

Sommaire

Sommaire	13
Introduction générale.....	21
Chapitre I. Étude bibliographique	25
1. Les lipides et leur métabolisme	27
A. Généralité	27
a. Rôle et classification des lipides	27
b. Les acides gras, des briques élémentaires diversifiées	29
c. Les lipides complexes dérivés des acides gras	33
i. Les glycérolipides.....	33
ii. Les glycérophospholipides	33
iii. Les sphingolipides et saccharolipides	35
d. Métabolisme des lipides.....	36
i. Synthèse des acides gras par le complexe acide gras synthase	36
ii. Allongement des chaînes d'acides gras par les élongases	39
iii. Modification des acides gras par l'ajout d'insaturations	40
iv. Acylation des acides gras par les acyltransférases : triacylglycérols, phospholipides et stéryl-ester	41
v. Dégradation via β -oxydation	44
vi. Hydrolyse des lipides	46
B. Les acides gras inhabituels et leurs usages.....	48
a. Rôles physiologiques et intérêt biotechnologique	48
i. Acides gras possédant des doubles liaisons conjugués	48
ii. Acides gras possédant une ou plusieurs triples liaisons	49
iii. Acides gras possédant une ou plusieurs fonction(s) époxyde(s).....	50
iv. Acides gras possédant une ou plusieurs fonction(s) hydroxyle(s).....	51
v. Conclusion	52
b. Panel des enzymes responsables des modifications inhabituelles des acides gras	
53	
c. Les rôles des transférases et d'autres enzymes dans l'accumulation des acides gras inhabituels	55
2. Les enzymes de la famille des désaturases	59
A. Les désaturases solubles.....	60

a.	Caractéristiques générales.....	60
b.	Les bases de leur régiospécificité	62
B.	Les désaturases membranaires	64
a.	Généralités	64
b.	Classement des désaturases membranaires.....	65
c.	Les premières structures des désaturases membranaires	66
C.	Mécanisme catalytique.....	67
D.	Activités inhabituelles et ingénierie des désaturases pour moduler leur spécificité	
	69	
a.	Les conjugases et acétylénases	69
i.	Les conjugases	70
ii.	Les acétylénases	71
b.	Les hydroxylases et époxydases	72
i.	Les hydroxylases	72
ii.	Les époxydases	73
3.	Utilisation de la levure oléagineuse <i>Yarrowia lipolytica</i> pour la production d'acides gras inhabituels	75
A.	Généralités.....	75
a.	Classement phylogénétique et caractéristiques micro- et macroscopiques	75
b.	Espèces du genre <i>Yarrowia</i>	75
c.	Caractéristiques physiologiques et physico-chimique.....	76
d.	Outils génétiques.....	78
e.	Applications industrielles	79
i.	Agroalimentaire	80
ii.	Valorisation de la biomasse (protéines et lipides)	81
iii.	Acides organiques et polyalcools.....	83
iv.	Lipides à haute valeur ajoutée et dérivés de lipides.....	84
B.	Souche OléoX et production d'acide ricinoléique	86
Chapitre II. Matériels et Méthodes.....	91	
1.	Souches	93
A.	Souches bactériennes.....	93
B.	Souches châssis de <i>Yarrowia lipolytica</i>	93
a.	Souche OléoX	93
b.	Souche OléoX zêta.....	94

c. Souche OléoX Δ PAH1	94
d. Conservation des souches châssis et témoins de <i>Y. lipolytica</i>	94
2. Milieux de cultures	94
A. Milieux pour <i>Escherichia coli</i>	94
B. Milieux de culture pour <i>Yarrowia lipolytica</i>	95
3. Biologie moléculaire	96
A. Description des plasmides	96
a. Plasmides pour l'amplification des cassettes d'expression chez <i>Y. lipolytica</i>	96
i. Plasmide Jmp62	96
ii. Les séquences hétérologues et endogènes (sur)exprimées	97
b. Plasmides réplicatifs pour la délétion CRISPR-Cas9	98
c. Plasmide pour construire les cassettes de délétion	99
B. Extraction d'ADN plasmidique	99
C. Purification de produits PCR et de fragments d'ADN	100
D. Extraction de l'ADN génomique de <i>Y. lipolytica</i> pour son amplification	100
a. Procédure Miniprep	100
b. Procédure PCR sur colonie	101
c. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	101
E. Mutagénèse dirigée	104
F. Électrophorèse de l'ADN	104
G. Séquençage	105
H. Transformations des souches	105
a. Souches <i>Escherichia coli</i>	105
i. Souches compétentes XL1-Blue	105
ii. Souches commerciales Stellar	106
b. Souches <i>Yarrowia lipolytica</i>	106
I. Délétion du gène PAH1 chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	106
4. Suivi des cultures	108
5. Analyse des lipides	108
A. Transméthylation des culots cellulaires	108
B. Silylation de la phase décane	109
C. Analyse de la composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse	110
6. Bio-informatique	111

A. Alignements et détermination des structures secondaires	111
B. Modélisation.....	111
Chapitre III. Résultats	113
Partie 1. Produire de l'acide ricinoléique de façon robuste et reproductible : optimisation du système de production	117
A. Développement d'un système de culture et d'analyse reproductible de type « fermentation extractive ».....	121
a. S'affranchir de la variabilité due au milieu de culture hétérogène	121
b. Un constat : l'acide ricinoléique est délétère pour la souche OléoX	121
c. Un mode de culture de type « fermentation extractive » pour limiter la toxicité de l'acide ricinoléique	122
d. Effet du nouveau mode de culture sur la croissance et l'état physiologique des cellules	123
e. L'analyse des acides gras des cultures en présence de phase décane	126
i. Nouvelles méthodes d'analyse et d'extraction	126
ii. Localisation des acides gras	126
iii. Effet sur la quantité d'acides gras produite et variabilité.....	128
f. Amélioration du milieu de culture	130
i. Source de carbone et ratio carbone/azote	130
ii. Effet d'une supplémentation en fer sur la production d'acide ricinoléique ..	131
g. Conclusion et Perspectives	132
B. La conservation des souches productrices d'acide ricinoléique et leur stabilité..	133
a. Récapitulatif des modifications déjà apportées à la souche châssis OléoX....	133
b. La nécessité d'utiliser des souches fraîchement transformées pour avoir une production reproductible d'acide ricinoléique	133
C. Amélioration de la souche châssis capable d'une expression reproductible.....	135
a. L'ajout d'une plateforme d'intégration dans la souche OléoX pour améliorer la reproductibilité de l'expression	135
b. Construction de la souche	135
c. Validation de la souche.....	137
d. Discussion	137
D. Conclusion générale, Discussion et perspectives	139
a. Synthèse des résultats obtenus.....	139
b. La toxicité de l'acide ricinoléique : état des lieux et perspectives d'amélioration	
	140

i.	État des lieux	140
ii.	Améliorer encore la sécrétion de l'acide ricinoléique ?	140
iii.	Des formes d'acide ricinoléique estérifiées pour limiter sa toxicité.....	142
iv.	Améliorer la stabilité en découplant la croissance et la production de la souche	145
c.	Effets bénéfiques de la phase décane.....	146
i.	L'amélioration du transfert d'oxygène	147
ii.	Rapidité d'analyse et seuil de détection	149
iii.	Effet sur la production des acides gras.....	149
d.	Vers une amélioration de la souche châssis avec l'outil CRISPR-Cas9.....	150
i.	OléoX : une souche affectée par les multiples modifications de son génome	151
ii.	Le système CRISPR-Cas9 pour redesigner une souche OléoX plus performante	151
e.	Vers le développement d'un procédé de conversion de la biomasse cellulosique en acide ricinoléique	153
Partie 2. Déterminants de la spécificité de l'hydroxylase et de la désaturase de <i>Claviceps purpurea</i>	155	
A.	Étude des déterminants de la spécificité de l'hydroxylase de <i>Claviceps purpurea</i>	157
a.	La construction des chimères CpFAH12/CpFAD2 et l'identification d'une position critique pour la désaturation.....	157
b.	Exploration de la position 198 et interprétation à l'aide d'un modèle tridimensionnel de CpFAH12	158
c.	Article	158
B.	Évaluation des déterminants de la spécificité de la désaturase de <i>Claviceps purpurea</i>	159
a.	Des chimères de CpFAD2 deviennent des hydroxylases/désaturases	159
b.	La mutagénèse de la zone H2 de CpFAD2.....	162
c.	Mutagénèse de saturation de la thréonine 198.....	164
d.	Discussion	165
i.	Comparaison des résultats entre hydroxylase et désaturase	165
ii.	Implication de la zone C-terminale dans l'hydroxylation	167
iii.	Comparaison des anciennes chimères « H1 » avec les nouvelles chimères « Cyt1 » : La position 176	168
C.	Conclusions générales et perspectives	171

a.	Synthèse des résultats obtenus	171
b.	Les zones autour des histidines-box sont cruciales pour la spécificité	171
c.	Autres cibles de mutagénèse	172
d.	Obtenir la structure tridimensionnelle	173
e.	L'évolution dirigée pour explorer la diversité	175
Partie 3. Ingénierie du métabolisme lipidique de <i>Yarrowia lipolytica</i> pour améliorer la production d'acide ricinoléique		177
A. Améliorer la quantité de substrat en augmentant la quantité de phospholipides synthétisés :		181
a.	Voies de synthèse des phospholipides chez les levures	181
b.	Effet de la délétion de Yl.PAH1 sur la production d'acide ricinoléique	182
c.	Effet de la surexpression des phosphotransférases de la voie de Kennedy sur la production d'acide ricinoléique	184
d.	Discussion et perspectives	186
i.	Effet de la délétion de Yl.PAH1	186
ii.	La surexpression des phosphotransférases de la voie de Kennedy	187
iii.	Poursuites futures de l'augmentation de la production de phosphatidylcholine	189
B.	Augmenter la libération de l'acide ricinoléique : lipases et phospholipases	191
a.	Choix des séquences à tester	191
b.	La lipase Yl.TGL5 est celle qui donne les résultats les plus encourageants ...	193
c.	Discussion et perspectives	194
C.	Conclusion générale et perspectives	195
a.	Variabilité et souche OléoX	195
b.	Une méthode d'analyse (trop) globale pour une réalité complexe	196
c.	La spécificité des enzymes : La clef de la réussite	197
d.	Conclusion générale	198
Partie 4. Les enzymes de modification originaires de plantes pour produire de nouveaux acides gras		199
A. État des lieux : les enzymes de plantes de la famille des désaturases membranaires sont peu ou pas actives chez <i>Yarrowia lipolytica</i>		203
a.	Les Δ^{12} -désaturases et Δ^{12} -hydroxylase de <i>Ricinus communis</i> sont très peu actives chez OléoX zéta	203
b.	Des conjugases et époxydases de la sous-famille Δ^{12} -désaturase originaires de diverses plantes ne présentent aucune activité dans la souche OléoX zéta	204

c. Exploration des hypothèses expliquant la non-activité des désaturases membranaires de plantes.....	208
B. Des chimères « plantes-champignons » pour comprendre et restaurer l’activité des enzymes de modification de plantes.....	215
a. Design des chimères <i>R. communis</i> / <i>C. purpurea</i>	215
b. Analyse de la production de lipide des chimères plantes-champignon	218
C. Conclusion générale, Discussion et perspectives	219
a. Les Δ^{12} -désaturases de levures et de plantes semblent avoir des parties transmembranaires compatibles.....	219
b. La chaîne membranaire de transport d’électrons.....	220
Conclusion générale :	223
Références bibliographiques	231

Introduction générale

Introduction

L'importance des matériaux biosourcés est un sujet critique à l'heure du développement durable. L'huile de ricin (*Ricinus communis*), est une huile végétale non-alimentaire importante dans plusieurs filières industrielles, comme celle des lubrifiants, polymères, arômes, cosmétiques, peintures ou encres. La production industrielle de cette huile nécessite des conditions climatiques tropicales qui ne sont pas compatibles avec une production européenne. De plus, la plante produit de nombreux allergènes posant problème pour sa récolte et contient une toxine puissante, la ricine. Ainsi, il est nécessaire pour pouvoir utiliser l'huile de la purifier pour en retirer la ricine qu'elle contient. Le séquençage du génome de *R. communis* a permis le développement de nouvelles variétés par des approches d'amélioration génétique, mais la production mondiale de l'huile stagne. Or le nombre d'applications industrielles augmente, et donc la demande devient plus élevée que l'offre, ce qui fait grimper le prix de l'huile, et laisse craindre une pénurie pour certaines applications. Certaines plantes produisant des huiles avec des propriétés similaires sont connues, mais leurs faibles caractéristiques agronomiques les rendent inexploitables à l'échelle industrielle. L'importance de l'huile de ricin est liée à sa composition particulière parmi les huiles commerciales disponibles. Plus de 90% des acides gras contenus dans cette huile sont de l'acide ricinoléique. Cet acide gras inhabituel à dix-huit atomes de carbones possède une hydroxylation à la position 12 et une double liaison (une insaturation) à la position 9-10.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans la problématique de trouver une alternative à la production de cet acide gras. La voie choisie est l'utilisation des biotechnologies pour permettre la production d'acide ricinoléique chez d'autres organismes. L'avantage de cette approche est l'absence totale de toxines ou d'allergènes de *R. communis* dans l'huile produite, ce qui est indispensable pour certaines applications, comme la cosmétique ou dans le domaine médical. Parmi les organismes utilisés, certains laboratoires préfèrent orienter leur stratégie vers l'utilisation de plantes. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser des micro-organismes, comme les levures, pour réaliser des productions d'acide ricinoléique en bioréacteurs. Un avantage de cette production est qu'elle peut se faire à n'importe quelle latitude et qu'elle est complètement indépendante des conditions environnementales. Un tel procédé assurerait pour les pays consommateurs (Europe, Amérique du nord et Chine) une production locale, et donc une certaine indépendance envers les pays producteurs (Inde, Chine, Brésil) et permettrait un approvisionnement plus sûr et constant.

Pour la production d'acide ricinoléique, nous avons choisi la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*. Cette levure possède plusieurs avantages, outre son métabolisme lipidique développé, son génome a été séquencé et des outils génétiques existent pour l'ingénierie génétique. Elle consomme efficacement le glycérol, qui est largement produit par l'industrie de biocarburants à partir d'huile végétale et d'autres déchets agro-industriels riches en composés hydrophobes peuvent aussi être utilisés (eaux usées de moulin à huile, huiles de fritures, graisses animales...). Une autre caractéristique est que *Y. lipolytica* est classé comme organisme « GRAS » (Generally Recognise As Safe). Un objectif de ma thèse est l'amélioration de la production d'acide ricinoléique par *Y. lipolytica*. La preuve de concept de la production a déjà été réalisée dans un article préalablement publié. Pour améliorer une conversion *in vivo*,

plusieurs stratégies sont possibles. Ici, nous avons choisi dans un premier temps de mieux comprendre les déterminants moléculaires de l'enzyme responsable de la conversion (une hydroxylase bifonctionnelle présentant des activités d'hydroxylation et de désaturation) pour pouvoir l'améliorer par la suite, puis nous avons ensuite essayé d'optimiser le métabolisme lipidique de la levure productrice. Pour identifier les déterminants de l'hydroxylase responsable de la bioconversion, nous avons tout d'abord recherché des zones impliquées dans la spécificité d'hydroxylation grâce à la comparaison avec une enzyme homologue mais n'ayant pas la même activité (la désaturase du même organisme). Les modifications apportées au métabolisme lipidique ont été testées indépendamment par l'expression ou la délétion d'un seul gène à la fois, pour voir si cela affectait la conversion.

Cette thèse s'articule donc en quatre parties :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique qui **décrit dans la première partie les lipides et leur métabolisme**. Après avoir donné quelques généralités sur les lipides et décrit certaines voies métaboliques impliquées dans leur production, le chapitre se focalise sur les acides gras inhabituels et les différentes familles enzymatiques qui les produisent. **La deuxième partie se concentre sur une famille particulière d'enzymes de modification des acides gras, les désaturases.** Après avoir présenté succinctement les désaturases solubles, la sous-famille des désaturases membranaires sera présentée plus en détails ; l'enzyme utilisée pour la production hétérologue d'acide ricinoléique fait partie de cette dernière famille. Nous présenterons également ce qui est connu sur les mécanismes catalytiques suspectés des désaturases et sur les activités inhabituelles que présentent certaines enzymes de cette famille. Enfin, **la dernière partie présente l'organisme châssis utilisé dans la thèse, *Y. lipolytica*.** Après avoir décrit des caractéristiques générales de cet organisme, un focus a été apporté sur la souche châssis utilisée, ainsi que ses modifications et les résultats préalablement obtenus pour la production d'acide ricinoléique.
- Le second chapitre récapitule les différentes techniques et protocoles expérimentaux utilisés au cours de cette thèse. Les différents domaines sont la microbiologie, la biologie moléculaire, la conduite de culture et les analyses chromatographiques et bio-informatiques.
- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus au cours de cette thèse. **Dans un premier temps, l'ensemble des modifications apportées à la méthode de culture et d'analyse** pour améliorer la reproductibilité des résultats seront exposées. En particulier, l'utilisation d'une stratégie de type « fermentation extractive » sera détaillée, puis les changements apportés sur les souches seront présentés. **La seconde partie présente l'étude des déterminants de la spécificité désaturation/hydroxylation** par construction de chimères et par mutagénèse. Cette stratégie appliquée à l'hydroxylase CpFAH12 a fait l'objet d'une publication. Une stratégie similaire a ensuite été réalisée sur la désaturase CpFAD2. **La troisième partie détaille l'effet des modifications apportées du métabolise lipidique de *Y. lipolytica*.** Enfin, **la dernière partie décrit la tentative d'expression de désaturases membranaires de plantes**, l'hydroxylase de RcFAH12, des conjugases et des époxydases pour obtenir une activité.
- Le quatrième et dernier chapitre est la conclusion générale et les principales perspectives qui sont issues de ce projet de thèse.

Chapitre I.

Étude bibliographique

1. Les lipides et leur métabolisme

A. Généralité

a. Rôle et classification des lipides

Les lipides sont un des quatre piliers essentiels des biomolécules avec les protides, glucides et acides nucléiques. Ils regroupent la plupart des composés hydrophobes retrouvés dans le vivant, et possèdent de multiples rôles fondamentaux dans les organismes vivants. Ils sont notamment à la base des différentes membranes, caractéristique essentielle des cellules, et forment une source énergétique sous forme de graisses ou d'huiles pour le stockage d'énergie à long terme des organismes.

La classification des lipides a été révisée en 2005 (Fahy et al. 2009, lipidmaps.org). Les lipides sont alors définis comme étant : « des petites molécules hydrophobes ou amphiphiles qui sont issues totalement ou partiellement de condensations de thioesters par un mécanisme de carbanions ou/et condensation d'unités isoprènes par un mécanisme de carbocation ». Cette définition se réfère au mécanisme de synthèse des lipides, qui sera développé par la suite.

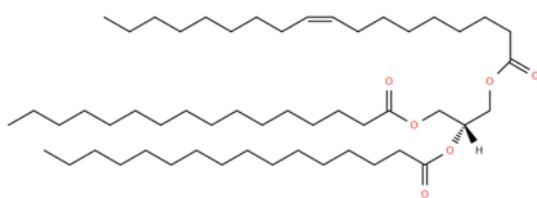
Les lipides peuvent être classés en huit catégories (figure I.1.1), dont deux sont issues de la condensation d'unité isoprènes, les stérols et les prénoles. Les stérols sont des molécules à quatre cycles qui ont des rôles physiologiques importants comme la modulation de la fluidité membranaire (Dufourc 2008) ou synthèse d'hormones stéroïdiennes (Nomura et al. 1999). Les prénoles sont des composés insaturés qui sont généralement des antioxydants, colorants ou composées aromatiques (Zhuang and Chappell 2015). Ils peuvent également rentrer dans la composition des membranes des Archaea (Jain et al. 2014). Leur membrane cytoplasmique a une composition tout à fait particulière il s'agit de prénoles liés par des liaisons éthers, et non pas d'acides gras liés par des liaisons esters. Les cinq autres catégories ont pour origine la condensation de thioesters et sont les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les saccharolipides et les polycétides. Les polycétides sont un groupe très divers de molécules (Mutka et al. 2006; Liu et al. 2019), qui sont généralement des métabolites secondaires pouvant avoir des effets variés. Les acides gras représentent une catégorie fondamentale dans cette classification puisqu'ils servent de briques élémentaires à la synthèse de quatre autres catégories de lipides plus complexes : les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides et les saccharolipides.

Nous détaillerons les caractéristiques des acides gras et des lipides dérivés d'acides gras dans les paragraphes suivants.

Condensation de thioester (Ac-CoA)

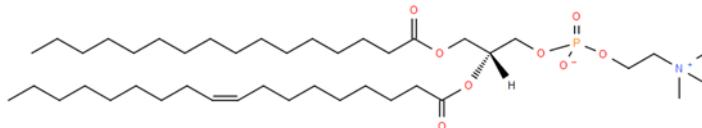
Glycérolipides

TG(16:0/16:0/18:1(9Z))
1,2-dipalmitoyl-3-oléoyl-sn-glycérol

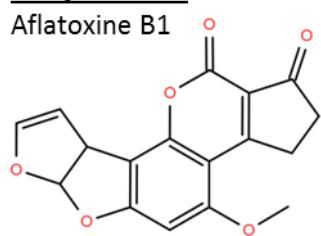


Glycérophospholipides

POPC
1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

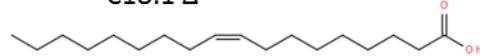


Polycétides



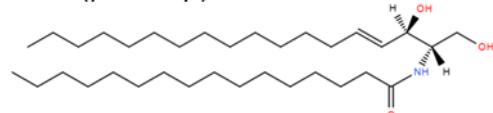
Acides gras

Acide oléique
C18:1 Δ^9c



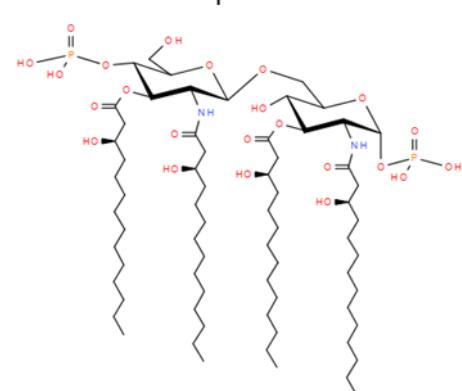
Sphingolipides

Cer(d18:1/16:0)
N-(palmitoyl)-céramide



Saccharolipides

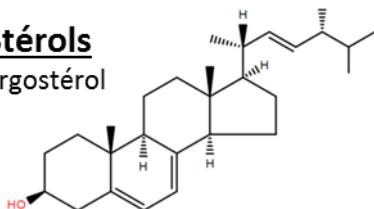
Lipide IVA
Précureur lipide A



Condensation d'isoprènes

Stérols

Ergostérol



Prénols

β -Carotène

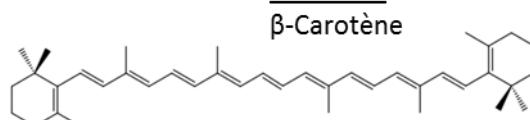
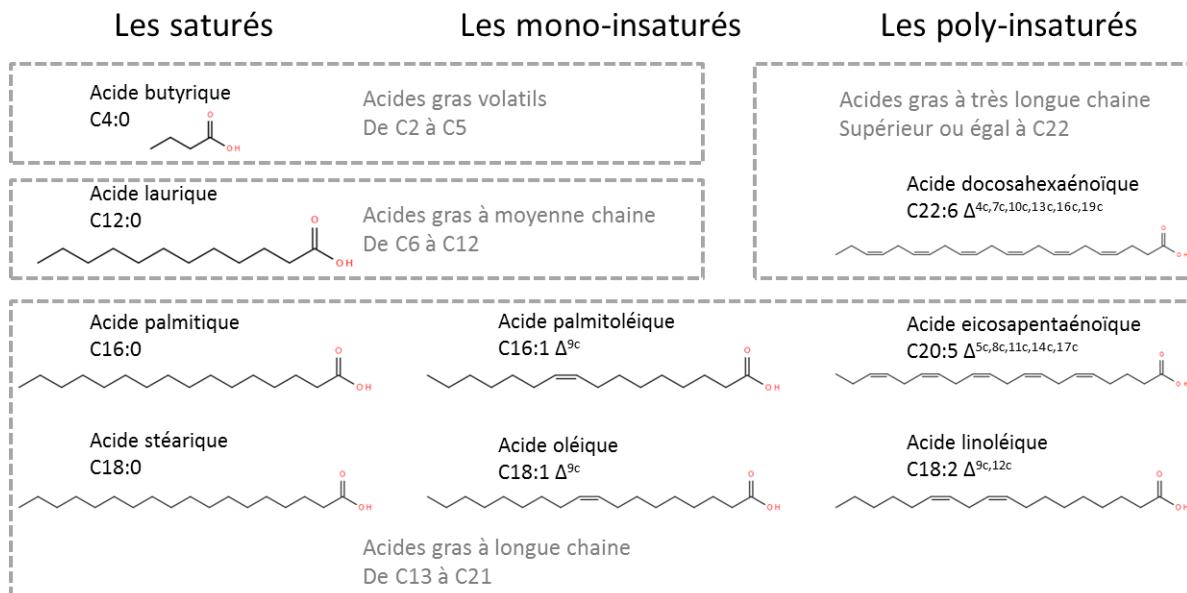


Figure I.1.1 : Figure récapitulative des huit catégories de lipides, qui est indiquée en gras souligné, avec une représentation d'un membre de chacune des catégories. Les thioesters sont généralement des acétyl-CoA, propionyl-CoA ou malonyl-CoA (Coenzyme A).

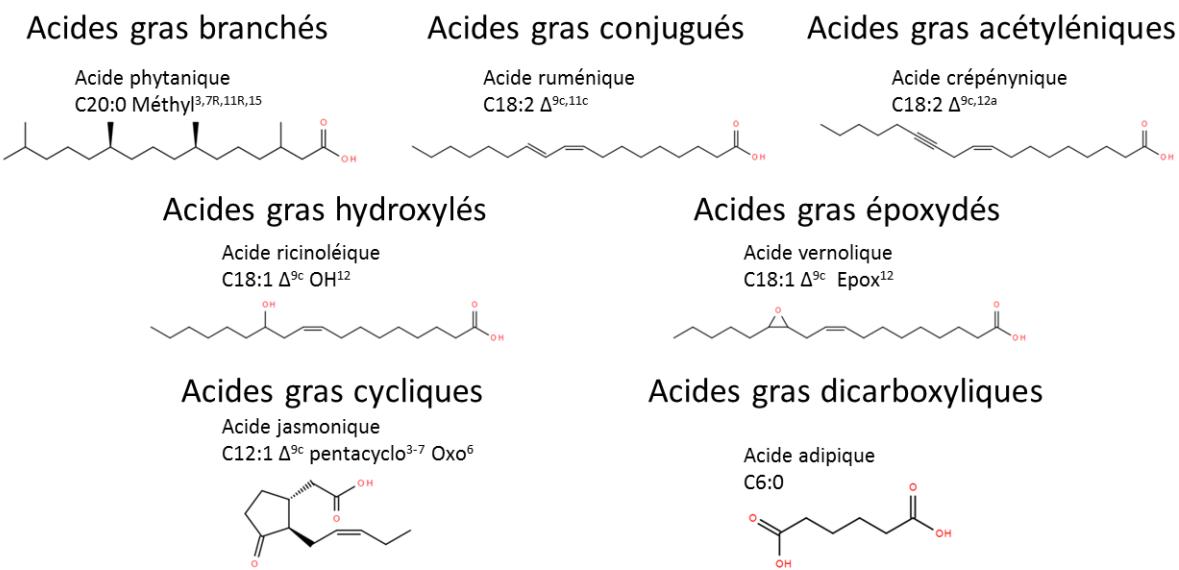
b. Les acides gras, des briques élémentaires diversifiées

Les acides gras sont formés d'une fonction acide carboxylique polaire liée à une chaîne linéaire de carbone apolaire. Dans la majorité des cas, la chaîne aliphatique est linéaire avec ou sans insaturation(s), mais des acides gras avec des chaînes ramifiées (Jung et al. 2017), cycliques ou fonctionnalisées existent également. Ces modifications confèrent des propriétés variées qui dépendent des fonctions chimiques présentes. La figure I.1.2 montre la diversité des acides gras et de leurs dérivés, leurs propriétés seront détaillées dans la partie I.1.B.

1) Acides gras conventionnels



2) Acides gras inhabituels



3) Dérivés d'acides gras



Figure I.1.2 : Figure représentant différents types d'acides gras. La partie 1 représente des acides gras conventionnels avec les deux classifications organisées selon le nombre d'insaturations ou la longueur de la chaîne de carbone. La partie 2 montre les différentes fonctions inhabituelles que l'on peut trouver chez les acides gras. La partie 3 présente deux dérivés réduits d'acide gras. Structures de base construites avec :

<http://www.lipidmaps.org/tools/structuredrawing/StrDraw.pl?Mode=SetupFAStrDraw>.

Deux paramètres principaux sont pris en compte pour organiser et classifier la grande diversité de la famille des acides gras. Le premier paramètre est la taille de la chaîne carbonée. Ainsi, on distingue les acides gras à courte chaîne (2 à 5 carbones, aussi appelés acides gras volatils), de ceux à chaîne moyenne (6 à 12 carbones), longue chaîne (13 à 21 carbones) ou très longue chaîne (plus de 22 carbones). La notation conventionnelle des acides gras est CX, où X correspond au nombre de carbones, par exemple C18 se réfère à tous les acides gras avec une chaîne de dix-huit carbones. Les acides gras avec un nombre pair de carbone sont les plus commun, en particulier ceux à 16 ou 18-carbones (longue chaîne) sont retrouvés dans toutes les cellules, ce sont les acides gras majoritaires composant les membranes biologiques (sauf exception comme chez les Archaea (Jain et al. 2014). Les autres acides gras (à plus courte ou plus longue chaîne) sont accumulés seulement par certains organismes et ils ont des propriétés biologiques souvent spécifiques pour leur hôte (phyto) hormones, antimicrobiens, structuraux...). Par exemple, les plantes ont besoin d'acides gras à très longue chaîne pour la synthèse de cires (Yeats and Rose 2013; Bernard and Joubès 2013; Miklaszewska et al. 2018; Yuan et al. 2019) pour leur cuticule. Les acides mycoliques de la paroi des Mycobacterium sont synthétisés à partir d'acides gras très longue chaîne (Barry et al. 1998), et les modifications qu'ils portent sont cruciales pour leur survie et pathogénicité (Dubnau et al. 2002; Barkan et al. 2012). Les acides gras volatils sont synthétisés par le microbiote intestinal, en particulier par la flore microbienne des ruminants pour qui ils forment la principale source de carbone et d'énergie (Nolan et al. 2014). Chez certaines plantes comme le cocotier, l'huile des graines contient une haute quantité d'acide gras à moyenne chaîne comme réserve d'énergie (Bezard et al. 1971).

Le second paramètre pour classer les acides gras est la présence de modifications chimiques sur la chaîne de carbone, en particulier le type de modification, leur position et orientation stéréochimique. Les acides gras saturés ne portent aucune modification et ils servent généralement de substrats pour la β -oxydation ou à synthèse d'acides gras modifiés (LeGrand and Rioux 2015). La modification la plus commune et présente chez tous les êtres vivants est l'intégration de doubles liaisons (ou insaturations) dans la chaîne carbonée, qui donne des acides gras mono-insaturés ou poly-insaturés selon qu'il y en ait une ou plusieurs (figure I.1.2). La conformation cis, ou Z, est de loin la plus courante mais certains organismes synthétisent des acides gras possédant une double liaison trans, comme c'est le cas par exemple de la flore ruménique qui modifie la composition des lipides des ruminants (Wilczek et al. 2017; Gamarra et al. 2018). L'hydrogénéation partielle des huiles végétales riches en acides gras poly-insaturés conduisent aussi à la formation d'acides gras trans (Wilczek et al. 2017; Zhao et al. 2018). La nomenclature associée est CX:Y, où Y est le nombre d'insaturations de l'acide gras. Pour préciser davantage la position de la ou des doubles liaisons, il est possible d'utiliser la notation Δ^Z , où Z est le numéro du carbone où commence la double liaison. Par exemple, C18:1 $\Delta^{9\text{cis}}$ correspond à l'acide octadéc-9cis-énoïque, couramment appelé acide oléique (figure I.1.2). La présence d'une ou plusieurs insaturations dans la chaîne carbonée, ainsi que leur placement et stéréochimie, modifie profondément les propriétés des acides gras (Shanklin and Cahoon 1998).

Les insaturations sont aussi responsables du phénomène de rancissement, c'est-à-dire de l'oxydation des doubles liaisons, ce qui conduit à la formation d'hydropéroxydes (Kaneko et

al. 1996; Evans et al. 1998) puis, si l'oxydation continue, divers produits de plus courtes chaîne comme des aldéhydes sont formés (Frankel 1988). Plus il y a d'insaturations présentes, plus la sensibilité à l'oxydation est forte (Evans et al. 1998; Zhang et al. 2015). Cela peut dégrader les propriétés initiales du produit, en particulier dans le domaine alimentaire car ces composés ont généralement des odeurs ou saveurs désagréables. Mais certaines applications sont basées sur cette propriété, comme dans les huiles siccatives de peinture qui, grâce à leurs hautes teneur en acide gras poly-insaturés, peuvent de réticuler et former un polymère protecteur (Stenberg et al. 2005; Sharmin et al. 2007). Techniquement, une huile siccative doit contenir une moyenne de 2,2 groupement $R-CH=CH-CH_2-CH=CH-R'$ (bis-allylique) par triglycéride (Samuelsson and Johansson 2001). L'une des huiles les plus utilisée dans ce domaine est l'huile de lin, car elle peut se réticuler dans les conditions ambiantes. Cette huile est très riche en acide linoléique ($C18:2 \Delta^{9c,12c}$) et α -linolénique ($C18:3 \Delta^{9c,12c,15c}$).

Dans le domaine alimentaire, les acides gras poly-insaturés sont particulièrement intéressants car ils ont des effets bénéfiques sur la santé comparés aux acides gras trans ou saturés. Les acides eicosapentaénoïque ($C20:5 \Delta^{5c,8c,11c,14c,17c}$) et docosahexaénoïque ($C22:6 \Delta^{4c,7c,10c,13c,16c,19c}$), trouvés par exemple dans les huiles de poissons, de micro-algues ou de crustacées, permettent ainsi par exemple une diminution du risque cardio-vasculaire, la prévention du diabète de type 2 et la réduction des inflammations chroniques (Nakamura and Nara 2003; Jiao et al. 2015). À l'inverse, plusieurs études ont montré que les acides gras trans (hors acide gras conjugué) ont des effets néfastes pour la santé sur de nombreux critères, en particulier les risques cardiovasculaires (Wilczek et al. 2017; Zhao et al. 2018).

Il est à noter que lorsque la fonction carboxylique est remplacée par une autre, comme une fonction hydroxyle ou aldéhyde, on parle alors respectivement d'alcool gras et d'aldéhyde gras. Ces molécules ont également un intérêt pour l'industrie. Par exemple l'octanal est utilisé en parfumerie et agroalimentaire pour son parfum de fleurs et fruits et le dodécanol sert comme précurseur au sodium-dodécyl-sulfate, un tensioactif (figure I.1.2). Ces composés peuvent être obtenus par synthèse pétrochimiques ou ils peuvent être biosourcés, par exemple à partir d'huiles, de graisses ou de cires (par extraction directe ou après modification chimique (réduction) à partir des acides gras). Or certaines enzymes, comme les acyl-Coenzyme A (acyl-CoA) réductases (par exemple *Tyto alba* FAR1) sont capable d'effectuer la réduction des acyl-CoA directement en alcools gras. Des productions ont déjà été obtenues chez *Escherichia coli* (Liu et al. 2013; Liu et al. 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Yu et al. 2017; Hu et al. 2018) ou *Yarrowia lipolytica* (Wang et al. 2016).

c. Les lipides complexes dérivés des acides gras

Les acides gras peuvent servir de briques élémentaires pour former quatre autres catégories de lipides complexes selon la nature de l'accepteur (glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, saccharolipides) (Fahy et al. 2009). L'estérification entre leur fonction acide carboxylique et une fonction hydroxyle d'un accepteur est le type de liaison le plus couramment retrouvé, mais une liaison amide peut être retrouvée chez des sphingolipides.

i. Les glycérolipides

Les glycérolipides sont formés par l'estérification d'une à trois chaînes d'acide gras sur un glycérol. Selon le nombre d'estérifications sur la chaîne de glycérol on parlera de, mono-, di- ou triacylglycérols. Ces derniers forment les lipides majoritaires des huiles et graisses d'origine biologiques, qui ont un but de stockage énergétique à long terme et/ou d'isolant thermique.

ii. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides, communément appelés phospholipides, sont aussi des esters de glycérol d'une ou deux chaînes d'acyl, mais la position sn1 du glycérol est liée à un phosphate, seul ou lié à une autre molécule polaire (choline, inositol, glycérol, sérine... Figure I.1.3). Cette propriété amphiphile importante fait des glycérophospholipides la base des membranes du cytoplasme et des organites et lui confèrent leurs propriétés. Les membranes ont des compositions différentes selon l'organisme considéré et la fluidité des membranes cellulaires est un paramètre crucial d'homéostasie omniprésent chez les êtres vivants (division cellulaire, perméabilité, ...). La plupart des activités biologiques nécessitent une membrane fluide, où les protéines encastrées peuvent facilement diffuser et où les vésicules peuvent se former et fusionner avec les différentes membranes. Cette propriété ainsi que d'autres, comme la différence de potentiel, proviennent en partie de la répartition asymétrique des charges des phospholipides dans la membrane cytoplasmique : chez les cellules eucaryotes, le feuillet externe contient en majorité des phosphatidylcholines chargées positivement, alors que le feuillet interne est plutôt chargé négativement avec des phosphatidylséries et phosphatidylinositols (Marquardt et al. 2015; Renne et al. 2015).

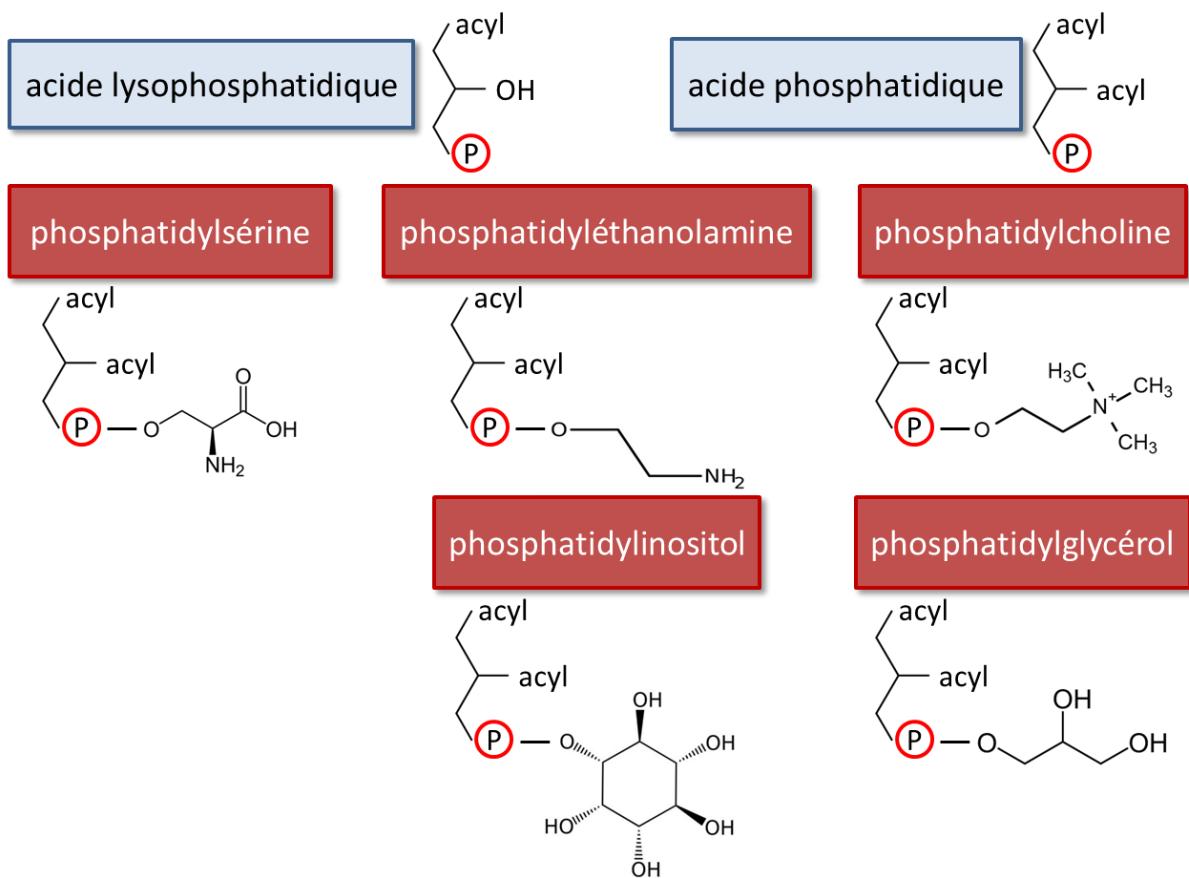


Figure I.1.3 : Représentation schématique du métabolisme des principaux phospholipides (en rouge). Le radical « acide phosphatique » et les différentes têtes polaires sont présentées. La voie métabolique de Kennedy (« Kennedy pathway ») est encadrée en pointillés. Les enzymes sont indiquées dans les rectangles gris.

Une manière de réguler la fluidité des membranes est de contrôler la composition en acide gras des glycérophospholipides. La présence d'insaturation(s) sur les chaînes d'acides gras diminue la température de transition de la membrane, c'est-à-dire la température à laquelle elle passe d'un état fluide (désordonné) à un état ordonné (Mansilla et al. 2004; Ernst et al. 2016). Un autre facteur important est l'arrangement stérique des chaînes d'acides gras. Deux chaînes saturées, donc linéaires, vont pouvoir interagir sur toute leur longueur et cela va donc rigidifier la structure et la rendre plus compacte. Les insaturations *cis* induisent un coude rigide dans la chaîne latérale, ce qui réduit la surface d'interaction et donc diminue cette compacité (figure I.1.4). Cela aussi explique que les membranes des organismes poikilothermes (organismes ne régulant pas leur température corporelle) s'enrichissent en acide gras poly-insaturés lorsque la température du milieu diminue pour en diminuer la viscosité (Mansilla et al. 2004). La composition des membranes influe également la tolérance à d'autres facteurs abiotiques, comme la concentration en sels ou la sécheresse (Zhang et al. 2012). Généralement, la présence d'acides gras insaturés améliore la résistance à ces stress.

