–111.
- Leão C, & van Uden N. 1982. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* **24**:2601–2604.

- Leão C, & van Uden N. 1985. Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* **22**:359–363.
- Lee JG, Lee YJ, Lee CH, & Maeng PJ. 2006. Mutational and functional analysis of the cryptic N-terminal targeting signal for both mitochondria and peroxisomes in yeast peroxisomal citrate Synthase Cit2p. *The Journal of Biochemistry* **140**:121–133.
- Leskovic V, Trivia S, & Periain D. 2002. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **2**:481–494.
- Lewin a S, Hines V, & Small GM. 1990. Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Molecular and cellular biology* **10**:1399–405.
- Liao XS, Small WC, Srere P, & Butow R. 1991. Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**:38–46.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, & Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147–57.
- Liu Z, & Butow RA. 2006. Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annual Review of Genetics* **40**:159–185.
- Ljungdahl PO, & Daignan-Fornier B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**:885–929.
- Lodeyro AF, Calcaterra NB, & Roveri OA. 2001. Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **3**:236–243.
- Lopez R, Enriquez E, & Pena A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, and $\Delta\Psi$ in yeast. *Yeast (Chichester, England)* **15**:553–562.
- Ludovico P, Madeo F, & Silva M. 2005. Yeast programmed cell death: an intricate puzzle. *IUBMB life* **57**:129–35.
- Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leão C, & Côrte-Real M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology (Reading, England)* **147**:2409–15.
- Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Manuel T, Barrientos A, & Co M. 2002. Cytochrome C release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **13**:2598–2606.
- Luttik M, Overkamp KM, Kötter P, de Vries S, van Dijken JP, & Pronk JT. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *The Journal of biological chemistry* **273**:24529–34.
- Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior B, Ramos J, Thevelein JM, & Hohmann S. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO journal* **14**:1360–71.

M

- Ma C, Remani S, Sun J, Kotaria R, Mayor J, Walters DE, & Kaplan RS. 2007. Identification of the substrate binding sites within the yeast mitochondrial citrate transport protein. *The Journal of biological chemistry* **282**:17210–20.

- Ma M, & Liu LZ. 2010. Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC microbiology* **10**:169.
- Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T, & Fröhlich K-U. 2004. Apoptosis in yeast. *Current opinion in microbiology* **7**:655–60.
- Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leão C, & Boles E. 2001. The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast (Chichester, England)* **18**:1131–43.
- Malfeito Ferreira M, Loureiro-Dias MC, & Loureiro V. 1997. Weak acid inhibition of fermentation and *Saccharomyces* by *Zygosaccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology* **36**:145–153.
- Maris AJA Van, Luttik MAH, Winkler AA, Dijken JP Van, & Pronk JT. 2003. Overproduction of threonine aldolase circumvents the biosynthetic role of pyruvate decarboxylase in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **69**:2094–2099.
- Van Maris J, Bakker BM, Brandt M, Boorsma A, Teixeira de Mattos MJ, Grivell L, Pronk JT, & Blom J. 2001. Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of HAP4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **1**:139–49.
- Meaden PG, Dickinson FM, Mifsud A, Tessier W, Westwater J, Bussey H, & Midgley M. 1997. The ALD6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg(2+)-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast (Chichester, England)* **13**:1319–27.
- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, & Dequin S. 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast (Chichester, England)* **13**:783–93.
- Millar D, Griffiths-Smith K, Algar E, & Scopes R. 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters* **4**:601–606.
- Milton J, Zmijewski J, & MacQuillan AM. 1975. Dual effects of glucose on dicarboxylic acid transport in *Kluyveromyces lactis*. *Revue canadienne de microbiologie* **21**:473–480.
- Minard KI, & McAlister-Henn L. 2001. Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free radical biology & medicine* **31**:832–43.
- Minard KI, Carroll C a, Weintraub ST, & Mc-Alister-Henn L. 2007. Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH. *Free radical biology & medicine* **42**:106–17.
- Minard KI, & McAlister-Henn L. 2005. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. *The Journal of biological chemistry* **280**:39890–6.
- Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144–148.
- Miyagi H, Kawai S, & Murata K. 2009. Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **284**:7553–7560.
- Mollapour M, Fong D, Balakrishnan K, Harris N, Thompson S, Schüller C, Kuchler K, & Piper PW. 2004. Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast (Chichester, England)* **21**:927–46.

- Mollapour M, & Piper PW. 2006. Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **6**:1274–80.
- Mollapour M, & Piper PW. 2007. Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Molecular and cellular biology* **27**:6446–56.
- Moreira dos Santos M, Raghevendran V, Kötter P, Olsson L, & Nielsen J. 2004. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metabolic engineering* **6**:352–63.
- Mori IC, Iida H, Tsuji FI, Isobe M, Uozumi N, & Muto S. 1998. Salicylic acid induces a cytosolic Ca²⁺ elevation in yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**:986–989.
- De Mot R, van Dijck K, Donkers A, & Verachtert H. 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology* **22**:222–226.
- El Moulaj B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J, & Sluse F. 1997. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **13**:573–581.
- Mouret JR, Jacobsen JN, & Guillouet SE. 2006. Kinetic analysis of a trehalase-overexpressing strain grown on trehalose: a new tool for respiro-fermentative transition studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology* **42**:363–8.
- Mouret J-R. 2006. Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oleate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Myers DE, Tolbert B, & Utter MF. 1983. Activation of yeast pyruvate carboxylase: interactions between acyl coenzyme A compounds, aspartate, and substrates of the reaction. *Biochemistry* **22**:5090–5096.
- N**
- Nagodawithana, TW Steinkraus K. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentation.” *Applied and environmental microbiology* **31**:158–162.
- Narendranath N V, Thomas KC, & Ingledew WM. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **26**:171–7.
- Navarro J, & Durand G. 1978. Fermentation alcoolique: influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Annales de Microbiologie* **129**:215–224.
- Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, Benito RM, & Serrano R. 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. *Yeast (Chichester, England)* **15**:829–42.
- Ng C-H, Tan S-X, Perrone GG, Thorpe GW, Higgins VJ, & Dawes IW. 2008. Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radical Biology and Medicine* **44**:1131–1145.

- Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, & Kielland-Brandt MC. 2001. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast (Chichester, England)* **18**:19–32.
- Nissen TL, Hamann CW, Kielland-Brandt MC, Nielsen J, & Villadsen J. 2000a. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast (Chichester, England)* **16**:463–74.
- Nissen TL, Kielland-Brandt MC, Nielsen J, & Villadsen J. 2000b. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabolic engineering* **2**:69–77.
- De Nobel H, Lawrie L, Brul S, Klis F, Davis M, Alloush H, & Coote P. 2001. Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **18**:1413–28.
- Nogae I, & Johnston M. 1990. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* **96**:161–169.
- Norbeck J, & Blomberg A. 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. *Journal of Biological Chemistry* **272**:5544–5554.
- Norbeck J, & Blomberg A. 2000. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo- instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **16**:121–137.
- Norkrans B, & Kylin A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of bacteriology* **100**:836–45.
- Novak M, Strehaiano P, Moreno M, & Goma G. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnology and bioengineering* **23**:201–211.

O

- Oliveira R. 2003. Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1613**:57–71.
- Olz R, Larsson K, Adler L, & Gustafsson L. 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *Journal of bacteriology* **175**:2205–13.
- Outten CE, & Culotta VC. 2003. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **22**:2015–2024.
- Overkamp KM, Bakker BM, Kötter P, van Tuijl A, de Vries S, van Dijken JP, & Pronk JT. 2000. In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of bacteriology* **182**:2823–30.

P

- Paalme T, Kahru A, Elken R, Vanatalu K, Tiisma K, & Raivo V. 1995. The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat). *Journal of Microbiological Methods* **24**:145–153.

- Pagliardini J. 2010. Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* par minimisation de la synthèse du glycérol : approche intégrée de génie métabolique et microbiologique; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Pagliardini J, Hubmann G, Bideaux C, Alfenore S, Nevoigt E, & Guillouet SE. 2010. Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. *Microbial cell factories* **9**:36.
- Pahlman I, Larsson C, Averet C, Bunoust N, Boubekour O, Gustafsson S, & Rigoulet M. 2002. Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **277**:27991–27995.
- Paiva S, Devaux F, Barbosa S, Jacq C, & Casal M. 2004. Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **21**:201–10.
- Palermo V, Falcone C, Calvani M, & Mazzoni C. 2010. Acetyl-L-carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission. *Aging cell* **9**:570–9.
- Palmieri F, Agrimi G, Blanco E, Castegna A, Di Noia M, Iacobazzi V, Lasorsa FM, Marobbio CMT, Palmieri L, Scarcia P, Todisco S, Vozza A, & Walker J. 2006. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1757**:1249–62.
- Palmieri L, Agrimi G, Runswick MJ, Fearnley IM, Palmieri F, & Walker JE. 2001. Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate. *The Journal of biological chemistry* **276**:1916–22.
- Palmieri L, Vozza A, Hönlinger A, Dietmeier K, Palmisano A, Zara V, & Palmieri F. 1999a. The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Molecular microbiology* **31**:569–77.
- Palmieri L, Lasorsa FM, Iacobazzi V, Runswick MJ, Palmieri F, & Walker JE. 1999b. Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **462**:472–476.
- Palmieri L, Lasorsa FM, de Palma A, Palmieri F, Runswicka MJ, & Walker JE. 1997. Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS letters* **417**:114–118.
- Pampulha ME, & Loureiro-Dias MC. 1989. Combined effect of acetic acid , pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied microbiology and biotechnology* **31**:547–550.
- Pampulha ME, & Loureiro-Dias MC. 2000. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters* **184**:69–72.
- Pearce K, Booth IR, & Brown J. 2001. Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)* **147**:403–10.
- Peña A. 1975. Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **167**:397–409.
- Petrik M, Käppeli O, & Fiechter A. 1983. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum* : involvement of short- and long-term regulation. *Journal of General Microbiology* **129**:43–49.

- Pham N, Robinson BH, & Hedley DW. 2000. Simultaneous detection of mitochondrial respiratory chain activity and reactive oxygen in digitonin-permeabilized cells using flow cytometry. *Cytometry* **41**:245–51.
- Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P, & Kuchler K. 1998. The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO journal* **17**:4257–65.
- Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Récnacq M, & Boucherie H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* **140**:3031–3038.
- Piper P, Calderon CO, & Hatzixanthis K. 2001. Weak acid adaptation : the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**:2635–2642.
- Piper PW. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **11**:339–355.
- Piper PW. 1999. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free radical biology & medicine* **27**:1219–1227.
- Piper PW, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, & Cole M. 1997. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharmyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperones* **2**:12–24.
- Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, & Compagno C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in genetics : TIG* **22**:183–6.
- Poilpre E, Tronquit D, Goma G, & Guillou V. 2002. On-line estimation of biomass concentration during transient growth on yeast chemostat culture using light reflectance. *Biotechnology Letters* **24**:2075–2081.
- Poilpré E. 2002. Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae* en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire. 2002; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Postgate J. 1967. Viable counts and viability. In: Norris, J, & Ribbons, D, editors. *Methods in Microbiology* Academic P. New York, pp. 611–628.
- Postma E, Verduyn C, Scheffers W a, & Van Dijken JP. 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **55**:468–77.
- Prohl C, Pelzer W, Diekert K, Hanna K, Bedekovics T, Kispal G, & Lill R. 2001. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix. *Molecular and cellular biology* **21**:1089–1097.
- Pronk JT, Steensma HY, & van Dijken P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **12**:1607–1633.
- Pronk JT, Wenzel TJ, Luttik MAH, Klaassen CCM, Scheffers WA, Steensma HY, & van Dijken JP. 1994. Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:601–610.