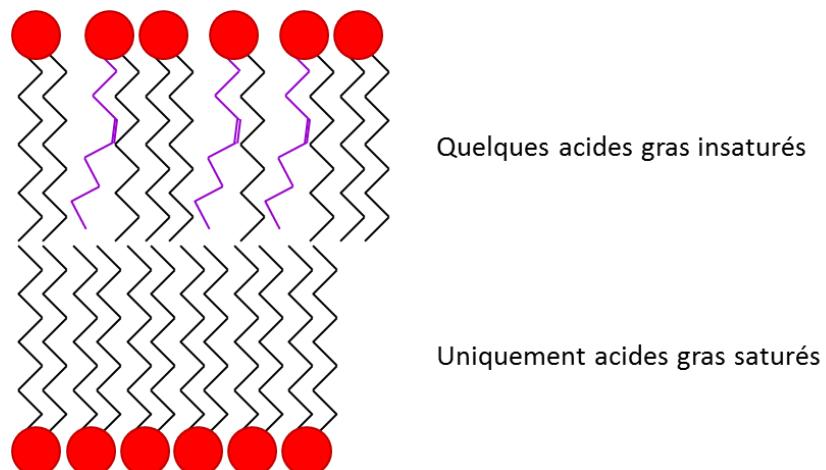


Figure I.1.4 : Représentation schématique d'une bicouche lipidique. La couche inférieure ne contient que des acides gras saturés et est bien plus dense que la couche supérieure qui contient des acides gras insaturés.

iii. Les sphingolipides et saccharolipides

Les sphingolipides et saccharolipides sont moins courants que les catégories précédentes et ne sont retrouvés qu'en bien plus faible quantité.

Les sphingolipides sont formé d'une base sphingoïde, synthétisée à partir d'un acide gras (majoritairement palmitoyl-CoA) et de sérine (figure I.1.5). Cette base contient une fonction amine sur laquelle un acide gras peut être lié par une liaison amide. Les bases et les acides gras peuvent aussi subir beaucoup de modifications, comme des désaturations, et diverses têtes polaires peuvent y être greffées, ce qui implique une énorme diversité de structures possible. Les sphingolipides simples servent dans certaines cascades de signalisation cellulaire et les sphingolipides plus complexes, généralement avec des glycosylations, ont des fonctions structurelles et interviennent dans les interactions cellulaires (Montefusco et al. 2014; Spincemaille et al. 2014). Le métabolisme des sphingolipides chez la levure *Yarrowia lipolytica* est assez peu connu, mais la délétion de *YILAC1* (une céramide synthase) empêche la glycosylation des céramides, ce qui empêche la transition vers une forme hyphale (Bal et al. 2013).

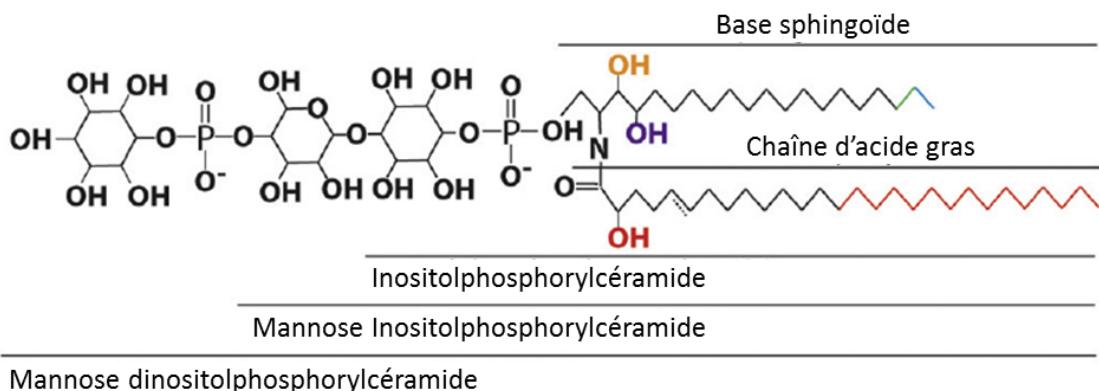


Figure I.1.5 : Exemple de sphingolipide retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae*. Tirée de Montefusco et al. 2014.

Les saccharolipides sont des acides gras estérifiés sur des oses. Il y a assez peu de bibliographie sur cette catégorie, mais il semble que les saccharolipides soient surtout présent chez les bactéries. Celui-ci forme le lipide A, la partie basale des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Zhang et al. 2013). Il est en partie responsable de sa grande toxicité, car c'est un puissant stimulant du système immunitaire.

Conclusion : les acides gras possèdent une grande diversité de tailles et modifications chimiques possibles. Les lipides qui sont composés d'acides gras partagent donc eux aussi cette large diversité. Nous allons dans les prochains paragraphes détailler les modes de synthèse de ces composés et ainsi que les enzymes qui sous-tendent leur production. Un focus particulier sur la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* sera appliqué car elle est la souche châssis choisie pour réaliser l'étude.

d. Métabolisme des lipides

i. Synthèse des acides gras par le complexe acide gras synthase

Les acides gras sont synthétisés via des complexes protéiques localisés dans le cytosol appelés « fatty acid synthase » ou FAS, et qui permettent la synthèse d'acide gras saturés comprenant généralement 16 ou 18 atomes de carbone. Cette synthèse nécessite l'action coordonnée de plusieurs enzymes et d'une protéine porteuse d'acyle ou ACP (« acyl-carrier protein ») (figure I.1.6 et tableau I.1.1).

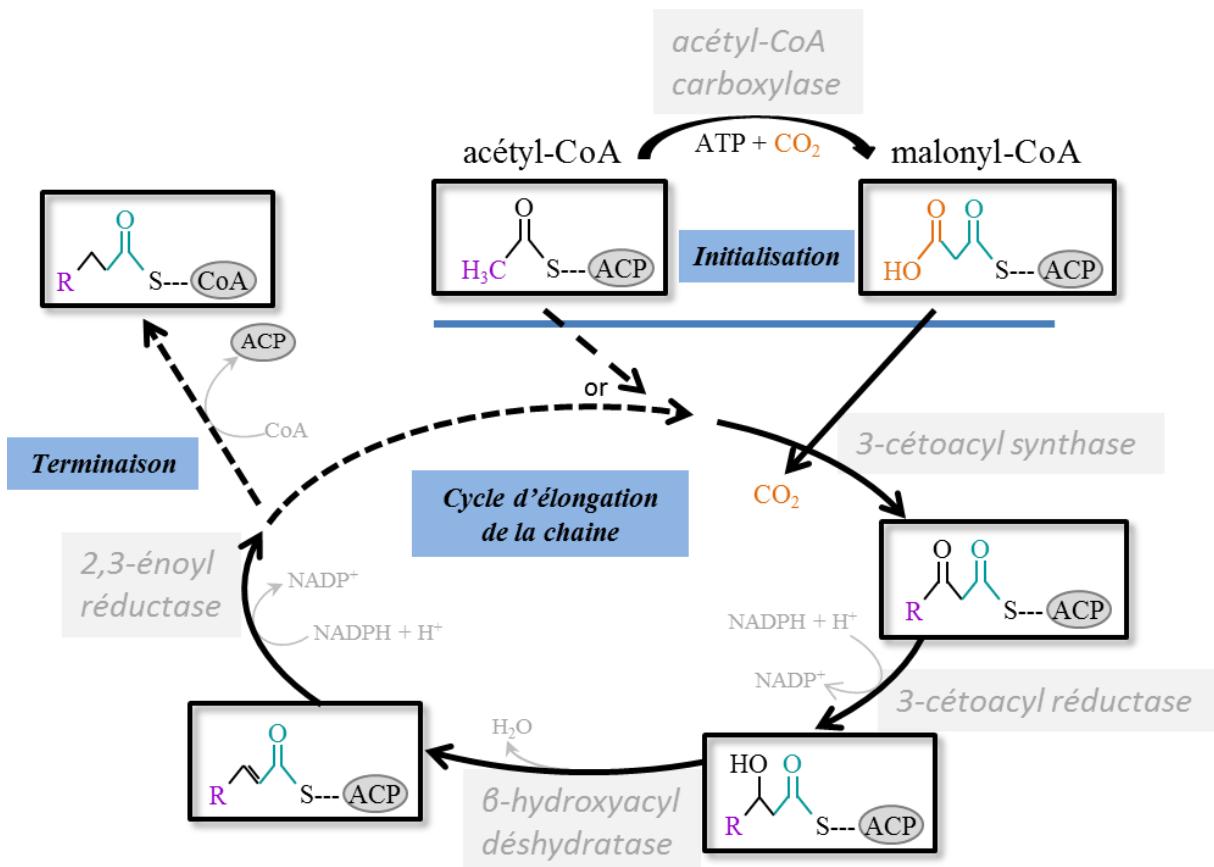


Figure I.1.6 : Schéma des quatre étapes d'un cycle pour la synthèse d'acide gras.

La synthèse des acides gras est réalisée à partir de deux précurseurs, l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est synthétisé par une enzyme extérieure au complexe : l'acétyl-CoA carboxylase, capable de condenser un acétyl-CoA avec un dioxyde de carbone (CO₂, HCO₃⁻ en milieu aqueux) en consommant un ATP. Une étape de phosphopantéinylation préalable permettra l'activation de l'ACP par un transfert d'un bras phosphopantéine du CoA sur une sérine conservée de l'ACP.

Dans une première phase d'initialisation, les groupements acétate et malonate des précurseurs sont transférés sur le bras phosphopantéine de deux ACP. L'acétyl-ACP formé est nécessaire uniquement pour cette phase d'initialisation.

S'en suivent alors plusieurs cycles d'elongations, qui sont formés de quatre réactions successives durant lesquels la chaîne carbonée de l'acyl-CoA (ou de l'acétyl-CoA lors du premier cycle) sera allongée de deux carbones. À chaque cycle, un résidu malonyl (lié à un ACP) servira de donneur pour l'elongation de l'acyl-ACP (ou acétyl-ACP), une molécule sera donc consommée à chaque cycle. La première étape catalysée par la cétoacyle synthase est une condensation décarboxylative de l'acyl-ACP et du malonyl-ACP en un 3-cétoacyl-ACP. Cette étape permet d'ajouter deux carbones à la chaîne en cours d'elongation. Puis la fonction cétone du carbone 3 subira une première réduction par la 3-cétoacyl-ACP réductase, donnant un 3-hydroxyacyl-ACP. La troisième étape est une déshydratation par la β-hydroxyacyle déshydratase donnant un trans-2,3-déhydroacyl-ACP. Finalement, l'énoyl-réductase catalyse la seconde

réduction qui permettra d'obtenir un acyl-ACP avec une chaîne carbonée allongée de deux carbones. Deux molécules de NAPDH sont consommées, une lors de chaque réduction.

Chez la levure, les produits sont majoritairement des acides gras C16 et C18 donc une fois que l'acyle atteint cette taille, il est transféré de l'ACP vers un CoA grâce à la malonyl:palmitoyl transférase (Tehlivets et al. 2007; Rigouin et al. 2017; Henritzi et al. 2018; Rigouin et al. 2018).

Il existe deux classes distinctes de FAS qui partagent les mêmes mécanismes (Rock and Jackowski 2002; Schweizer and Hofmann 2004). Les FAS de type II sont constitués de plusieurs protéines indépendantes dont chacune est responsable d'une seule activité catalytique. Elles sont généralement trouvées chez les procaryotes, les plastes et les mitochondries. Les FAS de type I sont quant à elles retrouvés dans le cytoplasme des eucaryotes. Elles sont composées d'une ou deux larges protéines possédant l'ensemble des activités enzymatiques, séparés en plusieurs domaines catalytiques. Chez les mammifères il s'agit d'une seule protéine portant les différentes activités enzymatiques et s'organisant en dimère. Chez la plupart des levures (comme chez *Yarrowia lipolytica*, notre organisme d'étude), deux sous-unités différentes, α et β , portent la totalité des activités nécessaires pour la synthèse des acides gras à partir des précurseurs acétyl et malonyl. Ces domaines protéiques s'organisent en dodécamère géant $\alpha_6\beta_6$ (Tehlivets et al. 2007; Gipson et al. 2010) (figure I.1.7).

Le tableau I.1.1 récapitule les numéros d'accessions des gènes et les activités enzymatiques portées par les deux sous-unités chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

	Activités enzymatiques	Accession	Références
	acétyl-CoA carboxylase :	YALI0C11407p	(Beopoulos et al. 2009; Tai and Stephanopoulos 2013)
FAS2 sous-unité α	- ACP - 3-cétoacyle synthase - 3-cétoacyle réductase - phosphopantéthéine transférase	YALI0B19382p	
FAS1 sous-unité β	- acétyltransférase - β -hydroxyacyle déshydratase - 2,3-énoyl réductase - malonyl/palmitoyl transférase	YALI0B15059p	

Tableau I.1.1 : Récapitulatif des différentes activités et des numéros d'accession des enzymes de synthèse des acides gras.

Monomères :

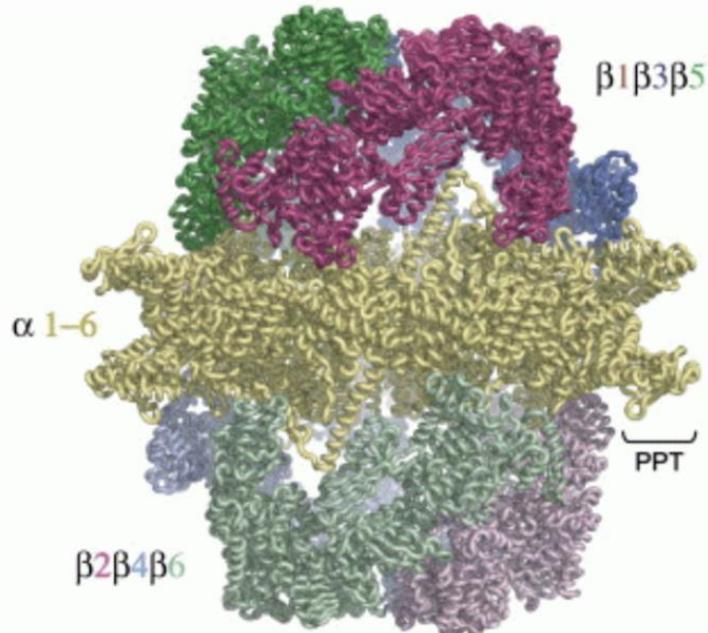
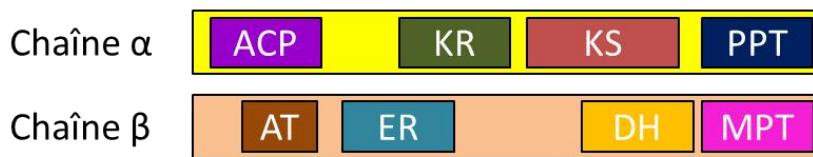


Figure I.1.7 : Schéma d'un complexe FAS de type I de levure. En haut, les deux chaînes protéique qui portent chacune quatre domaine catalytique. Ces sous-unités s'assemblent en dodécamère (six sous-unités de chaque chaîne protéique) pour former un complexe de grande taille qui permettra la synthèse des acides gras (en bas, image tirée de (Lomakin et al. 2007).

ii. Allongement des chaînes d'acides gras par les élongases

Les acides gras à très longue chaîne sont généralement synthétisés à partir des C16 et C18 par des élongases, des complexes de plusieurs enzymes, généralement localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique (Tehlivets et al. 2007; Joubès et al. 2008). Les quatre étapes pour l'elongation sont similaires à celles des complexes FAS, mais chacune de ses activités semblent codées par des protéines différentes. Chez les levures, les principales enzymes appartiennent à la famille Elo, qui codent pour des enzymes de condensation (3-cétoacyl-synthase).

Chez *Y. lipolytica*, deux gènes qui codent pour des enzymes avec une activité 3-cétoacyl-synthase ont été récemment caractérisés, YI.ELO1 (YALI0F06754p) et YI.ELO2 (YALI0B20196p). YI.ELO1 allonge les C14 et C16 en C18, alors que YI.ELO2 agit sur les C16 et plus pour former les acides gras à très longue chaîne (Rigouin et al. 2017; Rigouin et al. 2018). La délétion de YI.ELO1 n'a que peu d'impact sur la croissance de *Y. lipolytica* alors que celle de YI.ELO2 est extrêmement délétère et ne permet qu'une très faible croissance. Chez

Saccharomyces cerevisiae, les acides gras à très longue chaîne sont utilisés dans la synthèse des sphingolipides, telle la céramide, ou alors de glycolipides/phospholipides (Glycosylphosphatidylinositol-anchor lipid, ancrés GPI) (Henry et al. 2012; Klug and Daum 2014; Ernst et al. 2016; Yu et al. 2017). Chez cette levure, la délétion de gènes responsables de la synthèse des acides gras à très longue chaîne (Elo2 et Elo3) a conduit à plusieurs déficits importants dans les souches, similaire à ce que la délétion de Yl.ELO2 a donné chez *Y. lipolytica*. Il est donc possible que chez *Y. lipolytica* Yl.ELO2 servent à la synthèse de ces mêmes composées (céramides et ancrés GPI).

iii. Modification des acides gras par l'ajout d'insaturations

La synthèse d'acides gras par les FAS conduit à l'obtention d'acides gras saturés qui seront ensuite pour la plupart modifiés. La modification la plus classique est la désaturation. Il existe chez *Escherichia coli* un ancien système anaérobie de désaturation (Mansilla et al. 2004). Mais la majorité des désaturations sont réalisées par des désaturases qui comme leur nom l'indique ajoutent des doubles liaisons dans une chaîne carbonée déjà synthétisée. Nous traiterons plus en détail ces enzymes dans le paragraphe I.2) puisqu'elles sont au cœur de notre étude.

Une première étape de désaturation est commune à tous les organismes vivants, elle est réalisée à la position 9 des acides stéarique (C18:0) et palmitique (C16:0). Pour donner respectivement l'acide oléique (C18:1 Δ^{9c}) et acide palmitoléique (C16:1 Δ^{9c}). Ces enzymes sont membranaires et communes à tous les êtres vivants (OLE1 chez les levures, ou SCD1).

Puis d'autres désaturases peuvent agir séquentiellement pour former différents acides gras poly-insaturés caractéristiques de l'organisme considéré. Il est à noter que tous les organismes ne possèdent pas ces désaturases. Ainsi la levure *S. cerevisiae* ne produit pas d'acide gras poly-insaturés alors que la levure *Y. lipolytica* est capable de produire de l'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$).

Par ailleurs, certains animaux (Métazoaires ou Animalia) ont des besoins essentiels pour quelques acides gras qu'ils ne trouvent que dans leur alimentation, car ils n'ont pas la totalité de la machinerie enzymatique nécessaire à leur synthèse. Ainsi, les mammifères sont dépendant de leurs apports alimentaires pour l'acide linoléique et α -linolénique (C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$) (Nakamura and Nara 2003) ainsi que pour d'autres acides gras $\omega 3$ comme les acides eicosapentaénoïque (C20:5 $\Delta^{5c,8c,11c,14c,17c}$) et docosahexaénoïque (C22:6 $\Delta^{4c,7c,10c,13c,16c,19c}$). On peut noter que certains animaux « simples » comme les apludies (« lièvres de mer ») semblent avoir conservé la capacité à synthétiser des acides gras poly-insaturés (Pereira et al. 2018). Ces deux acides gras $\omega 3$ sont également synthétisés par des microalgues, ce qui explique leur large présence dans la chaîne alimentaire marine.

iv. Acylation des acides gras par les acyltransférases : triacylglycérols, phospholipides et stéryl-ester

Il est communément admis que les acides gras sous forme libre sont toxiques pour les cellules et ne peuvent donc pas être accumulés en grandes quantités sous cette forme (Desbois and Smith 2010; Sec et al. 2015). Dans les cellules, ils existent principalement sous forme estérifiée, par exemple sur un phospholipide pour être intégré aux membranes ou sur un glycérol pour être stockés sous forme de triacylglycérols ou encore sur un stérol pour former des stéryl-esters. Ces acides gras neutres sont stockés dans des organites spécialisés appelés corps lipidiques (Mlickova et al. 2004; Athenstaedt et al. 2006).

La voie de synthèse des triglycérides et des phospholipides est commune et débute par deux acylations successives du glycérol-3-phosphate (figure I.1.8) pour former un acide phosphatidique (Klug and Daum 2014; Silverman et al. 2016) avec deux chaînes d'acides gras en position 2 et 3 du glycérol. Cette molécule importante est le carrefour des voies de synthèse des triacylglycérol et des phospholipides (Guerfal et al. 2013).

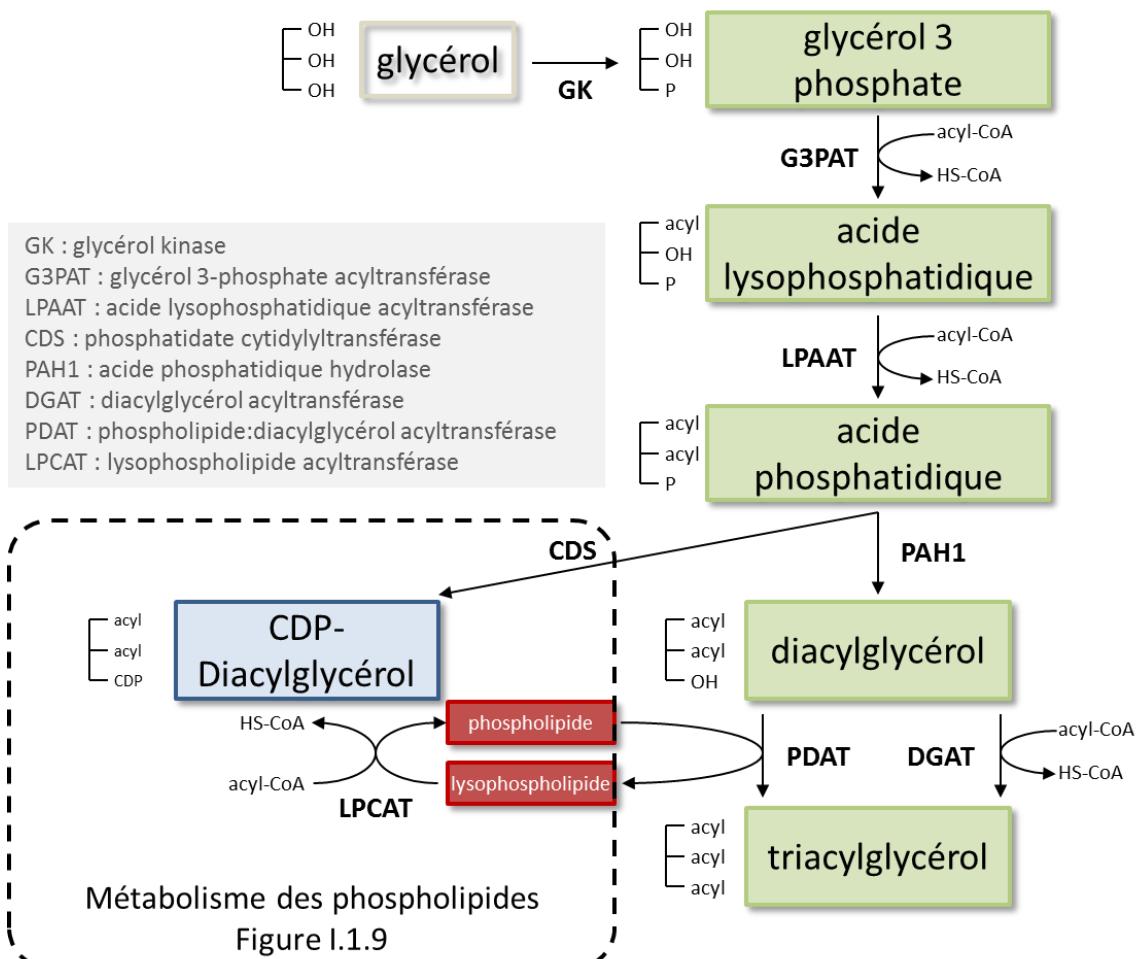


Figure I.1.8 : Voie de synthèse des triacylglycérols. Les familles enzymatiques sont indiquées en haut à gauche dans le carré gris. La voie de synthèse acyl-dépendante est celle avec DGAT et la voie de synthèse acyl-indépendante est celle avec PDAT.

Les triacylglycérols

L'acide phosphatidique peut être hydrolysé par l'acide phosphatidique phosphohydrolase 1 (PAH1, YALI0D27016g chez *Y. lipolytica*) pour donner du phosphate et du diacylglycérol (Guerfal et al. 2013). Une troisième acylation sur cette molécule donnera des triacylglycérols, et cette dernière acylation peut être réalisée selon au moins deux voies dépendant de deux types d'enzymes (Oelkers et al. 2000; Sandager et al. 2002; Athenstaedt 2011). La première voie, dite acyl-CoA dépendante, est catalysé par les acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférases (DGAT) qui transfèrent directement l'acyle provenant d'un acyl-CoA. La seconde voie, dite acyl-CoA indépendante, est catalysée par des phospholipide:diacylglycérol acyltransférases (PDAT) qui utilisent d'un phospholipide comme molécule donneuse d'acyle.

Chez *Y. lipolytica* au moins trois enzymes peuvent réaliser cette dernière étape d'acylation, deux DGAT (Yl.DGA1 : YALI0E32769g et Yl.DGA2 : YALI0D07986g) et une PDAT (Yl.LRO1 : YALI0E16797g) (Athenstaedt 2011; Beopoulos et al. 2012). Leur spécificité pour leur donneur d'acyle (CoA ou phospholipide) a été déterminée, mais aucune information n'est disponible à propos de leur spécificité envers les différents acides gras. Il a été montré que DGA1 est une enzyme cruciale pour l'accumulation des fortes quantités de lipides chez *Y. lipolytica* (Tai and Stephanopoulos 2013). Yl.DGA2 semble avoir une fonction importante sur la formation et/ou la stabilisation des corps lipidiques (Beopoulos et al. 2012). Yl.LRO1 utilise les phospholipides comme source d'acyl, mais sa spécificité pour les différents types de phospholipides est inconnue (Athenstaedt 2011).

Les phospholipides

Le métabolisme des phospholipides, aussi appelés glycérophospholipides, est complexe de par la diversité des molécules pouvant être construites. Il s'agit d'un glycérol estérifié avec un ou deux acyles et un phosphate lié à la position sn3. Les acides phosphatidique et lysophosphatidique appartiennent donc à cette catégorie. Chez les levures, il est courant d'avoir un acide gras saturé à la position sn1 et insaturé à la position sn2. Ils sont majoritairement synthétisés à partir de deux voies, connectées à celle de la synthèse des triacylglycérols (figure I.1.9) (Klug and Daum 2014; Vance 2018).

Dans la première voie, les acides phosphatidiques sont activés pour former du cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG), un précurseur qui pourra être converti en phosphatidylsérine, phosphatidylinositol ou phosphatidylglycérol. Chez *Yarrowia lipolytica*, l'enzyme présumptive qui ferait la conversion serait YALI0E14443g. La phosphatidylsérine pourra ensuite être convertie en phosphatidyléthanolamine puis phosphatidylcholine. La phosphatidylcholine est le phospholipide le plus présent dans les cellules et il est retrouvé dans pratiquement toutes les membranes. Les phosphatidylséries sont particulièrement importantes dans la membrane cytoplasmique. Les phosphatidylglycérols peuvent servir à synthétiser des cardiolipides (deux acides phosphatiques lié un glycérol) et ils sont particulièrement retrouvés dans la membrane de la mitochondrie.

La seconde voie de synthèse, nommée « Kennedy pathway » (ou voie métabolique de Kennedy, (Kennedy and Weiss 1956)), permet d'obtenir de la phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine à partir de diacylglycérol et de choline ou éthanolamine exogène. Le diacylglycérol utilisé peut provenir de l'hydrolyse de l'acide phosphatique, et rentre donc en compétition avec la synthèse des triacylglycérols. Deux étapes permettent d'activer ces précurseurs en CDP-choline ou CDP-éthanolamine. Puis à partir ces molécules, la choline phosphotransférase (CPT1) et l'éthanolamine phosphotransférase (EPT1) vont permettre l'ajout respectivement d'un groupement phosphocholine ou phosphoéthanolamine sur un diacylglycérol. Chez *Y. lipolytica*, deux gènes, respectivement YALI0C10989g et YALI0E26565g, sont annotées comme étant YI.CPT1 et YI.EPT1 de par leur similitude aux gènes de *S. cerevisiae*, mais ils n'ont pas été caractérisés.

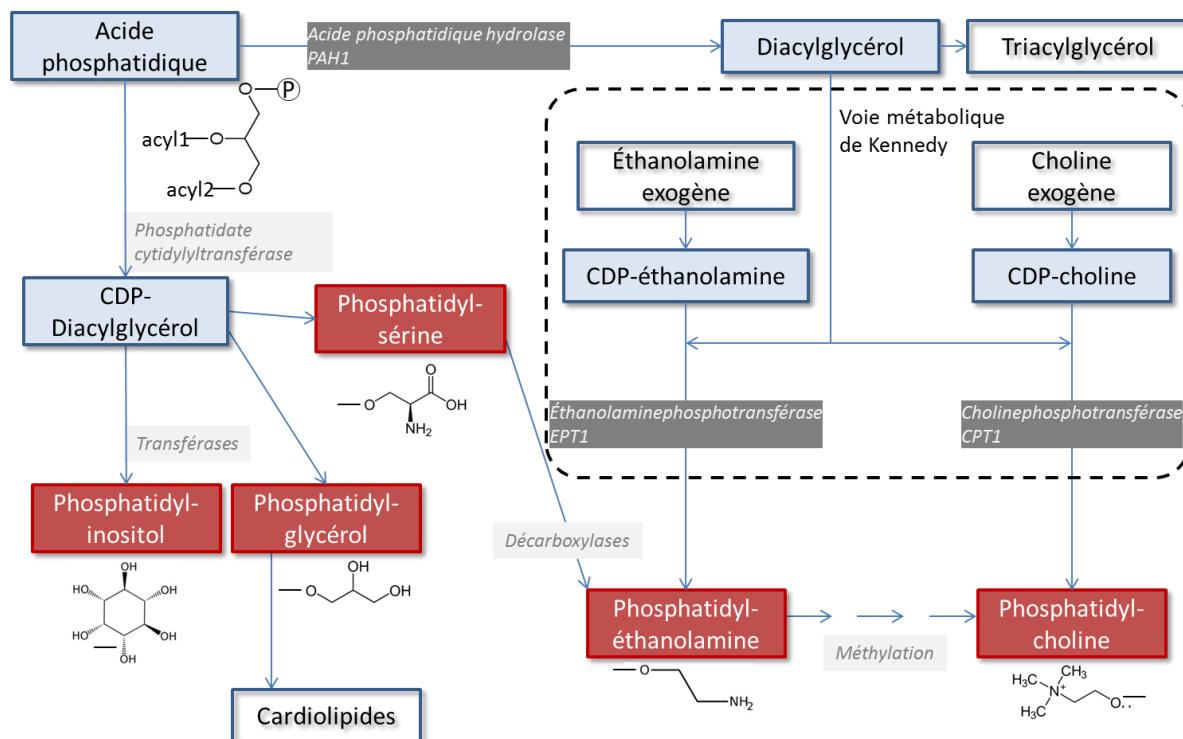


Figure I.1.9 : Représentation schématique du métabolisme des principaux phospholipides (en rouge). Le radical « acide phosphatique » et les différentes têtes polaires sont présentées. La voie métabolique de Kennedy (« Kennedy pathway ») est encadrée en pointillés. Les enzymes sont indiquées dans les rectangles gris.

Les stéryl-esters

Les stéryls-esters sont simplement des stérols estérifiés par un acide gras. Cette estérfication permet de limiter la toxicité des stérols libres en permettant leur stockage dans les corps lipidiques (Klug and Daum 2014). Seule la forme libre des stérols peuvent être intégrées aux membranes. Les stérols sont synthétisés en faible quantité, mais ils ont une grande importance dans la régulation de la fluidité des membranes. L'estérfication des stérols est réalisée par des stéryl-ester synthase, comme les Are1 et Are2 chez *S. cerevisiae* (Zweytick et al. 2000). Le stérol retrouvé en majorité chez les levures est l'ergostérol.

Chez *Yarrowia lipolytica*, les stérols ne sont présent qu'en faible proportion (moins de 8% de la composition des corps lipidique) (Athenstaedt et al. 2006). Une seule stéryl-ester synthase a été caractérisé, ARE1 (YALI0F06578g), et sa délétion a empêché toute synthèse ultérieure de stéryl-esters, ce qui semble indiquer qu'elle est la seule enzyme de ce type chez *Y. lipolytica* (Beopoulos et al. 2012). Y1.DGA2 partage des ressemblances avec la séquence ARE1, néanmoins, elle ne possède pas d'activité stéryl-ester synthase.

Corps lipidique

Les cellules eucaryotes stockent leurs molécules lipidiques dans des organites spécialisés appelés corps lipidiques ou gouttelettes lipidiques. Ils sont formés d'une membrane simple de phospholipides et de protéines membranaires spécifiques, et d'un cœur composé de lipides neutres, principalement triacylglycérols et stéryl-esters, mais d'autres composés hydrophobes peuvent être présents en faible proportion, comme des acides gras libres (Klug and Daum 2014; Aymé et al. 2015; Bhutada et al. 2018) ou des caroténoïdes. Ces corps lipidiques forment une réserve transitoire pour les lipides avant, par exemple, leur dégradation par la β -oxydation pour la production d'énergie ou encore la synthèse rapide de phospholipides lors de la division. Différentes enzymes sont spécifiques de la régulation des corps lipidique, comme Oil1 qui régule leur dégradation chez *Yarrowia lipolytica* (Bhutada et al. 2018). Chez les levures, il semblerait que le corps lipidique soit le siège de réactions métaboliques, et pas seulement un lieu de stockage (Mlickova et al. 2004).

La formation des corps lipidique chez les eucaryotes commence par l'accumulation de lipides neutres (stéryl-ester et triacylglycérol) au sein de la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique, dans le feuillet apolaire (Murphy and Vance 1999). Cette accumulation va continuer, puis lorsque la taille du renflement est suffisamment importante, le corps lipidique peut bourgeonner et se séparer du réticulum endoplasmique. Il existe deux modèles pour ce bourgeonnement, qui diffèrent par l'origine de la monocouche lipidique qui restera sur le corps lipidique, soit cette monocouche provient exclusivement du feuillet extérieur, soit elle est formé à 50% de chaque feuillet.

v. Dégradation via β -oxydation

Le procédé de dégradation des acides gras est appelé la β -oxydation (figure I.1.10) et comporte de nombreux points communs avec la synthèse des acides gras vue précédemment. Il s'agit de cycles répétés, comportant quatre étapes, au terme desquels des molécules d'acétyl-CoA sont générées en raccourcissant de deux carbones la chaîne d'acyl-CoA à chaque cycle. Les organismes vivants activent cette voie par exemple lorsque le milieu extérieur est riche en lipides, ou alors lorsqu'ils se retrouvent en déficit énergétique alors qu'ils ont des réserves lipidiques.

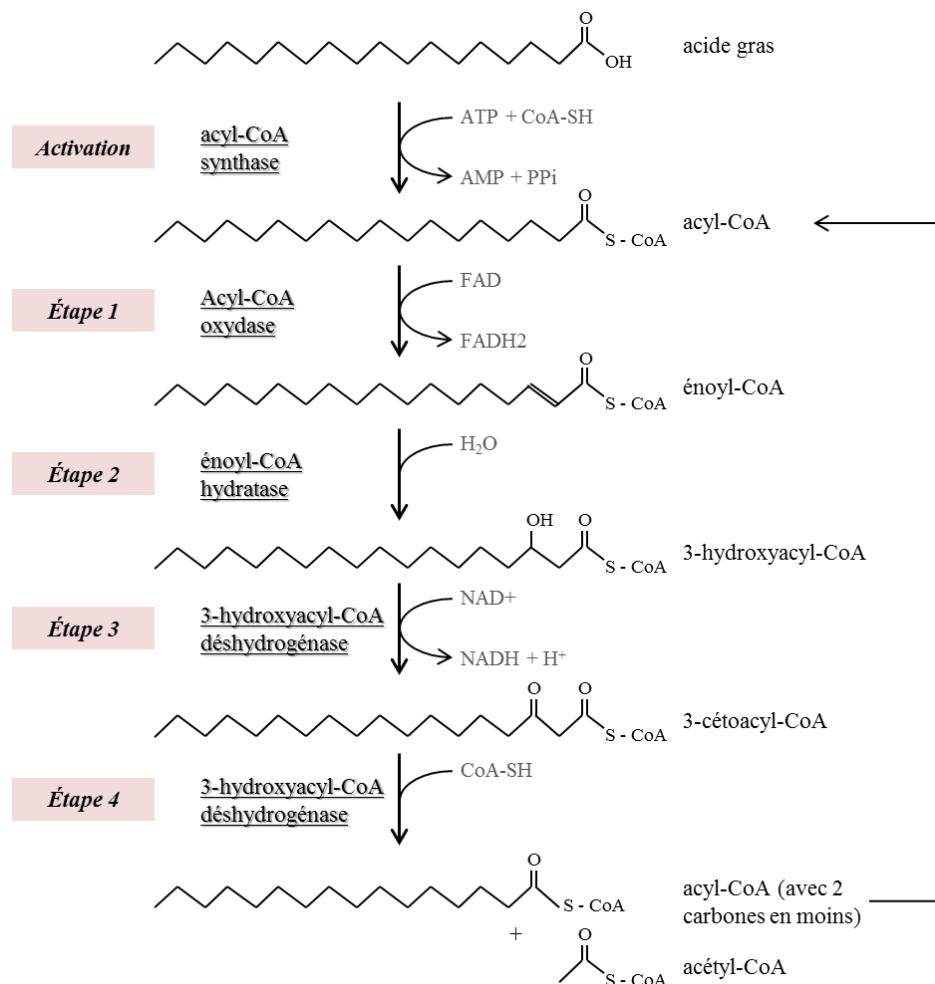


Figure I.1.10 : Représentation schématique des étapes de la β -oxydation, notée de 1 à 4.

La première étape est l'oxydation de l'acyl-CoA, catalysée par les acyl-CoA oxydases (ou déshydrogénases, (Wang et al. 1999)). Les organismes possèdent souvent plusieurs oxydases ayant des spécificités différentes pour les acides gras (longue ou courte chaîne), ou des régulations différentes. La seconde étape est l'hydratation de la double liaison formée, qui est ensuite oxydée dans la troisième étape. Chez *Y. lipolytica*, MFE2 (YALI0E15378g) est une enzyme multifonctionnelle qui réalise les deuxièmes et troisièmes étapes de la β -oxydation. Enfin, la quatrième étape du cycle est une lyse du 3-cétoacyl-CoA, pour former un acétyl-CoA et un acyl-CoA deux carbones plus court que l'acyl-CoA initial (Yamagami et al. 2001). Il existe deux types d'enzyme de ce type, les 3-oxoacyl-CoA thiolases (EC 2.3.1.16) ont une spécificité de chaîne large, alors que les acétoacétyl-CoA thiolases sont spécifiques de l'acétoacétyl.

Chez les levures, la β -oxydation est localisée quasi-exclusivement au niveau du peroxyosome (Tanaka et al. 1982; Wang et al. 1999; Beopoulos et al. 2008; Loira et al. 2012). Chez *Y. lipolytica*, elle peut se faire à partir de n'importe quelle longueur d'acide gras, mais il est nécessaire qu'ils soient estérifiés sur un CoA et présents dans le peroxyosome. Les acides gras à longue chaîne (C14 à C18) sont transportés vers le peroxyosome sous forme d'acyl-CoA avec le transporteur PXA1/PXA2, alors que les acides gras à moyenne et courtes chaînes (C12 à C4) sont transportés en tant qu'acides gras libres avec PEX11 et activés in situ en acyl-CoA (Loira

et al. 2012). L’enzyme Faa1p (gène FAA1 = YALI0D17864g) synthétise les acyl-CoA à partir d’acides gras de toute tailles et saturations (C4 à C18:2) (Loira et al. 2012), elle est présente dans le cytoplasme et les mitochondries.

Chez *Y. lipolytica*, la première étape du cycle, une oxydation, est catalysée par six acyl-CoA oxydases codées par les gènes POX1 à POX6. Chaque membre de cette famille multigénique possède une spécificité : Pox2p a une préférence pour les acides gras à longue chaîne alors qu’à l’inverse Pox3p agit sur les courtes chaînes. Ces deux iso-enzymes semblent concentrer la majeure partie de l’activité des acyl-CoA oxydases de *Yarrowia lipolytica*. Pox5p et Pox4p ne montrent pas de spécificité particulière envers les acides gras et Pox1p ne semble pas posséder d’activité significative (Wang et al. 1999; Loira et al. 2012).

Dégradation via ω -oxydation

L’ ω -oxydation est une voie métabolique particulière, retrouvée dans un nombre restreint d’organismes. Elle permet d’oxyder le carbone terminal d’une chaîne aliphatique, comme les alcanes ou le méthyl-terminal des acides gras. Cette réaction est catalysée par 12 cytochromes P450 différents chez *Y. lipolytica*, les gènes ALK1 à ALK12, et la cytochrome P450 réductase (Loira et al. 2012). Après l’apparition d’une fonction hydroxyle, deux oxydations supplémentaires ont lieu pour obtenir une fonction aldéhyde puis acide carboxylique. Ainsi, la levure *Y. lipolytica* est capable de métaboliser les alcanes par cette voie car une fois oxydés ils peuvent être dégradés par la β -oxydation. Par ailleurs, les acides gras peuvent également subir cette oxydation pour donner des acides dicarboxyliques (Werner and Zibek 2017). Ces molécules doublement fonctionnalisées présentent des propriétés d’intérêt dans le domaine des bio-polymères ou des adhésifs. A l’heure actuelle, la grande majorité des acides dicarboxyliques sont produits à partir de sources pétrochimiques. Des recherches sont en cours pour en produire par voie biotechnologique.

vi. Hydrolyse des lipides

Différentes enzymes peuvent hydrolyser les lipides (lipase, phospholipases, ...) et plusieurs facteurs sont pertinents pour leur spécificité. Le type d’acide gras et la molécule sur laquelle ils sont estérifiés sont importants. Elles divergent également au niveau de la localisation, certaines sont sécrétées pour permettre l’hydrolyse des lipides du milieu, alors que d’autres cytoplasmiques ou membranaires sont responsables de la mobilisation des réserves et de la réorganisation des lipides structurels.

Par exemple *Y. lipolytica* possède entre dix-neuf et seize lipases appartenant à plusieurs familles (Fickers et al. 2005; Loira et al. 2012). Elles ciblent préférentiellement les triacylglycérols pour libérer les acyles. Lip2p (YALI0A20350p) est la lipase principalement sécrétée pour hydrolyser les triacylglycérols situés dans le milieu extérieur. Elle a une préférence pour les acides gras à longue chaîne, en particulier l'acide oléique (Fickers et al. 2005; Loira et al. 2012). Lip7p et Lip8p sont deux lipases enchaînées dans la membrane avec une spécificité envers les acides gras à courte chaîne (Fickers et al. 2005; Loira et al. 2012).