Przybyla-Zawislak B, Gadde DM, Ducharme K, & McCammon MT. 1999. Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics* **152**:153–166.

R

Raab AM, Gebhardt G, Bolotina N, Weuster-Botz D, & Lang C. 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic engineering* **12**:518–25.

Ramos J, Haro R, & Rodriguez-Navarro A. 1989a. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1029**:211–217.

Ramos S, Balbin M, Raposo M, Valle E, & Pardo L. 1989b. The mechanism of intracellular acidification induced by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **135**:2413–2422.

Ratray J. 1988. Yeasts. In: Jovanovich, HB, editor. *Microbial Lipids* Rattledge, C., pp. 555–698.

Reed G, & Nagodawithana W. 1991. Yeast technology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold.

Remize F, Andrieu E, & Dequin S. 2000. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg(2+) and mitochondrial K(+) acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and environmental microbiology* **66**:3151–9.

Rep M, Albertyn J, Thevelein J, Prior B, & Hohmann S. 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **145**:715–727.

Rep M, Krantz M, Thevelein JM, & Hohmann S. 2000. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *The Journal of biological chemistry* **275**:8290–8300.

Rickey TM, & Lewin S. 1986. Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast. *Molecular and cellular biology* **6**:488–93.

Rieger M, Käppeli O, & Fiechter A. 1983. The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* **129**:653–661.

Rigoulet M, Aguilaniu H, Avéret N, Bunoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X, Larsson C, Pahlman I-L, Manon S, & Gustafsson L. 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biochemistry* **256–257**:73–81.

Rintala E, Toivari M, Pitkänen J-P, Wiebe MG, Ruohonen L, & Penttilä M. 2009. Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics* **10**:461.

Rodríguez-Navarro A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes* **1469**:1–30.

Van Roermund CWT, Waterham HR, Ijlst L, & Wanders RJ. 2003. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**:1838–51.

Van Roermund CW, Hettema EH, van den Berg M, Tabak HF, & Wanders RJ. 1999. Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *The EMBO journal* **18**:5843–52.

- Van Roermund CWT, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJA, & Tabak HF. 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *The EMBO Journal* **14**:3480–3486.
- Rønnow B, & Kielland-Brandt M. 1993. GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **9**:1121–1130.
- Rose AH, & Harrison JS. 1971. *The Yeasts. Volume 2: Physiology and Biochemistry of Yeasts. 1972 Academic P.* London-New York.
- Rosenkrantz M, Alam T, Kim KS, Clark BJ, Srere PA, & Guarente LP. 1986. Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes. *Molecular and Cellular Biology* **6**:4509–4515.
- Rothstein A. 1959. Role of the cell membrane in the metabolism of inorganic electrolytes by microorganisms. *Bacteriology reviews* **23**:175–201.
- Russell JB. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Microbiology* **73**:363–370.
- Ryan H, Ryan JP, & O'Connor WH. 1971. The effect of diffusible acids on potassium ion uptake by yeast. *The Biochemical journal* **125**:1081–5.
- Ryan JP, & Ryan H. 1972. The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *The Biochemical journal* **128**:139–46.

S

- Saint-Prix F, Bönquist L, & Dequin S. 2004. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading, England)* **150**:2209–20.
- Sales K, Brandt W, Rumbak E, & Lindsey G. 2000. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1463**:267–278.
- Dos Santos MM, Gombert AK, Christensen B, Olsson L, & Nielsen J. 2003. Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ¹³C-labeled substrates. *Eukaryotic cell* **2**:599–608.
- Schaffer JE, & Lodish HF. 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long-chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**:427–436.
- Schmalix W, & Bandlow W. 1993. The ethanol-inducible YAT1 gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **268**:27428–39.
- Schönfeld P, Schild L, & Kunz W. 1989. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **977**:266–272.
- Schuller C, Mamnun YM, Mollapour M, Krapf G, Schuster M, Bauer BE, Piper PW, & Kuchler K. 2004. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **15**:706–720.

- Seeboth PG, Bohnsack K, & Hollenberg CP. 1990. pdcl1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene : cloning of PDC5 , a gene homologous to PDC1. *Journal of bacteriology* **172**:678–685.
- Serrano R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *European Journal of Biochemistry* **105**:419–424.
- Siderius M, Van Wuytswinkel O, Reijenga K, Kelders M, & Mager WH. 2000. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Molecular microbiology* **36**:1381–90.
- Sigler K, & Höfer M. 1991. Activation of the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by addition of hydrogen peroxide. *Biochemistry international* **23**:861–873.
- Smits HP, Hauf J, Müller S, Hobley TJ, Zimmermann FK, Hahn-Hägerdal B, Nielsen J, & Olsson L. 2000. Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **16**:1325–34.
- Sols A, Gancedo C, & de la Fuente G. 1971. Energy-yielding metabolism in yeasts. *The Yeasts* **2**:271–307.
- Song H, & Lee SY. 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **39**:352–361.
- Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, & Stanley G. 2010. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **37**:139–49.
- Steiner S, & Philippsen P. 1994. Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular and General Genetics* **242**:263–271.
- Stephanopoulos G. 1998. Metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering* **58**:119–120.
- Stucka R, Dequin S, Salmon J-M, & Gancedo C. 1991. DNA sequences in chromosomes 11 and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Molecular & general genetics* **229**:307–315.
- Swan TM, & Watson K. 1997. Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Revue canadienne de microbiologie* **43**:70–77.
- Swiegers JH, Dippenaar N, Pretorius IS, & Bauer FF. 2001. Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain. *Yeast (Chichester, England)* **18**:585–95.