Les phospholipases ont de nombreuses fonctions biologiques (Burke and Dennis 2009; Leidy et al. 2011), comme le remaniement des lipides de la membrane, et elles rentrent également dans la compositions de venins. Il est possible de les répartir selon quatre groupes en fonction de la zone d'hydrolyse (figure I.1.11). Les phospholipases A (PLA) hydrolysent un acide gras à une position précise du phospholipide, respectivement en position sn1 pour les PLA1 et sn2 pour les PLA2. Les phospholipases B sont beaucoup moins spécifiques et hydrolysent sans distinction les deux positions. Certaines sont aussi capables d'agir sur les lysophospholipides formé ce qui donne un glycérol-3-phospho-« tête polaire ». Les phospholipases C et D hydrolysent les liaisons du phosphate, ce qui conduit respectivement à un diacylglycérol + « tête polaire »-phosphate (coupe entre glycérol et phosphate) ou à un acide phosphatidique + « tête polaire » seule (coupe entre phosphate et « tête polaire »). Chez *Y. lipolytica*, la famille des phospholipases (<https://pfam.xfam.org/family/PF01735>) regroupe six séquences non caractérisées.

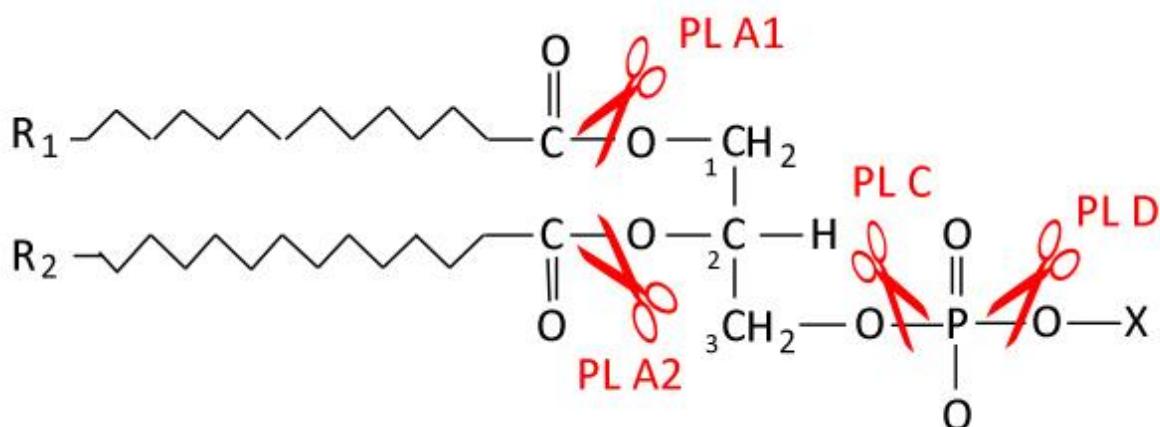


Figure I.1.11 : Représentation schématique des différents sites de coupe possible pour les phospholipases. L'activité phospholipases B est la somme des activités PLA1 et PLA2 et elle n'est pas représenté sur ce schéma.

Les « patatin-like phospholipases » (<https://pfam.xfam.org/family/PF01734>) forment une autre famille de lipase/phospholipases à large spectre d'activité. Elles possèdent une activité hydrolytique sur les phospholipides mais aussi sur les résidus acyles des triacylglycérols. *Yarrowia lipolytica* possèderait trois enzymes de cette famille, mais elles n'ont jamais été caractérisées biochimiquement, elles ont été inférées sur leurs seules données de séquences.

B. Les acides gras inhabituels et leurs usages

a. Rôles physiologiques et intérêt biotechnologique

Les acides gras inhabituels possèdent des modifications leur conférant des propriétés uniques par rapport aux acides gras saturés et insaturés. Ils sont rares et seulement retrouvés chez certains organismes. Avec leur chaîne aliphatique et leur(s) fonctionnalisation(s), les acides gras inhabituels forment des candidats intéressants pour l'obtention de synthons chimiques biosourcés et renouvelables, comme alternative aux ressources fossiles comme le pétrole. Mais pour le moment, le prix élevé et la faible disponibilité de la plupart de ces acides gras inhabituels limite leur utilisation dans l'industrie (Samuelsson and Johansson 2001). Mais quelques voies de synthèse chimiques existent pour fonctionnaliser ou modifier certains acides gras insaturés, voir même de les polymériser (Türünç et al. 2015).

En général, la ou les fonction(s) biologique(s) de ces lipides sont inconnues. Mais ils pourraient, comme beaucoup de métabolites secondaires chez les plantes, avoir une fonction dans la défense contre les organismes prédateurs ou pathogènes (Okada et al. 2013). Il est également peu probable qu'ils aient une fonction structurale dans la membrane cytoplasmique sans modifications supplémentaires. L'introduction au sein de la couche lipidique d'une fonction réactive et/ou polaire pourrait induire une forte déstabilisation, rendant ces molécules toxiques.

Parmi les types d'acides gras inhabituels retrouvés dans la nature, quatre seront particulièrement développés, il s'agit des acides gras conjugués, acétyléniques, époxydés et hydroxylés (Cahoon et al. 2003; Cao et al. 2013).

i. Acides gras possédant des doubles liaisons conjuguées

Chez les acides gras poly-insaturés précédemment cités, les doubles liaisons sont généralement séparées par deux carbones. La présence de doubles liaisons conjuguées, c'est-à-dire une alternance liaison double - liaison simple - liaison double ($C=C-C=C$), fait partie des modifications inhabituelles. Cette conjugaison des doubles liaisons augmente la vitesse de l'oxydation et donc exacerbé la siccavitité comparée aux acides gras poly-insaturés non-conjugués (Cahoon et al. 1999). Les huiles qui en contiennent sont donc recherchées dans la fabrication d'encre, peintures et vernis. Il n'y a pas de notations particulière pour ces acides gras, il faut juste que la position de deux doubles liaisons soit $\Delta^{n,n+2}$.

Par exemple, l'huile de Tung (ou d'abrasin ou encore de bois de Chine) obtenue à partir des graines de *Vernicia fordii* (anciennement *Aleurites*), un arbre originaire de Chine cultivé en climat subtropical, contient de grandes quantités ($\geq 65\%$ en masse) d'acide α -éléostéarique (C18:3 $\Delta^{9\text{cis},11\text{cis},13\text{trans}}$) (Cahoon et al. 1999). Cette huile sert comme huile siccative dans le traitement des peintures et du bois.

Une autre plante contenant des acides gras conjugués est la grenade, qui accumule dans l'huile de ses graines de haute teneurs en acide punique (C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$) (Hornung et al. 2002). Comme la plupart des acides gras conjugués, cet acide possède des propriétés d'intérêt comme huile siccative ou dans le domaine de la cosmétique.

Le groupe des acides linoléiques conjugués regroupe 28 isomères de l'acide linoléique ayant un système de deux doubles liaisons conjugués. Ils auraient des effets physiologiques intéressants, comme par exemple un possible effet protecteur contre l'athérosclérose ou certains cancers ou d'amélioration du système immunitaire (Gavino et al. 2000; Belury 2002; Salsinha et al. 2018). Mais ils sont assez rares et disponibles uniquement en faible quantité dans l'alimentation. L'un des isomères le plus important est l'acide ruménique (C18:2 $\Delta^{9c,11t}$), qui est retrouvé en majorité dans les produits des ruminant (lait, graisses...). Un autre isomère important, le $\Delta^{11t,13c}$, a été détecté dans le lait et il a deux origines possibles (Garcia et al. 2017; Garcia et al. 2018). La première origine possible vient de la biohydrogénéation de l'acide α -linoléique dans le rumen (ce qui forme une large gamme d'isomères), et la seconde est issu de la Δ^{13} -désaturation de l'acide trans-vaccénique C18:1 Δ^{11t} par une FADS3 (« fatty acid desaturase 3 »). Les acides linoléiques conjugués font l'objet d'une littérature assez importante ces dernières années à cause de leurs propriétés d'intérêts et des tentatives pour en produire de manière hétérologue (Imatoukene et al. 2017).

ii. Acides gras possédant une ou plusieurs triples liaisons

Les acides gras qui possèdent des triples liaisons carbone-carbone sont appelés acides gras acétyléniques. Ces acides gras acétyléniques peuvent ensuite servir à la synthèse de composés bioactifs, comme les polyacétylènes chez les plantes. Ils ont par exemple des effets biocides ou biostatiques contre les micro-organismes, les champignons, les insectes ou encore les cellules cancéreuses (Cahoon et al. 2003; Okada et al. 2013). Les alcynes sont particulièrement sensibles à l'oxydation et au rancissement et donc sont recherchés pour la fabrication d'encre, peintures et vernis comme les acides gras conjugués (Samuelsson and Johansson 2001). Les triples liaisons comptent comme une seule insaturation pour la notation, par exemple l'acide stéarolique est un C18:1 insaturé à la position 9 comme l'acide oléique, mais dans l'exposant du delta un « a » est ajouté (Δ^{9a}) à la place de la stéréochimie.

Certaines plantes de la famille des *Santalaceae* comme *Exocarpos cupressiformis* et *Santalum acuminatum* produisent entre autres des acides gras acétylénique comme les acides stéarolique (C18:1 Δ^{9a}) et ximénynique (aussi appelé santalbique, C18:2 $\Delta^{9a,11t}$) (Okada et al. 2013). Plus généralement, les plantes de l'ordre des *Santalales* produisent dans leurs graines mais aussi dans certaines de leurs parties végétatives des acides acétyléniques (Aitzetmüller 2012).

Par ailleurs, certaines espèces de plantes du genre *Crepis* produisent des graines dont l'huile peut être riche en acides acétyléniques (Earle et al. 1966). Par exemple *Crepis alpina* accumule dans ses graines environ 75% d'acide crépénynique, un C18:2 $\Delta^{9c,12a}$ (Gagné et al. 2009; Okada et al. 2013). Selon Cahoon (Cahoon et al. 2003), la voie de synthèse des polyacétylènes

(falcarinol et dérivés), qui utilise comme précurseurs des acides gras acétyléniques, pourrait être soit fortement diminuée, soit inactivée, ce qui conduirait à cette accumulation d'acide crépénynique.

D'autres familles de plantes (*Apiaceae*, *Araliaceae* et *Asteraceae*) n'accumulent pas d'acides gras acétyléniques dans les conditions standards, mais lors de l'infection d'un pathogène, elles en produisent pour alimenter la synthèse de polyacétylènes (Cahoon et al. 2003). Il s'agit certainement d'un mécanisme de défense hérité d'un ancêtre commun.

iii. Acides gras possédant une ou plusieurs fonction(s) époxyde(s)

Les acides gras époxydés portent au moins une fonction époxyde dans leur chaîne. Quelques plantes en possèdent dans leur cuticule (un mélange de polyester et de cire protégeant la surface de nombreux organes), possiblement pour en améliorer l'imperméabilité contre les hautes températures (Matzke and Riederer 1990; Bueno et al. 2019). D'autre part, un brevet stipule qu'ils peuvent aussi avoir une activité nématicide (brevet EP 2182062 A2).

Chez différents mammifères, il semblerait que les acides gras époxydés aient des rôles variés selon le type d'acide gras et le tissu où il est produit (anti-inflammatoire, antalgique, effets neurologiques et angiogéniques variables...) (Park and Corson 2019). Les acides gras époxydés sont très peu réactifs face à l'oxydation car les hydrogènes en alpha de la liaison oxygène-carbone sont faiblement labiles (Samuelsson and Johansson 2001). La résistance à l'oxydation est même plus élevée que pour l'acide oléique.

Ils peuvent servir de synthons pour la synthèse de résines polyépoxydes comme les époxydes conventionnels d'origine pétrochimique (Thames and Yu 1999). Les huiles époxydés peuvent ensuite être réticulées par mécanisme « UV/cationique » en mélange avec d'autre molécules pour améliorer certaines propriétés de la résine (Thames and Yu 1999). Actuellement les acides gras époxydés sur le marché sont produis majoritairement par voie chimique à partir d'acides gras poly-insaturés (huile de soja époxydée par exemple), mais d'autres étapes chimiques restent nécessaires pour obtenir des polymères avec les propriétés souhaitées (Samuelsson and Johansson 2001; Baye et al. 2005).

Le méthyl-vernolate (C18:1 Δ^9 Epox¹² estérifié par un méthanol) est légèrement plus visqueux que les méthyl-linoléate, oléate et stéarate, à cause de la plus grande polarité du groupement (Samuelsson and Johansson 2001). Et la viscosité des huiles est bien supérieure à celles des acides gras méthylés seuls, car l'effet des groupements époxy est plus important encore.

Le groupement oxirane (~époxy) par sa polarité confère aux huiles une viscosité importante. Par exemple, l'huile d'*Euphorbia lagascae* contenant 65% d'acide vernolique (soit en moyenne deux acyles par triglycérides) à une viscosité d'environ 40 mPa.s⁻¹ à 50°C (Samuelsson and Johansson 2001). Pour comparaison, la viscosité de l'huile de colza et d'olive sont d'environ

26 mPa.s⁻¹ à 50°C. La viscosité de l'huile est un paramètre important dans la fabrication de résines et revêtements.

Les plantes du genre *Crepis* produisent des huiles pouvant se classer en trois groupes : soit riches en acides gras acétyléniques (comme vu précédemment), soit riche en acides gras époxydés, soit contenant un mélange des deux (Earle et al. 1966). *C. palaestina* accumule environ 60% d'acide vernalique dans ses graines (Lee et al. 1998). Une autre plante, *Vernonia galamensis*, pourrait devenir une plante d'intérêt agronomique pour la production d'huile riche en acide gras époxydé car elle contiendrait entre 53% et 74% selon les lignées considérés (Baye et al. 2005).

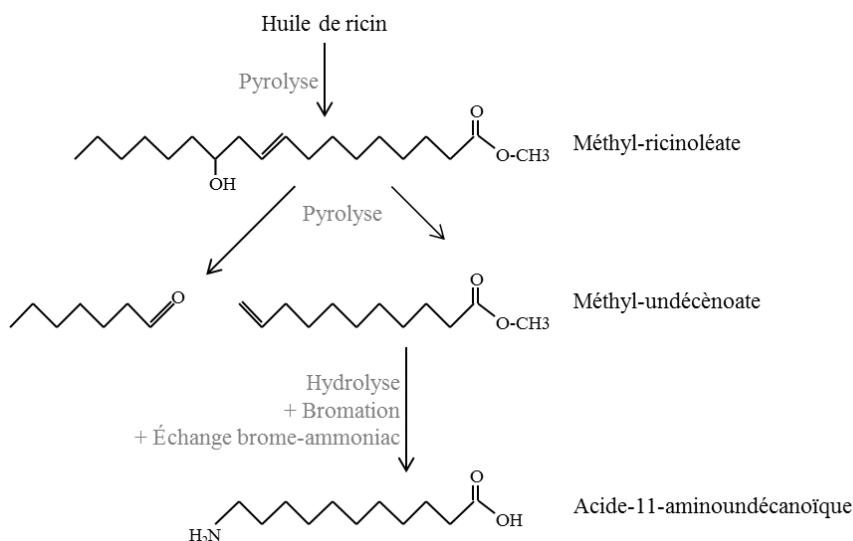
iv. Acides gras possédant une ou plusieurs fonction(s) hydroxyle(s)

Les acides gras hydroxylés sont plus communément retrouvés que les précédents acides gras inhabituels et sont les plus abondamment cités dans la littérature. Chez les plantes, ils servent entre-autre de monomères pour la synthèse de la cutine avec des acides gras époxydés (Matzke and Riederer 1990; Pineau et al. 2017; Bueno et al. 2019). Le polymère est formé de C16 et/ou C18 hydroxylés et/ou époxydés, et contient également des acides dicarboxyliques et du glycérol. Certains acides gras hydroxylés (C18:2 Δ^{9c,13t} OH¹² et C18:2 Δ^{8t,12c} OH¹⁰) ont montré un effet protecteur (antimycosique) chez le riz contre une maladie importante causé par un champignon, la pyriculariose (Korinek et al. 2017), une activité nématicide a même été revendiquée (brevet EP 2182062 A2) La présence d'une fonction hydroxyle semble renforcer l'effet cytotoxique des acides gras insaturés et leur donne un effet anti-allergénique, dont l'effet est amplifié par la présence d'insaturation(s) (Korinek et al. 2017).

La source la plus importante d'acides gras hydroxylés est actuellement l'huile de ricin, issu des graines d'une plante tropicale hautement toxique et allergénique (McKeon et al. 2007). L'huile contient environ 90% d'acide ricinoléique, un C18:1 Δ^{9c} OH¹². La plante est principalement cultivée dans trois pays, l'Inde, la Chine et le Brésil (plus de 90% de la production mondiale), et mais la production stagne alors que la demande ne cesse de croître (McKeon et al. 2007; Viswanath et al. 2016). Les acides gras hydroxylés, ou directement l'huile de ricin, sont largement utilisés dans plusieurs domaines (Mubofu 2016) : la fabrication de polymères (Hormaiztegui et al. 2018), de biocarburant (Baskar et al. 2018), d'arôme (Moradi et al. 2016; de Andrade et al. 2017), de cosmétiques, ou encore de lubrifiants mécaniques... La présence d'une fonction polaire comme la fonction hydroxyle augmente de manière importante la viscosité de l'acide ricinoléique comparé aux acides gras non hydroxylés.

Le polyamide 11 (Rilsan®) est le principal polymère synthétisé à partir de l'huile de ricin. Celle-ci subit plusieurs étapes de transformation pour former le monomère, l'acide 11-amino undécanoïque (C11:0 NH₂¹¹, figure I.1.12), à partir de l'acide ricinoléique. Un autre polymère, un polyuréthane, est réalisé à partir d'huile de ricin sans hydrolyse ou autre modifications préalable. Les ricinoléoylglycérols contenus dans l'huile réticulent au niveau des fonctions hydroxyles libres des carbones 12 avec des isocyanates (Hormaiztegui et al. 2018).

Figure I.1.12 : Simplification des différentes étapes de synthèse de l'acide-11-aminoundécanoïque, le monomère du polyamide 11.



monomère du polyamide 11.

De manière plus anecdotique, l'acide ricinoléique sert également à la synthèse de l'arôme de pêche, la γ -décalactone, suite à sa dégradation par la voie de la β -oxydation (Waché et al. 1998; Guo et al. 2012; Braga and Belo 2016; de Andrade et al. 2017).

v. Conclusion

Ces acides gras inhabituels sont pour la plupart produits par des végétaux, donc certains sont déjà cultivés à grande échelle (ricin) alors que d'autres plantes ont seulement été caractérisées. Certaines des enzymes responsables de la synthèse de ces acides gras inhabituels ont déjà été exprimées de manière hétérologue et avec succès chez des levures ou plantes (Broun and Somerville 1997; Singh et al. 2005; Zhou et al. 2006; Beopoulos et al. 2014). Dans le but d'obtenir un approvisionnement aisé et à grande échelle de ces acides gras inhabituels, il est cependant nécessaire d'augmenter les quantités produites. Une stratégie est de produire ces acides gras chez des organismes oléagineux (micro-organisme ou plante). Mais jusqu'à présent, cette stratégie n'a conduit qu'à de faibles productions d'acides gras inhabituels par rapport à ce qui est obtenu dans les plantes sauvages. Il est donc nécessaire d'améliorer ces productions. Des stratégies commencent à émerger, et elles sont liées à l'amélioration des connaissances sur les enzymes impliqués (voir partie I.2.), ainsi que sur le métabolisme général des lipides pour augmenter les quantités d'acides gras produits.

b. Panel des enzymes responsables des modifications inhabituelles des acides gras

Plusieurs familles enzymatiques peuvent réaliser les réactions qui permettent d'obtenir ces modifications.

Les **acides gras isomérases** ([EC 5.2.1.5](#)) déplacent une double liaison au sein d'une chaîne d'acide gras insaturé sans en créer une seconde, donc il n'y a pas de changement dans le nombre d'insaturation de l'acide gras produit. Néanmoins, un système de doubles liaisons conjuguées peut donc apparaître à partir d'acides gras poly-insaturés. Ces enzymes cytoplasmiques acceptent uniquement les acides gras libres, qui rappelons-le sont faiblement accumulés intracellulairement du fait de leur toxicité sous cette forme. Le mécanisme d'action supposé est assez bien décrit (Liavonchanka et al. 2006) : un des deux hydrogènes sur le carbone n situé entre deux doubles liaisons (n-2,n-1 et n+1,n+2) est capturé par l'enzyme. Puis une des doubles liaisons adjacente va se déplacer pour combler la vacance électronique créée sur le carbone n. Finalement, l'hydrogène est retransféré vers l'acide gras pour combler la vacance électronique positionnée en n-2 ou n+2. Par exemple, l'acide gras isomérase de *Propionibacterium acnes* catalyse le déplacement de la double liaison cis-9,10 de l'acide linoléique vers la position trans-10,11, ce qui crée un acide linoléique conjugué $\Delta^{10t,12c}$ (Liavonchanka et al. 2006). Cette enzyme, dont la structure est connue contient un domaine avec un cofacteur flavine-adénine-dinucléotide qui participe à l'abstraction de l'hydrogène sur le carbone 11. Une souche de *Yarrowia lipolytica* intégrant cette enzyme a été construite (B. Zhang et al. 2013).

Les **cytochromes P450** forment une très large famille d'enzymes présentes chez un grand nombre d'espèces (<http://pfam.xfam.org/family/PF00067>). Toutes sont des métalloenzymes qui possèdent un hème avec un ion fer, indispensable pour la catalyse. Leurs propriétés peuvent être très variables (membranaire/cytoplasmique ; cytochrome P450 réductase libre ou fusionnée...) mais leurs activités sont principalement liées à l'oxydation de molécules, par exemple pour la détoxicification cellulaire. Les cytochromes P450 qui utilisent du dioxygène pour l'oxydation sont qualifiés de mono-oxygénase. Certains agissent sur des acides gras pour former des acides gras hydroxylés à partir de liaison hydrocarbone, souvent aux niveau des extrémités de la chaîne (α , β ou ω) (Durairaj et al. 2015). Ces enzymes agissent sur des acides gras libres. Par exemple, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* possèderait 169 cytochromes P450 putatives. Parmi celles-ci, trois cytochromes P450 membranaires ont été caractérisés pour former des acides gras ω -hydroxylés : CYP505A1, CYP539A7 et CYP655C2 (Nakayama et al. 1996; Durairaj et al. 2015). Mais leurs spécificités et leurs cofacteurs sont différents : CYP505A1 forme des ω 1 à ω 3 sur une large gamme de longueur d'acide gras (C10 à C18) et possède un domaine réductase fusionné. CYP539A7 and CYP655C2 ont besoin d'un partenaire cytochrome P450 réductase NADPH pour former seulement des acides gras ω -hydroxylés. Ils sont actifs sur des acides gras à plus courte chaîne C10 et C12 (plus C8 pour CYP539A7).

Un autre type de réaction possible catalysée par les cytochromes P450 est l'époxydation (Spector and Kim 2015). Les époxydases agissent sur des doubles liaisons existantes et oxydent les acides gras généralement à une ou deux positions spécifiques de la chaîne. Les mammifères

possèdent les époxydases les plus étudiées car elles pourraient former des cibles thérapeutiques potentielles (Imig 2018).

À noter que les **époxydes hydrolases** (Wagner et al. 2017; Park and Corson 2019) (<https://pfam.xfam.org/family/PF06441> ; [EC 3.3.2.10](#)) sont alors capable d'agir sur les fonctions époxydes pour former deux fonctions hydroxyles contiguës. Ces enzymes semblent participer à la régulation des acides gras époxydés par les cytochromes P450 chez les mammifères.

Les **acides gras hydratases** ([EC 4.2.1.53](#)) sont des enzymes catalysant l'incorporation d'une molécule d'eau à une double liaison cis d'une chaîne d'acide gras libre (aucun cofacteur nécessaire). La plupart des enzymes connues sont actives sur l'acide oléique, et donc ces enzymes sont aussi appelées oléates hydratases (Engleeder and Pichler 2018). Certaines peuvent également avoir une activité sur d'autres acides gras insaturés, comme l'acide linoléique. Elles partagent toutes un domaine de liaison à la flavine adénine dinucléotide mais le cofacteur ne subit aucune oxydoréduction durant la catalyse. Ces enzymes ont plusieurs avantages, comme par exemple une bonne stabilité et une expression facile, ainsi qu'une régio- et stéréosélectivité presque parfaite. Il semblerait que la fonction hydroxyle soit ajoutée sur le carbone le plus éloigné de la fonction carboxyle. Néanmoins cela fait peu de temps qu'elles sont étudiées et donc les données possédées ne sont pas exhaustives. La plupart des activités sont localisées au niveau de l'insaturation de la position 9-10 (la plus commune des insaturations, comme celle de l'acide oléique), mais quelques hydratases ont montré une activité sur la double liaison 12-13 (présente par exemple chez l'acide linoléique et α -linolénique, (Kim et al. 2015; Hirata et al. 2015)). Elles forment ainsi de l'acide 13-hydroxy octadécén-cis-9-oïque (C18:1 Δ^{9c} OH¹³) à partir de l'acide linoléique, ainsi que d'autres produits mineur avec d'autres acides gras.

Les **lipoxygénases** (<http://pfam.xfam.org/family/PF00305>) ; [EC 1.13.11.-](#), (Upadhyay and Mattoo 2018)) catalysent la formation d'une fonction hydroperoxyde sur des composés lipides, et certaines sont capables d'agir sur une double liaison d'un acide gras. Les **cyclooxygénases** (http://pfam.xfam.org/family/An_peroxidase, (Smith and Malkowski 2019)) forment une des sous-unités des prostaglandine endopéroxide H synthases qui conduit à la formation d'un cycle dans la chaîne d'acide gras. La sous-unité cyclooxygénase catalyse la formation de deux fonctions hydroperoxydes, dont une intra-.

Finalement, et c'est l'objet de notre étude certaines enzymes de la famille des **désaturases membranaires** (classées dans plusieurs groupes, [EC 1.14.18.-](#) et [EC 1.14.19.-](#)) possèdent des activités inhabituelles qui conduisent à la production d'acides gras inhabituels au lieu d'acides gras insaturés. Elles sont alors appelées **hydroxylase, conjugase, acétylénase ou époxydase** selon le type d'acide gras qu'elles sont capables de synthétiser. L'enzyme étudiée lors de notre étude fait partie de cette famille enzymatique, il est donc nécessaire de bien comprendre le mode d'action et les caractéristiques de ces enzymes. Nous avons donc consacré le chapitre I.2 de la bibliographie à ces enzymes.

Bilan :

Les enzymes capables des modifications inhabituelles des acides gras appartiennent à des familles de protéines très diverses. Malgré l'identification de nombreuses enzymes candidates, leur surexpression ne suffit pas pour obtenir des quantités importantes d'acides gras inhabituels. Nous verrons dans le paragraphe suivant comment la spécificité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides influe sur la quantité des acides gras produits. Notre enzyme d'étude étant spécifique de l'acide ricinoléique, nous ferons un focus particulier sur les mécanismes permettant à la plante une accumulation de presque 90% d'acide ricinoléique dans ces lipides.

c. Les rôles des transférases et d'autres enzymes dans l'accumulation des acides gras inhabituels

Comme discuté précédemment, la synthèse des triacylglycérols fait intervenir de nombreuses enzymes. Stocker les acides gras inhabituels dans les triacylglycérols semble posséder plusieurs avantages, le premier est que cela limiterait leur toxicité en les séquestrant dans des lipides neutres (majoritairement les triacylglycérols). Cela conduirait à un traitement analogue à celui de l'huile et donc le procédé derrière serait déjà développé. Différentes stratégies ont été décrites pour améliorer le taux d'acides gras inhabituels stockés dans des triacylglycérols.

La première et la plus évidente consiste à exprimer des transférases CoA-dépendantes (diacylglycérol acyltransférase, DGAT) spécifiques de l'acide gras inhabituel-CoA en question. Chez des plantes accumulant naturellement de hautes quantités d'acides gras inhabituels dans les triacylglycérols, certaines acyltransférases peuvent avoir une préférence pour les acides gras inhabituels, ce qui favorisera leur accumulation.

Par exemple, les transférases du ricin, *Ricinus communis*, ont été étudiées car cette plante tropicale accumule dans les triglycérides de ses graines plus de 90% d'acide ricinoléique (McKeon and Chen 2000; McKeon et al. 2007; Viswanath et al. 2016; Mubofu 2016). La surexpression de RcDGAT1 dans une souche de *Arabidopsis thaliana* exprimant l'hydroxylase du ricin ne permet pas une meilleure production d'acide ricinoléique. Par contre la

surexpression de RcDGAT2 permet d'augmenter la proportion en acide gras hydroxylé dans les graines, il est considéré comme un déterminant majeur de la synthèse de TAG contenant des acides gras hydroxylés (Burgal et al. 2008). RcDGAT2 à une plus grande affinité envers les diacylglycérols contenant deux résidus ricinoléoyls- qu'avec deux oléoyls- ou linoléoyls-. Mais la co-expression de RcDGAT2 seule, même si elle permet d'améliorer le pourcentage d'accumulation de 17% à presque 29%, ne permet pas à elle seule d'atteindre des teneurs en acide gras hydroxylés aussi élevé que ceux de *R. communis* (>90%).

La seconde étape d'acylation de la position 2 de l'acide lysophosphatidique (sn1-acyle sn3-phosphate glycérol) à partir d'acyl-CoA est catalysée par les acide lysophosphatidique acyltransférases (LPAT). Un article a montré que celle issue de *R. communis*, RcLPAT2, permet d'améliorer l'accumulation d'acide gras inhabituel chez *Arabidopsis thaliana* produisant de l'acide ricinoléique (Shockley et al. 2019). La surexpression de RcLPAT2 chez *Lesquerella fendlerii*, qui accumule nativement environ 60% d'acide gras hydroxylés dans l'huile de ses graines, n'a pas permis d'obtenir une augmentation de la quantité d'acide ricinoléique (Chen et al. 2016). Mais il y a eu une réorganisation des acides gras hydroxylé, ce qui a montré que RcLPAT2 favorise le transfert de l'acide ricinoléique vers la position sn2 de l'acide lysophosphatidique.

Une approche complémentaire à la précédente est l'expression d'acyl-CoA synthases spécifique d'acides gras inhabituels. En effet dans le cas d'une expression hétérologue, les acyl-CoA synthases de l'hôte ne sont pas spécifique de l'acide gras inhabituel, ce qui limite la quantité disponible à l'acylation par la voie CoA-dépendante. Par exemple, l'acyl-CoA synthase 2 du ricin montre une affinité accrue pour l'acide ricinoléique, ce qui augmenterait la quantité de ricinoléoyl-CoA disponible pour les acylation CoA-dépendante (McKeon et al. 2007).

Dans une souche n'ayant pas d'acyltransférases spécifiques d'acides gras inhabituels, tel qu'*A. thaliana*, les phosphatidylcholine:diacylglycérol cholinephosphotransférase (PDCT) permettent quand même de synthétiser des diacylglycérols pouvant contenir des acides gras inhabituels lorsque qu'une désaturase membranaire hétérologue est exprimée. Le groupement choline-phosphate est déplacé sur un diacylglycérol ne comportant pas d'acide gras modifié, ce qui peut régénérer le substrat pour la désaturase. Et le diacylglycérol libéré, comportant un acide gras inhabituel, peut être acylé pour former un triacylglycérol.

Une PDCT de *R. communis* est codée par le gène RcROD1, qui est un homologue à celle de *A. thaliana*, AtROD1. RcROD1 et AtROD1 sont moins actives sur une phosphatidylcholine portant deux résidus ricinoléoyl que sur celles issu de soja, composé d'acides gras « classiques » (Hu et al. 2012). Cela semble indiquer que RcROD1 pourrait ne pas être directement dédié au stockage des phospholipides comportant des acides gras hydroxylé.

Les phospholipases C elles aussi libèrent des diacylglycérols après l'hydrolyse du groupement phosphate-tête polaire, avec potentiellement la libération d'un diacylglycérol portant un acide gras inhabituel estérifié à la position sn2. Il a été possible de favoriser l'accumulation d'acides gras hydroxylés chez *Camelina sativa* lors de l'expression d'une phospholipase C de *R. communis*, RcPLCL1 (Aryal and Lu 2018). La teneur en phospholipides contenant des acides

gras hydroxylés a diminué alors que celle des triacylglycérols a augmenté chez *C. sativa* lors de son expression. Il y a donc un transfert des acides gras hydroxylés du pool des phospholipides vers le pool des triacylglycérols. Un autre effet positif est une amélioration du taux de germination des graines.

Les phospholipides-diacylglycérols acyltransférases (PDAT) peuvent permettent simultanément de retirer un acide gras modifié et de le transférer vers un diacylglycérol pour former un triacylglycérol. Sinon, exprimer des phospholipases A ou B spécifiques de l'acide gras inhabituel pourraient permettre de les décrocher pour le rendre disponible pour les acyl-CoA synthase (Burke and Dennis 2009; Bayon et al. 2015).

Les désaturases membranaires produisant des acides gras inhabituels agissent principalement sur des phospholipides, donc favoriser la libération ou le transfert de ces acides gras inhabituels permettrait d'améliorer la conversion et/ou la synthèse de triacylglycérols avec des acides gras inhabituels.

Conclusion :

Les lipides présentent une large variété de composés aux propriétés diverses indispensables dans tous les phénomènes biologiques (structure, énergie, signalisation...). Les acides gras originaux, à la base de plusieurs autres catégories de lipides, ont un intérêt industriel croissant de par la tendance à rechercher des molécules biosourcées comme synthons chimique pour remplacer les produits venant de la modification du pétrole. Même si nous avons vu que les enzymes de modification n'étaient pas les seuls facteurs déterminant l'accumulation finale, leur activité est indispensable pour obtenir des acides gras inhabituels.

Nous nous intéresserons dans le chapitre suivant à une famille d'enzyme particulière, les désaturases. Ces enzymes très intéressantes sont capables de réaliser des désaturations, mais certaines ont également des activités inhabituelles pour la production d'acide gras hydroxylés, conjugués, acétyléniques ou époxydés par exemple.

2. Les enzymes de la famille des désaturases

Une importante revue détaillée et toujours pertinente a été réalisée sur les désaturases par J. Shanklin et E.B. Cahoon en 1998 (Shanklin and Cahoon 1998). Comme montré sur la figure I.2.1, ces enzymes introduisent des doubles liaisons dans une chaîne carbonée, toujours sur un acide gras estérifié. Elles présentent généralement une excellente régio- et stéréospécificité, c'est-à-dire qu'elles placent la double liaison à une position précise de la chaîne carbonée et dans une conformation donnée. De même, la plupart ont une forte préférence pour une taille donnée d'acide gras (C18 par exemple).

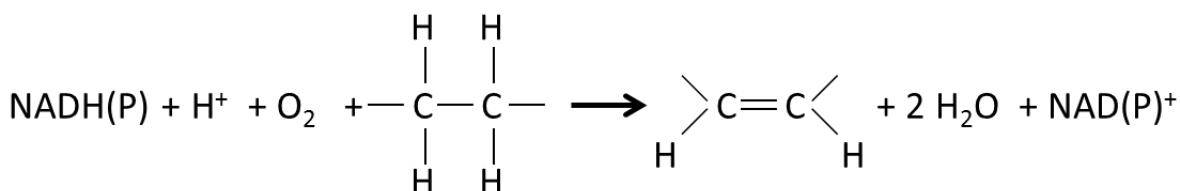


Figure I.2.1 : Récapitulatif général de la réaction de désaturation. Le type de cofacteurs, NADH ou NADPH et le cosubstrat sur lequel est estérifié l'acide gras (chaîne carbonée) dépend de la sous-famille considérée.

Elles ont besoin de deux cofacteurs : du dioxygène et un partenaire redox. La double liaison est introduite par oxydation d'une simple liaison de la chaîne linéaire d'acide gras, et en parallèle le dioxygène est réduit en eau grâce à l'apport extérieur de deux électrons supplémentaires (Shanklin and Cahoon 1998). Cette réaction d'oxydo-réduction est permise par la présence d'un centre fer dans cette classe d'enzyme.

Les désaturases appartiennent à un groupe plus large de protéines agissant sur des liaisons carbone-carbone et/ou carbone-hydrogène non-activées (Wallar and Lipscomb 1996; Shanklin et al. 2009), comme les monooxygénases (Alonso et al. 2014; Chen et al. 2014), les rubrérythrines (Dillard et al. 2011) ou les ribonucléotides réductases (Puig et al. 2013). Toutes sont des métalloenzymes possédant un centre non-hémique avec deux ions métalliques, généralement du fer, coordonnés directement par des acides aminés de la chaîne protéique.

Les électrons (autrement dit le pouvoir réducteur), peuvent être apportés par différentes chaînes de transport d'électrons, selon la localisation de la désaturase (Shanklin and Cahoon 1998). Pour les désaturases localisées dans les plastes, la chaîne de transfert d'électrons est composée des ferrédoxines et ferrédoxine-NADP⁺ oxydoréductases, qui permettent le transfert des électrons à partir du NADPH. Quand la photosynthèse est active, les ferrédoxines peuvent directement être réduites par le photosystème I, à la place de l'oxydoréductase. Pour les désaturases localisées dans le réticulum endoplasmique, le transfert d'électrons provenant du NADH est assuré par des cytochromes b5 et cytochrome b5 réductases enchâssés dans la membrane. Le fonctionnement des deux chaînes de transfert d'électrons est très similaire : deux électrons sont récupérés par les réductases auprès du NADH ou du NAPDH, puis ils sont transmis un par un à un deuxième intermédiaire (ferrédoxine ou cytochrome b5) qui interagit avec les désaturases. (figure I.2.2). Une différence notable entre les deux systèmes est le

potentiel électronégatif plus élevé de la ferrédoxine par rapport au cytochrome b5, ce qui en fait un meilleur réducteur (Heilmann et al. 2004). Mais des enzymes d'un compartiment exprimées dans l'autre possèdent toujours une activité, ce qui laisse supposer que la différence entre leurs potentiels n'a pas d'impact réel sur la réaction.

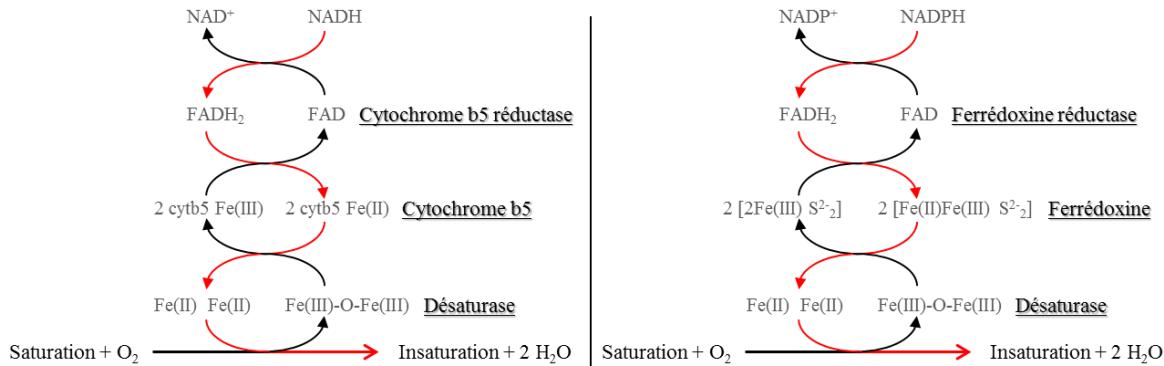


Figure 1.2.2 : Représentation schématique des partenaires rédox intervenant dans les réactions des désaturases. Le type de cofacteurs, NADH ou NADPH et le cosubstrat sur lequel est estérifié l'acide gras (chaîne carbonée) dépend de la sous-famille considérée.

Deux familles principales non-apparentées partageant ces caractéristiques existent (Shanklin and Cahoon 1998; Shanklin et al. 2009). Elles diffèrent principalement de par leur placement dans la cellule. La première famille est soluble alors que la deuxième est membranaire. D'autres différences existent entre-elles, comme par exemple le groupement qui estérifie l'acide gras, ou les séquences d'acides aminés conservées coordonnant le centre Fer. Leurs mécanismes catalytiques partagent probablement des points communs mais il est difficile de déterminer lesquels. Les enzymes sur lesquelles reposent notre étude sont de la famille des désaturases membranaires cependant les données structurales et les hypothèses quant aux mécanismes catalytiques sont bien plus abondantes pour les désaturases solubles. Il nous a donc paru important de présenter plus en détails ces deux classes d'enzymes.

A. Les désaturases solubles

a. Caractéristiques générales

Les désaturases solubles se retrouvent presque uniquement chez les plantes dites « supérieures » (Lindqvist et al. 1996; Guy et al. 2007; Shanklin et al. 2009) et les microalgues (Xue et al. 2016). Le fait qu'elles soient beaucoup moins fréquentes que les désaturases membranaires laisse supposer qu'elles sont apparues plus tardivement dans l'évolution (Shanklin and Cahoon 1998). Dans la grande majorité des cas, les désaturases solubles sont présentes dans le stroma des chloroplastes et elles y sont adressées généralement à l'aide d'un peptide de localisation. À cause de leur localisation, la chaîne de transport d'électron privilégiée est le couple ferrédoxine réductase/ferrédoxine et donc le donneur est le NADPH ou le photosystème I.

Aucune désaturase soluble native ne semble montrer une activité autre que la désaturation. D'autre part, elles agissent uniquement sur des acides gras estérifiés sur des acyl-carrier protein (protéine porteuse d'acyle, ACP) (Shanklin and Cahoon 1998; Whittle et al. 2008).

Plusieurs structures tridimensionnelles sont disponibles pour cette famille car la surexpression et la purification de la plupart de ces protéines sont assez aisées (tableau I.2.1 pour les références, (Lindqvist et al. 1996; Guy et al. 2007)). Ces enzymes sont formées presque exclusivement d'hélices α (11 au total), dont quatre d'entre elles sont profondément enfouies au cœur de la protéine et lient le centre fer. Une poche hydrophobe, coudée à proximité de centre fer, semble être le site de liaison du résidu d'acide gras. En effet, si un C18:0 est ajouté par « docking » moléculaire, la position 9-10 se place parfaitement au niveau du coude (Shanklin et al. 2009; Guy et al. 2011).

Organisme et enzyme	Référence PDB	Référence
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DesA2	1ZA0	(Dyer et al. 2009)
<i>Hedera helix</i> palmitoyl-ACP désaturase	2UW1	(Guy et al. 2007)
<i>Ricinus communis</i> stéaroyl-ACP désaturase	1AFR	(Lindqvist et al. 1996)
	1OQ4 ; 1OQ7 ; 1OQ9 ; 1OQB	(Moche et al. 2003)
	2J2F	(Guy et al. 2006)
	2XZ0 ; 2XZ1	(Guy et al. 2011)
	4V0J	(Liu et al. 2015)

Tableau I.2.1 : Tableau récapitulatif des différentes désaturases solubles dont la structure a été résolue par cristallographie.

Il existe dans cette famille deux séquences conservées riches en histidines et aspartates/glutamates, ces acides aminés portés par des hélices situées au cœur de la protéine coordonnent les deux ions fers permettant la catalyse (figure I.2.3). Les deux motifs consensus sont [(D/E) X₂ H] et lient chacun des deux ions fers : l'azote δ de l'histidine lie un des deux ions fers et les deux oxygènes issus des glutamates ou aspartates lient chacun des deux ions fers. Deux aspartates ou glutamates supplémentaires participent à la coordination, ils sont en dehors des séquences consensus mais très conservés dans les séquences.

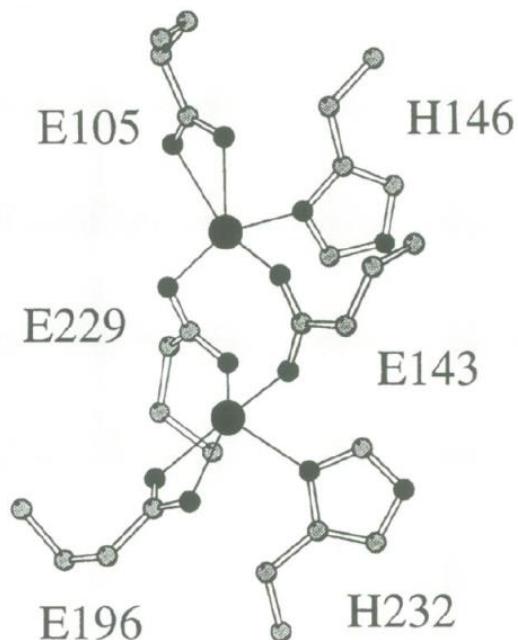


Figure 1.2.3 : Représentation de la liaison du centre fer (grosses sphères sombres) par les histidines et glutamines conservées chez la stéaroyl-ACP désaturase de *Ricinus communis* (tiré de (Lindqvist et al. 1996)). Les couples E143-H146 et E229-H232 sont dans les séquences conservées, alors que E105 et E196 sont isolés.

Une des sous-familles les plus représentées sont les Δ^9 désaturases, qui catalysent la première insaturation sur les C16 et C18 saturés pour former respectivement les acides palmitoléique et oléique (Xue et al. 2016). Elles sont ubiquitaires chez les plantes. Le peptide signal permettant l'adressage aux plastes est localisé en partie N-terminal de la séquence.

Il existe quelques désaturases solubles qui ont une régiospécificité différente (Cahoon et al. 1994; Schultz et al. 1996; Guy et al. 2007), comme celle du lierre qui réalise la désaturation de la position 4-5 de l'acide palmitique. Ces désaturases solubles partagent toujours une assez grande identité de séquence avec les Δ^9 stéaroyl-ACP désaturases (plus de 70%). Elles ont de plus pratiquement toujours une activité sur des acides gras saturés, et elles sont localisées précisément dans certains organes de la plante (graines, trichomes, ...).

Ces différences de régiospécificité sont intéressantes et ont permis d'étudier plus en détail les mécanismes responsables de la spécificité.

b. Les bases de leur régiospécificité

La forte régio- et stéréospécificité vient du placement de la liaison à désaturer. Il se fait par rapport à la partie carboxy-terminale de l'acide gras, c'est-à-dire au niveau de la fixation du cosubstrat ACP sur le site de liaison au substrat. Par exemple, la lysine 275 de la désaturase du lierre interagit avec le phosphate de l'ACP, donc le remplacement de l'aspartate, situé à une position équivalente de la désaturase de ricin, par une lysine produit de gros changements dans l'activité, une amélioration de plus de huit fois de la désaturation en Δ^4 du C14:0 (Guy et al. 2011).

Certains articles montrent qu'il est possible de construire des mutants dont la poche de liaison au substrat est modifiée, ce qui conduit à un changement de la spécificité de la longueur de l'acide gras (figure I.2.4, (Cahoon et al. 1997; Cahoon et al. 1998; Whittle and Shanklin 2001)). Les positions mutées sont principalement localisées au fond de la poche de liaison. Mais généralement, ces mutants ont une activité spécifique bien plus faible que la désaturase initiale. L'étape limitante de la catalyse serait la libération et/ou la liaison de l'acide gras du site actif, car la chaîne apolaire passerait dans un compartiment aqueux, ce qui est énergétiquement défavorable (Shanklin et al. 2009). Avoir des acides gras plus courts changerait la partition avec la phase aqueuse ce qui diminuerait l'efficacité de la conversion (Whittle and Shanklin 2001). Mais il est probable que d'autres facteurs pour le moment inconnus rentrent en jeu.

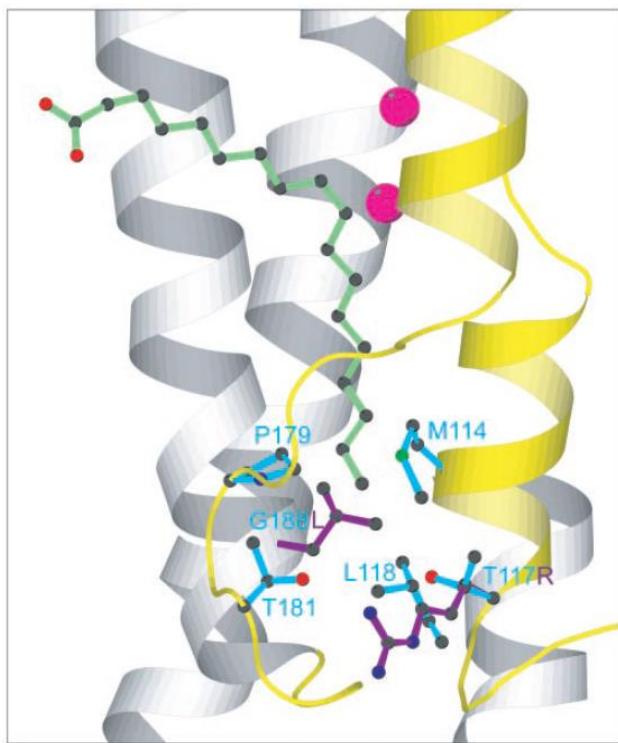


Figure I.2.4 : Représentation du positionnement d'acides aminés pouvant intervenir dans la spécificité de longueur de chaîne, tiré de (Whittle and Shanklin 2001). Un acide stéarique (vert) est modélisé dans la poche de liaison au substrat (sphères roses : ions fers ; hélices grises sont en arrière-plan et hélices jaune sont devant). Les acides aminés représentés en bleu sont ceux initialement présents. Les deux résidus violets sont les résidus mutés dans l'article.

Enfin, un mutant avec trois changements d'acides aminés de la stéaroyl-ACP désaturase de *R. communis* lui a conféré une activité inhabituelle supplémentaire d'hydroxylation plus isomérisation de la double liaison (Whittle et al. 2008). Il est intéressant de remarquer que ces trois changements sont localisés au fond de la poche de liaison au substrat et au niveau du domaine de liaison à l'ACP. Donc les changements catalytiques proviennent certainement du changement de placement/d'orientation du substrat et non pas du centre catalytique. Tout d'abord l'enzyme est capable de réaliser sa désaturation classique, c'est à dire former de l'acide oléique (C18:1 Δ^{9c}) à partir d'acide stéarique (C18:0). Puis cet acide oléique est converti en alcool allylique C18:1 Δ^{10} OH⁹ (environ 90% de trans et 10% de cis) après abstraction de l'hydrogène situé en position 11 puis réorganisation de la double liaison pour libérer la position 9. L'utilisation d'acide élaïdique (C18:1 Δ^{9t}) modifie les produits obtenus (avec formation de C18:2 $\Delta^{9t,11c}$).

B. Les désaturases membranaires

a. Généralités

Les désaturases membranaires sont présentes chez la plupart des organismes vivants, et sont suspectées d'être les premières désaturases à être apparues au cours de l'évolution, en particulier chez les cyanobactéries (Wilding et al. 2017). Comme leur nom l'indique, elles sont retrouvées dans les membranes du réticulum cytoplasmique chez les Eucaryotes (Mycètes, Mammifères, Plantes...) (Dyer and Mullen 2001; Meesapyodsuk et al. 2007; Liu et al. 2015; Bai et al. 2015). Elles existent également chez certaines cyanobactéries, dans les thylakoïdes ou la membrane cytoplasmique (Murata and Wada 1995; Mapaisansup et al. 2013) ou dans les membranes des chloroplastes chez des plantes (Chen et al. 2018).

Leur omniprésence fait qu'un grand nombre de séquences sont connues, et certaines enzymes possèdent des activités multiples et/ou inhabituelles, ce qui en fait un sujet intéressant de recherches. Malheureusement, leur nature membranaire rend plus difficile leur isolation et leur purification, ce qui complique leur caractérisation biochimique et leur cristallisation (Bai et al. 2015; Zhu et al. 2015; Wang et al. 2015). Ces désaturases agissent sur des acides gras estérifiés sur diverses molécules, comme par exemple les coenzymes A (CoA), les phospholipides et céramides, à ce jour aucune désaturase membranaire n'a été décrite pour agir sur l'acyl-ACP ou des stéryl-esters (Shanklin and Cahoon 1998; Santomartino et al. 2017). Ainsi, par exemple, les stéaroyl-CoA Δ^9 -désaturases catalysent la formation d'acide oléique à partir d'acide stéarique estérifié sur un CoA (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015). Comme précisé précédemment, leur partenaire redox dépend de leur localisation cellulaire. Certaines ont un domaine cytochrome b5 fusionné pour favoriser le transfert d'électron.

Elles ont toutes trois boîtes histidines conservées (que nous nommerons his-box), de forme générale $HX_{3-4}H$, $HX_{2-3}HH$, $(H/Q)X_2HH$ dont l'organisation et la séquence sont spécifiques du groupe de désaturases considéré. Elles sont indispensables à la liaison du centre fer, et leur mutation conduit à la perte totale d'activité (Shanklin et al. 1994). Deux autres enzymes partagent ces huit histidines équivalentes, ainsi que leur écartement relatif et leur positionnement par rapport aux hélices transmembranaires: il s'agit de deux monooxygénases de *Pseudomonas* (Shanklin and Whittle 2003). Cela semble indiquer qu'elles peuvent être évolutivement connectées.

Comme dit précédemment, les désaturases ont une régiosélectivité marquée. Chez certaines enzymes, il est possible d'avoir deux désaturations successives mais les modalités de la catalyse ne sont pas connues.

b. Classement des désaturases membranaires

Les différentes sous-familles de désaturases membranaires ont été classées selon différentes modalités. Une des premières classifications à avoir été mise en place utilisait les caractéristiques biochimiques, principalement le type de modification ajoutée et sa position. Ainsi historiquement, on considérait trois types de désaturases se distinguant par le positionnement de la double liaison (Higashi and Murata 1993; Shanklin and Cahoon 1998; Buček et al. 2014).

- 1) Le placement peut se faire comme pour les désaturases solubles par rapport à l'extrémité carboxyle-terminale, donc du côté estérifiée. Les enzymes ayant ce type de régiospécificité sont couramment appelées Δ^X -désaturases, où X est la position de l'insaturation.
- 2) À l'inverse, la désaturation peut être placée par rapport à l'extrémité méthyle de l'acide gras. Les ωX -désaturases réalisent ce genre de réactions, où X est la position de l'insaturation en partant de la fin de la molécule (comme le type ω de l'acide gras formé : $\omega 3, \omega 6\dots$).
- 3) Le dernier mécanisme de placement s'organise selon une double liaison préexistante (ou d'une autre modification comme époxydation ou hydroxylation), généralement trois carbones après. Les désaturases de ce type sont noté comme $v+3$ désaturases. Elles ne peuvent donc agir que sur des acides gras préalablement modifiés.

Par la suite d'autres classifications ont tenu compte du cosubstrat utilisé (Shanklin and Cahoon 1998). Les dernières classifications en date ont été réalisées par des approches phylogénétiques (López-Alonso et al. 2003; Hashimoto et al. 2008; Li et al. 2016; Wilding et al. 2017). Ce nouveau classement sépare quatre sous-familles principales, les « first desaturases », les « methyl-end desaturases », les « front-end desaturases » et les « sphingolipid desaturases ». Chacune de ces sous-familles contient des enzymes appartenant aux différents règnes, ce qui semble montrer une origine évolutive commune de chacune d'entre-elles.

Les « first desaturases » regroupent les désaturases membranaires qui ajoutent une double liaison dans une chaîne saturée d'acide gras. Cette sous-famille peut de nouveau se séparer en plusieurs clusters, mais seulement deux contiennent des enzymes caractérisées (Li et al. 2016). Le premier cluster majoritaire est celui des Δ^9 -stéaroyl-CoA désaturases, et le second contient les Δ^7 -palmitoyl-monogalactosyldiacylglycérol/ Δ^9 -palmitoyl-phosphatidylcholine désaturases bifonctionnelles retrouvées chez *A. thaliana* (Heilmann et al. 2004). Ces dernières peuvent être exprimées soit au niveau du réticulum endoplasmique ou dans les plastes, et leurs changements de régiospécificité seraient dus à la différence de substrats entre les deux compartiments. Dans ces clusters, il y a également une séparation assez nette selon le règne d'où provient l'enzyme. Par exemple, dans le cluster des Δ^9 -stéaroyl-CoA désaturases, celles des Métazoaires sont séparées de celles des Mycètes, ces dernières contenant généralement un domaine cytochrome b5 en plus, fusionné en C-terminal.

Les « methyl-end desaturases », aussi appelées « omega desaturases », catalysent l'ajout d'une modification entre une modification existante et la partie terminale de l'acide gras (coté groupement méthyle). Deux clusters séparent cette sous-famille : le premier est composé des Δ^5 -phospholipide désaturases majoritairement procaryotiques et est fonctionnellement plus

proche des « first desaturases ». Le second cluster, plus important, contient des Δ^{12} -désaturases, Δ^{15} -désaturases et bifonctionnelles Δ^{12} - Δ^{15} de tous les règnes, mais il y a une sous-représentation des Métazoaires et d'avantage de Plantae (Cahoon et al. 2003). Cela montre l'origine commune des Δ^{12} et Δ^{15} et la diversification des activités plus tardivement au cours de l'évolution des espèces (Hashimoto et al. 2008; Wang et al. 2013). Cette famille possède la plus large gamme d'activités inhabituelles connues (hydroxylation, conjugaison, acétylénisation, époxydation) (Cahoon et al. 2003). Il est probable que les modifications autres que la désaturation aient elles aussi une origine plus tardive. Le substrat de prédilection pour la sous-famille est un phospholipide, souvent une phosphatidylcholine. Souvent les Δ^{12} forment une famille multigénique chez les plantes (à l'exception d'*Arabidopsis thaliana*). Pour le carthame des teinturiers (*Carthamus tinctorius* L.), la famille est particulièrement développée avec onze gènes différents (Cao et al. 2013). L'expression de chaque gène est modulée par la localisation tissulaire, le stade de développement et/ou de l'inductibilité. Des éléments de régulation semblent exister dans un intron en 5' des gènes. Chez le soja, GmFAD2-1 est exprimée dans les graines et son activité enzymatique est régulée par la phosphorylation d'une sérine (Tang et al. 2005).

Les « front-end désaturases » ajoutent une double liaison entre une double liaison existante et le début de l'acide gras (coté fonction acide carboxylique). Plusieurs types de désaturases appartiennent à cette famille : les Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 et Δ^6/Δ^8 sphingolipide désaturases. Pour elles aussi il semblerait que les différentes activités soient apparues postérieurement à la séparation des règnes. Certaines « front-end désaturases » possèdent un domaine cytochrome b5 fusionné en N-terminal. Cette sous-famille est plus variée que les autres en termes de substrats utilisables ou de régiospécificité, ce qui rend plus difficile son organisation.

Enfin, la dernière sous-famille des « sphingolipid desaturases » regroupe à l'heure actuelle uniquement des Δ^4 -sphingolipides désaturases. Elles participent à la formation des céramides à partir de dihydrocéramide.

c. Les premières structures des désaturases membranaires

Au début de la thèse, aucune donnée structurale sur les désaturases membranaires n'existe. Aujourd'hui, il existe seulement trois désaturases membranaires avec une structure tridimensionnelle résolue : deux sont des stéaroyl-CoA Δ^9 -désaturases (SCD1, (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015)) et la dernière est une sphingolipide α -hydroxylase (Zhu et al. 2015). Toutes les structures tridimensionnelles obtenues semblent avoir une forme en « champignon » : elles possèdent deux paires d'hélices transmembranaires (le pied), qui partitionnent trois larges domaines cytoplasmiques rassemblés à la surface externe de la membrane du réticulum endoplasmique (le chapeau) (figure I.2.5).

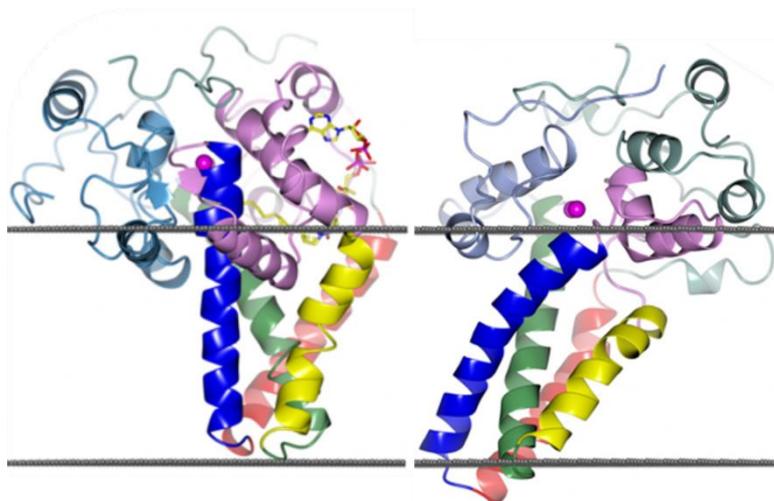


Figure I.2.5 : Comparaison entre mSCD1 (stéaroyl-CoA de souris, gauche) et ScSs7p (sphingolipide α -hydroxylase de *S. cerevisiae*, droite). Les ions fers sont indiqué par les sphères roses (tiré de (Zhu et al. 2015)). Le substrat (stéaroyl-CoA) est affiché en stick sur la structure de mSCD1.

Selon les trois structures tridimensionnelles disponibles, les huit histidines sont toujours présentes dans le chapeau, orienté du côté cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique. Les deux structures des stéaroyl-CoA Δ^9 -désaturases partagent beaucoup de points communs car elles sont très proches, avec une forte identité de 84%. La sphingolipide α -hydroxylase de *S. cerevisiae* (ScSs7p) est assez différente des deux SCD1. D'un point de vue de la catalyse, elle réalise une hydroxylation à la position 2 et non pas une désaturation à la position 9 et son substrat est estérifié sur une sphingosine et pas un CoA. L'identité est également bien plus faible, car seulement 12% à 15% de sa séquence s'alignent avec les SCD1. ScSs7p possède aussi un domaine cytochrome b5 en N-terminal.

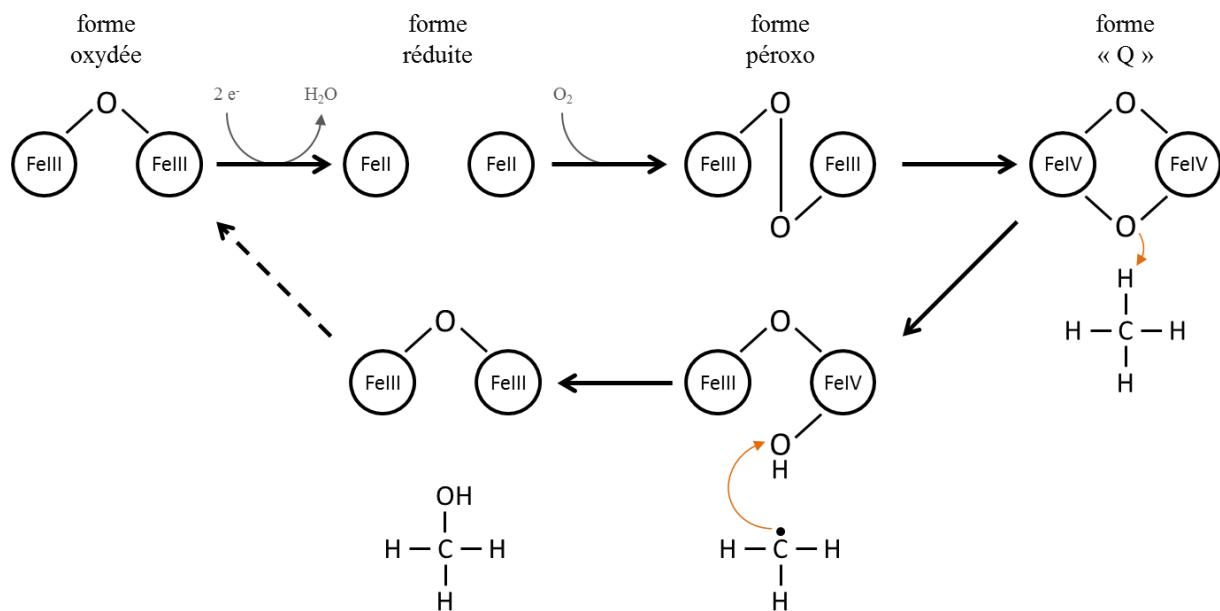
Mais grâce à l'obtention de ces premières structures, la compréhension de la catalyse dans cette famille d'enzymes va pouvoir aller plus loin et va sans doute accélérer dans les prochaines années.

C. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des désaturases membranaires n'est pas encore élucidé, car il n'y avait pas encore de structures utilisables il y a quelques années. Et même actuellement, le nombre très limité de structure rend l'étude de ce mécanisme difficile. Le mécanisme catalytique de certaines familles enzymatiques apparentées aux désaturases membranaires a été étudié, et cela pourrait servir à obtenir des indices sur son fonctionnement. Celui des désaturases solubles a été étudié à partir des différentes structures tridimensionnelles depuis la fin des années 2000, mais n'a pas été complètement élucidé (Lindqvist et al. 1996; Whittle et al. 2008; Liu et al. 2015). Par contre, le mécanisme catalytique des alcanes monooxygénases (ou alcanes hydroxylases) a été étudié en détail (Wallar and Lipscomb 1996; Austin et al. 2000; Kopp and Lippard 2002). Ces enzymes partagent par exemple la présence de deux ions métalliques dans leur site actif (Shanklin and Münck 1997). Elles agissent sur des alcanes en les hydroxylant et elles existent aussi bien sous forme soluble (Kopp and Lippard 2002) que membranaires (Marin et al. 2003; van Beilen et al. 2005). Leur mécanisme catalytique a été étudié en détail.

Les premières étapes sont supposées similaires entre les deux familles (Shanklin and Cahoon 1998; Kopp and Lippard 2002) (figure I.2.6). Le centre fer est initialement quiescent sous forme oxydée, il est donc tout d'abord réduit par deux électrons provenant du NADH ou NADPH au travers de la chaîne de transport d'électron (forme réduite). Puis le dioxygène se lie aux deux ions fers, formant après plusieurs étapes de réarrangement un peroxy (liaison linéaire entre le dioxygène encadré par les deux fers). Après un dernier réarrangement, chaque oxygène fini par se lier aux deux fers, formant l'intermédiaire réactionnel activé avec deux oxo-bridges (forme « Q »). Cet intermédiaire est la forme active de l'enzyme pour agir sur le substrat.

Figure I.2.6 : Mécanisme réactionnel des méthane-monoxygénases. La partie haute pourrait

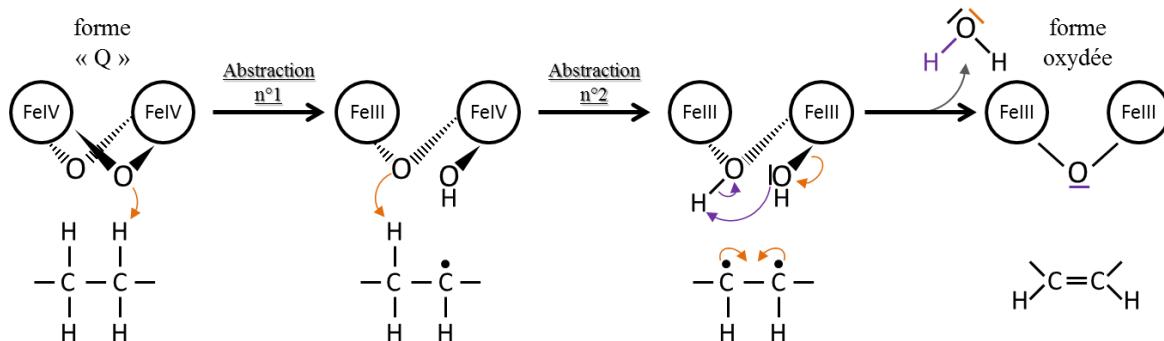


représenter les mécanismes communs aux autres enzymes à centre fer, comme les désaturases. La partie du bas représente les étapes catalytiques spécifiques des méthane-monoxygénases.

Le mécanisme d'action sur le substrat est ensuite différent entre les monooxygénases et les désaturases, car il y a incorporation d'un atome d'oxygène dans le substrat des monooxygénases à la différence de la désaturation (figure I.2.6). Un des oxygènes sur l'intermédiaire « Q » attaque l'hydrogène de la chaîne carbonée, ce qui forme un radical sur la chaîne carbonée (carboradical). Ce radical va ensuite réattaquer le même oxygène qui a réalisé l'abstraction, ce qui forme une fonction hydroxyle sur la chaîne carbonée, et redonne l'enzyme sous sa forme quiescente (forme oxydée).

Le mécanisme proposé pour la désaturation est différent (figure I.2.7). La première particularité se situe au niveau de la géométrie du centre fer, contrairement aux monooxygénases où un atome d'oxygène peut être loin du substrat, ici le substrat serait à proximité des deux oxygènes. Comme pour les monooxygénases, un des oxygènes effectue une abstraction d'un hydrogène, ce qui forme un carboradical. Puis le second atome d'oxygène effectue l'abstraction d'un autre hydrogène sur un carbone adjacent au premier. La troisième et dernière étape est une réorganisation du carboradical et du centre fer : les deux électrons libres adjacents vont

s'appareiller pour former une double liaison sur le substrat, et un hydroxyle du centre fer va récupérer l'hydrogène de l'autre, ce qui va former une molécule d'eau supplémentaire et la



forme oxydée initiale (figure I.2.6, partie haute).

Figure I.2.7 : Mécanisme réactionnel présumptif de la désaturation à partir de l'intermédiaire réactionnel activé avec deux oxo-bridges (forme « Q » de la figure I.2.6)

D. Activités inhabituelles et ingénierie des désaturases pour moduler leur spécificité

Certaines désaturases membranaires peuvent avoir des activités autres que la désaturation. Ces activités sont peu communes, c'est pour cela qu'elles sont qualifiées d'inhabituelles. Elles ont été nommées en fonction des types d'acides gras inhabituels synthétisés.

a. Les conjugases et acétylénases

Les conjugases et acétylénases permettent la synthèse des acides gras respectivement conjugués et acétyléniques. Elles réalisent elles aussi des désaturations comme les désaturases conventionnelles (elles enlèvent deux hydrogènes), mais les produits obtenus ont des réactivités bien différentes (figure I.2.8). Les deux enzymes utilisent comme substrat initial une chaîne de carbone possédant une insaturation existante. Le mécanisme réactionnel des acétylénases pourrait être identique à celui de la désaturation simple, avec l'abstraction de deux hydrogènes adjacents (figure I.2.7). Par contre, les conjugases doivent posséder un mécanisme différent pour expliquer le déplacement de la double liaison existante, peut-être en réalisant une abstraction sur des hydrogènes plus lointains et non pas adjacents (Hornung et al. 2002).

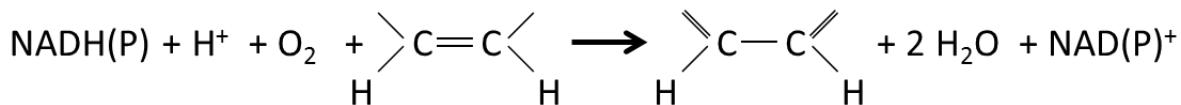
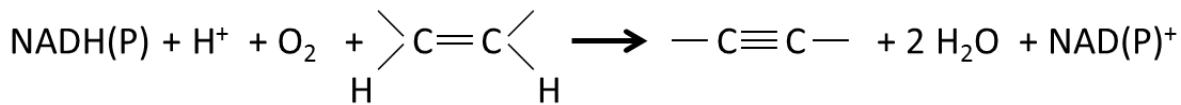


Figure I.2.8 : Récapitulatif général de la réaction d'acétylénation (haut) et de conjugaison (bas).

i. Les conjugases

Les conjugases modifient une double liaison à la position n en deux doubles liaisons adjacentes à la première, soit n-1 et n+1 (Cahoon et al. 1999). Actuellement, il existe deux grands types de conjugases, celles agissant soit sur les insaturations à la position 9 (appelées FADX9) et celles agissant sur les insaturations à la position 12 (appelées FADX12), les deux liaisons obtenues sont alors respectivement en position 8-10 ou 11-13. Différents isomères de configuration cis et trans peuvent être obtenus selon les enzymes, mais toutes les combinaisons n'ont pas encore été trouvées naturellement.

Par exemple, les deux conjugases de *Trichosanthes kirilowii* et *Punica granatum* (Hornung et al. 2002; Iwabuchi et al. 2003) ont pour activité principale la production d'acide punique (C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$) à partir d'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$). Elles possèdent également plusieurs faibles activité conjugases sur d'autres C16 et C18 possédant des insaturations à la position 12. Finalement, elles possèdent une activité désaturase résiduelle sur les C16:1 Δ^{9c} et C18:1 Δ^{9c} .

La conjugase de *Vernicia* (ex *Aleurites*) *fordii* (qui produit l'huile de Tung, (Dyer et al. 2002)) convertit l'acide linoléique en acide α -éléostéarique (C18:3 $\Delta^{9c,11t,13t}$) et l'acide α -linolénique (C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$) en acide α -parinarique (C18:4 $\Delta^{9c,11t,13t,15c}$). Comme les deux autres conjugases précédentes, elle possède une activité désaturase non-négligeable sur les C16:1 Δ^{9c} et C18:1 Δ^{9c} lorsqu'elle est exprimée chez la levure. Les conjugases de *Momordica charanica* (Cahoon et al. 1999; Rawat et al. 2012) et *Impatiens balsamina* (Cahoon et al. 1999), McFADX2, font la même conversion.

La conjugase de *Calendula officinalis* (Qiu et al. 2001; Cahoon et al. 2001) appartient à la famille des FADX9, elle agit sur différents acides gras possédant une double liaison cis à la position 9 (converti acide linoléique en acide calendique C18:3 $\Delta^{8t,10t,12c}$), et elle n'a pas d'activité sur une double liaison trans.

ii. Les acétylénases

Les désaturases membranaires qui produisent des acides gras avec des triples liaisons sont appelés acétylénases (à cause du nom de l'alcyne le plus court, l'acétylène). La triple liaison provoque une forte rigidité de la chaîne carbonée, donc il est probable que l'organisation spatiale du site actif soit adaptée en conséquence.

Les acides gras acétyléniques servent comme base pour la synthèse des polyacétylènes, des composés de défense omniprésents, en particulier chez les plantes. Paradoxalement à la large présence d'acétylénases, ces acides gras inhabituels sont peu fréquemment retrouvés dans les huiles de plantes (Minto and Blacklock 2008).

Des acétylénases similaires aux FAD2 ont été caractérisées parmi trois espèces de plantes appartenant à trois familles différentes, les *Apiaceae*, *Asteraceae* et *Araliaceae*, et aucune de ces espèces n'accumule d'acides gras inhabituels (respectivement le persil *Petroselinum crispum*, le tournesol *Helianthus annuus* et le lierre *Hedera helix*) (Cahoon et al. 2003). Il a été prouvé que chez le persil et le tournesol, l'expression de cette acétylénase est induite par l'infection par un champignon pathogène. Ces acétylénases agissent sur la double liaison en position 12 de l'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$) pour former de l'acide crépénynique (C18:2 $\Delta^{9c,12a}$), il y a aussi une coproduction probable d'acide déhydrocrépénynique (C18:3 $\Delta^{9c,12a,14c}$) lors de son expression dans des embryons de soja.

Crepis alpina est une des plantes qui accumulent de l'acide crépénynique dans l'huile de ses graines. Une acétylénase a été caractérisé (Lee et al. 1998), elle agit sur la double liaison en position 12 de l'acide linoléique pour former l'acide crépénynique (C18:2 $\Delta^{9c,12a}$). Elle possède aussi une très légère activité désaturase sur l'acide oléique à la même position. L'acétylénase de *Carthamus tinctorius* (Cao et al. 2013) permet elle aussi la production d'acide crépénynique. Curieusement, l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae* n'avait permis d'obtenir qu'une désaturation à la position 12, avec un mélange d'isomères cis et trans.

La mousse *Ceratodon purpureus* possède une acétylénase/désaturase bifonctionnelle qui possède une action sur la position 6 (Sperling et al. 2000). Son spectre d'activité est large car elle est capable d'agir sur n'importe quel C18 insaturé classique (de l'acide oléique à l'acide stéaridonique) pour former une insaturation puis une triple liaison si possible. Elle possède un domaine cytochrome b5 en N-terminal.

b. Les hydroxylases et époxydases

Les hydroxylases et les époxydases sont les deux derniers types de désaturases membranaires qui ont une activité inhabituelle. Toutes les deux conduisent à l'intégration d'un oxygène, provenant du dioxygène, au sein de la chaîne carbonée (figure I.2.9). Elles ne produisent donc qu'une seule molécule d'eau au final. Les hydroxylases permettent d'obtenir une fonction hydroxyle sur un carbone comme les alcanes monooxygénases, donc le mécanisme catalytique est supposé être très similaire entre elles (figure I.2.6). Les époxydases ajoutent l'oxygène sur un substrat possédant une double liaison, donc le mécanisme doit être certainement différent pour expliquer son intégration (cassure de la double liaison).

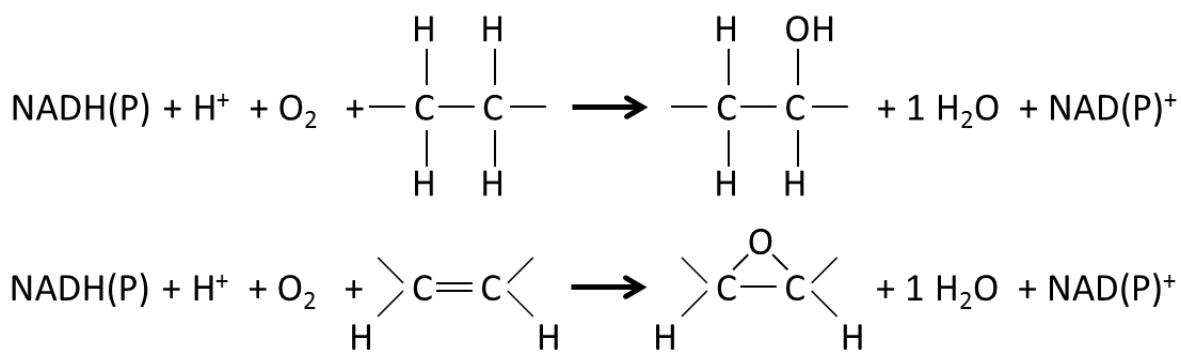


Figure I.2.9 : Récapitulatif général de la réaction d'hydroxylation (haut) et d'époxydation (bas).

i. Les hydroxylases

Les hydroxylases sont responsables de la synthèse d'acides gras hydroxylés. Il y a actuellement six hydroxylases caractérisées qui agissent au niveau de la position 12. Cinq appartiennent à des plantes, il s'agit de celles de *Ricinus communis* RcFAH12 (Van de Loo et al. 1995), *Lesquerella fendleri* LfFAH12 (Broun et al. 1998), *Lesquerella lindheimeri* LlFAH12 (Dauk et al. 2007) et deux de *Hiptage benghalensis* HbFAH12-1 et HbFAH12-2 (Zhou et al. 2013; Tian et al. 2019). La dernière hydroxylase est celle de *Claviceps purpurea* CpFAH12 (Meesapayodsuk and Qiu 2008), un champignon phytopathogène. Ces hydroxylases permettent toutes la synthèse d'acide ricinoléique (C18:1 Δ⁹ OH¹²) à partir d'acide oléique. Mais RcFAH12 et LlFAH12 sont monofonctionnelles alors que LfFAH12, HbFAH12-1, HbFAH12-2 et CpFAH12 sont bifonctionnelles, elles réalisent en parallèle la désaturation (coproduction d'acide linoléique, C18:2 Δ^{9,12}). *Hiptage benghalensis* est une autre plante tropicale qui accumule de l'acide ricinoléique. Récemment, des hydroxylases ont été révélées par l'analyse bio-informatique des données de transcriptomique (Tian et al. 2019). Il faudra maintenant les caractériser biochimiquement.

La dihydrocéramide Δ^4 -désaturase de *Candida albicans* possède une activité hydroxylase non négligeable, ce qui produit de la phytosphinganine à partir de sphinganine (Beckmann et al. 2003). Mais le produit majoritaire reste la forme désaturée, la sphingosine.

Aucune autre hydroxylase ne semble connue à l'heure actuelle. Aucune hydroxylase agissant sur d'autres positions (9 ou 15 par exemple) n'a été trouvée.

ii. Les époxydases

Les acides gras époxydés sont synthétisés par des époxydases, un époxyde est une fonction qui apporte beaucoup de rigidité dans une chaîne carbonée, donc le site actif doit être adapté pour l'accepter.

La principale époxydase a été trouvée chez *Crepis palaestina* (Lee et al. 1998; Singh et al. 2001; Zhou et al. 2006), et elle est responsable de la synthèse d'acide vernalique (C18:1 Δ^{9c} Epox¹²). Il a été montré que son expression chez *Arabidopsis thaliana* réduit la quantité d'acide oléique transformé par les désaturases natives (principalement acides linoléique et linolénique). Cela empêche d'avoir une bonne production hétérologue car l'époxydase utilise l'acide linoléique comme substrat. Mais la co-expression avec la désaturase de *Crepis palaestina* permet d'obtenir à nouveau un taux de conversion normal, ce qui augmente la quantité produite jusqu'à une limite où cet acide gras devient létal pour l'embryon.

Vernonia galamensis est une autre plante qui accumule de hautes teneurs d'acide vernalique (C18:1 Δ^{9c} Epox¹²) dans ses graines (Baye et al. 2005). Elle doit donc posséder une époxydase qui n'a pas encore été caractérisée.

Conclusion :

Dans cette partie, nous avons montré l'énorme diversité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides, un focus a été apporté sur les désaturases membranaires, qui forment le cœur de notre sujet. Dans cette famille d'enzyme, on retrouve (majoritairement chez des plantes) des enzymes permettant des modifications inhabituelles des acides gras : l'acétylénisation, la conjugaison, l'époxydation et finalement l'hydroxylation. On peut noter que les enzymes possédant une activité inhabituelle ont souvent une double activité, l'une de désaturation et l'autre inhabituelle.

3. Utilisation de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* pour la production d'acides gras inhabituels

A. Généralités

a. Classement phylogénétique et caractéristiques micro- et macroscopiques

Yarrowia lipolytica est un Mycète saprophyte et lipolytique appartenant à la division des *Ascomycètes*. C'est un champignon dimorphique, c'est-à-dire qu'il peut se présenter sous deux formes : soit sous forme de levure (cellules ovoïdes isolées) ou sous forme d'hyphe (forme végétative filamenteuse). Dans l'ancien système de classement d'avant 2013, un champignon pouvait posséder deux noms selon sa morphologie et son mode de reproduction. L'anamorphe, autrefois classé comme *Candida lipolytica*, est la forme « levure » haploïde et asexuée se reproduisant par bourgeonnement. Cette forme est la principale quand le milieu n'est pas limité. Les colonies formées sont blanches et plutôt de type S (colonies rondes, crémeuses, opaques, mates, diamètre ~3mm). Le téléomorphe apparaît par exemple lorsque que le milieu est épuisé, et elle est responsable de la reproduction sexuée. Les hyphes diploïdes sont septés (c'est-à-dire cloisonnés ou séparés les uns des autres) et branchés, ils forment des asques (cellule reproductive) contenant de 1 à 4 spores, à l'allure et à la position variables sur le thalle (l'ensemble des hyphes). Les colonies qui produisent des spores changent souvent de couleur et deviennent marrons ou roses (van der Walt and von Arx 1980). Ces caractéristiques en font une levure bien différente de la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* (Zinjarde 2014). Le téléomorphe a subi au moins deux changement de noms (*Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica*) jusqu'en 1980, où l'appellation *Y. lipolytica* a été finalement proposée et conservée après la réforme de la classification des Champignons appliquée en 2013 (réforme « Un Fungi, un nom ») (van der Walt and von Arx 1980; Suzuki et al. 1999; Hawksworth 2011).

b. Espèces du genre *Yarrowia*

Le genre *Yarrowia* a longtemps été monotypique avec uniquement l'espèce *Y. lipolytica* mais de nouvelles espèces y ont été ajoutées par la suite (Groenewald and Smith 2013; Michely et al. 2013; Groenewald et al. 2014). Ces onze « nouvelles » espèces légitimes ([MycoBank](#)) étaient auparavant classées avec les *Candida*, comme par exemple *Y. lipolytica*, *Y. deformans*, *Y. galli* ou *Y. alimentaria*.

Différentes souches de *Y. lipolytica* ont été isolées à partir de différentes sources naturelles ou d'origine anthropique, souvent riches en composés hydrophobes et/ou protéiques (Zinjarde 2014). Certaines souches ont été isolées chez des animaux (Groenewald et al. 2014), et il est donc possible que cette souche puisse être en partie commensale, en particulier au niveau des voies aériennes.

La souche industrielle W29 ([ATCC20460](#), CBS7504 ou CLIB89) dont descendent les souches utilisées dans notre étude a été isolée à partir d'un échantillon provenant des égouts de Paris (Pomraning and Baker 2015; Magnan et al. 2016). Elle a été séquencée tout comme la souche CLIB122 (un hybride de W29 avec une souche américaine). W29 possède six chromosomes (YALIW29_A à F), la taille totale de son génome est de 20,3 Mpb et le taux de G-C est de 49%. À titre de comparaison, *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al. 1996) possède plus de chromosomes (seize numérotés de I à XVI) mais son génome est bien plus court (12,1 Mpb). Chez *Y. lipolytica* W29, la taille des chromosomes s'échelonne de 2,26 Mpb à 4,20 Mpb pour respectivement YALI1A et YALI1F alors que le chromosome IV de *S. cerevisiae*, le plus long, n'atteint « que » 1,53 Mpb. La densité génétique moyenne de W29 est de 14 gènes pour 100 kpb, ce qui est sensiblement plus faible que celle de *S. cerevisiae*, qui est d'environ 49 gènes pour 100 kpb.

La série de souche Po1, dont sont issues les souches utilisées dans notre projet, dérive de W29. La souche Po1d porte trois modifications génétiques non-réversibles (W29 *MatA*, *leu2-270*, *ura3-302*, *xpr2-322*) (Tharaud et al. 1992; Pomraning and Baker 2015). Cette souche a ensuite subi dix délétions supplémentaires pour obtenir la souche châssis OléoX utilisée dans mes travaux, (Po1d, *Pox1-6*, *Yl.DGA1*, *Yl.DGA2*, *Yl.LRO1*, *Yl.FAD2*) (Beopoulos et al. 2014).

c. Caractéristiques physiologiques et physico-chimique

Yarrowia lipolytica est considérée comme un organisme modèle pour de nombreux domaines, comme la production de molécules organiques (Aiba and Matsuoka 1979; Beopoulos et al. 2009; Dulermo et al. 2015) ou d'enzymes (Pignede et al. 2000; Nicaud et al. 2002; Fickers et al. 2011) ou dans les domaines alimentaires (Zinjarde 2014) et industriels (Groenewald and Smith 2013; Groenewald et al. 2014). Elle est aussi étudiée comme organisme modèle pour les mécanismes de sécrétion (Tharaud et al. 1992; Nicaud et al. 2002), les mitochondries et peroxysomes (Guerrero-Castillo et al. 2012) ou la transition dimorphique (Dominguez et al. 2000).