T

- Taherzadeh MJ, Niklasson C, & Lidn G. 1997. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ? *Chemical Engineering Science* **52**:2653–2659.
- Tamás MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior B, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, & Hohmann S. 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular microbiology* **31**:1087–104.

- Tarrío N, García-Leiro A, Cerdán ME, & González-Siso MI. 2008. The role of glutathione reductase in the interplay between oxidative stress response and turnover of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research* **8**:597–606.
- Tenreiro S, Rosa PC, Viegas C, & Sá-Correia I. 2000. Expression of the AZR1 gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **16**:1469–81.
- Thevelein JM. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast (Chichester, England)* **10**:1753–1790.
- Thomas D, Cherest H, & Surdin-Kerjan Y. 1991. Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *The EMBO journal* **10**:547–53.
- Thomas KC, Hynes SH, & Ingledew WM. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic Acids. *Applied and environmental microbiology* **68**:1616–1623.
- Thomas K, & Ingledew W. 1992. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **10**:61.
- Thomson JM, Gaucher E, Burgan MF, De Kee DW, Li T, Aris JP, & Benner S a. 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature genetics* **37**:630–5.
- Tosteson DC, & Hoffman JF. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *The Journal of general physiology* **44**:169–94.
- Trotter PJ. 2001. The genetics of fatty acid metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition* **21**:97–119.

U

- Van Urk H, Mark PR, Scheffers WA, & van Dijken JP. 1988. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast (Chichester, England)* **4**:283–291.
- Van Urk H, Postma E, Scheffers WA, & van Dijken JP. 1989a. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Microbiology* **135**:2399–2406.
- Van Urk H, Schipper D, Breedveld GJ, Mak PR, Scheffers WA, & van Dijken JP. 1989b. Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochimica et Biophysica Acta* **992**:78–86.
- Van Urk H, Voll WSL, Scheffers WA, & Dijken JP Van. 1990. Analysis of metabolic fluxes in transient-state Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Applied and environmental microbiology* **56**:281–287.

V

- Valenti D, Vacca RA, Guaragnella N, Passarella S, Marra E, & Giannattasio S. 2008. A transient proteasome activation is needed for acetic acid-induced programmed cell death to occur in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **8**:400–4.

- Valle E, Bergillos L, Gascón S, Parra F, & Ramos S. 1986. Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification. *European journal of biochemistry / FEBS* **154**:247–51.
- Vanrolleghem P, & Heijnen JJ. 1998. A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. *Biotechnology and bioengineering* **58**:133–8.
- Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH, & Harder W. 1987. Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **3**:77–84.
- Vélot C, Lebreton S, Morgunov I, Usher KC, & Srere PA. 1999. Metabolic effects of mislocalized mitochondrial and peroxisomal citrate synthases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **38**:16195–16204.
- Vemuri GN, Eiteman M, McEwen JE, Olsson L, & Nielsen J. 2007. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:2402–7.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers W, & van Dijken JP. 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of general microbiology* **136**:395–403.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers W, & Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast (Chichester, England)* **8**:501–17.
- Verduyn C. 1992. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms*:325–353.
- Verduyn C, Zomerdijk TPL, Dijken JP, & Scheffers WA. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**:181–185.
- Viegas C, Almeida PF, Cavaco M, & Sá-Correia I. 1998. The H(+)-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Applied and environmental microbiology* **64**:779–83.
- Viegas C, Rosa MF, Sá-Correia I, & Novais JM. 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and environmental microbiology* **55**:21–8.
- Vilanova M, Ugliano M, Varela C, Siebert T, Pretorius IS, & Henschke P. 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology* **77**:145–57.
- Visser D, van Zuylen G, van Dam JC, Eman MR, Pröll A, Ras C, Wu L, van Gulik WM, & Heijnen JJ. 2004. Analysis of in vivo kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. *Biotechnology and bioengineering* **88**:157–67.
- Vrabel P, van der Lans R, Cui Y, & Luyben K. 1999. Compartment model approach: Mixing in large scale aerated reactors with multiple impellers. *Chemical Engineering Research and Design* **77**:291–302.
- De Vries S, & Marres C. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **895**:205–239.
- Vriesekoop F, & Pamment NB. 2005. Acetaldehyde addition and pre-adaptation to the stressor together virtually eliminate the ethanol-induced lag phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology* **41**:424–7.

Vriesekoop F, Barber AR, & Pamment NB. 2007. Acetaldehyde mediates growth stimulation of ethanol-stressed *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a redox-driven mechanism. *Biotechnology letters* **29**:1099–103.

W

Walker ME, Val DL, Rohde M, Devenish RJ, & Wallace JC. 1991. Yeast pyruvate carboxylase: Identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **176**:1210–1217.

Warth AD. 1989. Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of general microbiology* **135**:1383–1390.

Warth AD. 1991. Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **57**:3415.

Watkins PA, Lu J-F, Steinberg SJ, Gould SJ, Smith KD, & Braiterman LT. 1998. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very-long chain fatty acyl-coA synthetase activity and elevates intracellular very-long chain fatty acid concentrations. *Journal of Biological Chemistry* **273**:18210–18219.

Watson BTG. 1970. Sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* **64**:91–99.

Watson K, & Rose H. 1980. Fatty-acyl composition of the lipids of *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically in media containing different fatty acids. *Microbiology* **117**:225–233.
<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-117-1-225>.

White WH, Skatrud PL, Xue Z, & Toyn JH. 2003. Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: the ALD2 and ALD3 genes are required for beta-alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**:69–77.

Wiebe MG, Rintala E, Tamminen A, Simolin H, Salusjärvi L, Toivari M, Kokkonen JT, Kiuru J, Ketola R, Jouhten P, Huuskonen A, Maaheimo H, Ruohonen L, & Penttilä M. 2008. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. *FEMS yeast research* **8**:140–54.