Son métabolisme est particulièrement bien orienté envers l'utilisation de composés hydrophobes comme des lipides (grande diversité d'enzymes lipolytiques) mais elle a également la capacité inhabituelle de pouvoir consommer des hydrocarbures (Pareilleux 1979; Mauersberger et al. 2001). Ainsi, elle peut être utilisée comme organisme de bio-remédiation lors d'incidents avec des hydrocarbures (Fickers et al. 2005). Elle peut utiliser un nombre restreint de glucides (glucose, mannitol, N-acétylglucosamine) et polyols (glycérol, sorbitol) (Groenewald et al. 2014) mais il a récemment été possible d'étendre son spectre d'activité grâce

à de l'ingénierie génétique ((Ledesma-Amaro and Nicaud 2016), inuline, amidon...). Certaines souches peuvent également posséder naturellement une activité protéolytique prononcée (Nicaud 2012). Cela est cohérent avec les milieux dans lesquels elle est communément retrouvée ainsi qu'avec sa capacité à sécréter des protéases et des lipases (zones polluées, produits laitiers...).

Sa température optimale de croissance se situe aux alentours de 28°C, mais elle est capable de tolérer une faible température et de pousser à 4°C. Par contre, elle est incapable de croître à des températures de 37°C ou plus (Groenewald et al. 2014). C'est un organisme aérobie strict, ce qui nécessite une bonne oxygénation du milieu (Barth and Gaillardin 1997; Fickers et al. 2005; Groenewald et al. 2014), qui peut tolérer une large gamme de pH (Zinjarde 2014) entre 2,5 et 8 (<http://microbialfoods.org/microbe-guide-yarrowia-lipolytica/>).

Comme dit précédemment, plusieurs souches ont été isolées à partir de biotopes divers. Cela conduit à des caractéristiques qui peuvent varier selon la souche considérée. Par exemple, la souche marine NCIM3589 a été isolée à partir d'eau de mer contaminée par des huiles (Zinjarde et al. 1997). Elle tolérera de plus fortes teneurs en sels, des températures plus basses et aura un pH optimum légèrement basique.

Cette levure n'est pas pathogène mais a été décrite comme opportuniste dans de rares cas (Groenewald et al. 2014; Boyd et al. 2017). 55 cas de pathologies liées à *Y. lipolytica* ont été relevés chez l'Homme depuis 1985, ce qui fait entre un et deux cas par an en moyenne. Ces cas surviennent surtout sur les personnes immunodéprimées, et le mode de contamination le plus fréquent est la colonisation des cathéters, lieu où *Y. lipolytica* peut développer un biofilm. Mais sa virulence est faible, et un traitement n'est souvent pas nécessaire bien que des antibiotiques efficaces existent. Des cas de résistance aux antifongiques semblent être probables parmi les espèces du Clade de *Yarrowia* (Groenewald et al. 2014). La collection du CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures ou bureau central des cultures fongiques) contient quatre souches isolées à partir de prélèvements réalisés sur des patients humains malades (CBS 2070, CBS 5570, CBS 5589 et CBS 7133, (Groenewald et al. 2014)). Cette faible pathogénicité et sa présence courante dans certains aliments a permis à cette levure d'acquérir le statut GRAS (« generally recognized as safe », généralement reconnu comme sûr) par la FDA (« Food and Drug Administration », l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux).

Y. lipolytica présente un métabolisme des composés hydrophobes efficace, elle est capable de synthétiser ou métaboliser divers lipides (acides gras et triacylglycérols) et des alcanes allant au minimum du décane à l'octadécane (Mauersberger et al. 2001; Fickers et al. 2005). Elle possède 80 à 90 gènes impliqués dans l'assimilation des n-alcanes. Il existe une classification des souches / des mutants (alkA à alkE) selon leur incapacité à utiliser certains composés hydrophobes (respectivement alcane, alcool gras, aldéhyde gras, acide gras, acétate). Par exemple les mutants alkA ne peuvent pas pousser sur un milieu contenant des alcanes mais ils pourront pousser sur un milieu contenant un alcool / aldéhyde / acide gras ou acétate (Mauersberger et al. 2001). Certains clones Alk- peuvent être affectés pour d'autres caractéristiques comme la reproduction, la morphologie ou la transformabilité.

Une des caractéristiques marquantes de *Y. lipolytica* est sa capacité à accumuler de fortes quantités d'acides gras (plus de 20% de sa masse sèche), surtout en présence d'un excès de la source de carbone par rapport à la source d'azote (Papanikolaou et al. 2001; Beopoulos et al. 2009; Papanikolaou et al. 2009; Tai and Stephanopoulos 2013; Sestric et al. 2014; Abghari and Chen 2014; Ochoa-Estopier and Guillouet 2014). Elle est donc considérée comme une levure oléagineuse, les lipides qu'elle accumule sont majoritairement des triacylglycérols (>90%) et des teneurs significatives d'acides gras libres sont observées (Beopoulos et al. 2008; Beopoulos et al. 2009). Même si elle possède la capacité de synthétiser de l'ergostérol, elle n'accumule que très peu de stéryl-esters (Beopoulos et al. 2008; Beopoulos et al. 2012).

Une autre propriété native de *Y. lipolytica* est la production de molécules tensioactives. Le ratio carbone / azote a également un impact sur la production de bio-surfactants, car *Y. lipolytica* privilégie sa croissance / division à la production ou le stockage (Fontes et al. 2010). La souche NCIM3589 produit un biosurfactant lipoglycoprotéique thermorésistant après induction avec des alcanes (Zinjarde et al. 1997; Zinjarde and Pant 2002). Il est produit pendant la croissance des cellules et il reste associé aux cellules, puis il est libéré dans le milieu pendant la phase stationnaire lors qu'il y a une carence azotée. Il permet à cette souche d'adsorber à sa surface de petites micelles d'alcane pour pouvoir ensuite les assimiler.

d. Outils génétiques

Plusieurs outils génétiques sont déjà développés chez cette levure et de nouveaux apparaissent régulièrement, dont la plupart ont été adaptés à partir des outils disponibles chez *Saccharomyces*. Un outil indispensable est la possibilité de transformer génétiquement les cellules. Une méthode assez ancienne mais toujours employée est la transformation à l'acétate de lithium (Davidow et al. 1985). Actuellement, certains kits de transformation de levures fonctionnent également avec *Yarrowia lipolytica*. Pour pouvoir sélectionner efficacement des souches, plusieurs gènes de criblage classiques sont utilisés. La souche W29 possède les gènes LEU2 et URA3 qui codent respectivement pour la β -isopropylmalate déshydrogénase et la orotidine-5'-phosphate décarboxylase qui permettent la synthèse de leucine et d'uracile. Mais dans la souche Po1d qui en dérive, ces deux gènes ont été tronqués (leu2-270 et ura3-302) pour permettre de les utiliser comme marqueur de sélection. Un autre marqueur existe avec un antibiotique, l'hygromycine (Cordero-Otero and Gaillardin 1996). La séquence exprimée est celle de l'hygromycine phosphotransférase de *Escherichia coli*, sous un promoteur fort de *Y. lipolytica* (pTEF ou pXPR2), qui phosphoryle la molécule et empêche son activité biologique.

Il est possible de transformer *Y. lipolytica* avec de l'ADN linéaire ou circulaire. Ce dernier peut-être réplicatif si l'origine de transcription est compatible avec la machinerie de *Y. lipolytica*. La quantité d'ADN nécessaire à ajouter est assez importante, et *Y. lipolytica* est capable de l'intégrer tel quel dans son génome. En apportant une cassette homologue à l'ADNg sur environ 500 à 1000 pb, il est possible de favoriser l'intégration à un locus donné ou d'exciser un gène. W29 possède quelques éléments génétiques mobiles mais le transposon Ylt1 y est absent contrairement à la souche CLIB122 (Magnan et al. 2016). Cette absence est intéressante car

elle permet d'utiliser les longues répétitions terminales (« long-terminal-repeats », LTR) de ce rétrotransposon (trouvé dans d'autres souches) pour augmenter la fréquence d'insertion des gènes transformés flanqués de cette séquence. Si la séquence du LTR est intégré dans le génome (appelée dans ce cas plateforme zêta), le gène transformé flanqué de cette séquence a de très fortes chances d'être intégré au locus de la plateforme zêta plutôt qu'ailleurs dans le génome (Mauersberger et al. 2001; Juretzek et al. 2001; Bordes et al. 2007). Dans une souche avec la plateforme zêta, le taux de faux positifs est assez faible, avec un clone sur onze ayant une insertion non-spécifique en dehors de la plateforme zêta (Bordes et al. 2007).

Le système CRISPR/Cas9 a été adapté à *Y. lipolytica* et se développe depuis quelques années (Borsenberger et al. 2018; Gao et al. 2018). Pour rappel, ce a deux composantes, la nucléase Cas9 et un ARN guide simple brin. Cet ARN est composé d'une séquence de vingt bases qui cible une séquence d'ADN particulière et d'une séquence de 79 pb qui guide la nucléase. Ainsi, en modulant les vingt bases de reconnaissance de la séquence on peut théoriquement réaliser des coupures double-brin très spécifique dans un génome. La « protospacer adjacent sequence » (PAM) est indispensable au fonctionnement du système, elle permet à la Cas9, en association avec l'ARNsg, de se fixer à l'ADN pour le cliver. Le système utilisé vient de *Streptococcus pyogenes*, et la séquence spécifique de sa PAM est 5'-NGG. Une fois la séquence-cible d'une vingtaine de bases reconnues, une coupure franche (« blunt-end ») du double brin est réalisée, et donc les mécanismes de correction de l'ADN de l'hôte vont intervenir pour corriger ce dommage. Tant que la Cas9 est exprimée, une réparation correcte du locus ciblé régénérera la cible, qui sera donc recoupée. Générer cette coupure permet de multiples choses : faire en sorte de générer une erreur de réparation ponctuelle, comme une insertion et/ou une délétion de base (un indel) ou une mutation et donc obtenir assez facilement des souches mutantes KO pour certains gènes. Ou alors si on fournit une matrice à la souche, cela peut permettre d'intégrer des gènes ou des modifications dans le locus ciblé par recombinaison homologue. Une des forces de ce système est la possibilité de cibler plusieurs locus simultanément, soit avec plusieurs ARNsg, soit avec un ARNsg présent sur plusieurs cibles, comme pour une famille de gènes.

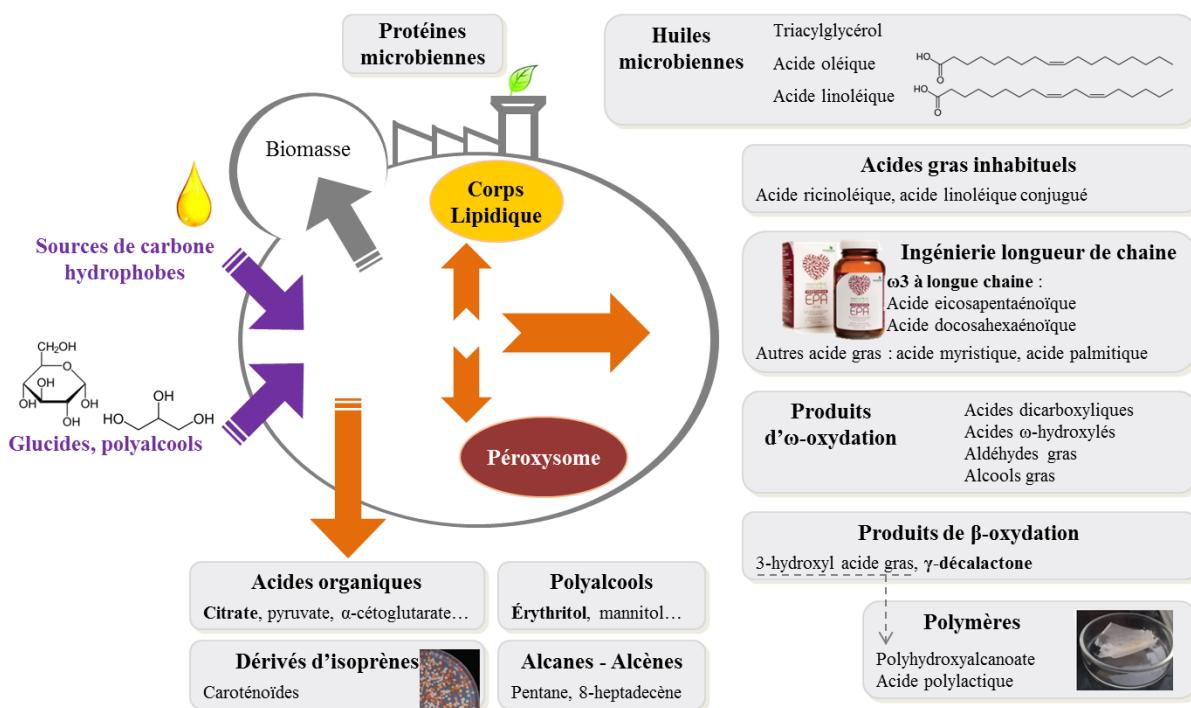
Lorsque l'ADNg de *Y. lipolytica* W29 est endommagé par une coupure double-brin et en l'absence de matrice de recombinaison, la réparation par jonction d'extrémités non-homologue (NHEJ) est privilégiée. La raison de cette préférence pour la NHEJ n'est pas élucidée à l'heure actuelle, mais en comparant les séquences génomiques de CLIB122 et W29, Magnan et al (Magnan et al. 2016) ont révélé que W29 aurait sur le chromosome A deux gènes en moins annotés comme étant impliqué dans la réparation d'ADN et la recombinaison.

De nouveaux outils continuent d'être développés pour *Y. lipolytica*. Par exemple, des souches châssis NHEJ-déficientes avec des organites tagués GFP ou des vecteurs réplicatifs pour l'expression et la localisation de protéines taguées GFP ont récemment été construits (Bredeweg et al. 2017).

e. Applications industrielles

De nombreuses souches sauvages et/ou modifiées sont aussi utilisées industriellement pour ses propriétés d'intérêt. Plusieurs revues ont été réalisées sur le sujet (Groenewald and Smith 2013; Groenewald et al. 2014; Zinjarde 2014), la figure I.3.1 récapitule quelques-unes de ces applications et les paragraphes suivants décrivent de manière non-exhaustive les applications les plus souvent retrouvées dans la littérature.

Figure I.3.1 : Schéma récapitulatif des différentes productions biotechnologiques que peut réaliser *Y. lipolytica*. Certaines sont détaillées dans cette partie.



i. Agroalimentaire

Dans l'agro-alimentaire, différentes souches de *Yarrowia lipolytica* sauvages (et des autres espèces du genre) sont retrouvées dans un grand nombre de produits alimentaires (Zinjarde 2014; Groenewald et al. 2014). Les fromages et charcuteries sont les principaux produits qui en contiennent, mais d'autres aliments ont montré qu'ils pouvaient également en contenir (viandes fraîches, saumures, beurres et crèmes, laits fermentés, fruits et jus de fruits...) mais de manière plus discrète, ce qui va dans le sens d'une souche alimentaire mineure mais couramment rencontrée. Certaines souches appartiennent à la flore naturelle de maturation des fromages et charcuteries, où elles participent aux effets bénéfiques comme dans la production d'arômes ou à la conservation. Dans l'industrie fromagère, *Y. lipolytica* n'est pas introduite délibérément mais vient vraisemblablement d'une contamination de l'environnement. C'est l'une des levures les plus prédominantes, surtout au niveau de la croute puisqu'elle est aérobie stricte. D'autres produits laitiers ont montré eux aussi la présence de *Y. lipolytica*, donc elles semblent appartenir à la flore normale des produits laitiers. Elles peuvent également conduire à l'altération des produits, mais les conditions exactes du passage de flore bénéfique à celle de

dégradation ne sont pas précisément déterminées. Dans tous ces cas de dégradation, aucun cas d'intoxication/intoxination par *Y. lipolytica* n'a été relevé et seules les qualités organoleptiques et/ou l'apparence du produit ont été affectées.

ii. Valorisation de la biomasse (protéines et lipides)

Yarrowia lipolytica permet la production de grandes quantités de biomasse, intéressante par sa teneur en protéines (applications « Single-Cell Protein ») ou en lipides (application « Single-Cell Oil ») (Papanikolaou et al. 2001; Zinjarde 2014; Sestric et al. 2014; Groenewald et al. 2014; Silverman et al. 2016) à partir de substrats peu coûteux, comme des effluents agroindustriels (huilleries, sucreries...) ou pétrochimiques (n-alcanes) lorsque ceux-ci étaient bon marché avant la crise pétrolière de 1973. Actuellement, avec l'explosion de la production de biodiesel, de grandes quantités de glycérol sont produites à partir d'huiles et *Y. lipolytica* peut l'utiliser efficacement. Cette biomasse « Single-Cell » a historiquement servi à l'alimentation animale, mais maintenant de nouveaux acteurs tentent de diversifier les utilisations en tant que prébiotique et/ou probiotique pour l'alimentation humaine et/ou animale ((Groenewald et al. 2014), [Skotan SA](#)).

Plusieurs stratégies ont été suivies pour augmenter la production de lipides chez *Y. lipolytica*. Une des stratégies est de jouer sur les conditions de culture (Dulermo and Nicaud 2011; Sestric et al. 2014; Ochoa-Estopier and Guillouet 2014; Kubiak et al. 2019). Souvent, un ratio carbone / azote élevé (entre 80 et 120) sera avantageux pour la production d'acide gras. En effet, quand la souche est carencée en azote (au tout autre composé) mais que la disponibilité en carbone est élevée, elle ne peut plus se diviser et elle privilégie l'accumulation de réserves lipidiques.

L'une des stratégies qui a été le plus utilisée consiste à empêcher la dégradation des acides gras, en ciblant la β -oxydation (Mlickova et al. 2004; Beopoulos et al. 2008; Dulermo and Nicaud 2011). Les cibles les plus fréquemment délestées sont les acyl-CoA oxydases (Acox1 à Acox6, codés respectivement par les gènes POX1 à POX6), qui codent pour la première étape de la β -oxydation (acyl-CoA \rightarrow 2,3-énoyl-CoA). Une autre cible est la MFE (« Multifunctional Enzyme ») qui catalyse la seconde et troisième réaction du cycle de la Δ -oxydation. Sa délétion unique donne des effets similaires à celui de la délétion des six gènes POX (Dulermo and Nicaud 2011).

Une cible possible est également Yl.GUT2 (une glycérol-3-phosphate déshydrogénase) qui permet l'oxydation du glycérol-3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate. La délétion de ce gène empêche la conversion du glycérol-3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate. Ainsi, celui-ci est utilisé pour la production de triglycérides (Beopoulos et al. 2008). La surexpression d'une glycérol-3-phosphate déshydrogénase, Yl.GPD1, catalysant la réaction inverse de réduction de la dihydroxyacétone phosphate en glycérol-3-phosphate ne permet pas seule

d'observer une amélioration (Dulermo and Nicaud 2011). L'amélioration n'est visible que lorsque la β -oxydation est inactivée avec 70% d'augmentation de la teneur en lipide (souche Δ pox1-6, GPD1).

Tai et Stephanopoulos (Tai and Stephanopoulos 2013) ont utilisé une stratégie de « push and pull » (pousser-tirer) pour augmenter la quantité d'acides gras produits en minimisant les inhibitions. Le principe du « push » est d'agir sur le flux d'acétyl-CoA en surexprimant Yl.ACC1 (acétyl-CoA carboxylase), ce qui va former du malonyl-CoA, le précurseur utilisé pour l'élongation des acides gras lors de la synthèse. La surexpression de Yl.DGA1 (diacylglycérol acyltransférase) va tirer (« pull ») les acides gras produits dans les triacylglycérols. La combinaison des deux gènes a permis d'obtenir une teneur en lipide de 41,4% gLipides.g⁻¹Biomasse, soit une amélioration de l'accumulation de 4,7 fois comparée au témoin.

Des souches de *Y. lipolytica* avec des compositions en lipides modifiées ont été construites, comme une souche hyper-oléique qui possède plus de 90% d'acide oléique dans les triacylglycérols (Tsakraklides et al. 2018). La production en bioréacteur a permis d'obtenir 77 g.L⁻¹ de biomasse sèche avec une accumulation de lipide de 45% en 133h. Cela a été permis par de multiples modifications (figure I.3.2) :

- 1- Délétion de la Δ^{12} -désaturase endogène.
- 2- Délétion de la Yl.SCT1 endogène (glycérol-3-phosphate acyltransférase, qui a une préférence pour les acides gras saturés) et remplacement par la SCT1 de *Arxula adeninivorans*, un homologue avec une meilleure affinité pour l'acide oléique.
- 3- Délétion de Yl.OLE1, la Δ^9 -désaturase endogène et remplacement par *Puccinia graminis* OLE1. L'effet est de diminuer l'activité désaturase sur l'acide palmitique, pour n'avoir pratiquement que de l'acide oléique. Une seconde copie a été intégrée dans la souche la plus productive.
- 4- Expression de ELO2 de rat, pour faire l'élongation de l'acide palmitique en acide stéarique.
- 5- Expression des DGAT1 de *Rhodotorula toruloides* et DGAT2 de *Claviceps purpurea*.

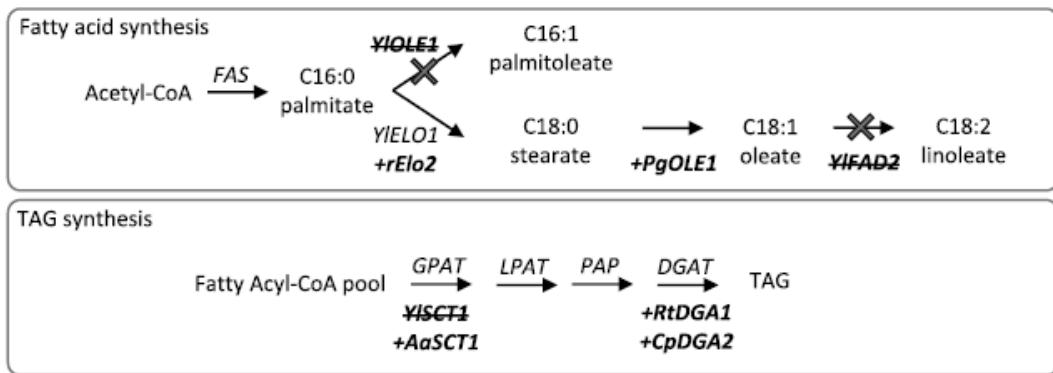


Figure I.3.2 : Schéma récapitulatif des différentes délétions et surexpressions réalisées pour obtenir une souche hyper-oléique (tirée de (Tsakraklides et al. 2018)).

Finalement, la production lipidique la plus élevée a été obtenue par Qiao et ses collègues (Qiao et al. 2017). Par modélisation, ils ont déterminé qu'une limitation à la conversion de glucose en acide gras était la limitation en NADPH. Pour corriger cela, ils ont suivi différentes stratégies pour convertir le NAD+/NADH produit en excès en NADP et ils ont pu obtenir une souche produisant 99g.L⁻¹ d'acides gras méthylés (rendement de 0,269 gLipide.g⁻¹Glucose et un taux d'accumulation de 67%).

Bien qu'il soit possible d'utiliser les lipides natifs de *Y. lipolytica*, sa composition (majoritairement acides oléique, linoléique et palmitoléique) ne présente qu'un intérêt limité pour des applications commerciales.

iii. Acides organiques et polyalcools

Yarrowia lipolytica est connue depuis longtemps comme une souche permettant la production de nombreuses molécules organiques, principalement des acides organiques comme le citrate (Aiba and Matsuoka 1979; Mirończuk et al. 2016; Egermeier et al. 2017; Yuzbasheva et al. 2019). Il peut être produit par des souches sauvages sélectionnées dans certaines conditions de culture (carence en azote et excès de glucose). D'autres acides apparentés au citrate peuvent aussi être produit (pyruvate, α -cétoglutarate, isocitrate...), (Papanikolaou et al. 2009; Holz et al. 2011)), mais des modifications du métabolisme sont nécessaires à une accumulation. La production d'acide citrique peut elle aussi être améliorée par de l'ingénierie. Ces acides organiques viennent du cycle de Krebs (mitochondrie), lorsque l'excès de carbone est important ils sont transportés dans le cytoplasme puis sécrétés.

La production de polyalcools comme l'érythritol ou le mannitol, des édulcorants (Zinjarde 2014; Groenewald et al. 2014; Rakicka et al. 2016; Mirończuk et al. 2016; Rakicka et al. 2017), est également réalisable par *Y. lipolytica*, en particulier par la souche Wratislavia K1, ce qui permet une meilleure production d'érythritol. Elle a pu atteindre les 84 g.L⁻¹ avec 2,5% de NaCl en utilisant du glycérol pur comme source de carbone (rendement de 0,50g.g⁻¹) (Tomaszewska et al. 2012). Le mannitol est un autre polyalcool à six carbones, et il s'avère que sa production est plus efficace lorsque du fructose ou du glucose sont utilisés comme source de carbone.

iv. Lipides à haute valeur ajoutée et dérivés de lipides

La composition native en lipides de *Yarrowia lipolytica* a peu de valeur ajoutée car ses lipides sont communs (acides oléique, linoléique et palmitique). Mais il est possible de détourner sa machinerie cellulaire pour produire des composés lipidiques à bien plus haute valeur ajoutée.

Des caroténoïdes comme l'astaxanthine (Kildegaard et al. 2017) ou la β -ionone (Czajka et al. 2018) ont été produits avec succès chez *Y. lipolytica*. L'astaxanthine est un pigment utilisé dans l'alimentation animale pour modifier la couleur des produits (jaune d'œuf, pisciculture...). La β -ionone est utilisée comme un composé aromatique qui a des notes boisées (parfum corporel et alimentaire). Ces composés appartiennent à la catégorie des prénoles, issu de la condensation d'unités isoprénées (isopentényl-pyrophosphate).

Une preuve de concept pour la production de campestérol, un précurseur stéroïdien utilisé pour la synthèse de composés pharmaceutiques, a été obtenue (Du et al. 2016). La production est la plus haute teneur obtenue pour un micro-organisme, elle serait due à l'accumulation du composé dans les corps lipidiques. Comme *Y. lipolytica* ne contient nativement qu'une faible quantité de stérol, la production du stérol d'intérêt est assez faiblement contaminée.

Un challenge important est de modifier la composition de l'huile produite (des acides gras sur glycérolipides) pour obtenir une huile à plus haute valeur ajoutée. Par exemple, les acides docosahexaénoïque (C22:6 $\Delta^{4c,7c,10c,13c,16c,19c}$) et eicosapentaénoïque (C20:5 $\Delta^{5c,8c,11c,14c,17c}$) sont deux acides gras insaturés à longue chaîne qui sont « essentiels » dans l'alimentation humaine (car ils peuvent être synthétisés à partir d'acide linoléique) (Nakamura and Nara 2003). Augmenter la teneur de ces deux acides gras dans l'huile permettrait de proposer une alternative aux huiles de poissons actuellement proposées. Plusieurs publications montrent que *Y. lipolytica* est utilisable pour faire cette conversion (Xue et al. 2013; Zhu and Jackson 2015; Xie et al. 2015; Xie et al. 2017), et une production industrielle est même faite (entreprise Dupont).

Une production d'acide linoléique conjugué (des isomères de C18:2 qui ont des doubles liaisons conjuguées) a également été reportée (Imatoukene et al. 2017). Ce procédé ne fait pas intervenir de conjugase mais une isomérase qui déplace une des liaisons de l'acide linoléique pour former un système de deux doubles liaisons conjuguées. Les quantités produites sont pour le moment limitées, mais ce résultat est prometteur pour la production d'acides gras conjugués.

Des collègue de l'équipe ont réussi à produire des acides gras à moyenne chaîne (Rigouin et al. 2018; Rigouin et al. 2017). Cela a été possible en réalisant des mutations sur la « fatty acid synthase », le complexe synthétisant les acides gras. Le domaine ciblé est le domaine cétoacyle synthase, qui catalyse l'elongation de la chaîne d'acyle. Une mutation dans ce domaine a permis d'obtenir des souches produisant 11,6% d'acide myristique (C14:0). Avec l'expression d'une diacylglycérol acyltransférase spécifique des moyennes chaîne et la délétion de l'elongase Y1.ELO1 (qui allonge le C14:0 en C16:0), la teneur en acide myristique est passée à 45% des acides gras totaux.

Y. lipolytica est également utilisée pour la production de la γ -décalactone, une lactone responsable de l'arôme de pêche (Waché et al. 1998; Pagot et al. 1998; Waché et al. 2003; Groguenin 2004; Gomes et al. 2011; Moradi et al. 2016; Braga and Belo 2016; Kang et al. 2016; de Andrade et al. 2017; Guerreiro et al. 2017; Try et al. 2018). Cet arôme est produit industriellement à partir d'huile de ricin, contenant majoritairement de l'acide ricinoléique, qui quand il est consommé par la levure conduit à la formation de la lactone. Après quatre cycles de β -oxydation, l'acide ricinoléique est raccourci en acide 4-hydroxydecanoïque C10:0 OH⁴, capable de s'auto-cycliser pour former la γ -décalactone. Des modifications peuvent être apportées à la levure pour éviter la re-consommation des lactones produites.

Enfin, un dernier type de molécule pouvant être produite sont les surfactants, pour remplacer les détergents d'origine pétrochimique aujourd'hui employés (Pareilleux 1979; Cirigliano and Carman 1984; Zinjarde et al. 1997; Zinjarde and Pant 2002; Fontes et al. 2010). L'avantage des surfactants d'origine biologique est qu'ils sont biodégradables, tout en pouvant avoir des propriétés supplémentaires ou être aussi efficaces que les détergents de synthèse. Chez *Y. lipolytica*, les surfactants produits sont principalement glycolipidiques, comme le yansan (il existe aussi des surfactants lipopeptidiques). *Y. lipolytica* possède un métabolisme des composés hydrophobes développés lié à son habileté à produire de tels composés.

Enfin, il est également possible de produire de l'acide ricinoléique chez *Y. lipolytica*. Comme il s'agit de l'objectif principal de ma thèse, cela sera détaillé dans le chapitre suivant.

B. Souche OléoX et production d'acide ricinoléique

Précédemment, une souche modifiée de *Yarrowia lipolytica* (Beopoulos et al. 2014) a également permis de produire de l'acide ricinoléique (C18:1 Δ^{9c} OH¹²). Cette souche a été développée en partenariat entre l'équipe où j'ai fait ma thèse et l'équipe du Dr J.M. Nicaud (Institut Micalis). Elle dérivait d'une Po1d, qui combinait 10 délétions (souche OléoX : Po1d $\Delta Pox1-6$, $\Delta Yl.DGA1$, $\Delta Yl.DGA2$, $\Delta Yl.LRO1$, $\Delta Yl.FAD2$) et exprimait l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* CpFAH12 sous le contrôle du promoteur constitutif pTEF (figure I.3.4).

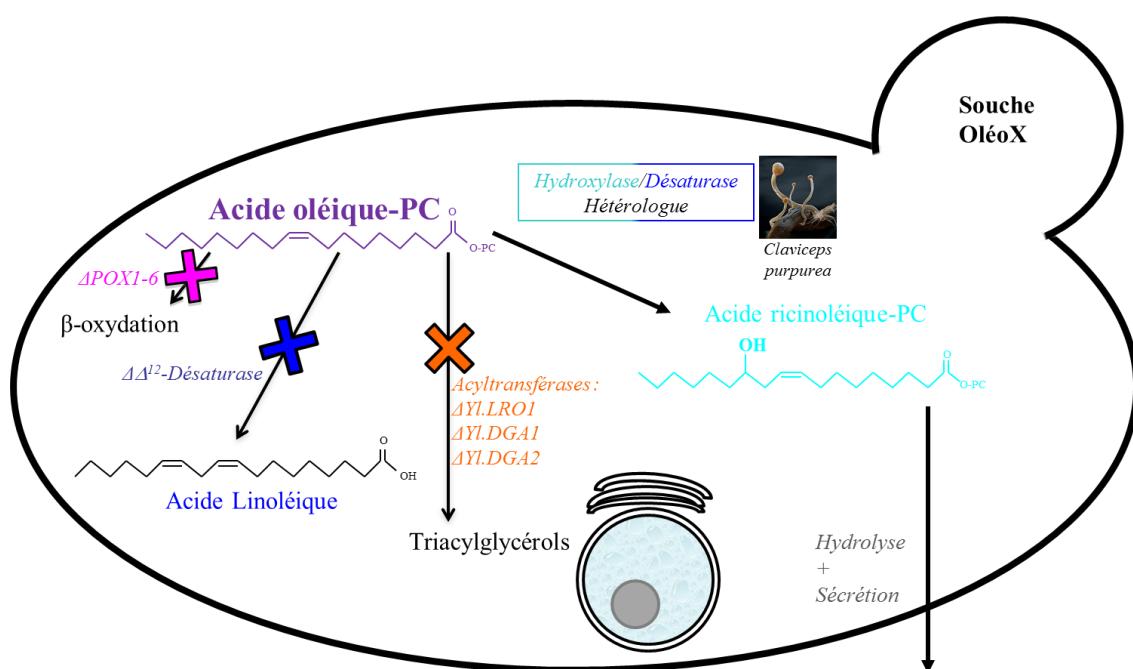


Figure I.3.4 : Schéma de la souche OléoX exprimant l'hydroxylase bifonctionnelle de *Claviceps purpurea*. La localisation des étapes n'a pas été précisée dans le schéma, mais la β -oxydation (et Pox1-6) est localisée dans les peroxysomes ; les Δ^{12} -désaturases et hydroxylases sont localisées dans le réticulum endoplasmique, de même que les PC (phosphatidylcholines) substrats et produits. La localisation des acyltransférases est à la fois dans le réticulum endoplasmique et les corps lipidiques. En l'absence d'acyltransférases, les corps lipidiques ne peuvent plus se former dans la cellule.

L'hydroxylase CpFAH12 a pour substrat l'acide oléique (C18:1 Δ^{9c}) estérifié sur la phosphatidylcholine (sn2-oléoyl-phosphatidylcholine) et catalyse l'hydroxylation et la désaturation sur la position 12 pour produire de la sn2-ricinoléoyl- et sn2-linoléoyl-phosphatidylcholine. Les délétions de la souche ont été pensées pour maximiser le pool d'acide oléique qui sert de substrat de bioconversion.

Ainsi la délétion des six gènes POX (POX1 à POX6), codant pour des acyl-CoA oxydases (enzymes appelées Acox, acyl-CoA oxydases), évite à la fois la dégradation du substrat (acide oléique) et du produit de la réaction (acide ricinoléique) via la β -oxydation. De même, les transférases de *Yarrowia* (YI.DGA1, YI.DGA2, YI.LRO1), particulièrement efficaces chez cette levure oléagineuse, ont été déletées pour éviter la séquestration de l'acide oléique dans les triglycérides pour du stockage à long terme (empêchant alors l'hydroxylase d'agir sur la sn2-oléoyl-phosphatidylcholine).

Finalement la désaturase native YI.FAD2, elle aussi active sur la sn2-oléoyl phosphatidylcholine, a également été déletée pour éviter la compétition avec le substrat de la réaction. Celle-ci conduit à la formation d'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$). La souche OléoX ne peut donc plus synthétiser de triacylglycérols et n'accumule plus de grandes quantités de lipides (disparition des corps lipidiques). Le taux d'accumulation moyen devient inférieur à 8% (non-oléagineux). Son profil lipidique est composé majoritairement d'acide oléique et ne contient plus d'acide linoléique (environ 80% d'acide oléique dans les acides gras totaux). Alors que dans celui de la souche exprimant l'enzyme bifonctionnelle CpFAH12, on retrouve de l'acide linoléique et de l'acide ricinoléique.

Dans ces conditions, la majeure partie de l'acide ricinoléique formé est sécrétée dans le milieu, probablement par l'hydrolyse de sa liaison à la phosphatidylcholine via une activité endogène phospholipase A2 ou B (figure I.3.4). Ensuite le mécanisme de diffusion est inconnu. Il pourrait être passif (diffusion libre à travers la membrane) ou être facilité par un(des) transporteur(s).

D'autres micro-organismes (Mycètes) ont également été ingénierés pour produire de l'acide ricinoléique, nous avons récapitulé ces productions dans le tableau I.3.1. L'organisme dont est issu l'hydroxylase, *Claviceps purpurea*, accumule des quantités d'acide ricinoléique non négligeables dans son sclérote, un « organe » de résistance du champignon. Mais sa forte pathogénicité pour les plantes et sa toxicité font qu'il n'est pas possible de l'utiliser pour la production. Parmi les autres levures, *Saccharomyces cerevisiae* est l'un des organismes les plus utilisés pour l'expression des désaturases membranaires mais n'est pas un organisme oléagineux (c'est-à-dire capable d'accumuler des lipides) et donc les quantités produites sont faibles. Deux levures oléagineuses, *Pichia pastoris* et *Schizosaccharomyces pombe*, sont de bonnes candidates pour la production, la première accumule environ 0,17 g.L⁻¹ d'acide ricinoléique principalement sous forme libre malgré la co-expression d'une acyltransférase de *C. purpurea*. *S. pombe* sécrète l'acide ricinoléique et la co-expression de phospholipase endogène permet de l'améliorer (jusqu'à 0,4 g.L⁻¹ au total) tout en restaurant une partie du taux de croissance car la production d'acide ricinoléique a un effet délétère.

Organisme	Modifications	Production d'AR obtenu	Référence
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Δ FAD2 Δ DGA1-2 Δ POX1-6 Δ LRO1 pTEF-CpFAH12	% (AR/AGT) = 42% AR = 63 mg/gDCW Production en bioréacteur non publiée : AR total = 10 g.L ⁻¹ 80 gBiomasse.L ⁻¹	(Beopoulos et al. 2014)
<i>Pichia pastoris</i> Souche GS115 Mesure à 72h	Δ FAD2 + CpFAH12	% (AR/AGT) = 51% AR total = 0,125 g.L ⁻¹	(Meesapyodsuk et al. 2015)
	Δ FAD2 + CpFAH12 + CpDGAT1 (KT581979)	% (AR/AGT) = 56% AR total = 0,171 g.L ⁻¹	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Souche ARC010-1 5 jours de culture à 20°C	+ nmt1-CpFAH12	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 49,7% AR _{cellulaire} = 0,15 g.L ⁻¹ AR _{sécrété} = 0,025 g.L ⁻¹	(Yazawa et al. 2014)
	+ nmt1-CpFAH12 + nmt41-ptl2	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 53,9% AR _{cellulaire} = 0,13 g.L ⁻¹ % (AR/AGT) _{sécrété} = 83,2% AR _{sécrété} = 0,15 g.L ⁻¹	
	+ nmt1-CpFAH12 + nmt41-plg7	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 47,1% AR _{cellulaire} = 0,12 g.L ⁻¹ % (AR/AGT) _{sécrété} = 85,8% AR _{sécrété} = 0,28 g.L ⁻¹	
	+ nmt1-CpFAH12 + nmt41-plg7 + nmt41-ptl2	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 48,6% AR _{cellulaire} = 0,13 g.L ⁻¹ % (AR/AGT) _{sécrété} = 78,2% AR _{sécrété} = 0,24 g.L ⁻¹	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Souche ARC010-1 11 jours de culture à 20°C	+ nmt1-CpFAH12	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 58,1% AR _{cellulaire} = 0,200 g.L ⁻¹ % (AR/AGT) _{sécrété} = 75,9% AR _{sécrété} = 0,069 g.L ⁻¹	(Yazawa et al. 2013b)
	+ nmt1-CpFAH12 + plg7	% (AR/AGT) _{cellulaire} = 55,2% AR _{cellulaire} = 0,181 g.L ⁻¹ % (AR/AGT) _{sécrété} = 74,9% AR _{sécrété} = 0,184 g.L ⁻¹	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Souche ARC010-1 5 jours de culture à 30°C	+ nmt1-CpFAH12	AR = 12,7 mg/gDCW AGT = 80,0 mg/gDCW	(Yazawa et al. 2013a)
	+ nmt1-CpFAH12 + plg7	AR = 11,2 mg/gDCW AGT = 86,8 mg/gDCW	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Souche ARC010-1 24h à 37°C + 5 jours à 20°C	+ nmt1-CpFAH12	% (AR/AGT) = 34% à 53% AGT = 71 à 109 mg/gDCW	(Holic et al. 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Souche H1246 : Δ DGA1 Δ LRO1 Δ ARE1 Δ ARE2	+ CpFAH12	% (AR/AGT) = 8,2% Pas de quantification	(Mavraganis et al. 2010)
	+ CpFAH12 + CpDGAT2 (HM038411)	% (AR/AGT) = 10,2% Pas de quantification	
	+ CpFAH12 + ScDga1	% (AR/AGT) = 7,4% Pas de quantification	
<i>Claviceps purpurea</i> Sclérote à 20 jours	Aucune modification	AR = 27 mg/gDCW AGT = 83,1 mg/gDCW	

Tableau I.3.1 : Synthèse des articles scientifiques ayant pour sujet la production d'acide ricinoléique (AR, C18:1 Δ^{9c} OH¹²) chez les Mycètes. AGT : acides gras totaux ; DCW : masse sèche cellulaire (« dry cell weight ») ; ptm2 est homologue aux triacylglycérol lipases de *S. cerevisiae* (TGL3, TGL4 et TGL5) ; plg7 est équivalent à la phospholipase A2 de la famille des facteurs d'activation plaquettaire ; nmt1 / nmt41 sont des promoteurs répressibles à la thiamine, nmt41 est une version affaiblie de nmt1.

D'autre part, un article relate également la production d'acide ricinoléique chez la microalgue *Chaetoceros gracilis* (Kajikawa et al. 2016). Il est difficile de comparer sa production à celle d'une levure, mais ils obtiennent au maximum une quantité d'acide ricinoléique de 3,3 pg.cellule⁻¹ avec une teneur totale de 11,5% des acides gras totaux grâce à la co-expression d'une C-16 élongase. La particularité de cet organisme est qu'une partie de l'acide ricinoléique est accumulé sous forme d'estolide (17% de l'acide ricinoléique total), c'est à dire que la fonction hydroxyle d'un acide ricinoléique (estérifié sur un triacylglycérol 61%, ou libre 9%) est estérifiée par un autre acide gras.

Enfin, la souche OléoX de *Y. lipolytica* a précédemment été utilisée pour la production d'acide ricinoléique à hauteur de 63g.g⁻¹DCW, des résultats non-publiés montrent que cette levure permet la production la plus élevé parmi toutes celles relevées. Ma thèse fait donc suite à ces travaux et c'est avec ce châssis que nous avons choisi de poursuivre. Elle se concentre sur l'amélioration de la production d'acide ricinoléique dans cette souche OléoX.

Pour cela, deux stratégies globales ont été suivies :

- La première porte sur **l'ingénierie de l'enzyme** pour en améliorer les caractéristiques, comme l'augmentation de la conversion ou du taux d'hydroxylation. L'existence d'enzymes ayant une forte identité avec CpFAH12 mais une activité différente permettra d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'hydroxylation et désaturation.
- La seconde stratégie cible la souche OléoX, il s'agit de **l'ingénierie du métabolisme lipidique** pour avoir un environnement cellulaire plus favorable à la conversion, comme une amélioration de la quantité de substrat disponible ou une meilleure sécrétion de l'acide ricinoléique. La sécrétion innée de l'acide ricinoléique est un atout pour un procédé de production, il sera intéressant de l'exploiter.

Chapitre II.

Matériels et Méthodes

La majorité des consommables (produit chimiques, réactifs, composés nutritifs) sont achetés auprès de Merck-Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). Les produits achetés à des fournisseurs spécifiques seront indiqués quand nécessaire.

1. Souches

A. Souches bactériennes

La seule bactérie utilisée dans cette étude est *Escherichia coli*, elle n'a servie qu'à la production et à la conservation de plasmide. Les trois souches d'*E. coli* utilisées sont les souches DH5 α (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni), Stellar (Clontech, USA) et XL1-Blue (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni).

La souche majoritairement utilisée est la souche XL1-Blue car elle donne une très bonne production de plasmide (supérieure à 300 ng. μ L $^{-1}$ et jusqu'à 800 ng. μ L $^{-1}$ après purification) tout en ayant un bon taux de transformation. Les souches DH5 α sont des anciennes souches utilisées avant la transition vers les XL1-Blue. Enfin, les souches Stellar commerciales et achetés directement compétentes n'ont été utilisées que pour des transformations difficiles où une très forte compétence était nécessaire (mutagénèses...).

Une fois la séquence vérifiée par séquençage et confirmée, les souches sont stockées à -80°C en stock glycérol. Dans un cryotube, j'ajoute 0,9 mL de glycérol 50% et 0,9 mL de culture (overnight, soit environ 16h) de la souche à conserver. Cette méthode est celle utilisée pour conserver les plasmides à long terme.

B. Souches châssis de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica est l'organisme utilisé dans toutes les expériences de production d'acides gras ou de suivi de culture. Plusieurs souches châssis ont été utilisées, toutes dérivent de la souche Po1d, décrite dans un chapitre de livre (MATa ura3-302 leu2-270 xpr2-322, (Wolf 1996)).

a. Souche OléoX

La souche OléoX a été construite précédemment et décrite dans l'article de Beopoulos et al., 2014 (appelé souche JMY2159 dans (Beopoulos et al. 2014)). Elle est auxotrophique pour l'uracile et la leucine, comme Po1d, mais elle possède dix délétions supplémentaires ciblant les six acyl-CoA oxydases (gènes POX), trois acyltransférases (Yl.DGA1, Yl.DGA2 et Yl.LRO1) et la Δ^{12} -désaturase (Yl.FAD2). OléoX est donc incapable de réaliser la β -oxydation, de synthétiser des triacylglycérols et de produire de l'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$).

b. Souche OléoX zêta

La souche OléoX a servi de châssis pour la construction de la souche, OléoX zêta. Le détail de la construction de cette souche est décrit dans la partie III.1.C.

c. Souche OléoX Δ PAH1

La souche OléoX Δ PAH1 a été construite par la délétion du gène YI.PAH1 chez la souche OléoX. La construction de cette souche est détaillée dans la partie II.3.I.

d. Conservation des souches châssis et témoins de *Y. lipolytica*

Deux clones différents des souches châssis n'exprimant pas de gènes hétérologues ont été conservées en stock glycérol à -80°C. Un des clones sert à préparer des cellules compétentes. Le second clone est un clone de secours qui ne servira que si un problème arrive au premier clone. Il s'agit des souches OléoX ura- leu- ; OléoX zêta ura- ; OléoX Δ PAH1 ura-

Des souches prototrophes pour les marqueurs de sélection sont construites avec des cassettes sans séquences codantes et stockées à -80°C. Elles pourront être utilisées comme souches témoins lorsque nécessaire. Il s'agit des souches OléoX ura- leu+ ; OléoX ura+ leu- ; OléoX ura+ leu+ ; OléoX zêta ura+ ; OléoX Δ PAH1 ura+

2. Milieux de cultures

A. Milieux pour *Escherichia coli*

Deux types de milieux ont été utilisés. Le milieu LB (lysogeny broth) est le principal milieu utilisé pour toutes les cultures et criblages de souches *E. coli*. Il est composé de : 10 g.L⁻¹ de peptones, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 10 g.L⁻¹ de NaCl, et pour réaliser un milieu solide on y ajoute 15 g.L⁻¹ d'agar-agar. Après autoclavage (121°C pendant 20 minutes), un antibiotique, la kanamycine (LB_{kanamycine}) ou l'ampicilline (LB_{ampicilline}), est ajouté respectivement à 40 mg.L⁻¹ ou 100 mg.L⁻¹ selon la sélection souhaitée (ajouté lorsque le milieu est aux alentours de 50°C).

Le second milieu utilisé est le SOC, ce milieu est utilisé uniquement lors de l'expression phénotypique pendant les transformations, c'est un milieu commercial fourni avec les cellules compétentes. Selon le fournisseur, il est composé de :

20 g.L⁻¹ de bacto-tryptone
5 g.L⁻¹ d'extrait de levure
4 g.L⁻¹ de glucose
0,58 g.L⁻¹ de NaCl
0,19 g.L⁻¹ de KCl
0,95 g.L⁻¹ de MgCl₂
1,2 g.L⁻¹ de MgSO₄

B. Milieux de culture pour *Yarrowia lipolytica*

Différents milieux ont été utilisés pour la culture des souches de *Yarrowia lipolytica*. Pour les précultures, le milieu riche non-sélectif YPD est utilisé. Il est composé de 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 10 g.L⁻¹ de bacto-tryptone (Difco, Paris, France) et 10 g.L⁻¹ de glucose pour un milieu liquide et 15 g.L⁻¹ d'agar-agar sont ajoutés pour faire un milieu gélosé. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Après la transformation, les souches sont criblées sur des milieux gélosés synthétiques YNB. Il est composé de 1,7 g.L⁻¹ de YNB_{wowo} (yeast nitrogen base sans acides aminés ni ammonium sulfate, stérilisé par filtration. Il s'agit d'un mélange commercial de vitamines et sels minéraux), 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 10 g.L⁻¹ glucose, 50 mM de tampon Na/K phosphate à pH 6,8 and 15 g.L⁻¹ d'agar-agar. Chaque solution stock est préparée séparément et est stérilisée (autoclavage, ou filtration si précisé). Le milieu YNB est préparé stérilement au moment à partir des solutions mères.

Pour information, les anciennes conditions de cultures ont été réalisées dans le milieu Y_{0,5}D₅ composé de 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 50 g.L⁻¹ de glucose (autoclavé 20 minutes à 121°C). Dans le cas de la bioconversion, les cultures étaient complémentées avec 3 g.L⁻¹ d'acide gras. La solution utilisée était une émulsion (5 mL.L⁻¹ de Tween 40) à 200 g.L⁻¹ d'acide oléique (à 70% de pureté). Cette émulsion était préparée par sonication.

Le milieu de production d'acide gras utilisé dans les nouvelles conditions est le milieu YT₂D₅, Tp.cit. Ce milieu contient 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 20 g.L⁻¹ de bacto-tryptone, 50 g.L⁻¹ de glucose et 100mM de tampon citrate à pH 4,0. Lorsque les conditions utilisées diffèrent, les modifications sont détaillées dans les parties concernées (parties résultats III.1 à III.4).

3. Biologie moléculaire

Les enzymes de restriction sont commandées auprès de New England Biolabs (Evry, France).

A. Description des plasmides

a. Plasmides pour l'amplification des cassettes d'expression chez *Y. lipolytica*

i. Plasmide Jmp62

Le plasmide utilisé pour générer les cassettes de transformation est le plasmide vecteur Jmp62 (figure II.1). Ce plasmide possède une partie bactérienne composée de l'origine de réPLICATION ColE1 (Ori) pour amplifier le plasmide chez *E. coli* et du marqueur de sélection à la kanamycine (NeoR/KanR). La cassette de transformation, délimitée par des sites de restriction NotI, est bordée par les zones zéta 1 et zéta 2, chacune étant une moitié de la longue répétition terminale du rétrotransposon Ylt1. La cassette contient un marqueur de sélection pour l'auxotrophie soit à l'uracile (gène URA3), soit à la leucine (gène LEU2). Le promoteur et la séquence codante de la protéine d'intérêt sont localisés respectivement entre des sites ClaI – BamHI et BamHI – AvrII. Le promoteur utilisé pour l'expression est pTEF (constitutif et fort) sauf si autre chose est indiqué. Les séquences codantes sont variables et sont donc indiquées à chaque fois.

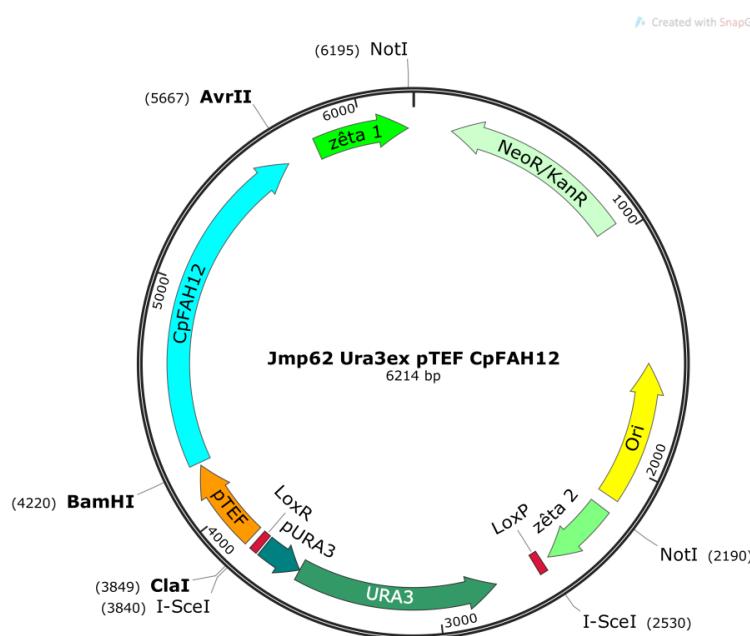


Figure II.1 : Organisation du plasmide Jmp62. Ici, la séquence codante est celle de l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* (cyan), exprimée sous le promoteur pTEF (orange). Le marqueur de sélection de la levure est le gène URA3 (vert d'eau). La taille totale du plasmide est ici de 6214 pb.

ii. Les séquences hétérologues et endogènes (sur)exprimées

Les codes d'acessions ou les références concernant les séquences des gènes ou le numéro YALI des gènes exprimés chez *Y. lipolytica* dans le cadre de cette thèse sont données dans le tableau II.1.

Gènes	Numéros d'acession	Gènes	Numéros d'acession
CpFAH12	B4YQU1	Rc.cyb5B1	EEF44276
CpFAD2	ABS18716	Rc.cyb5B2	XP_002521096
RcFAH12	XP_002528127/ Q41131	Rc.cyb5E1	XP_002518220
RcFAD2	NP_001310648/ EEF31658	Cp.cyb5-1	CCE29659
CoFADX12	Q9FPP8	Yl.CPT1	YALI0C10989g
IbFADX12	Q9SP62	Yl.EPT1	YALI0E26565g
McFADX12	Q9SP61	Yl.TGL4	YALI0F10010g
VfFADX12	Q8GZC2	Yl.TGL5	YALI0D16379g
VgFAE12	?	Yl.PLBsc1	YALI0E16060g
SIFAE12	AAR23815	Yl.PLBsc2	YALI0D08206g
CpaFAE12	CAA76156	Yl.NTE1	YALI0B11044g
Yl.DGA1	YALI0E32769g	Yl.LRO1	YALI0E16797g
Yl.DGA2	YALI0D07986g	Yl.PAH1	YALI0D27016g
LEU2-270	YALI0C00407g	Yl.FAD2	YALI0B10153g

Tableau II.1 : Code d'acession ou référence concernant les gènes ciblés dans cette étude (surexprimés, délétés ou cibles de recombinaison). La séquence de VgFAE12 a été obtenue directement dans un brevet, et donc ne possède pas de code d'acession.

Les séquences de CpFAH12 (hydroxylase de *Claviceps purpurea*), CpFAD2 (désaturase de *Claviceps purpurea*) et RcFAH12 (hydroxylase de *Ricinus communis*) étaient déjà présentes au laboratoire avant le début de ma thèse.

Quatre séquences codantes ont été amplifiées à partir du génome de la souche OléoX ura- leu- avec des amorces spécifiques. Il s'agit de celles des gènes Yl.TGL4, Yl.PLBsc1, Yl.PLBsc2 et Yl.NTE1. Une fois amplifiées et vérifiées, ces séquences codantes ont été intégrées au plasmide Jmp62 LEU2 en utilisant le « In-fusion® HD cloning kit » (Clontech, USA).

Quatre séquences codantes proviennent du laboratoire du Docteur Jean-Marc Nicaud (institut Micalis) partenaire de ce projet. Il s'agit des gènes Yl.LRO1 ; Yl.CPT1 ; Yl.EPT1 et Yl.TGL5. Les séquences codantes ont été récupérées par digestion BamHI-AvrII puis intégrée et vérifiées dans le vecteur plasmide Jmp62 LEU2.

Certaines séquences codantes ont été synthétisées par Synbio Technologies (Monmouth Junction, New Jersey, USA) ou GenScript (Piscataway, USA). Ces gènes synthétiques ont été directement clonés dans le vecteur Jmp62 (LEU2 ou URA3 selon la séquence codante considérée). L'ensemble des séquences ont été optimisées pour le biais de codon de *Yarrowia*. Les Δ^{12} -désaturases (FAD2), Δ^{12} -conjugases (FADX12) ou Δ^{12} -époxydases (FAE12) qui ont été commandées sont les séquences suivantes : RcFAD2 (*R. communis*) ; CoFADX12 (*Calendula officinalis*), IbFADX12 (*Impatiens balsamina*), McFADX12 (*Momordica charantia*), VfFADX12 (*Vernicia fordii*), VgFAE12 (*Vernonia galamensis*), CpaFAE12 (*Crepis palaestina*), SIFAE12 (*Stokesia laevis*).

Les chimères suivantes RcFAD2 Triple_CpDes, RcFAH12 Triple_CpHyd, RcFAH12 TM_CpHyd, RcFAH12 Cytdiff_CpHyd, RcFAH12 C-term_CpHyd, CpFAD2 TM_Hyd, CpFAH12 TM_Des, CpFAH12 N-term/TM_Des, CpFAH12 Cyt1/TM_Des, CpFAH12 Cyt2/TM_Des, CpFAH12 Cyt3/TM_Des, CpFAH12 C-term/TM_Des, CpFAH12 Cyt2''/TM_Des ont également été synthétisées par les mêmes fournisseurs de gènes synthétiques indiqués plus haut. Le découpage des chimères est précisé dans la partie résultat.

Trois cytochromes b5 de *R. communis* et un de *C. purpurea* ont également été synthétisés : Rc.cyb5B1, Rc.cyb5B2, Rc.cyb5E1, Cp.cyb5-1.

b. Plasmides réplicatifs pour la délétion CRISPR-Cas9

La stratégie CRISPR-Cas9 est basée sur deux plasmides réplicatifs navettes, pCg58 et pg7 (figure II.2, (Borsenberger et al. 2018)), chacun exprimant un guide ARN sous la dépendance du promoteur tRNA-gly. L'origine de réPLICATION pour *Yarrowia lipolytica* est ARS18. La partie bactérienne est composée de l'origine de réPLICATION ColE1 (Ori) et du marqueur de sélection AmpR, pour la sélection de la résistance à l'ampicilline. Les deux différences principales entre ces plasmides sont que pCg58 exprime la Cas9 et pas pg7, et le marqueur de sélection n'est pas le même (URA3 pour pCg58 et LEU2 pour pg7). La co-transformation de ces deux plasmides permet d'exprimer simultanément la Cas9 et deux ARN guides, et permet donc de cibler deux locus en même temps. Ici, les deux guides ciblent le gène à déléter (avec un écart entre 500 et 1000 pb) car cette stratégie permet d'obtenir des troncatures du gène ciblé et non pas des mutations ponctuelles. Les gènes qui ont été ciblés avec cette stratégie sont Yl.DGA1 (YALI0E32769g), Yl.DGA2 (YALI0D07986g), Yl.LRO1 (YALI0E16797g), Yl.FAD2 (YALI0B10153g) et Yl.MFE2 (YALI0E15378g).

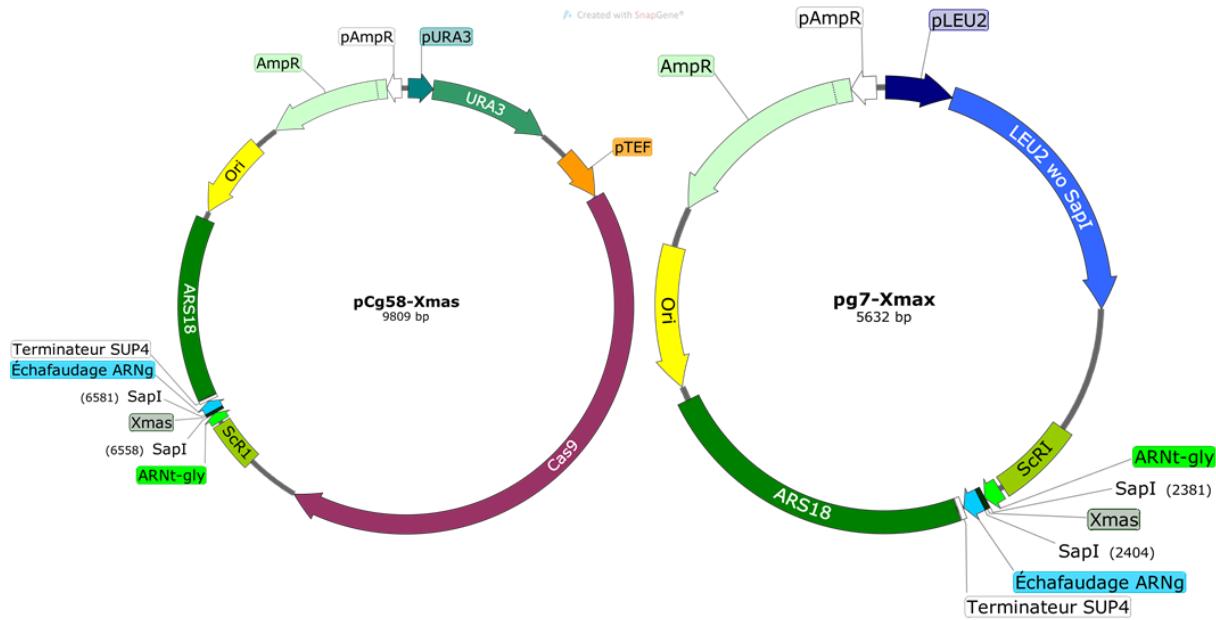


Figure II.2 : Organisation des plasmides pCg58 (gauche) et pg7 (droite). Le gène LEU2 possédait un site SapI qui a été supprimé, d'où son nom (LEU2 wo SapI). ScRI est une structure qui favorise l'expression de l'ARNt de la glycine, dans lequel le guide est intégré pour être exprimé. Le guide de 23 pb est inséré à la place de la séquence Xmas, qui est enlevé avec une digestion SapI.

c. Plasmide pour construire les cassettes de délétion

Le plasmide pour générer les cassettes de délétion est le plasmide commercial TOPO® fourni avec le « Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit ». La procédure de construction de ce plasmide et de sa cassette est détaillée dans la partie II.3.I.

B. Extraction d'ADN plasmidique

Les souches *E. coli* qui portent un plasmide d'intérêt à produire sont cultivées dans 5 mL de milieu LB_{kanamycine} ou LB_{ampicilline}. Après une nuit d'incubation à 37°C et 200 rpm d'agitation, les cultures sont arrêtées et centrifugées (5 minutes à 13 000 rpm). Le culot cellulaire est extrait avec le « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen, Hilden, Germany) selon les indications du fournisseur.

C. Purification de produits PCR et de fragments d'ADN

La purification des produits PCR est réalisée avec le « GenElute™ PCR Clean-Up Kit » (Merck-Sigma) selon les indications données. La purification des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse est réalisé avec le « GenElute™ Gel Extraction Kit » (Merck-Sigma).

D. Extraction de l'ADN génomique de *Y. lipolytica* pour son amplification

Deux procédures différentes ont été utilisées pour extraire l'ADN génomique (ADNg) de *Yarrowia lipolytica* en vue de son amplification. Elles ont été employées pour des conditions différentes, mais toutes ont pu être utilisées pour réaliser les PCR de vérification des souches.

a. Procédure Miniprep

Cette procédure ne peut se faire qu'à partir de milieux liquides, et elle est basée sur l'utilisation du « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen, Hilden, Germany) de purification des plasmides. Dans cette procédure, une toute petite portion de l'ADN génomique de la levure est extraite (probablement sous forme fragmenté), mais ces quantités sont suffisantes pour réaliser des PCR de vérification de souches.

Environ 1 mL de culture est centrifugé en microtubes et le culot est repris dans 250 µL de tampon P1 et 250 µL de tampon de lyse P2. Des billes en verre sont ajoutées et le mélange est passé 30 secondes à 1 minute au fastprep. Puis 350 µL de tampon de neutralisation N3 est ajouté, et les microtubes sont ensuite centrifugés et le surnageant est déposé sur la colonne de silice. Le reste de la procédure a été suivie selon les indications du fournisseur (lavage PB, PE, séchage), sauf l'élution qui est faite dans 20 µl d'eau ultra-pure.

Cette procédure est la première à avoir été employée. L'ADNg obtenu de cette procédure est celui ayant servi à réaliser les PCR pour obtenir les quatre gènes Yl.TGL4, Yl.NTE1, Yl.PLBsc1 et Yl.PLBsc2 et les fragments P et T pour la cassette de délétion de Yl.PAH1 (voir partie II.3.I).

Par rapport aux techniques d'extraction d'ADN de levure, cette technique à l'avantage d'être plus rapide. Elle est par contre plus coûteuse et longue de la prochaine stratégie présentée, mais elle permet d'avoir un ADNg avec moins de contaminants ce qui améliore la qualité de la PCR obtenue. Elle est réalisable par l'absence de plasmide endogène de *Y. lipolytica*.

b. Procédure PCR sur colonie

Cette procédure fonctionne avec les colonies sur gélose (ou toute autre origine). Une anse de biomasse est resuspendue dans 50 μ L de soude à 20 mmol.L⁻¹ en microtube PCR et incubé à plus de 90°C pendant 10 minutes. Une centrifugation est ensuite réalisée et le surnageant est récupéré. Il contient l'ADNg utilisé dans les PCR.

Cette procédure est très rapide et facile à mettre en place, surtout lorsqu'un grand nombre d'extraction doivent être réalisées en parallèle (microplaque). Les criblages sur colonies sont réalisés de cette manière. Mais la quantité et la qualité de l'ADN récupéré est variable. De plus pour ne pas inhiber la réaction, seule une faible quantité doit être ajoutée pour les PCR.

c. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR sont réalisées avec un T100 (Biorad) en utilisant le « CloneAmp HiFi PCR Premix », les conditions utilisées sont celles préconisées par le fournisseur :

Pour un volume final de 50 μ L, on mélange :

- 25 μ L de Prémix
- 1,5 μ L de chaque amorce à 10 μ mol.L⁻¹
- 1 à 10 μ L de matrice selon sa concentration
- Eau ultra-pure en quantité suffisante pour 50 μ L total (donc entre 21 μ L et 12 μ L selon la matrice).

La totalité des amores ont été commandées auprès de Eurogentec (Liège, Belgium), les séquences sont fournies dans la tableau II.2 ci-dessous.

Nom	Séquence (5'-->3')	Taille	T°f	%GC	Remarques :
ChromC_YI.Leu2-amont_d	TAGTTGCTGTCGAATTCCGTCG	22pb	59°C	50%	Partie III.1.C : Couple d'amorces de vérification du locus LEU2 (intégration plateforme zéta)
ChromC_YI.Leu2-aval_r	CCTACAACTCATATACCAGACAC	23pb	54°C	43%	
YI.DGAT1g1_fwd	GCA AGAGTAATGGTGTGATAGCG	23pb		52%	
YI.DGAT1g1_rev	AAC CGCTATCGACACCATTACTC	23pb		48%	
YI.DGAT1g2_fwd	GCA ATAGAGGTGTTCTCACCAA	23pb		48%	
YI.DGAT1g2_rev	AACT TGGTGAGAACGACCTCTAT	23pb		43%	
YI.DGAT2g1_fwd	GCA ATTGTCGCCACGGGGTT	23pb		61%	Partie III.1.D :
YI.DGAT2g1_rev	AAC AAACCCGTGGCAGGCACAAT	23pb		57%	Couple de guides pour la délétion des gènes de transférase par CRISPR-Cas9
YI.DGAT2g2_fwd	GCA GTGCGGGTCAATGCGTCGG	23pb		65%	
YI.DGAT2g2_rev	AAC CCGACGCATTGAACCGCGAC	23pb		61%	
YI.LRO1g1_fwd	GCA GGGGTCGAGCCAGCAGTGG	23pb		74%	
YI.LRO1g1_rev	AAC CCACTGCTGGCTGACCCGC	23pb		70%	
YI.LRO1g2_fwd	GCA GGAGCCGGAAATGTCGACAA	23pb		57%	
YI.LRO1g2_rev	AAC TTGTCGACATTCCGGCTCC	23pb		52%	
YI.DGAT1_Verif-fwd	GCTCTGCAACAGTTCTCACG	20pb	58°C	55%	
YI.DGAT1_Verif-rev	TTGCCCTCTCGGTCCAATC	20pb	60°C	60%	Partie III.1.D :
YI.DGAT2_Verif-fwd	CACCATCTGACAATCGTCG	20pb	57°C	55%	Couple d'amorces pour la vérification de la délétion des gènes de transférase par CRISPR-Cas9
YI.DGAT2_Verif-rev	GAATGCACAAGTGGTTGTC	20pb	55°C	50%	
YI.LRO1_Verif-fwd	TCTCATTCTGCTAACCTGC	20pb	56°C	50%	
YI.LRO1_Verif-rev	TTCCGGCTTATCCTTCTAGC	20pb	54°C	50%	
YI.PAH1_P-fwd_1123pb	ACTAGT GGTAGAACTGTGATTGGA GAGC	28pb	57°C	46%	Partie III.3.A : Couple d'amorces d'amplification des cassettes amont et aval pour la délétion du locus YI.PAH1.
YI.PAH1_P-rev	CGATTACCTGTTATCCCTACCCA TTGACACAGAACCTCGACC	43pb	58°C	51%	Les parties longues (soulignées) ne s'hybrident pas à la séquence et servent à lier les deux fragments de la cassette et à l'intégration du marqueur de sélection au centre. Elles contiennent un site I-SceI.
YI.PAH1_T-fwd	GTAGGGATAAACAGGGTAATCGC ACCGTAGTTGTGACGTCG	42pb	58°C	52%	
YI.PAH1_T-rev_1018pb	CCTAGGCTTCTCCA ATTGACAAAG TTCAC	29pb	56°C	45%	
ChrD_YI.PAH1_Vérif_d	TTGAACATCGAACTACTAAGGTGC	24pb	56°C	42%	
ChrD_YI.PAH1_Vérif_r	AGTGATGATATGAGGGCTGGTG	22pb	58°C	50%	
YI.TGL4_direct	CCCGAAGGATCCCACA ATGTTCAC CTCCAGAGTTCCGA	39pb	60°C	54%	
YI.TGL4_reverse	AGACACCCTAGGTACCTAGCACG AGTCAGAACAGTTCTCG	41pb	58°C	51%	
YI.NTE1_direct	CCCGAAGGATCCCACA ATGGACTC TTGCATGTCCTTCG	40pb	58°C	53%	Partie III.3.B : couples d'amorces pour l'amplification des gènes du métabolisme lipidique à tester.
YI.NTE1_reverse	AGACACCCTAGGTACCC CTAAATAC TATTCGCGGGCAA	39pb	62°C	49%	
YI.PLBsc1_direct	CCCGAAGGATCCCACA ATGAAGTT CTCTCCACTTTGCTGG	41pb	57°C	49%	
YI.PLBsc1_reverse	AGACACCCTAGGTACCT ACATAAA GAAGAGCGGCAAAACC	40pb	58°C	48%	
YI.PLBsc2_direct	CCCGAAGGATCCCACA ATGAAGTT CTCGGCTACCATCTG	40pb	60°C	53%	
YI.PLBsc2_reverse	AGACACCCTAGGTACCT TTAGTTGT AACAGTAGTCGAGAACACTG	46pb	59°C	46%	

CpFAD2_MutA-fwd	CACCATAAGG g TACCGGCCATATG GAG	27pb	61°C	56%	
CpFAD2_MutA-rev	CTCCATATGGCCGGT a CCTTATG GTG	27pb	56°C	56%	
CpFAD2_MutB-fwd	CACCATAAGG CTA <u>t</u> CGGCCATATG GAG	27pb	60°C	52%	
CpFAD2_MutB-rev	CTCCATATGGCCG a TAGCCTTATG GTG	27pb	58°C	52%	
CpFAD2_MutC-fwd	GCTACCGG <u>Caac</u> ATGGAGCGAGAT ATGG	28pb	58°C	57%	
CpFAD2_MutC-rev	CCATATCTCGCTCCAT gtt GCCGGT AGC	28pb	58°C	57%	Partie III.2.B : couples amores utilisés pour la mutagénèse des quatre positions de CpFAD2H2 pour les positions de CpFAH12
CpFAD2_MutAB-fwd	CCACCATAAGG g T a CGGCCATAT GG	26pb	57°C	54%	
CpFAD2_MutAB-rev	CCATATGGCCG a TA <u>c</u> CCTTATGGTG G	26pb	50°C	54%	
CpFAD2_MutBC-fwd	CCATAAGGCT <u>At</u> CGG <u>Caac</u> ATGGA GCGAG	29pb	55°C	55%	
CpFAD2_MutBC-rev	CTCGCTCCAT gtt GCCG a TAGCCTTA TGG	29pb	55°C	55%	
CpFAD2_MutD-fwd	CGGAACCCGAG <u>Ag</u> CAGCAGGCTAC TCG	27pb	60°C	67%	
CpFAD2_MutD-rev	CGAGTAGCCTGCTG gtt CTCGGGTTC GG	27pb	60°C	67%	
CpFAH12_I198X-fwd	CCACAAGGGC <u>NNN</u> GGCAACATGG AG	25pb	53°C - 63°C	62% - 68%	Avec le codon variable selon acide aminé souhaité pour la mutation : G : GGC ; A : GCC ; V : GTC ; L : CTG ; I : ATC ; F : TTC ; Y : TAC ; W : TGG ; D : GAC ; E : GAG ; Q : CAG ; N : AAC ; K : AAG ; R : CGA ; P : CCC ; H : CAC ; S : TCC ; T : ACC ; M : ATG ; C : TGC
CpFAD2_T198X-fwd	CACCATAAGGCT <u>NNN</u> GGCCATAT GGAG	27pb	51°C - 62°C	52% - 59%	
Tef amont	AGCCAAGGGTATAAAAGAC	19pb	51°C	42%	PCR de vérification /
CpFAH12_centre_r	CAGCCGATCAGCTGCTTGC	19pb	61°C	63%	Séquençage du gène intégré (généralement CpFAH12)
Lipaval	CGGATGACTAACTCTCCAGAGCG	23pb	60°C	57%	

Tableau II.2 : Liste des amores utilisées au cours des expériences présentées. T°f : température de fusion de l'amorce selon SnapGene® V4.1.4.

Lorsqu'il est nécessaire de récupérer le fragment amplifié (gènes, fragments P et T, séquençage de l'amplicon...), alors des volumes de 50 µL final sont réalisés. Inversement, pour les criblages et les vérifications qui nécessitent peu de matériel (juste quelques microlitres pour un dépôt sur gel), les amplifications sont réalisées dans un volume final de 12µL.

Les conditions d'amplifications sont les suivantes :

- 98°C pendant 10 secondes (dénaturation)
 - 55 à 60°C pendant 10 secondes (hybridation)
 - 72°C pendant 30 secondes à 3 minutes (élongation)
 - 72°C pendant 5 à 10 mn (élongation finale)
- } ~30 - 35 cycles

Selon le couple d'amores utilisé, la température d'hybridation nécessaire peut varier. Les temps d'élongations dépendent de la taille du fragment amplifié, il est d'environ 30 secondes

par cycle pour 1000 bases amplifiées, et l’elongation finale sera plus longue si le fragment amplifié est plus long (5 minutes pour des fragments de 1000 bases et 10 minutes pour des amplifications de plus de 6000 bases par exemple). Les PCR de mutagénèse utilisent des conditions un peu différentes qui seront détaillées dans la partie suivante.

E. Mutagénèse dirigée

Les PCR de mutagénèse dirigée utilisent elles aussi le Prémix CloneAmp mais les conditions un peu différentes : le nombre de cycles n'est que de 20 à 25 maximums, et la température d'hybridation est basse, aux alentours de 50°C. Quand le mutant est difficile à obtenir, le temps d'hybridation est augmenté jusqu'à 30 secondes. Les amorces utilisées sont précisées dans le tableau (tableau II.2).

La stratégie de mutagénèse utilisée a été identique entre les différentes constructions. Une paire d'amorce réverses-complémentaires l'une de l'autre sont utilisées, elles portent au centre de la séquence leur mutation (tableau II.2). Cette mutation est faite avec l'un des codons les plus courants chez *Y. lipolytica* en limitant le nombre de bases à modifier si possible.

La modification s'est faite sur le plasmide Jmp62 URA3ex pTEF et après amplification PCR, une digestion par DpnI est réalisée pour digérer les restes de matrice et limiter les faux positifs. Ce mix est transformé chez *E. coli* (Stellar ou XL1-Blue directement) et les plasmides de certains transformants sont séquencés pour obtenir la séquence correcte du mutant.

F. Électrophorèse de l'ADN

Les électrophorèses sont réalisées avec un gel d'agarose à 0,8% et dans du tampon TAE (Tris, Acétate et EDTA). Le tampon TAE est composé de 40mM de Tris, 20 mM d'acide acétique, 1mM EDTA à pH 8,3. Les conditions de migrations dépendent de la taille des fragments d'ADN à observer mais elles sont réalisées généralement à 100 mV pendant 30 à 35 minutes.

Une fois la migration réalisée, le gel est révélé au BET (bromure d'éthidium) sauf si les fragments doivent être purifiés et récupérés, dans ce cas ils sont révélés au SyberSafe.

G. Séquençage

Le séquençage est réalisé avec la méthode de Sanger par l'entreprise Eurofins (Ebersberg, Germany). Les amores utilisées pour séquencer les séquences codantes dans le plasmide Jmp62 sont soit Tef amont (dans promoteur pTEF, sens direct) ou Lipaval (entre la séquence codante et zêta 2, sens réverse), indiquées dans la tableau II.2. Les conditions de préparation sont celles spécifiées par le fournisseur.

D'autres amores ont pu ponctuellement servir au séquençage, comme CpFAH12_centre_r pour certains mutants et chimères de CpFAH12.

H. Transformations des souches

a. Souches *Escherichia coli*

Les souches *E. coli* utilisées servent à faire les constructions génétiques et à amplifier l'ADN plasmidique qui servira pour les transformations des souches de *Y. lipolytica*.

i. Souches compétentes XL1-Blue

Ces souches sont préparées avec le « Mix & Go!™ Transformation Kit » (Zymo Research, Freiburg, Germany). Puis la suspension cellulaire est aliquotées en microtube Eppendorfs avec 50 µL de cellules compétentes et conservées à -80°C.

Les transformations sont réalisées sans choc thermique, ainsi les cellules compétentes sont directement mélangées avec 2 à 5 microlitres d'ADN. Ensuite, si le marqueur de sélection est l'ampicilline, les cellules peuvent être étalées immédiatement sur gélose LB_{ampicilline} préchauffées à 37°C (pas besoin d'expression phénotypique). Si le marqueur de sélection utilisé est la résistance à la kanamycine, une expression phénotypique est nécessaire et sept volumes de SOC sont ajoutés puis le milieu est incubé à 37°C sous agitation pendant au moins une heure. Ensuite, le mélange est étalé sur des géloses LB_{kanamycine} préchauffées à 37°C.

ii. Souches commerciales Stellar

Les souches Stellar (Takara) sont des souches commerciale chimio-compétentes. La transformation se passe dans des conditions similaires à ce qui est préconisé par le fournisseur. Quelques microlitres de plasmide (résistance kanamycine) sont ajoutés à 20 µL de cellules compétentes et incubés au moins 15 minutes dans la glace. Puis un choc thermique est réalisé (42 secondes à 42°C) et les cellules sont refroidies dans la glace. Du milieu SOC préchauffé à 37°C est ajouté (sept volumes par rapport aux cellules compétentes, soit 140 µL) et le mix de transformation est incubé pendant au moins une heure à 37°C sous agitation (incubateur Infors). Après cette incubation, de 50 à 100 µL de mix réactionnel sont étalés sur une gélose LB_{kanamycine} et incubé à 37°C.

b. Souches *Yarrowia lipolytica*

Les conditions de transformation sont les mêmes pour toutes les souches. La préparation des cellules compétentes est faite avec le « Frozen-Ez Yeast Transformation II Kit™ » (Zymo Research, Freiburg, Germany) et les cellules compétentes sont aliquotées et conservées à -80°C.

La transformation est généralement réalisée :

- Soit avec un fragment d'ADN linéaire pour l'intégration génomique d'une cassette d'expression ou de délétion. Les cassettes d'expressions sont obtenues par digestion NotI du plasmide Jmp62. Les cassettes de délétion par digestion enzymatique ou amplification PCR à partir du plasmide TOPO généré.
- Soit par des plasmides réplicatifs pCg58 et pg7 pour l'expression transitoire de la Cas9 et de ses guides pour réaliser la délétion de gènes par CRISPR-Cas9.

Après avoir fait la transformation, les souches sont criblées sur gélose YNB. La souche OléoX ayant été modifiée, il faut attendre de 48 à 72 heures pour avoir des colonies de taille suffisante pour une inoculation.

Après transformation, l'ensemble des souches récupérées sont vérifiées avant d'être conservées à -80°C sous forme de stock glycérol à 25%.

I. Délétion du gène PAH1 chez *Yarrowia lipolytica*

La souche châssis OléoX ΔPAH1 a été construite par la délétion du gène Yl.PAH1 chez la souche OléoX. La construction de la cassette de délétion s'est faite en plusieurs étapes (représentation graphique du protocole dans figure II.3) :

- Premièrement, une amplification génomique des parties amont (fragment P, 1123 bases) et aval (fragment T, 1018 bases) du locus du gène Yl.PAH1 a été réalisée par PCR à l'aide

des couples d'amorces respectif Yl.PAH1_P-fwd_1123pb/Yl.PAH1_P-rev et Yl.PAH1_T-fwd/Yl.PAH1_T-rev_1018pb.

- Ces fragments P et T sont ensuite purifiés par le « GenElute™ PCR Clean-Up Kit » (cf partie II.3.C), et une PCR de fusion est réalisée en mélangeant les deux fragments P et T avec le couple d'amorce Yl.PAH1_P-fwd_1123pb/Yl.PAH1_T-rev_1018pb pour former un fragment unique PT.
- Le fragment PT obtenu est purifié sur gel avec le « GenElute™ Gel Extraction Kit » (cf partie II.3.C). Il est ensuite intégré dans le plasmide TOPO® avec le « Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit » (cf partie II.3.A) pour obtenir le plasmide TOPO_PT.
- Une digestion I-SceI des plasmides TOPO_PT et de Jmp62 LEU2ex sont réalisées en parallèle, cela permet respectivement de linéariser TOPO_PT et d'obtenir le marqueur de sélection LEU2. Les deux digestions sont purifiées et une ligation est réalisée. Cela permet d'obtenir le plasmide TOPO_PLeuT, qui porte la cassette de délétion de Yl.PAH1.
- Enfin, la souche OléoX est transformée avec la cassette de délétion de Yl.PAH1 (après PCR avec Yl.PAH1_P-fwd_1123pb/Yl.PAH1_T-rev_1018pb ou digestion SpeI/AvrII de TOPO_PLeuT). Des clones prototrophes pour la leucine sont ciblés par PCR au niveau du locus Yl.PAH1 pour confirmer la délétion.

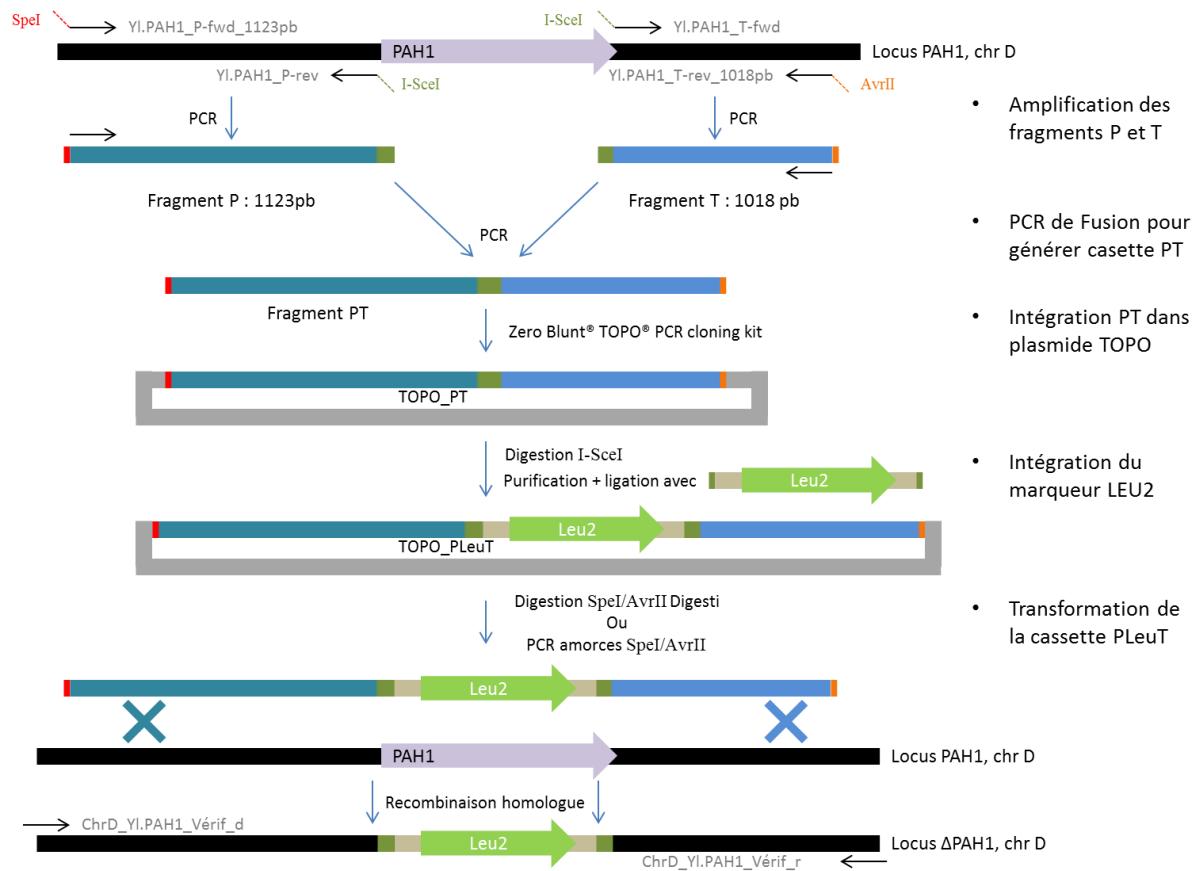


Figure II.3 : schéma récapitulatif de la stratégie pour construire la souche OléoX ΔPAH1.