Wills C. 1979. Amino acid substitutions in two functional mutants of yeast alcohol dehydrogenase. *Nature* **279**:734–736.

Wissing S, Ludovico P, Herker E, Büttner S, Engelhardt SM, Decker T, Link A, Proksch A, Rodrigues F, Cortes-Real M, Fröhlich K-U, Manns J, Candé C, Sigrist SJ, Kroemer G, & Frank M. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *The Journal of General Physiology* **166**:969–974.

Wojtczak L, & Schönfeld P. 1993. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1183**:41–57.

Wright J, Bellissimi E, de Hulster E, Wagner A, Pronk JT, & van Maris AJ. 2011. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **11**:299–306.

Y

- Yale J, & Bohnert HJ. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The Journal of biological chemistry* **276**:15996–16007.
- Yamaki M, Umehara T, Chimura T, & Horikoshi M. 2001. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **6**:1043–54.
- Yano T, Itoh Y, Yamada M, Egashira N, & Oishi R. 2008. Combined treatment with l-carnitine and a pan-caspase inhibitor effectively reverses amiodarone-induced injury in cultured human lung epithelial cells. *Apoptosis* **13**:543–552.
- Yenush L, Mulet JM, Ariño J, & Serrano R. 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *The EMBO journal* **21**:920–9.
- Yoshida F, Tsuneko Y, & Yoshio M. 1970. Oxygen absorption into oil-in-water emulsions. A study on hydrocarbon fermentors. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **9**:570–577.
- Yoshida S, & Yokoyama A. 2012. Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast. *Journal of bioscience and bioengineering* **113**:556–61.
- Young ET, & Pillgrim D. 1985. Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **5**:3024–3034.

Z

- Zancan P, & Sola-Penna M. 2005. Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. *Archives of biochemistry and biophysics* **444**:52–60.
- Zelle RM, de Hulster E, van Winden W, de Waard P, Dijkema C, Winkler A, Geertman J-M, van Dijken JP, Pronk JT, & van Maris AJ. 2008. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Applied and environmental microbiology* **74**:2766–77.

Annexe

**Réseau métabolique du modèle utilisé pour
l'estimation des flux intracellulaires**

$glc + atp = glcp + adp$
 $glcp = frup$
 $frup + atp = gap + dhap + adp$
 $dhap = gap$
 $gap + nad + adp + p = pg + atp + nadh + h$
 $pg = pep + eau$
 $pep + adp = pyr + atp$

$pyr = acd + co$
 $acd + nadh + h = etoh + nad$

%Réaction cytosolique de transformation de l'acétaldéhyde en acétate (modèle principal)

$acd + nadp + eau = acetat + nadph + h$

%Réaction cytosolique de transformation de l'acétaldéhyde en acétate (spécifique au modèle Δ ALD6)

$acd + nad + eau = acetat + nadh + h$

$dhap + nadh + h = g3p + nad$
 $g3p + eau = glyc + p$

$2 * atp + eau + acetat + coa = 2 * adp + 2 * p + accoa$

$glcp + 2 * nadp + eau = ribup + 2 * nadph + 2 * h + co$
 $ribup = xylup$
 $ribup = ribop$
 $ribop + xylup = eryp + frup$
 $eryp + xylup = gap + frup$

$akg + nh + nadph = glut + eau + nadp$

$glut + atp + nh = glum + adp + p + h$
 $pyr + glut = ala + akg$
 $oac + glut = asp + akg$
 $asp + glum + 2 * atp + 2 * eau = asn + glut + 2 * p + 2 * adp$
 $ser + so + 3 * atp + 4 * nadph + 6 * h + accoa = cys + eau + 3 * adp + 3 * p + 4 * nadp + acetat + coa$
 $ser + nadp + nad + adp + p = gly + co + nadph + nadh + atp + 2 * h$
 $thr + pyr + glut + nadph + 2 * h = ileu + akg + co + eau + nh + nadp$
 $2 * glut + accoa + 2 * nad + 2 * nadph = lys + akg + coa + co + 2 * nadh + 2 * nadp$
 $asp + accoa + so + co + 5 * atp + 8 * nadph + nadh + 11 * h = met + acetat + coa + 2 * eau + 5 * adp + 5 * p + 8 * nadp + nad$
 $cho + glut = phe + akg + co + eau$
 $pg + glut + eau + nad = ser + akg + p + nadh + h$
 $asp + eau + 2 * atp + nadph + nadh + 2 * h = thr + 2 * adp + 2 * p + nadp + nad$
 $cho + glut + nad = tyr + akg + co + nadh + h$
 $cho + glum + ser + prpp = try + pyr + glut + gap + co + 2 * p + eau$
 $prpp + glum + co + nh + 3 * eau + 3 * atp + nad = his + akg + 3 * adp + 6 * p + nadh + 2 * h$

$ribop + 2 * atp = prpp + 2 * adp$
 $eryp + 2 * pep + nadph + atp + h = cho + nadp + adp + 4 * p$
 $co + glum + 2 * eau + 2 * atp = carp + glut + 2 * adp + p$
 $prpp + 2 * glum + gly + asp + 3 * co + 2 * eau + 6 * atp + 2 * nadh + 2 * h = imp + 2 * glut + fum + 6 * adp + 8 * p + 2 * nad$
 $imp + asp + gtp + atp = 2 * adp + fum + gdp + p$
 $imp + glum + 3 * eau + 3 * atp + nad = gdp + glut + 3 * adp + 2 * p + nadh + h$

$atp + nadph + h = datp + eau + nadp$
 $gdp + atp + nadph + h = dgtp + adp + eau + nadp$
 $carp + asp + prpp + 1/2 * o + atp = udp + co + eau + adp + 3 * p$
 $udp + atp = utp + adp$
 $utp + atp + nh = ctp + adp + p + h$