4. Suivi des cultures

Dans les nouvelles conditions, les souches sont fraîchement transformées avant la culture. Au moins trois clones isolés sont pré-cultivés dans 2 mL de YPD à 28°C et 140 rpm d'agitation. Après 24 à 48 heures, selon les souches, une mesure de la densité optique (DO) et une observation microscopique sont réalisées pour sélectionner les deux clones dans le meilleur état physiologique.

La culture est réalisée dans des erlenmeyers non-bafflés de 100 mL contenant 9 mL de milieu YT₂D₅, Tp.cit (voir composition dans partie II.2.B) plus 1 mL de décane (pureté >95%). La quantité de décane initiale est mesurée par pesée. Les cultures sont inoculées à une DO de 0,5 dans le milieu, puis incubées à 28°C et 140 rpm d'agitation.

Après 48 heures de culture, les erlenmeyers sont arrêtés pour les prélèvements. D'abord, 400 µL de décane (quantité pesée) avec comme étalon interne le méthyl-laurate (mC12:0, à une concentration connue d'environ 1 g.L⁻¹) sont ajoutés, puis la DO de la phase aqueuse est mesurée en prélevant 20 µL de culture (qui seront dilués environ 100 fois), et une observation microscopique est réalisée. La totalité de la culture est ensuite transférée dans un Falcon 15 puis est centrifugée pendant 10 minutes à 4000g. La phase décane située à la surface du tube est récupérée dans un tube en verre de 1,8 mL et est stockée à température ambiante. La phase aqueuse est ensuite éliminée et le culot cellulaire est transféré vers un tube en verre de 15 mL pour être lyophilisé. Après au moins 48 heures de lyophilisation, les cellules sont réduites en poudre par vortex et sont ensuite conservées à -20°C.

5. Analyse des lipides

Deux types de quantifications différentes sont réalisés, la première est une transméthylation des acides gras des cellules et la seconde est la silylation des acides gras contenu dans la phase décane.

A. Transméthylation des culots cellulaires

La transméthylation était la méthode précédemment utilisée pour quantifier les acides gras du milieu total de l'ancienne méthode. Cette technique a été initialement adaptée de celle de Browse et al (Browse et al. 1986), et le protocole utilisé a été encore modifié suite au développement de la stratégie avec la phase décane.

Dans les nouvelles conditions, la transméthylation se réalise sur les lyophilisats des culots cellulaires réduit en poudre pour pouvoir les transméthyler à cœur. La solution de méthylation

est une solution de méthanol qui contient 2,5% d'acide sulfurique (en volume) et un étalon interne, l'acide myristique (C14:0), qui est ajouté à hauteur d'environ $0,3 \text{ g.L}^{-1}$. 4 mL de cette solution sont ajoutées à la poudre, deux fois plus que dans l'ancien protocole, et les tubes sont mélangés au vortex pour la resuspendre. Dans l'ancienne méthode, du toluène était ajouté en plus (à hauteur de $\frac{1}{2}V$ de la solution de méthylation), il servait initialement à solubiliser les lipides neutres comme les triacylglycérols dans le méthanol, or OléoX est incapable d'en synthétiser (et c'est un solvant très toxique et volatil). Un test a été réalisé et a confirmé que le toluène était inutile dans notre situation.

La transméthylation dure 4 heures à 80°C pendant laquelle les tubes sont régulièrement mélangés, soit 1 heure de plus que dans l'ancien protocole pour être certain d'obtenir une transméthylation complète. Pendant cette période, la présence d'acide et le large excès de méthanol font que simultanément, il y a lyse des (thio)esters présents (phospholipides, acyl-CoA...) puis estérification avec le méthanol.

Les tubes sont ensuite refroidis à température ambiante, et 3 mL de solution de NaCl 5% (pour faciliter la séparation de phase) et 3 mL de décane (pour extraire les acides gras) sont ajoutés. La phase décane contient un second étalon interne, du méthyl-laurate (mC12:0). Le mélange est passé au vortex fortement deux fois, puis est centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes pour séparer les phases. La phase supérieure, alors composée du décane et des méthyl-esters, est prélevée et elle sera analysée par chromatographie en phase gazeuse. L'ancienne méthode utilisait l'hexane comme solvant d'extraction, hors celui-ci est neurotoxique et aussi fortement volatil, ce qui induisait de la variabilité selon son évaporation (conjointe à celle du toluène). C'est pour cela que le décane lui a été préféré car l'extraction est inchangée.

B. Silylation de la phase décane

L'analyse des lipides de la phase décane de la culture a été développée pour la nouvelle méthode de culture. Elle consiste à silyler les échantillons et à les analyser en chromatographie en phase gazeuse. Pour chaque échantillon analysé, 40 μL de la phase décane, déjà prélevée et conservée à température ambiante, sont diluée dans 160 μL de décane et dérivatisés avec 5 μL de N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide. Le milieu est mélangé puis il est incubé au moins une heure à 45°C pour accélérer la réaction. Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse. Si la concentration d'un échantillon dépasse celle de la gamme de quantification (entre 0,1 et 1 g.L^{-1}), une dilution est réalisée avec du décane pour faire tomber la concentration dans l'intervalle de quantification.

C. Analyse de la composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse

Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG, Thermo Scientific, Trace 1310-ISQ LT) avec une colonne TG-5MS (Thermo Scientific, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La quantification est réalisée à partir du signal du détecteur à ionisation de flamme (FID). Le spectre de masse permet d'identifier les pics inconnus. Un volume de 1 µL est injecté avec un split de 1:5 et une température de 250°C et le FID est à 270°C sans make-up.

Les aires obtenues avec le FID sont utilisées pour la quantification. La calibration est réalisée avec les six acides gras principaux : acide palmitique (C16:0), acide palmitoléique (C16:1 Δ^{9cis}), acide stéarique (C18:0), acide oléique (C18:1 Δ^{9cis}), acide linoléique (C18:2 Δ^{9cis,12cis}) et acide ricinoléique (C18:1 Δ^{9cis} OH¹²). Les échantillons issus des culots cellulaires sont quantifiés avec la gamme d'acides gras méthylés, et les échantillons de la phase décane ont été quantifiés avec la gamme d'acides gras silylés. A la première injection, on vérifie à partir des aires de la gamme étalon si la silylation est totale, si ce n'est pas le cas, il suffit d'attendre que la réaction se termine et d'injecter les échantillons le lendemain.

Les programmes utilisés pour l'analyse sont décrits dans les tableaux II.3 et II.4 suivants :

Température cible [°C]	Taux [°C.min ⁻¹]	Durée de maintien du plateau [min]	Temps de la séquence [min]
150	0	0	0
180	5	0	6
185	2	8	16,5
204	10	5,1	23,5
300	80	0,3	25

Tableau II.3 : Programme pour l'analyse des acide gras silylés.

Température cible [°C]	Taux [°C.min ⁻¹]	Durée de maintien du plateau [min]	Temps de la séquence [min]
80	0	2	2
140	80	0	2,75
175	10	11,5	17,75
208	100	4	22,08
300	80	0,27	23,5

Tableau II.4 : Programme pour l'analyse des acide gras méthylés.

6. Bio-informatique

A. Alignements et détermination des structures secondaires

Le logiciel utilisé pour travailler avec les séquences nucléiques est SnapGene® 4.1.4. Les bases de données utilisées en lignes sont celles de Blast et le GRYC.

Les prédictions de structures secondaires ont été réalisées par les applications suivante : la suite T-Coffee (Notredame et al. 2000), PSIPRED (Jones 1999; Buchan et al. 2013) et Interpro (Finn et al. 2017). Phyre2 (Kelley et al. 2015) et I-TASSER (Yang et al. 2015) sont deux suites de logiciels qui ont été utilisés pour réaliser des modèles prédictifs et également pour obtenir des prédictions de structures secondaires.

La suite T-Coffee a été utilisée pour réaliser des alignements basés sur les structures secondaires entre les différentes enzymes. Ces alignements ont permis une première localisation des structures secondaires de CpFAH12 et CpFAD2 à l'aide des structures des stéaroyl-CoA désaturases de la souris et de l'humain (PDB : 4YMK et 4ZYO).

Dans l'article, un des alignements entre dix désaturases membranaire a été réalisé par PROMALS3D (Pei et al. 2008).

B. Modélisation

Le modèle de l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* a été généré par des approches comparatives et de « threading ». Cette partie du travail a été réalisée par un collaborateur en modélisation moléculaire. Bien qu'ayant participé aux discussions, je n'ai donc pas réalisé cette partie du travail et nous avons donc choisi de ne pas présenter ces méthodes dans cette partie du manuscrit de thèse. Pour de plus amples informations, les méthodes sont détaillées dans le papier (Robin et al. 2019).

Chapitre III.

Résultats

L'un des objectifs de cette thèse est d'utiliser la levure *Yarrowia lipolytica* pour produire des acides gras inhabituels, c'est à dire portant des fonctions chimiques comme par exemple des fonctions hydroxyles ou des systèmes de doubles liaisons conjuguées. L'acide gras utilisé comme exemple est l'acide ricinoléique, un acide gras avec une chaîne de 18 carbones, une insaturation *cis* entre les carbones 9 et 10 et une fonction hydroxyle sur le carbone 12 (C18:1 Δ^{9c} OH¹²). Il a été choisi de par ses propriétés d'intérêt industriel (cf partie biblio I.1.B). En amont, une souche châssis de *Y. lipolytica* a été préalablement développée au laboratoire pour produire cet acide gras d'intérêt (cf partie biblio I.3.B) à partir d'acide oléique. Il s'agit de la souche OléoX (Beopoulos et al. 2014).

Il existe quelques hydroxylases caractérisées (Van de Loo et al. 1995; Broun et al. 1998; Dauk et al. 2007; Meesapyodsuk and Qiu 2008; Zhou et al. 2013) capables de produire de l'acide ricinoléique à partir d'acide oléique (C18:1 Δ^{9c}), mais les deux principales sont celles issues soit de la plante *Ricinus communis*, RcFAH12, soit du champignon *Claviceps purpurea*, CpFAH12. Avant ma thèse, les deux ont été exprimées dans la souche OléoX mais RcFAH12 n'a pas permis d'obtenir une activité d'hydroxylation significative alors que CpFAH12 a permis la production d'acide ricinoléique sécrété dans le milieu de culture (Beopoulos et al. 2014). Une souche avec plusieurs copies de CpFAH12 et de Yl.LRO1 (une acyltransférase de *Y. lipolytica*) a permis la production de presque 10 g.L⁻¹ d'acide ricinoléique en bioréacteur, principalement sous forme sécrétée. Cependant, CpFAH12 est une enzyme bifonctionnelle qui réalise également la synthèse d'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$) à partir du même substrat.

Deux stratégies ont été envisagées pour améliorer la production d'acide ricinoléique :

- La première stratégie consiste à améliorer l'activité de conversion de l'enzyme responsable de l'hydroxylation. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur l'hydroxylase bifonctionnelle de *C. purpurea* CpFAH12 et nous nous sommes intéressés à la compréhension de la spécificité d'hydroxylation par rapport à celle de désaturation. Pour cela, les déterminants de cette spécificité hydroxylation/désaturation ont été recherchés. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux enzymes de plantes notamment à l'hydroxylase du ricin car cette plante est connue pour accumuler de hautes teneurs en acide ricinoléique dans ses graines et son hydroxylase présente l'avantage d'être monofonctionnelle. Nous avons essayé de comprendre pourquoi cette enzyme de plante était très peu active chez *Y. lipolytica*.

- La seconde stratégie consiste à optimiser le métabolisme de l'hôte, *Y. lipolytica*, pour la production de l'acide gras d'intérêt. Comme l'enzyme permettant l'hydroxylation est active sur les acides gras estérifiés sur la position sn2 de la phosphatidylcholine, l'ingénierie de son métabolisme lipidique pourra être orientée de plusieurs manières : soit en augmentant la quantité de substrat (phosphatidylcholine) synthétisé par la souche ; soit en favorisant la libération de l'acide ricinoléique produit en surexprimant des phospholipases.

Mais avant de commencer l'optimisation de la production, il a été nécessaire de résoudre les problèmes récurrents de reproductibilité que nous avons rencontrés. Ainsi, les protocoles de production, d'extraction et d'analyse doivent être reproductibles alors même que l'acide gras sécrété dans le milieu de culture forme un milieu biphasique et hétérogène. D'autre part, il faut également que la souche soit robuste pour permettre des productions reproductibles et que cette méthode de production puisse être appliquée à un procédé industriel. Donc, avant de mettre en place les différentes stratégies citées plus haut, il est indispensable de travailler sur le système de production, et c'est l'objet du premier chapitre de résultats de cette thèse.

Chapitre III. Résultats

Partie 1.

Produire de l'acide ricinoléique
de façon robuste et reproductible :
optimisation du système de production

Préalablement à mes travaux, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse et leurs partenaires avaient déjà réussi à produire de l'acide ricinoléique de manière hétérologue (Beopoulos et al. 2014). Le système de production faisait intervenir une souche de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* qui portait dix délétions et qui exprimait l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* (CpFAH12). Les délétions comprenaient les six acyl-CoA oxydases (POX1 à POX6), trois acyltransférases (YI.DGA1, YI.DGA2 et YI.LRO1) et la Δ^{12} -désaturase (YI.FAD2). Cette souche appelée OléoX (et dont les caractéristiques sont détaillées dans la partie bibliographique I.3.B, figure I.3.4) accumule majoritairement de l'acide oléique, précurseur converti en acide ricinoléique lorsque CpFAH12 est exprimée.

Premièrement, la β -oxydation a été ciblée car le substrat et le produit de la réaction d'intérêt, respectivement l'acide oléique et l'acide ricinoléique, sont rapidement dégradés par cette voie. Chaque cycle de la β -oxydation est composé de quatre étapes enzymatiques successives qui conduisent au raccourcissement de la chaîne carbonée des acides gras de deux carbones. Les six enzymes appelées POX1 à POX6, qui catalysent la première étape, ont été déletées, ces enzymes sont des acyl-CoA oxydases qui catalysent la formation d'un intermédiaire Δ^{2t} -énoyl-CoA. Avec leur délétion, la souche n'est plus capable d'oxyder des acides gras pour s'en servir de source d'énergie, que ce soit l'acide ricinoléique ou les autres acides gras.

Deuxièmement, les acyltransférases assurant la synthèse des triacylglycérols ont également été déletées. En effet, *Y. lipolytica* est reconnue pour sa capacité à accumuler des lipides sous forme de triacylglycérols. Pour s'assurer de la disponibilité du substrat pour l'enzyme, l'acide oléique estérifié en position sn2 de la phosphatidylcholine, celui-ci ne doit pas être séquestré dans les triacylglycérols. Lorsque CpFAH12 est exprimé dans une souche qui possède ses acyltransférases, seulement une très faible production d'acide ricinoléique est visible. Ainsi, les deux acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférases YI.DGA1 et YI.DGA2 (qui transfèrent l'oléoyl-CoA vers les triacylglycérols) et la phospholipide:diacylglycérol acyltransférase YI.LRO1 (qui transfère l'acide gras en position sn2 de la phosphatidylcholine sur les diacylglycérols) ont été déletées. Suite à ces délétions, la souche n'est plus en mesure d'accumuler des acides gras et ne peut plus former de corps lipidiques.

Enfin, la Δ^{12} -désaturase YI.FAD2 native réalise la désaturation de l'acide oléique estérifié en position sn2 de la phosphatidylcholine en acide linoléique. Elle rentre donc directement en compétition pour le substrat avec CpFAH12. De plus, l'acide linoléique formé ne peut plus être reconvertis en acides oléique ou ricinoléique et cela représente donc une perte. C'est pour cette raison que cette enzyme a été déleté.

Préalablement, les différentes souches construites à partir de la souche OléoX étaient transformées par la méthode à l'acétate de lithium, selon un protocole « maison » basé sur celle de Davidow et al, 1985 (Davidow et al. 1985). Les souches ainsi obtenues étaient conservées à 4°C ou -80°C jusqu'à ce qu'elles soient testées en culture. Les cultures d'évaluation des souches étaient réalisées en erlenmeyer bafflé de 250 mL contenant 25 mL de milieu riche (10 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 50 g.L⁻¹ de glucose), à une température de 28°C (optimum de *Y. lipolytica* Po1d), sous une agitation de 140 rpm. Pour travailler dans des conditions de bioconversion et non pas en néosynthèse, de l'acide oléique pouvait être ajouté au milieu à hauteur de 3 g.L⁻¹.

Des prélèvements de 2 mL étaient réalisés toutes les 24 heures, de un jour (24h) à cinq jours (120h) de culture selon l'expérience. Les prélèvements étaient ensuite lyophilisés puis analysés après une transméthylation basée sur le protocole de Browse et al (Browse et al. 1986). Les acides gras après transméthylation étaient ensuite analysés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse.

Quand j'ai commencé ma thèse, j'ai repris ce protocole. Il permettait effectivement de quantifier les acides gras mais malheureusement j'étais confronté régulièrement à des problèmes de variabilité de la production d'acide ricinoléique. Sur des triplicats biologiques, il était courant d'observer un clone avec un comportement différent des deux autres. De plus, la même souche lancée à diverses reprises donnait des résultats très différents avec une diminution de la production d'acide ricinoléique. Mon travail consistant à améliorer la production, il est apparu indispensable d'avoir des conditions d'analyse et de production reproductibles pour permettre de comparer les résultats pour en tirer des conclusions pertinentes.

Ces améliorations ont été réalisées les unes après les autres au fil des expériences pour obtenir un nouveau protocole décrit ci-après. La première priorité a été d'obtenir un mode de culture réduisant la variabilité. Une fois les conditions posées, le travail a porté sur l'ingénierie de la souche pour réduire la variabilité biologique.

A. Développement d'un système de culture et d'analyse reproductible de type « fermentation extractive »

a. S'affranchir de la variabilité due au milieu de culture hétérogène

L'acide ricinoléique a la particularité d'être sécrété lorsqu'il est produit chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Si cela est un avantage majeur pour le rendement et le coût des procédés de traitement post-culture (extraction et purification, procédés « downstream »), cela représente un challenge majeur en termes de suivi de culture et de reproductibilité. En effet, dans une culture contenant des acides gras, le milieu est hétérogène et un prélèvement partiel de culture n'est pas toujours représentatif du milieu total.

Pour éviter cela, les cultures seront traitées en intégralité afin de n'avoir aucune variation due aux prélèvements réalisés. De petits volumes de cultures (10 mL) seront réalisés dans des erlenmeyers non-bafflés de 100 mL. Les cultures seront traitées après 48 heures car les cultures précédentes montraient que les 50 g.L⁻¹ de glucose étaient consommés en quasi intégralité à ce temps de culture. De plus, ne réaliser qu'un seul point réduit le nombre de manipulation, et donc les problèmes liés à la sortie de l'incubateur des cultures (sédimentation, changement de température, contamination...).

b. Un constat : l'acide ricinoléique est délétère pour la souche OléoX

Chez la souche OléoX, des cultures tests ont été réalisées avec 3 g.L⁻¹ d'acide ricinoléique ou oléique ajouté au milieu. On constate alors une diminution du taux de croissance avec l'acide ricinoléique alors qu'avec l'acide oléique ajouté à la même concentration, aucune différence de croissance n'est observable. Et lorsque la souche OléoX est transformée avec CpFAH12, l'impact sur la croissance est encore plus fort alors que la quantité produite est inférieure à 3 g.L⁻¹. Cet effet délétère de la production d'acide ricinoléique est certainement dû à l'incorporation d'acide ricinoléique dans les membranes biologiques (Yazawa et al. 2013a). Lorsque l'acide ricinoléique est produit *in situ*, l'effet est encore plus significatif étant donné qu'il est produit directement sur la position sn2 de la phosphatidylcholine, un composant majoritaire des membranes chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

Cet effet toxique est retrouvé chez de nombreux organismes produisant de l'acide ricinoléique de façon hétérologue et est abordé plus en détail dans la partie discussion (III.1.D.b). Pour limiter cet effet toxique et ainsi permettre une meilleure capacité d'accumulation, de nouvelles conditions doivent être déterminées.

c. Un mode de culture de type « fermentation extractive » pour limiter la toxicité de l'acide ricinoléique

Pour limiter l'effet toxique de l'acide ricinoléique sur *Y. lipolytica* et réduire la pression de sélection négative, nous avons cherché un moyen de l'extraire en continu du milieu. Nous avons choisi un mode de culture de type « batch » avec une phase d'extraction qui doit être insoluble dans la phase aqueuse pour pouvoir séquestrer l'acide ricinoléique. L'idée est de tirer avantage de la tolérance de cette levure pour les alcanes. En effet, *Y. lipolytica* est une des rares levures capable d'utiliser les alcanes comme source de carbone (Yamagami et al. 2001). Même s'il porte une fonction polaire, l'acide ricinoléique libre est soluble dans les alcanes jusqu'à au moins 5 g.L⁻¹ (expérimentalement on observe que des solutions à ces concentrations sont totalement monophasique).

Pour le choix de l'alcane à utiliser, il faut en utiliser un qui n'est pas volatil à la température de culture (28°C) mais peu visqueux pour ne pas empêcher l'agitation et donc l'aération du milieu. Le n-décane, l'alcane linéaire à dix carbones est un choix pertinent car il respecte ces différents critères : il est liquide à température ambiante (point d'ébullition : 174°C à pression atmosphérique) et il a une viscosité similaire à celle de l'eau (viscosité_{décane} = 0,85 mPa·s à 25 °C et viscosité_{eau} = 0,89 mPa·s à 25 °C). Sa pression de vapeur saturante à 25°C est de seulement 213 Pa (celle de l'eau est de 3,17 kPa à 25°C) et la densité du gaz est de 4,9 comparée à l'air. Donc même si un peu de décane s'évapore, la haute densité du gaz fait qu'il restera « piégé » dans l'rlenmeyer. De plus, le décane est suffisamment volatil pour pouvoir être utilisé comme solvant en chromatographie en phase gazeuse.

Un volume de 1 mL de décane a donc été ajouté à 9 mL de milieu de culture, ce qui correspond à 10% du volume total de la culture. Cette phase organique permettra d'extraire en continu l'acide ricinoléique sécrété par les souches cultivées et limitera son effet toxique.

À la fin de la culture, un volume de 0,5 mL de décane supplémenté avec 1 g.L⁻¹ de méthyl-laurate (mC12:0) sera ajouté à la culture. Cet acide gras est utilisé comme étalon interne pour quantifier le décane présent à la fin de la culture car celui-ci peut être consommé par la levure *Y. lipolytica*. Ainsi, il sera possible de déterminer précisément la quantité d'acide ricinoléique produit par les diverses souches construites.

Par ailleurs, pour favoriser la diffusion de l'acide ricinoléique vers la phase décane, le milieu est tamponné à pH 4 pour favoriser son état protoné car le pKa des acides carboxylique est aux alentours de 4 à 5, par exemple 5,02 pour l'acide oléique. L'acide ricinoléique aura plus d'affinité avec la phase organique que la forme ricinoléate qui porte une charge négative. Le tampon utilisé est à base de citrate/acide citrique. Une culture test a été réalisée et a montré que le pH restait constant pendant la culture.

d. Effet du nouveau mode de culture sur la croissance et l'état physiologique des cellules

Pour vérifier l'intérêt de ce nouveau mode de culture, les croissances des deux souches, la souche témoin OléoX zêta (OXZ) et la souche productrice OléoX zêta CpFAH12, ont été cultivées dans les nouvelles conditions avec et sans la phase décane. La souche OXZ utilisée est issue de OléoX et en est identique d'un point de vue métabolique. Elle sera décrite dans la partie C de ce chapitre. La souche OléoX zêta CpFAH12 a été construite par transformation de la souche OléoX zêta par une cassette comportant la séquence codante de CpFAH12 sous le promoteur pTEF.

La figure III.1.1 représente la densité optique (DO) des quatre cultures au cours du temps jusqu'à environ 37h de culture. La croissance de la souche sans l'hydroxylase est similaire dans les deux milieux de culture avec une légère amélioration de la DO à 37h (courbes magenta et violette). Ceci est positif car cela montre que le décane n'est pas nocif pour la croissance cellulaire. Pour la souche produisant de l'acide ricinoléique, on observe tout le long de la culture une DO améliorée quand le décane est présent dans le milieu de culture et la DO finale totale est de 76 en présence de décane et de 45 en son absence (courbes bleu foncé et cyan). Les taux de croissance maximum de la souche OléoX zêta sont de respectivement $0,27 \text{ h}^{-1}$ et $0,26 \text{ h}^{-1}$ en absence et en présence de décane. La souche OléoX zêta CpFAH12 a un taux de croissance maximum bas ($0,16 \text{ h}^{-1}$) mais qui augmente largement lorsqu'il y a une phase décane ($0,23 \text{ h}^{-1}$). Ceci tend à prouver que le décane limite la toxicité de l'acide ricinoléique. D'autre part, *Y. lipolytica* étant une levure aérobie stricte et par conséquent sensible à la concentration en dioxygène dans le milieu, l'amélioration pourrait être également due à l'amélioration du transfert de dioxygène dans le milieu. En effet, il a été montré qu'une phase organique peut permettre de favoriser le transfert de dioxygène (discuté plus en détail dans partie III.1.D.c, (Rols et al. 1990)).

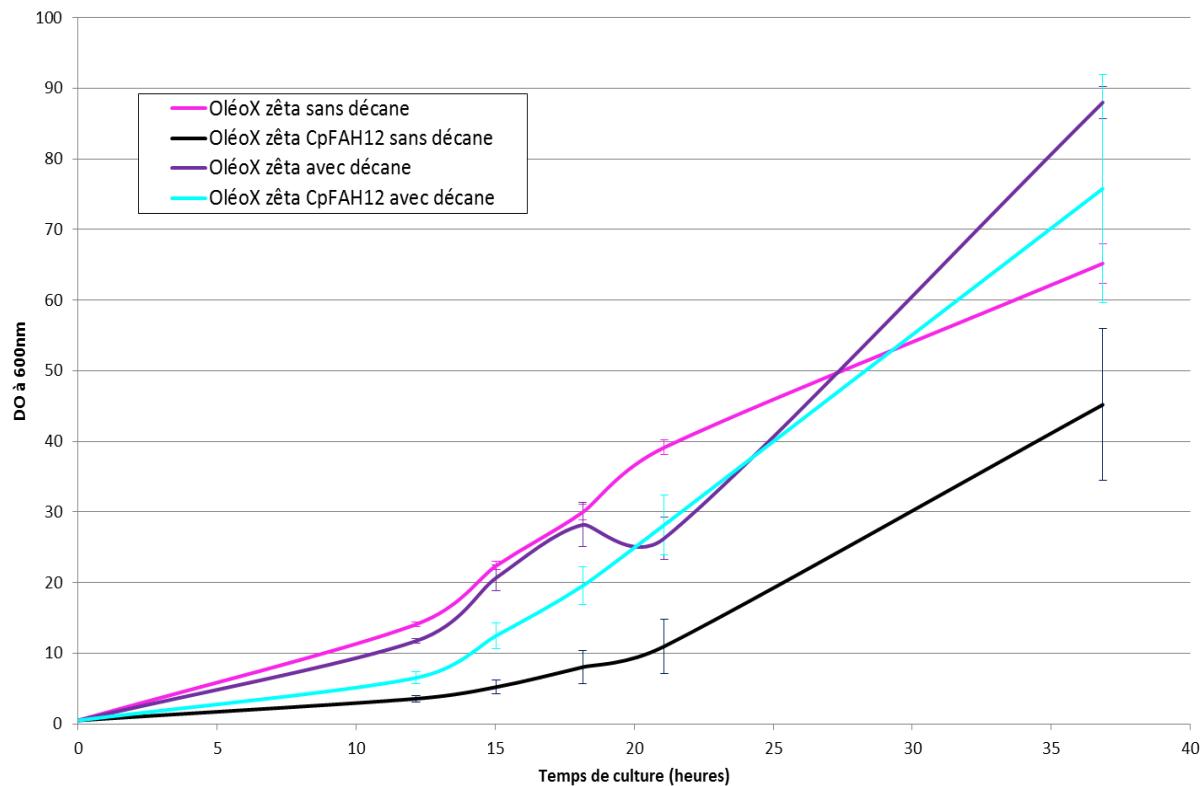


Figure III.1.1 : Suivi de la densité optique (600nm) au cours de la culture de souches dans différentes conditions. Le milieu utilisé est le YT₂D₅, Tp.cit. Les deux conditions testées sont en présence de phase décane (1mL de décane + 9mL de milieu) ou en absence de phase décane (10mL de milieu). Les densités optique à 600 nm des souches OléoX zéta sans décane, OléoX zéta avec décane, OléoX zéta CpFAH12 sans décane, OléoX zéta CpFAH12 avec décane sont respectivement tracées en magenta, violet, noir et cyan (cf légende). Les barres d'erreurs correspondent à des dupliques biologiques.

Il faut cependant prendre quelques précautions car ces conclusions reposent sur des observations de densité optique (DO, mesure de l'absorbance à 600nm pour évaluer la densité en biomasse d'un milieu liquide) et *Y. lipolytica* est une levure dimorphique, donc la DO mesurée dépend également de son état physiologique, car la forme bourgeonnante ne diffuse pas la lumière de la même manière qu'un hyphe. Les observations microscopiques complémentaires réalisées montrent effectivement des différences en fonction de la souche et des conditions utilisées. On note cependant une plus forte proportion de cellules ovoïdes dans le cas des cultures en présence de décane, or la transition vers la forme hyphe est souvent due à une carence ou à un effet toxique du milieu. Ceci confirme l'effet positif du nouveau milieu de culture sur la souche.

Pour vérifier cet effet, un dénombrement est réalisé après 37h de culture pour quantifier le nombre de cellules vivantes et viables du milieu (tableau III.1.1). Une fraction du milieu est ainsi diluée par dilution successives (en cascade) puis un volume connu est étalé sur une gélose YPD. Les cellules vivantes donneront des colonies qu'il sera possible de compter pour estimer leur quantité dans la culture. Curieusement, la présence ou l'absence de phase décane dans le milieu de culture semble peu influencer le dénombrement quelle que soit la souche prise en compte. Par contre, le dénombrement pour la souche OléoX exprimant CpFAH12 est inférieur d'environ 44% à ce qui est obtenu pour la souche n'exprimant pas CpFAH12 quel que soit le

milieu utilisé. Cela montre bien que l'expression de CpFAH12 est délétère pour la souche, en absence ou en présence de décane. Sur la souche témoin OléoX zéta ura+, en présence de décane, il est possible de remarquer que la variabilité du dénombrement est très élevée et très supérieure à ce qui est attendu.

		Dénombrement cellules vivantes UFC.mL ⁻¹	Intervalle de confiance 1.σ
OXZ	sans décane	$4,81 \cdot 10^8$	± 5,8%
	avec décane	$6,80 \cdot 10^8$	± 23,2%
OXZ pTEF CpFAH12	sans décane	$2,67 \cdot 10^8$ *	± 6,7%
	avec décane	$2,70 \cdot 10^8$ *	± 12,6%

Tableau III.1.1 : Dénombrements réalisés sur géloses YPD des souches OléoX zéta dans différentes conditions. Plusieurs dilutions ont été réalisées (10^{-3} ; 10^{-5} ; 10^{-7}) et 100 µL ont été déposé. Les géloses utilisées pour la quantification contenaient entre 246 et 792 UFC (« Unité Formant Colonie ») sur la gélose 10^{-5} . Cela a été fait après 36h51 de culture. Les tests de Student sont réalisés entre les deux souches (exprimant ou non CpFAH12) pour une condition donnée (avec ou sans décane). Une étoile (*) correspond à un test significatif (<5%).

En conclusion :

L'utilisation d'une phase décane pour limiter la toxicité de l'acide ricinoléique a donné des résultats positifs, ainsi, cela a permis d'améliorer le taux de croissance des souches productrices d'acide ricinoléique (+43%). Et lorsque qu'une phase décane est ajoutée, l'observation microscopique montre bien que les cellules sont dans un meilleur état physiologique (cellules ovoïdes plus présentes que hyphes). Cependant, le dénombrement montre que lors de l'expression de CpFAH12, le nombre de cellules viables diminuent dans les mêmes proportions en présence ou absence de la phase décane. Cette dernière n'est pas délétère pour les souches car sa présence ne fait chuter ni le dénombrement ni la DO, et lorsque qu'elle est ajoutée l'observation microscopique montre bien que les cellules sont dans un meilleur état physiologique (ovoïdes plus présentes que hyphes). La présence d'une corolle de gouttelettes de décane autour des cellules pourrait expliquer l'augmentation de la densité optique alors que la quantité de cellules viables (UFC.mL⁻¹) reste identique.

D'autre part, avec ce mode de culture on peut espérer une meilleure reproductibilité dans les prélèvements car l'acide ricinoléique ne sera plus en émulsion dans un milieu de culture aqueux mais solubilisé de façon homogène dans la phase décane. De plus, le décane permettra de concentrer les acides gras sécrétés pour les quantifier plus justement et détecter même une faible production. Finalement on pourra quantifier séparément les acides gras sécrétés de ceux qui sont présents dans les cellules. Les prochaines cultures seront donc réalisées avec cette phase décane.

e. L'analyse des acides gras des cultures en présence de phase décane

i. Nouvelles méthodes d'analyse et d'extraction

Avec ce nouveau mode de culture, une nouvelle méthode de quantification a été développée pour analyser les acides gras de la culture. Comme mentionné dans la partie a., la totalité de la culture (9mL de milieu et 1mL de décane) est récupérée pour l'analyse. Une centrifugation permet de séparer un culot cellulaire, une phase aqueuse et la phase décane à la surface. Seules les compositions de la phase décane et du culot cellulaire sont analysées car la phase aqueuse ne contient aucun acide gras en proportion détectable (vérifié expérimentalement).

L'analyse du culot cellulaire est réalisée de manière similaire à ce qui était réalisée précédemment, par transméthylation après une étape préliminaire de lyophilisation. Mais la plus grande quantité de lipides à analyser a nécessité de modifier le protocole (voir partie II.5.A).

Les acides gras contenus dans la phase décane sont directement analysés après silylation, car cette méthode de dérivatisation est rapide et ne nécessite que quelques étapes. À l'issu de la culture, la phase décane est suffisamment anhydre pour pouvoir être silylée directement sans étape de séchage. Cinq agents silylants commerciaux ont été testés :

- N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide
- N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
- N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide + triméthylchlorosilane 99:1
- Hexaméthyldisilazane + triméthylchlorosilane 3:1
- Iodotriméthylsilane

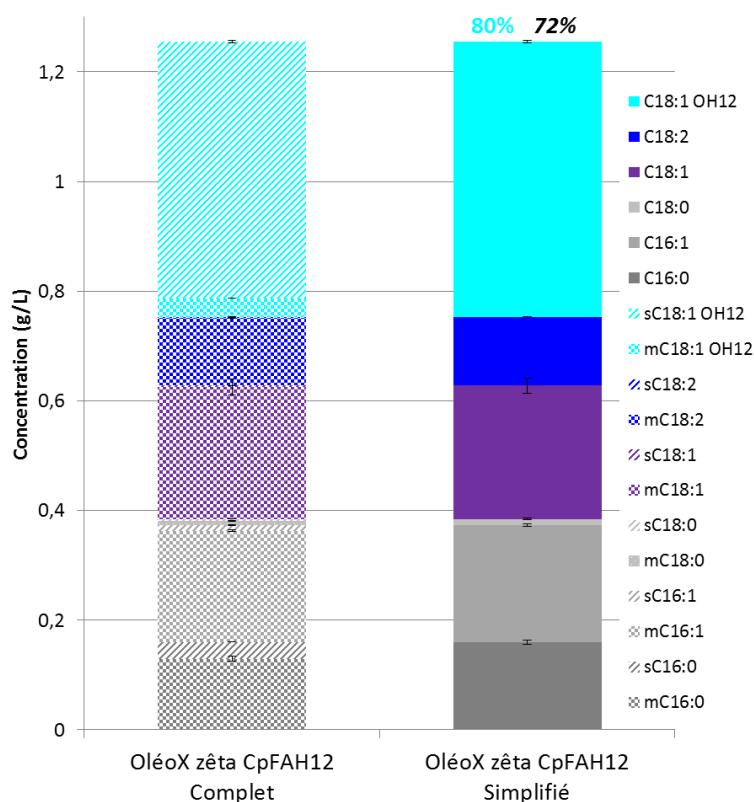
Le bis(triméthylsilyl)acétamide a permis une silylation complète des acides oléique et ricinoléique dans des conditions les plus douces (plusieurs heures à température ambiante ou 1h à 45°C). La silylation des fonctions acides est aisée mais la fonction hydroxyle secondaire de l'acide ricinoléique est plus récalcitrante. Une gamme étalon de solutions d'acides gras libres est réalisée et silylée au dernier moment avec les échantillons. Ils sont stables au moins 48 heures à température ambiante. Il est important de ne pas conserver les phases décane à -20°C car la condensation après décongélation apporte probablement de l'eau à l'échantillon, ce qui nuit à la réaction et empêche la silylation.

ii. Localisation des acides gras

Avant de discuter les résultats obtenus, je vais rapidement présenter le mode de représentation que je vais employer dans ce manuscrit pour les extractions de lipides. La figure III.1.2 montre les concentrations totales des acides gras obtenues pour la culture de la souche OléoX CpFAH12 après 48 heures de culture dans les nouvelles conditions. Le code couleur est indiqué dans la légende de la figure et sera le même tout au long de ce manuscrit. Les deux

histogrammes montrent les mêmes résultats, celui de gauche détaille l'origine des acides gras, les acides gras méthylés issus du culot cellulaire avec des pointillés blanc et les acides gras silylés issus de la phase décane en couleur hachurée. Les concentrations des acides gras représentées sont celles dans le milieu total. L'histogramme de droite quant à lui est une version simplifiée qui ne détaille pas l'origine des acides gras (intracellulaires ou extracellulaires).

Figure III.1.2 : Concentration totale des acides gras produits par deux réplicats biologiques de la souche



OléoX zéta CpFAH12 au cours de la culture. Les concentrations sont mesurées après 48 heures de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé est 9mL de YT₂D₅, Tp.cit plus une phase décane de 1 mL.

Les acides gras sont représentés par différentes couleurs (de haut en bas) : cyan : acide ricinoléique, bleu : acide linoléique, violet : acide oléique, gris clair : acide stéarique (très faible), gris: acide palmitoléique et gris foncé : acide palmitique.

Les acides gras silylés sont représentés avec des hachures et les acides gras méthylés avec des pointillés (histogramme de gauche).

Les silyles et méthyles sont chacun représentés par une couleur pleine (histogramme de droite). Les barres d'erreurs sont représentées sur les deux histogrammes. Au-dessus de l'histogramme de droite, le taux d'hydroxylation (cyan) et le pourcentage de conversion (gras) sont affichés.

Les souches ne produisant pas d'acide ricinoléique n'ont que des traces d'acides gras dans la phase décane. Par exemple, pour la souche témoin OléoX zéta, le ratio des acides gras silylés sur les acides gras totaux ne représente que 1,1% (tableau III.1.2). Comme attendu, cette souche châssis produit principalement de l'acide oléique (81% de ses acides gras cellulaires) et pas d'acide linoléique et ricinoléique. Mais dans le cas de souche productrice comme OléoX zéta CpFAH12 (figure III.1.2), l'acide ricinoléique se retrouve très largement dans la phase décane puisque 93% de l'acide ricinoléique total se trouve dans la phase décane. Ainsi, l'acide ricinoléique représente 90% des acides gras de la phase décane.

	Total (g.L ⁻¹)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1
Méthylés	0,438	11%	7,1%	0,87%	81%
Silylés	0,00469	26%	8,7%	7,6%	57%
Ratio sAG/AGT	1,1%				

Tableau III.1.2 : Récapitulatif de la production d'acide gras de la souche témoin OléoX zéta prototrophe. La colonne « Total (g.L⁻¹) » est la concentration totale en acide gras de chacune des phases (décane ou culot). Les pourcentages donnés dans la même ligne sont la teneur de chacun des acides gras dans la phase considérée. Les conditions de cultures sont les nouvelles (YT₂D₅, Tp.cit + phase décane). Pour rappel, les acides gras méthylés sont ceux retrouvés dans le culot cellulaire et les acides gras silylés sont ceux libre dans la phase décane (sécrétion). sAG représente la totalité des acides gras silylés et AGT la totalité des acides gras.

Cela pourrait être intéressant dans le cadre d'un procédé d'extraction et de purification de l'acide ricinoléique dans une culture en continue. Cela permettrait d'obtenir directement de l'acide gras pur à 90%, comme chez le ricin chez qui la teneur est supérieure à 80% (Bafor et al. 1991). La bibliographie plus récente annonce des teneurs proches de 90% (McKeon et al. 2007; McKeon et al. 2016; Viswanath et al. 2016; Tian et al. 2019). Le pourcentage de conversion (ratio entre la somme des produits divisé par la somme des produits et substrat) est d'ici de 72% et le taux d'hydroxylation (ratio entre l'acide ricinoléique et la somme des produits) est de 80%. La quantité totale d'acide ricinoléique produite est d'environ 0,50 g.L⁻¹ et la phase décane (qui le concentre) en contient à elle seule 4,7 g.L⁻¹. Pour des raisons de clarté dans les futurs graphiques, la plupart des résultats seront montrés sans la distinction entre l'origine des acides gras (phase décane ou culot cellulaire) mais avec uniquement la combinaison entre les deux phases.

iii. Effet sur la quantité d'acides gras produite et variabilité

Une culture comparative de la souche OléoX CpFAH12 entre l'ancienne et la nouvelle méthode de culture est réalisée, et la production de chaque acide gras de chaque phase est mesurée. Pour s'affranchir de l'effet souche dans cette comparaison, des réplicats techniques sont utilisés, c'est-à-dire que les quatre réplicats de la culture ont été inoculées à partir de la même préculture et non pas de clones différents.

Les concentrations sont présentées dans la figure III.1.3, où les blocs de chaque acide gras sont écartés pour pouvoir comparer la différence entre les deux conditions. L'histogramme de gauche représente les anciennes conditions de cultures et celui de droite les nouvelles conditions (YT₂D₅, Tp.cit plus phase décane). Une différence notable est que la quantité totale d'acide gras produite par OléoX CpFAH12 dans les anciennes conditions est supérieure à celle de la nouvelle méthode, mais tous les acides gras ne sont pas impactés de la même manière. Les acides gras dont la quantité diminue de manière significative sont les C16 (acides palmitique et palmitoléique) et l'acide linoléique, qui représentent respectivement 78%, 68% et 59% de la quantité produite dans les anciennes conditions. L'acide stéarique est en très faible quantité dans les deux cas, donc sa diminution n'a que peu d'impact sur la teneur totale en acide gras.