$\text{ctp} + \text{nadph} + \text{h} = \text{dctp} + \text{eau} + \text{nadp}$
 $\text{udp} + \text{co} + 4 * \text{atp} + 3 * \text{nadph} + \text{nadh} + 4 * \text{h} = \text{dttp} + 4 * \text{adp} + 3 * \text{p} + 3 * \text{nadp} + \text{nad}$
 $\text{glcp} + \text{utp} + \text{eau} = \text{udpg} + 2 * \text{p}$
 $\text{udpg} + \text{glcp} + \text{eau} = \text{tre} + \text{udp} + \text{p}$
 $\text{frup} + \text{gdp} = \text{gdpmannose} + \text{p}$
 $\text{frup} + \text{glum} + \text{accoa} + \text{eau} + \text{utp} = \text{udpacetylglucosamine} + \text{glut} + \text{coa} + 2 * \text{p}$

$8 * \text{accoa} + 14 * \text{nadph} + 7 * \text{atp} + \text{eau} + 14 * \text{h=palmitate} + 8 * \text{coa} + 14 * \text{nadp} + 7 * \text{adp} + 7 * \text{p}$
 $9 * \text{accoa} + 16 * \text{nadph} + 8 * \text{atp} + \text{eau} + 16 * \text{h=stearate} + 9 * \text{coa} + 16 * \text{nadp} + 8 * \text{adp} + 8 * \text{p}$
 $18 * \text{accoa} + 11 * \text{eau} + 14 * \text{nadph} + 18 * \text{atp} + \text{o} + 14 * \text{h} = \text{lanosterol} + 18 * \text{coa} + 14 * \text{nadp} + 18 * \text{adp} + 18 * \text{p} + 6 * \text{co}$
 $\text{lanosterol} + 3 * \text{o} + 3 * \text{nad} = \text{zymosterol} + 3 * \text{co} + 3 * \text{nadh} + 3 * \text{h}$
 $\text{lanosterol} + 2 * \text{o} + 2 * \text{nad} = \text{fecosterol} + 2 * \text{co} + 2 * \text{nadh} + 2 * \text{h}$
 $\text{fecosterol} = \text{episterol}$
 $\text{episterol} + \text{nadp} = \text{ergosterol} + \text{nadph} + \text{h}$
 $\text{pextra} + 2 * \text{hextra} = \text{p} + 2 * \text{h}$
 $\text{nhextra} + \text{hextra} = \text{nh} + \text{h}$
 $\text{soextra} + 3 * \text{hextra} = \text{so} + 3 * \text{h}$
 $\text{atp} + \text{eau} = \text{adp} + \text{p}$
 $\text{h} = \text{hextra}$

$\text{pyr} + \text{atp} + \text{co} + \text{eau} = \text{oac} + \text{adp} + \text{p}$

%changes mitochondrie/cytoplasme :

$\text{glut} = \text{glutmi}$
 $\text{argmi} = \text{arg}$
 $\text{leumi} = \text{leu}$
 $\text{promi} = \text{pro}$
 $\text{valmi} = \text{val}$
 $\text{carp} = \text{carpmi}$
 $\text{asp} = \text{aspmi}$
 $\text{oac} = \text{oacmi}$

%Réaction de transport de l'α-cétoglutarate (modèle principal)

$\text{akg} = \text{akgmi}$

%Réaction de transport de l'α-cétoglutarate couplé au citrate (spécifique au modèle CIT2+)

$\text{akgmi} + \text{cit} = \text{akg} + \text{citmi}$

$\text{pyr} = \text{pyrmi}$

$\text{sucmi} = \text{suc}$

$\text{fum} = \text{fummi}$

%Réaction de transport du citrate (modèle principal)

$\text{citmi} = \text{cit}$

%Réaction de formation cytosolique de citrate (spécifique au modèle CIT2+)

$\text{oac} + \text{accoa} + \text{eau} = \text{cit} + \text{coa}$

$\text{acdmi} + \text{nadhmi} + \text{hmi} = \text{etohmi} + \text{nadmi}$

$\text{acd} = \text{acdmi}$

$\text{acetatmi} = \text{acetat}$

$\text{comi} = \text{co}$

$\text{eaumi} = \text{eau}$

$\text{atpmi} = \text{atp}$

$\text{adpmi} = \text{adp}$

$\text{pmi} = \text{p}$

$\text{o} = \text{omi}$

$\text{gtpmi} = \text{gtp}$

$\text{gdp} = \text{gdpmi}$

%métabolisme mitochondrial :

pyrmi + coami + nadmi = accoami + comi + nadhmi + hmi
accoami + oacmi + eaumi = citmi + coami
acdmi + nadpmi + eaumi = acetatmi + nadphmi + hmi

citmi + nadmi = akgmi + nadhmi + hmi + comi
akgmi + coami + nadmi = succoami + comi + nadhmi + hmi
succoami + gdpmi + pmi = sucmi + gtpmi + coami
sucmi + fadmi = fummi + fadhmi
fummi + eaumi = malmi
malmi + nadmi = oacmi + nadhmi + hmi

gdpmi + atpmi = gtpmi + adpmi

$2 * \text{glutmi} + \text{carpmi} + \text{aspmi} + \text{eaumi} + 3 * \text{atpmi} + \text{nadphmi} + \text{hmi} = \text{argmi} + \text{fummi} + \text{akgmi} + 3 * \text{adpmi} + \text{nadpmi} + 4 * \text{pmi}$

$2 * \text{pyrmi} + \text{glutmi} + \text{accoami} + \text{nadmi} + \text{nadphmi} = \text{leumi} + \text{akgmi} + \text{coami} + 2 * \text{comi} + \text{nadhmi} + \text{nadpmi}$

$\text{glutmi} + \text{atpmi} + \text{nadhmi} + \text{nadphmi} + 2 * \text{hmi} = \text{promi} + \text{eaumi} + \text{adpmi} + \text{pmi} + \text{nadpmi} + \text{nadmi}$

$2 * \text{pyrmi} + \text{glutmi} + \text{nadphmi} + \text{hmi} = \text{valmi} + \text{akgmi} + \text{comi} + \text{eaumi} + \text{nadpmi}$

$\text{nadhmi} + 1/2 * \text{omi} + \text{PO} * \text{adpmi} + \text{PO} * \text{pmi} + \text{hmi} = \text{PO} * \text{atpmi} + \text{nadmi} + (1 + \text{PO}) * \text{eaumi}$

$\text{fadhmi} + 1/2 * \text{omi} + \text{PO} * \text{adpmi} + \text{PO} * \text{pmi} = \text{PO} * \text{atpmi} + \text{fadmi} + (1 + \text{PO}) * \text{eaumi}$

%synthèse des macromolécules :

$\text{coeffglut} * \text{glut} + \text{coeffglum} * \text{glum} + \text{coeffpro} * \text{pro} + \text{coeffarg} * \text{arg} + \text{coefflys} * \text{lys} + \text{coeffser} * \text{ser} + \text{coeffgly} * \text{gly} + \text{coeffcys} * \text{cys} + \text{coeffasp} * \text{asp} + \text{coeffasn} * \text{asn} + \text{coeffthr} * \text{thr} + \text{coeffmet} * \text{met} + \text{coeffileu} * \text{ileu} + \text{coeffala} * \text{ala} + \text{coeffval} * \text{val} + \text{coeffleu} * \text{leu} + \text{coeffphe} * \text{phe} + \text{coefftyr} * \text{tyr} + \text{coefftry} * \text{try} + \text{coeffhis} * \text{his} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{atp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gtp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{eau} = \text{protein} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{adp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gdp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{p} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{h}$
 $\text{coeffatp} * \text{atp} + \text{coeffgtp} * \text{gtp} + \text{coeffutp} * \text{utp} + \text{coeffctp} * \text{ctp} + (\text{coeffatp} + \text{coeffgtp} + \text{coeffutp} + \text{coeffctp}) * \text{eau} = \text{rna} + (2 * \text{coeffatp} + 2 * \text{coeffgtp} + 2 * \text{coeffutp} + 2 * \text{coeffctp}) * \text{p}$
 $\text{coeffdatp} * \text{datp} + \text{coeffdgt} * \text{dgtp} + \text{coeffdct} * \text{dctp} + \text{coeffdtt} * \text{dtt} + (\text{coeffdatp} + \text{coeffdgt} + \text{coeffdct} + \text{coeffdtt}) * \text{eau} = \text{dna} + (2 * \text{coeffdatp} + 2 * \text{coeffdgt} + 2 * \text{coeffdct} + 2 * \text{coeffdtt}) * \text{p}$
 $(\text{coeffpalpa} / 2 + \text{coeffstepa} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpa} * \text{palmitate} + \text{coeffstepa} * \text{stearate} = \text{phosphatidate} + (\text{coeffpalpa} + \text{coeffstepa}) * \text{eau}$
 $(\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{glcp} + (\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpi} * \text{palmitate} + \text{coeffstepi} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{atp} = \text{phosphatidylinositol} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{adp} + (\text{coeffpalpi} * 3/2 + \text{coeffstepi} * 3/2) * \text{p}$
 $(\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalps} * \text{palmitate} + \text{coeffsteps} * \text{stearate} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{atp} = \text{phosphatidylserine} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{adp} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{p} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{eau}$

$(\text{coeffpalpc}/2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpc} / 2 + \text{coeffstepc} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpc} * \text{palmitate} + \text{coeffstepc} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5/2) * \text{atp} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nadh} + (\text{coeffpalpc} * 3/2 + \text{coeffstepc} * 3 / 2) * \text{nadh} + (\text{coeffpalpc} * 6 + \text{coeffstepc} * 6) * \text{h} + (\text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc}) * \text{co} = \text{phosphatidylcholine} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5/2) * \text{adp} + (\text{coeffpalpc} * 5/2 + \text{coeffstepc} * 5 / 2) * \text{p} + (3 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 3) * \text{nadh} + (\text{coeffpalpc} * 3/2 + \text{coeffstepc} * 3 / 2) * \text{nad} + (2 * \text{coeffpalpc} + \text{coeffstepc} * 2) * \text{eau}$
 $(\text{coeffpaldpg} + \text{coeffstedpg}) * \text{g3p} + \text{coeffpaldpg} * \text{palmitate} + \text{coeffstedpg} * \text{stearate} + (\text{coeffpaldpg} + \text{coeffstedpg}) * \text{atp} = \text{diphosphatidylglycerol} + (\text{coeffpaldpg} / 4 + \text{coeffstedpg} / 4) * \text{glyc} + (\text{coeffpaldpg} + \text{coeffstedpg}) * \text{adp} + (\text{coeffpaldpg} * 6/4 + \text{coeffstedpg} * 6 / 4) * \text{p}$
 $(\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpe} * \text{palmitate} + \text{coeffstepe} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{atp} = \text{phosphatidylethanolamine} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{co} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{adp} + (\text{coeffpalpe} + \text{coeffstepe}) * \text{p} + (\text{coeffpalpe} / 2 + \text{coeffstepe} / 2) * \text{eau}$
 $\text{coeffpa} * \text{phosphatidate} + \text{coeffpe} * \text{phosphatidylethanolamine} + \text{coeffps} * \text{phosphatidylserine} + \text{coeffpi} * \text{phosphatidylinositol} + \text{coeffdpg} * \text{diphosphatidylglycerol} + \text{coeffpc} * \text{phosphatidylcholine} = \text{phospholipids}$
 $(\text{coeffpaltag} / 3 + \text{coeffstettag} / 3) * \text{g3p} + \text{coeffpaltag} * \text{palmitate} + \text{coeffstettag} * \text{stearate} = \text{tag} + (2 * \text{coeffpaltag} / 3 + 2 * \text{coeffstettag} / 3) * \text{eau} + (\text{coeffpaltag} / 3 + \text{coeffstettag} / 3) * \text{p}$
 $\text{coeffpalla} * \text{palmitate} + \text{coeffstela} * \text{stearate} + (\text{coeffpalla} + \text{coeffstela}) * \text{lanosterol} + (\text{coeffpalla} + \text{coeffstela}) * \text{atp} = \text{lanosterolester} + (\text{coeffpalla} + \text{coeffstela}) * \text{adp} + (\text{coeffpalla} + \text{coeffstela}) * \text{p}$
 $\text{coeffpalzy} * \text{palmitate} + \text{coeffstezy} * \text{stearate} + (\text{coeffpalzy} + \text{coeffstezy}) * \text{zymosterol} + (\text{coeffpalzy} + \text{coeffstezy}) * \text{atp} = \text{zymosterolester} + (\text{coeffpalzy} + \text{coeffstezy}) * \text{adp} + (\text{coeffpalzy} + \text{coeffstezy}) * \text{p}$
 $\text{coeffpalfe} * \text{palmitate} + \text{coeffstefe} * \text{stearate} + (\text{coeffpalfe} + \text{coeffstefe}) * \text{fecosterol} + (\text{coeffpalfe} + \text{coeffstefe}) * \text{atp} = \text{fecosterolester} + (\text{coeffpalfe} + \text{coeffstefe}) * \text{adp} + (\text{coeffpalfe} + \text{coeffstefe}) * \text{p}$
 $\text{coeffpalep} * \text{palmitate} + \text{coeffsteep} * \text{stearate} + (\text{coeffpalep} + \text{coeffsteep}) * \text{episterol} + (\text{coeffpalep} + \text{coeffsteep}) * \text{atp} = \text{episterolester} + (\text{coeffpalep} + \text{coeffsteep}) * \text{adp} + (\text{coeffpalep} + \text{coeffsteep}) * \text{p}$
 $\text{coeffpaler} * \text{palmitate} + \text{coeffsteer} * \text{stearate} + (\text{coeffpaler} + \text{coeffsteer}) * \text{ergosterol} + (\text{coeffpaler} + \text{coeffsteer}) * \text{atp} = \text{ergosterolester} + (\text{coeffpaler} + \text{coeffsteer}) * \text{adp} + (\text{coeffpaler} + \text{coeffsteer}) * \text{p}$
 $\text{coeffflae} * \text{lanosterolester} + \text{coeffzye} * \text{zymosterolester} + \text{coefffee} * \text{fecosterolester} + \text{coeffepe} * \text{episterolester} + \text{coeffere} * \text{ergosterolester} = \text{se}$

$\text{coefftag} * \text{tag} + \text{coeffpl} * \text{phospholipids} + \text{coeffse} * \text{se} = \text{lipids}$

$(1 / 162) * \text{udpg} = (1 / 162) * \text{udp} + \text{glycogen}$

$(1 / 162) * \text{udpg} = (1 / 162) * \text{udp} + \text{glucan}$

$(1 / 203) * \text{udpacetylglucosamine} = (1 / 203) * \text{udp} + \text{chitin}$

$(1 / 162) * \text{gdpmannose} = (1 / 162) * \text{gdp} + \text{mannan}$

$\text{coeffglycogen} * \text{glycogen} + \text{coeffchitin} * \text{chitin} + \text{coeffglucan} * \text{glucan} + \text{coeffmannan} * \text{mannan} + (\text{coefftre} / 342) * \text{tre} = \text{polysacch}$

%synthèse de la biomasse :

$\text{qttlipids} * \text{lipids} + \text{qttpolysacch} * \text{polysacch} + \text{qtrna} * \text{rna} + \text{qttprotein} * \text{protein} + \text{qttDNA} * \text{DNA} = \text{bio}$

Abréviations

- ABC : ATP binding cassette
- Acide-H : désigne la forme protonée d'un acide
- Acide⁻ : désigne la forme dissociée d'un acide
- ACS : acétyl-coA synthase
- ADH : alcool déshydrogénase
- ADP : adénosine diphosphate
- ALD : acétaldéhyde déshydrogénase
- AMP : adénosine monophosphate
- ATP : adénosine triphosphate
- CAT : carnitine-acétyl transférase
- coA : coenzyme A
- D : taux de dilution
- D_C : taux de dilution critique
- DHAP : dihydroxyacétone phosphate
- DRO : dérivés réactifs de l'oxygène
- FADH₂ : forme réduite de la flavine adénine dinucléotide
- FAD : forme oxydée de la flavine adénine dinucléotide
- GAAC : general amino acids control pathway
- G6PDH : glucose-6-P déshydrogénase
- MFS : major facilitator superfamily
- NADH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide
- NAD⁺ : forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide
- NADPH : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NADP⁺ : forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- PDC : pyruvate décarboxylase
- PDH : pyruvate déshydrogénase

- pH : potentiel hydrogène
- pHi : potentiel hydrogène intracellulaire
- pHe : potentiel hydrogène extracellulaire
- Pi : phosphate inorganique
- PPP : voie des pentose-phosphates
- PYC : pyruvate carboxylase
- P/O : rapport d'ATP formé sur oxygène consommé
- q_A : vitesse spécifique nette de production ou de consommation d'un composé A
- QR : quotient respiratoire
- r_A : vitesse volumique nette de production ou de consommation d'un composé A
- rho⁻ : cellules présentant une mitochondrie déficiente
- SDH : succinate deshydrogénase
- TOR : target of rapamycin pathway
- $Y_{A/B}$: rendement de composé A sur composé B
- Yatp : rendement en biomasse produite sur ATP formé
- μ : taux de croissance cellulaire