L'acide oléique augmente faiblement dans les nouvelles conditions. Même si la quantité d'acides gras est plus faible, le point d'intérêt est que la production d'acide ricinoléique est similaire entre les deux conditions. La diminution de la quantité d'acide linoléique produite explique pourquoi le taux d'hydroxylation a augmenté de 70% à 80% dans les nouvelles conditions.

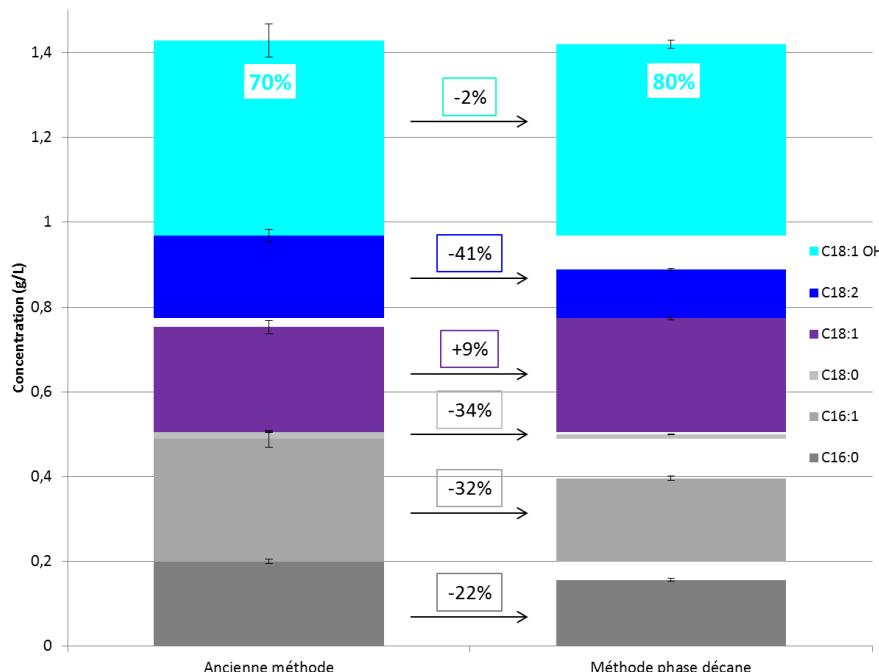


Figure III.1.3 : Comparaison de la production d'acide gras des souches OléoX CpFAH12 dans les anciennes (gauche) et nouvelles (droite) conditions de culture. Les barres de chaque acide gras sont séparées par des intervalles blancs correspondant à la différence. Les pourcentages encadrés correspondent à la quantité de l'acide gras correspondant comparé aux anciennes conditions. Le taux d'hydroxylation est indiqué en cyan dans le rectangle blanc.

Les barres d'erreurs entre des dupliques techniques sont bien plus faibles que pour des cultures réalisées sans phase décane. Le tableau III.1.3 montre les coefficients de variation, et il est possible de confirmer que les nouvelles conditions ont un effet bénéfique sur la reproductibilité avec moins de 3% de variabilité. L'amélioration est vraiment significative dans le cas de l'acide ricinoléique (majoritairement sécrété) puisque la variabilité a diminué de 8.6% à seulement 2.1%.

	Écart-type/moyenne des concentrations en acide gras dans le milieu total					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:1 OH
Ancienne méthode	2,8%	6,9%	4,8%	6,4%	7,7%	8,6%
Méthode phase décane	2,2%	2,8%	2,3%	1,6%	2,6%	2,1%

Tableau III.1.3 : Tableau récapitulatif des coefficients de variation (écart type/moyenne) de la production d'acide gras pour les anciennes et nouvelles conditions de culture. Quatre réplicats technique de la souche OléoX CpFAH12 sont mis en culture.

Des cultures avec de l'acide oléique ajouté dans la phase décane ont été réalisées pour voir si OléoX est capable d'utiliser cet acide gras pour de la bioconversion. Aucune augmentation de la concentration en acide oléique, linoléique ou ricinoléique chez les souches n'a été obtenue et il n'y a pas eu de diminution significative de la concentration en acide oléique de la phase décane. Il semblerait que les acides gras contenus dans la phase décane ne puissent pas être métabolisés de manière significative par *Y. lipolytica* en 48 heures. Donc toutes les cultures réalisées par la suite auront une phase décane sans acide oléique.

f. Amélioration du milieu de culture

i. Source de carbone et ratio carbone/azote

Plusieurs expériences de cultures ont été réalisées en faisant varier la composition du milieu. Les résultats de ces expériences ont permis de montrer que l'utilisation de milieu minimum (composition donnée dans la partie II Matériels & Méthodes), censé favoriser l'accumulation par un fort ratio carbone/azote, n'est pas pertinente pour ce type de production. En effet, les quantités de lipides accumulés sont seulement de l'ordre de 3 à 4 % alors que des souches classiques de *Y. lipolytica* peuvent facilement accumuler 20 à 30 % de lipides dans ces conditions. Ceci est à mettre en relation avec l'incapacité de la souche à stocker ses lipides sous forme de triacylglycérols.

Ensuite, utiliser du glucose ou du glycérol pour la croissance n'impacte aucunement la production de lipides ou la biomasse (figure III.1.4). Par contre, le changement du tampon phosphate pH 7 à tampon citrate pH 4 a un impact assez important dans une culture avec du décane. Avec le tampon phosphate, la quantité d'acide palmitique (C16:0) produite est beaucoup plus importante et il se retrouve dans la phase décane en proportion non-négligeable. De plus, le taux de conversion et la quantité d'acide ricinoléique produit sont aussi plus importants, de même que la biomasse produite.

La contamination de la phase décane par les C16 n'est pas souhaitée donc les cultures se feront avec le tampon citrate pH 4. On notera que dans tous les cas le ratio d'hydroxylation reste le même.

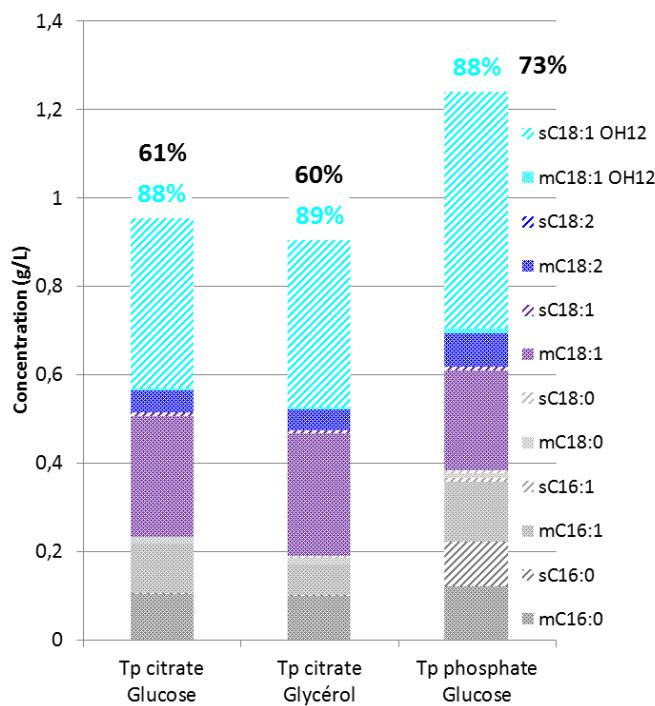


Figure III.1.4 : Concentrations totales des acides gras produits par la souche OléoX zêta CpFAH12 au cours de la culture dans différentes conditions de milieu. Les concentrations sont mesurées après 48 heures de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé pour la première colonne est le YT₂D₅, Tp.cit ; dans la deuxième colonne le glucose est remplacé par 46g.L⁻¹ de glycérol ; dans la troisième colonne le tampon citrate pH 4 est remplacé par un tampon phosphate pH 7. Toutes les cultures ont une phase décane de 1 mL (10%). Le taux d'hydroxylation (cyan) et le pourcentage de conversion (noir et gras) sont indiqués.

ii. Effet d'une supplémentation en fer sur la production d'acide ricinoléique

L'hydroxylase de *Claviceps purpurea* est une enzyme avec un centre à deux ions fers qui convertit l'acide oléique estérifié en position sn2 sur la phosphatidylcholine. Une expérience a été d'ajouter au milieu de culture soit de la choline, soit du fer. La concentration du Fe²⁺ ajouté dans le milieu est de 144 µmol.L⁻¹ (concentration de fer identique à celle ajoutée lors de culture en milieu synthétique) et celle de la choline ajoutée est de 20 mmol.L⁻¹. Les suivis de la densité optique (DO) sur 48 heures montrent une croissance identique pour la souche OléoX zêta pTEF CpFAH12 quel que soit le milieu. La quantification des acides gras s'est faite aussi après 48 heures de culture. Pour le milieu avec la choline, on observe le même profil d'acides gras qu'avec le milieu non-complémenté (figure III.1.5) et le ratio d'hydroxylation reste par conséquent le même. La complémentation avec le sulfate de fer a par contre un effet sur le profil d'acide gras obtenu avec une augmentation de la conversion de l'acide oléique en acide linoléique et ricinoléique (58% pour le témoin contre 85% avec la supplémentation). La quantité d'acide ricinoléique est donc améliorée d'un facteur 1,6. En parallèle un milieu avec ajout de fer et de choline a été réalisé et il montre exactement le même profil que l'ajout de fer seul.

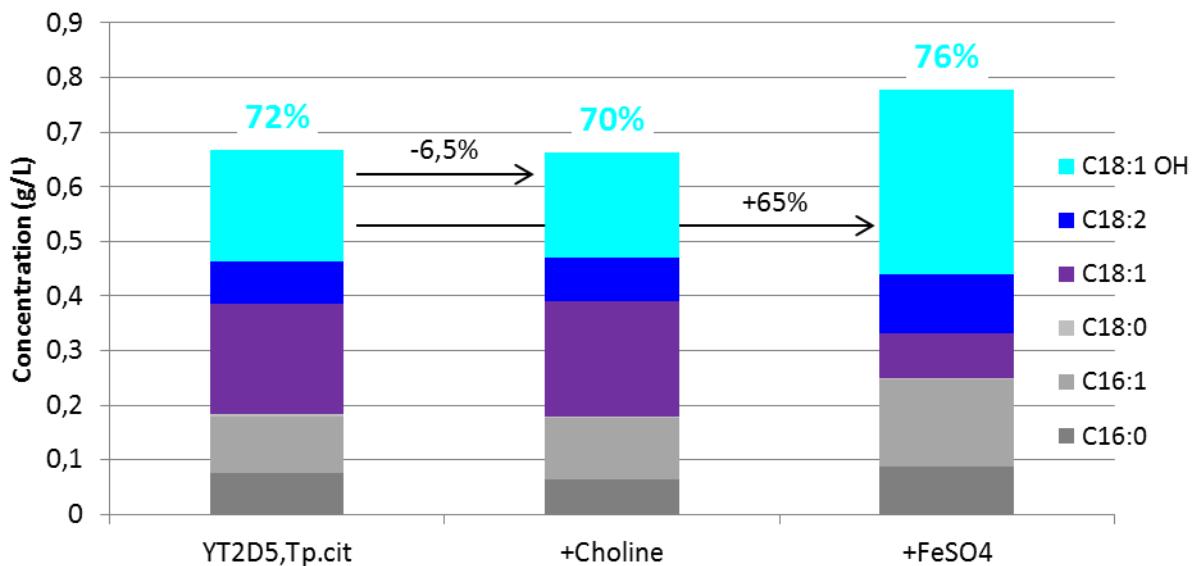


Figure III.1.5 : Production d'acide gras de la souche OléoX zéta pTEF CpFAH12 dans le milieu riche YT_2D_5 , Tp.cit complémenté avec différents composés. Les flèches et nombres en noir indiquent la variation de la concentration d'acide ricinoléique par rapport au témoin. Le taux d'hydroxylation est indiqué en cyan.

Un des aspects de nos cultures pouvant être limitant pour la production d'acide ricinoléique semble donc être la quantité de fer disponible dans le milieu. Comme le promoteur pTEF est fort et constitutif, peut-être que la quantité d'hydroxylase synthétisée est supérieure à la quantité de fer disponible, et que l'hydroxylase entre en compétition avec toutes les autres activités métaboliques nécessitant du fer, comme les cytochromes b5 qui servent de donneur d'électron à la réaction. Comme la croissance est similaire, cette carence en fer ne semble pas avoir d'impact sur la croissance mais juste sur la conversion de l'acide oléique en acide ricinoléique.

Pour voir plus en détail l'effet du fer et obtenir la concentration optimale, il serait possible de tester différentes concentrations. Tester d'autres contre-ions ou niveau d'oxydation ($Fe_2(SO_4)_3$ par exemple) pourrait aussi permettre de déterminer la forme la plus assimilable. Enfin, d'autres types de di-cations métalliques pourraient être testés, comme le zinc. Comme celui-ci est retrouvé dans le site actif des désaturases membranaires cristallisées (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015), il doit pouvoir y accéder et peut-être rentrer en compétition avec le fer, voir possiblement modifier la catalyse.

g. Conclusion et Perspectives

Cette nouvelle méthode de culture avec une phase décane a permis l'amélioration des conditions de production, en particulier de réduire la variabilité au sein d'une même expérience. Maintenant que les conditions de culture et d'analyses sont établies et fonctionnelles, la prochaine étape sera de réduire la variation due à la souche elle-même. En effet même si au sein d'une même culture les réplicats biologiques sont corrects, la production sur plusieurs cultures différentes de la même souche est variable.

B. La conservation des souches productrices d'acide ricinoléique et leur stabilité

a. Récapitulatif des modifications déjà apportées à la souche châssis OléoX

Jusqu'à présent, les souches utilisées pour la production sont dérivées de la souche OléoX qui porte dix délétions et est auxotrophe pour la leucine et l'uracile (les gènes LEU2 et URA3 sont utilisés comme marqueurs de sélection des souches recombinantes). La combinaison de ces dix délétions a permis d'augmenter la disponibilité du substrat pour l'enzyme de bioconversion et a été indispensable à l'obtention d'une souche productive. Auparavant, des souches avec moins de modifications ont été testées mais aucune n'a permis d'obtenir des titres significatifs d'acide ricinoléique. Le détail des modifications apportées a été détaillé dans le paragraphe introductif de la partie 1. Succinctement, la dégradation des acides gras par la β -oxydation a été neutralisée par la délétion des six gènes POX, les acyltransférases Yl.DGA1, Yl.DGA2 et Yl.LRO1 impliquées dans la synthèse des triacylglycérols ont été déletées pour ne pas immobiliser l'acide oléique dans les réserves de la cellule et enfin la désaturase endogène Yl.FAD2 a été déletée pour ne pas avoir de compétition pour le substrat. Ces modifications ont eu pour effet de baisser l'efficacité de transformation de la souche ($6,8 \cdot 10^1$ UFC. μ g⁻¹ plasmide pour 50 μ L de cellules compétentes) et son taux d'accumulation de lipides (de 20-30% à 3-4%).

b. La nécessité d'utiliser des souches fraîchement transformées pour avoir une production reproductible d'acide ricinoléique

Quand j'ai commencé ma thèse, il était commun de garder les souches de *Yarrowia lipolytica* plusieurs semaines ou mois sur des milieux nutritifs gélosés conservés à 4°C et de réaliser en parallèle un stock glycérol conservé à -80°C pour une conservation longue durée. Pour lancer une culture, des précultures en milieu liquide étaient inoculées avec une colonie chacune. Les densités optiques (DO) de ces précultures étaient mesurées après 24 heures de culture et servaient à inoculer les erlenmeyers. Lorsque la souche avait des problèmes pour repartir convenablement, une nouvelle gélose était faite à partir de l'ancienne ou à partir du stock glycérol. Pour obtenir une souche productrice, la souche OléoX a été transformée avec une cassette d'expression (linéaire) qui s'intègre aléatoirement dans le génome (voir partie II.3.A et H). Celle-ci est composée de :

- 1) La séquence codante de l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* CpFAH12, dont le biais de codon a été optimisé pour *Y. lipolytica* sous le contrôle du promoteur fort et constitutif pTEF (Müller et al. 1998)
- 2) Le marqueur de sélection URA3

3) Deux zones zéta1 et zéta2 (chacune étant la moitié de la zone zéta) bordant la cassette qui favorisent son intégration dans le génome

Les transformants ont été sélectionnés sur leur auxotrophie à l'uracile (URA3) et une souche productrice caractéristique a ensuite été sélectionnée et rendue prototrophe pour pouvoir lancer des productions.

Après plusieurs cultures, il s'est avéré que ces souches donnaient des productions d'acide ricinoléique de plus en plus faibles et variables entre les différentes cultures. Suspectant une évolution de la souche, nous avons d'abord mis en place une procédure de conservation des souches uniquement en stock glycérol (-80°C). Mais même à partir de stocks issus d'une même culture, la quantité d'acide ricinoléique produite diminuait par rapport à la même souche cultivée fraîchement après transformation. Plusieurs mois de la thèse ont été dédiés à la résolution de ce problème, mais malheureusement sans succès.

En revanche, différentes cultures lancées séquentiellement avec des souches OléoX fraîchement transformées avec CpFAH12 donnent des résultats comparables, nous avons donc décidé d'arrêter de conserver les souches productrices d'acide ricinoléique à 4°C ou -80°C. Seules les souches châssis OléoX sans désaturases hétérologues sont conservées sous forme de stocks glycérols à -80°C et chaque culture est lancée directement après la transformation avec l'hydroxylase. Cette méthode alourdit de façon conséquente la quantité de travail par culture, mais il s'agit de la seule alternative trouvée pour nous permettre de comparer nos souches les unes avec les autres et poursuivre le travail de thèse.

Une hypothèse vraisemblable est que la toxicité de l'acide ricinoléique est responsable de cette variabilité. Il a été montré dans le paragraphe précédent que l'acide ricinoléique est délétère pour les souches, d'autant plus s'il était produit *in situ*. Même si tous les organismes possèdent des mécanismes pour assurer le maintien de leur génome, des mutations spontanées peuvent apparaître dans la souche. Or comme la production d'acide ricinoléique est délétère, la pression de sélection est inversée : la cellule qui obtient une mutation diminuant la production d'acide ricinoléique a une meilleure croissance et va finir par s'imposer dans le milieu.

Dans le cas des stocks glycérols conservés à -80°C, la pression de sélection ne devrait pas s'appliquer à cause du ralentissement du métabolisme. Un autre phénomène entre donc en jeu : la présence d'acide ricinoléique dans les membranes pourrait les fragiliser et conduire à davantage de mortalité (lyse) pour les cellules dont la membrane comporte le plus d'acide ricinoléique. Lors de la reprise de la culture, il y a encore moins de cellules productives et donc la pression de sélection négative reprend avec des souches encore moins productives que les fois précédentes.

Une autre origine possible de la variabilité est liée à la manière de transformer les cellules. Les cassettes sont insérées aléatoirement dans le génome et donc la manière dont les gènes sont exprimés dépend du locus où ils se retrouvent (Mauersberger et al. 2001). De plus, l'insertion aléatoire peut conduire dans certains cas à avoir des insertions génomiques multiples ce qui fausse la comparaison entre les clones. Ces insertions multiples peuvent être soit en tandem, c'est-à-dire lorsque plusieurs cassettes s'intègrent les unes à la suite des autres au même locus, soit plusieurs intégrations indépendantes à des locus différents.

C. Amélioration de la souche châssis capable d'une expression reproductible

a. L'ajout d'une plateforme d'intégration dans la souche OléoX pour améliorer la reproductibilité de l'expression

Pour limiter la variabilité liée à cette intégration, une stratégie similaire à celle de Bordes et al, 2007 (Bordes et al. 2007) a été suivie. Il s'agit d'intégrer à un locus donné de la souche OléoX (construite précédemment pour produire de l'acide ricinoléique (Beopoulos et al. 2014)) une plateforme d'intégration génomique appelée zêta. Cette plateforme correspond à la séquence des « répétitions terminales longues » (« Long Terminal Repeats ») du rétrotransposon *Ylt1*, qui est présent uniquement chez les souches américaines (Schmid-Berger et al. 1994; Magnan et al. 2016) et donc absent chez la souche OléoX. Cette séquence favorise la recombinaison chez la levure *Y. lipolytica* (Juretzek et al. 2001; Mauersberger et al. 2001; Bordes et al. 2007). Si la cassette d'expression est encadrée par cette séquence zêta, cela pourrait permettre de favoriser l'intégration au locus ciblé et donc de réduire le biais dû à l'expression aléatoire dans le génome. De plus, d'après la publication précédente de l'équipe, cela aurait également un effet positif sur le taux de transformation de la souche. La souche ainsi formée sera appelée par la suite OléoX zêta.

b. Construction de la souche

Le locus ciblé dans la construction de la souche OléoX zêta est le locus du gène LEU2 qui permettra de cribler facilement les souches ayant intégré correctement la plateforme. En effet, la souche OléoX est auxotrophe pour la leucine car son gène LEU2 est inactif après une délétion *StuI* (*leu2_270*). D'autre part, on travaille avec un plasmide contenant la plateforme zêta et *Leu2_t*, une forme tronquée en 3' du gène de sélection pour la leucine (figure III.1.6). La cassette de transformation est obtenue en linéarisant le plasmide par *HincII*, qui coupe dans le gène *Leu2_t*. Si la cassette formée s'intègre aléatoirement dans le génome, la souche obtenue ne sera pas auxotrophe pour la leucine car c'est la forme tronquée de gène LEU2 qui sera présente et qui ne sera par conséquent pas fonctionnelle. Par contre, s'il y a recombinaison homologue entre *Leu2_t* de la cassette de transformation et le gène *Leu2_270* du génome, un gène LEU2 fonctionnel est formé en plus d'une copie accumulant les deux mutations (*Leu2_270t*).

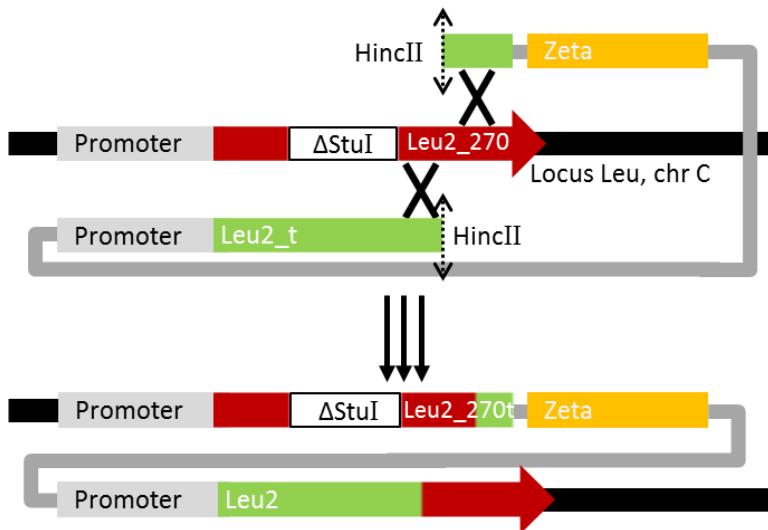


Figure III.1.6 : Schéma simplifié de la construction de la plateforme zéta au locus LEU2. La ligne noire épaisse représente le chromosome C (chr C) aux alentours du locus LEU2 portant le gène inactif Leu2_270 (rectangle gris + flèche rouge avec délétion StuI en blanc). La ligne grise représente le plasmide portant la plateforme zéta (jaune-orange) et le gène Leu2_t tronqué (rectangle gris + rectangle vert) par la digestion HincII de la cassette. Après transformation et recombinaison homologue, la cassette peut s'intégrer à ce locus pour former un gène LEU2 fonctionnel et la plateforme zéta (figure en bas). Figure tirée de (Robin et al. 2019).

Les transformants sont sélectionnés sur un milieu minimum dépourvu de leucine et parmi les clones obtenus, certains sont vérifiés par PCR pour s'assurer de l'intégration correcte de la cassette au locus LEU2 (figure III.1.7). La taille théorique du locus avec l'insertion de la cassette est de 6337pb alors que le locus sauvage à une taille attendue de 1201 pb. La figure III.1.7 montre que 12 clones sur les 13 testés ont un profil correspondant à une intégration au locus désiré. La souche n°2 a donc été sélectionnée pour servir de nouvelle souche châssis OléoX zéta. Cette souche n'a plus qu'un seul marqueur d'auxotrophie, l'uracile, et ne sera donc utilisée que lorsqu'un seul gène devra être introduit dans la souche.

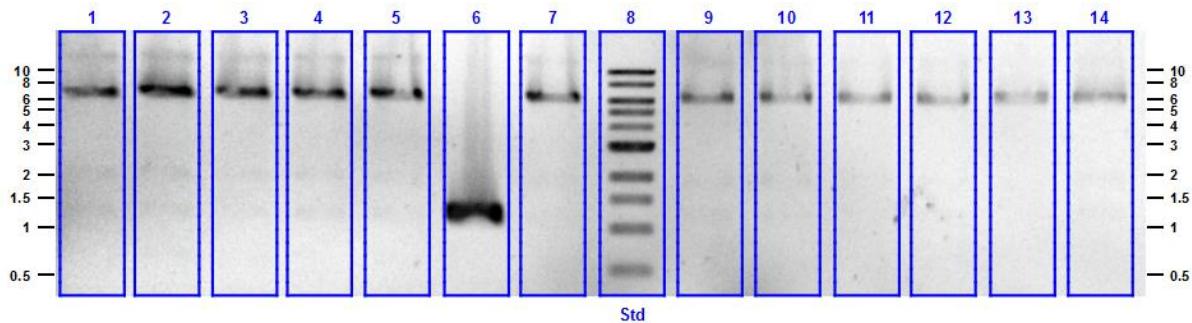


Figure III.1.7 : Électrophorèse de vérification du locus LEU2. La piste 8 correspond au marqueur de taille 1kpb, les indications de tailles sont affichées de chaque côté de la figure (bas en haut : 0,5|1,5|2|3 (forte intensité) |4|5|6|8|10kpb). Les pistes 1 à 7 et 9 à 14 correspondent à des colonies ayant poussées sur géloses YNBura. Le couple d'amorce utilisé est ChromC_YI.Leu2-amont_d / ChromC_YI.Leu2-aval_r.

c. Validation de la souche

Lorsqu'elle est transformée avec CpFAH12 ou la désaturase de *Claviceps purpurea* (CpFAD2), la souche OléoX zêta permet un meilleur taux d'intégration, $62 \cdot 10^1$ UFC. μ g⁻¹plasmide, contre environ $6,8 \cdot 10^1$ UFC. μ g⁻¹plasmide pour une souche OléoX (soit environ un facteur 10, pour des quantités équivalentes de cellules compétentes).

Une première vérification par PCR au locus LEU2 a montré que **sur les neuf clones avec la plateforme zêta testés, ils ont tous intégré le transgène au locus ciblé**. On notera que cette analyse ne permet pas de vérifier s'il y a une seconde intégration aléatoire dans le génome. Cette vérification aurait pu être faite par qPCR sur l'ADN génomique de la levure par comparaison avec un gène de référence présent à une seule copie dans le génome. Cependant, la double intégration reste un phénomène limité chez la levure *Y. lipolytica*.

Pour vérifier que le changement de souche châssis a un effet sur la reproductibilité de la production d'acide gras, une culture sur des souches exprimant CpFAH12 dans les deux châssis a été réalisée avec la nouveau mode de conduite de culture. Quatre clones OléoX zêta et cinq clones OléoX ont été cultivés. Sur cette manipulation, les résultats concernant la production de biomasse et de lipides ne révèlent aucune différence significative entre les deux cultures que ce soit pour les quantités produites ou les écarts-types. Ainsi, les résultats ne permettent pas de montrer un effet positif de la plateforme zêta sur la variabilité. Avec l'ancienne méthode, il était courant qu'un clone sur les trois réplicats ait une teneur en acide gras différente des deux autres. Or cette fois ci par « (mal)chance », les cinq clones lancés ont donné des résultats similaires. Il aurait fallu traiter plus de clones pour s'assurer de ce gain de reproductibilité. Cependant, l'effet positif sur la reproductibilité de l'expression avait été montré très clairement à partir de l'analyse d'un grand nombre de transformants (196) dans la publication de (Bordes et al. 2007). Ceci avait été rendu possible car le système pouvait être miniaturisé ce qui n'est pas le cas aujourd'hui pour la production et l'extraction des lipides. **De plus, au cours des diverses expériences menées par la suite, j'ai pu noter que l'apparition de clones prototrophes n'ayant pas intégré de gènes fonctionnel a vraiment diminué.** Ainsi, même si la preuve que la diminution de la variabilité n'a pas été apportée par cette expérience, la souche OléoX zêta apporte réellement un avantage sur ce point.

d. Discussion

Pour avoir une souche permettant de comparer des variants d'une même enzyme, une plateforme d'intégration zêta a été introduite dans la souche châssis OléoX. Le locus LEU2 a été choisi comme cible car il permettait une sélection facile des transformants ayant effectué la recombinaison homologue avec *leu2-270*. Ce système de criblage nous a permis d'éviter une étape longue et coûteuse de criblage d'un grand nombre de clones par PCR, car la recombinaison homologue est couramment peu efficace chez *Y. lipolytica*. De plus, la leucine est un acide aminé assez fréquent dans les protéines (8,71% des codons chez *Y. lipolytica*,

<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4952&aa=15&style=N>), donc les enzymes de sa voie de biosynthèse doivent être exprimées convenablement. Le locus LEU2 est donc susceptible d'être dans une zone plutôt accessible et favorable à l'expression. Mais une des limitations à l'utilisation de cette stratégie est que le marqueur de sélection LEU2 ne pourra pas être excisé de la souche par l'utilisation du système Cre-Lox, comme cela est le cas lors d'une transformation avec une cassette issu du plasmide Jmp62 LEU2ex. Donc les souches zêta n'ont plus qu'un seul marqueur de sélection utilisant l'auxotrophie, le gène URA3 pour l'uracile. Cela n'est pas pénalisant pour nos expériences pour l'amélioration de l'hydroxylase car un seul gène à la fois a besoin d'être exprimé dans les expériences de chimères et mutants. Cependant pour les expériences nécessitant d'exprimer deux gènes (dans le cadre de la partie III.3 sur le métabolisme de lipides par exemple), cette souche ne pourra pas être utilisée.

Les différentes transformations réalisées au cours de la thèse montrent une diminution des faux positifs, c'est-à-dire des clones ayant récupérés le marqueur de sélection URA3ex mais sans le gène souhaité (par exemple CpFAH12). Des cultures lancées avec de tels clones ne donnent pas d'acide ricinoléique alors que les souches sont prototrophes. Cela est dû soit à l'intégration du marqueur de sélection uniquement, soit à la réparation par recombinaison homologue du locus URA3 (inactivé par une intégration de 900 bp dans sa séquence (Wolf 1996)).

D. Conclusion générale, Discussion et perspectives

a. Synthèse des résultats obtenus

Ce chapitre récapitule de façon organisée toutes les différentes améliorations qui ont été apportées au système de production. Cependant, ces améliorations n'ont pas été apportées de manière linéaire mais au fur et à mesure des expériences. La combinaison de toutes ces améliorations a permis d'obtenir un procédé fiable et robuste qui a permis par la suite de comparer entre elles, et par rapport au(x) témoin(s), différentes souches productrices d'acide ricinoléique. **Les principales améliorations portent d'une part sur le milieu et le mode de culture, et d'autre part sur l'utilisation de la souche châssis OléoX zêta et l'utilisation de clones fraîchement transformés.**

Ainsi le mode de culture choisi, de type « fermentation » extractive, nous a permis à la fois de limiter la toxicité du produit synthétisé, comme le prouve l'état physiologique des cellules, et surtout d'améliorer la reproductibilité et la sensibilité pour son analyse. Dans la partie suivante, ce point sera discuté au regard de la littérature.

La souche OléoX zêta, construite pour assurer la reproductibilité de l'expression de l'enzyme, permet une intégration du transgène au locus désiré. De façon concomitante, une amélioration du taux de transformation est observée. Concernant la reproductibilité des transformants testés, même si cela n'a pas pu être démontré de façon statistique, nous avons observé au cours des expériences suivantes une vraie amélioration, avec une forte diminution des faux positifs. Ainsi, la souche OléoX zêta a été utilisée pour la poursuite de ces travaux de thèse et a permis de réduire le nombre de transformants à tester. Deux clones au lieu de trois seront donc lancés en culture car la probabilité d'avoir deux souches avec une intégration incorrecte est vraiment très faible. Cette réduction du nombre de réplicats nécessaires permet de lancer plus de souches différentes en parallèle et donc de tester davantage de gènes différents pendant une même culture.

Il reste cependant un point noir à notre système, c'est la stabilité de la souche due à la toxicité de l'acide ricinoléique. Dans les paragraphes suivants, nous essaierons de comprendre à quoi est due cette toxicité et d'envisager différentes stratégies pour y remédier.

Mais le système permet d'obtenir des résultats suffisamment reproductibles et sensibles pour permettre d'étudier l'hydroxylase de *Claviceps purpurea* en détail. Dans la partie suivante, les déterminants de la spécificité de cette enzyme seront étudiés avec notre système pour essayer de déterminer les acides aminés impliqués dans l'hydroxylation ou la désaturation. Puis, dans un second temps, des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique seront exprimées en parallèle d'une hydroxylase pour une amélioration de la production.

b. La toxicité de l'acide ricinoléique : état des lieux et perspectives d'amélioration

i. État des lieux

Dans la littérature, plusieurs équipes travaillant sur la production de l'acide ricinoléique de façon hétérologue chez différents organismes ont été confrontées à la toxicité de cet acide gras (Van de Loo et al. 1995; Broun et al. 1998; Burgal et al. 2008; Holic et al. 2012; Yazawa et al. 2013a; Yazawa et al. 2013b; Yazawa et al. 2014; Bayon et al. 2015; Meesapyodsuk et al. 2015; Kajikawa et al. 2016; Aryal and Lu 2018). Les différentes tentatives ont donné des résultats décevants avec une faible production d'acide ricinoléique. Les premiers articles faisant état de la production d'acide ricinoléique chez *Schizosaccharomyces pombe* montrent une toxicité importante du produit affectant la croissance de la souche (Holic et al. 2012; Yazawa et al. 2013a). La raison de cette toxicité est probablement la synthèse de l'acide ricinoléique sur la position sn2 de la phosphatidylcholine. Comme les phospholipides sont les composants majoritaires des membranes biologiques, la présence de sn2-ricinoléoyl-phosphatidylcholine dans les membranes biologiques (Holic et al. 2012; Yazawa et al. 2013a) est probablement néfaste pour les organismes qui en produisent. En effet, la présence d'une fonction polaire au sein de la couche lipidique doit conduire à la désorganisation des membranes cytoplasmiques et modifier fortement la perméabilité et/ou la fluidité membranaire. Mais tous les organismes ne tolèrent pas l'acide ricinoléique de la même manière. Chez *Pichia pastoris*, l'acide ricinoléique est principalement accumulé sous forme libre et non pas estérifié (Meesapyodsuk et al. 2015) et même si les auteurs ne font pas mention d'une toxicité, aucune des données présentées ne permet de montrer qu'il n'y en a pas. Le premier article faisant état de la production d'acide ricinoléique chez *S. pombe* montre une toxicité importante du produit affectant la croissance de la souche (Holic et al. 2012).

Chez les plantes produisant des acides gras hydroxylés à partir d'enzymes hétérologues, la toxicité se traduit généralement par des diminutions du taux de germination (Lu et al. 2006; Dauk et al. 2007; Lu and Kang 2008; Snapp et al. 2014).

ii. Améliorer encore la sécrétion de l'acide ricinoléique ?

De manière intéressante, le groupe travaillant sur *Schizosaccharomyces pombe* a poursuivi ses travaux et a montré que lorsque une phospholipase A2 était surexprimée chez une *S. pombe* produisant de l'acide ricinoléique (Yazawa et al. 2013b), cela permettait à la fois la sécrétion de l'acide ricinoléique et de limiter sa toxicité sans toutefois s'en affranchir complètement. En effet, la croissance de la souche surexprimant les deux gènes (celui de l'hydroxylase et celui de la phospholipase) reste moins rapide que la souche n'exprimant que les vecteurs.

De la même manière, la souche OléoX exprimant CpFAH12 produit elle aussi de l'acide ricinoléique extracellulaire, et bien que la majorité de celui-ci soit sécrétée dans le milieu, un défaut de croissance est tout de même observé par rapport à la souche sauvage.

Le ou les mécanisme(s) conduisant à la sécrétion d'acide ricinoléique reste(nt) toujours inconnu(s). *Yarrowia lipolytica* ne sécrète pas d'acides gras conventionnels dans les conditions normales mais des travaux réalisés par Ledesma-Amaro sur la sécrétion d'acide gras (Ledesma-Amaro et al. 2016) ont permis d'obtenir des souches sécrétant jusqu'à environ 3 g.L^{-1} d'acides gras classiques dans le milieu pour des cultures en erlenmeyer. Ces souches permettant la sécrétion d'acides gras accumulent des modifications ayant pour but de favoriser la production d'acides gras libres, par la délétion de l'acyl-CoA synthétase FAA1 notamment, et sans cibler d'hypothétiques gènes impliqués dans le transport. Ainsi, la sécrétion d'acide ricinoléique est peut-être liée à une forme libre majoritaire dans la cellule qui peut être expliquée par deux facteurs :

- 1) *Y. lipolytica* pourrait posséder un mécanisme de protection en réponse à la désorganisation des membranes cytoplasmiques provoqué par l'acide ricinoléique estérifié sur la phosphatidylcholine. Une enzyme de réorganisation membranaire avec une activité phospholipase non-spécifique pourrait hydrolyser et libérer l'acide ricinoléique sous forme libre.
- 2) La forme libre pourrait ensuite être sécrétée par le même mécanisme que les acides gras conventionnels. Ce mécanisme non élucidé à ce jour pourrait être une diffusion passive à travers la membrane ou un phénomène actif pour éviter la toxicité des acides gras libres mais il doit être finement régulé par la souche dans ce cas. Il est intéressant de noter que les acides gras dicarboxyliques (Thévenieau 2007) produits pas la voie de l' ω -oxydation chez la levure *Y. lipolytica* sont également sécrétés et que ces acides gras présentent des propriétés similaires à celle de l'acide ricinoléique en terme de polarité.

Cette hypothèse est également supportée par les travaux déjà cités sur la levure *S. pombe* (Holic et al. 2012; Yazawa et al. 2013a; Yazawa et al. 2013b; Yazawa et al. 2014). Cette levure exprimant seulement CpFAH12 accumule intra-cellulairement l'acide ricinoléique alors qu'elle le sécrète une fois que la phospholipase Pgl7 est exprimée conjointement.

Notons que la sécrétion est un avantage non négligeable dans le cadre d'un procédé car cela permet de s'affranchir de coûteuses étapes d'extraction et de purification du produit d'intérêt et permet de rendre le procédé compétitif d'un point de vue économique (Abghari and Chen 2014; Cuellar and van der Wielen 2015).

Cette stratégie, consistant à favoriser la libération de l'acide ricinoléique de la phosphatidylcholine, nous a paru particulièrement intéressante et fait l'objet d'une partie du chapitre résultats III.3.B de ma thèse.

iii. Des formes d'acide ricinoléique estérifiées pour limiter sa toxicité

Chez les plantes autre que le ricin exprimant des hydroxylases hétérologues (Lu et al. 2006; Lu and Kang 2008; Snapp et al. 2014), lorsque la production d'acide ricinoléique est ciblée dans les graines, seul un faible taux de germination est obtenu (Dauk et al. 2007). Cependant, nombreuses études montrent que l'expression de gènes impliqués dans le renouvellement des phospholipides et/ou la synthèse des triacylglycérols (TAG) permet généralement la diminution de cet effet toxique et conduit également à une augmentation de la quantité d'acides gras hydroxylés produits.

De nombreuses études ont eu lieu chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (récapitulés dans le tableau III.1.4), et la plupart de celles ayant conduit à une amélioration de la viabilité favorisaient le stockage d'acide ricinoléique dans les TAG. Les deux lignées équivalentes d'*Arabidopsis thaliana*, CL7 et CL37 (Columbia ΔFAE1 nmt1-RcFAH12), sont les plus utilisées comme références dans la production d'acides gras hydroxylés (AGH). Dans ces lignées, l'expression de l'hydroxylase de *Ricinus communis* et la délétion de l'elongase C18 (FAE1) endogène permettent des teneurs en AGH totaux entre 17 et 18% et une teneur d'AGH dans les TAG de l'ordre de 20,2% (Lu et al. 2006).

Par exemple, Burgal et ses collègues (Burgal et al. 2008) ont obtenu une augmentation de la production d'acide ricinoléique en co-exprimant RcDGAT2, la teneur en acide ricinoléique de l'huile des graines est alors passée de 17% à presque 30%. La composition des TAG a également été modifiée, avec d'avantage de tri- et bi-ricinoléoyl (respectivement trois et deux résidus ricinoléoyl estérifiés).

Enzymes co-exprimées	Amélioration de la production	Références
RcDGAT2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 22,9% (T1) et 27,5% jusqu'à 29% (T3)	(Burgal et al. 2008)
RcDGAT1	- %(AGH/AGT) similaire : 18,5% (T1)	
RcLPAT2	- %(AGH/AGT) similaire : 18,3% (T1)	
RcLACS4	- Diminution légère %(AGH/AGT) : 15,2% (T1)	
AtDGAT2	- %(AGH/AGT) similaire : 17,8% (T1)	
RcDGAT2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 20,6% (T2) - Augmentation %(AGH/TAG) : 37%	(Shockey et al. 2019)
RcLPAT2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 19,0% (T2) - Augmentation %(AGH/TAG): 27,4%	
RcDGAT2 + RcLPAT2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 24,2% (T2) Significativement plus élevé que RcDGAT2 ou RcLPAT2 seul	
RcDGAT2 + RcLPAT2 + RcGPAT9	- Augmentation %(AGH/AGT) : 21,8% (T2) Significativement similaire à RcDGAT2 + RcLPAT2 - Augmentation %(AGH/TAG) : 37,2%	
RcPDCT1	- Amélioration %(AGH/AGT) : 23,3% (homozygote)	(Hu et al. 2012)
RcPDCT1 + RcDGAT2	- Amélioration %(AGH/AGT) : 28,5% (homozygote)	

RcPDAT1-1	- Diminution %(AGH/AGT) : 15,25% (T1 hétérozygote)	
RcPDAT1-2	- Amélioration %(AGH/AGT) : 24,05% (T1 hétérozygote) et 26-27% (T6 homozygote) - Augmentation %(AGH/TAG) : 28%	(van Erp et al. 2011)
RcPDAT2	- %(AGH/AGT) similaire : 16,5% (T1 hétérozygote)	
AtPDAT1	- %(AGH/AGT) similaire	
RcPDAT1A + RcDGAT2	- Augmentation légère %(AGH/AGT) : 26,7% (homozygote) comparé à RcPDAT1-2 seul	
RcPDAT1-1	- %(AGH/AGT) similaire : 17,3% (T2)	(Kim et al. 2011)
RcPDAT1-2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 19,8% (T2) et 22,1% (T4)	
RcPDAT2	- %(AGH/AGT) similaire : 17,4% (T2)	
RcPDAT1-2 + RcDGAT2	- Pas d'amélioration de %(AGH/AGT) comparé à RcPDAT1-2 seul	
RcPDAT1-2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 27%	(Bates et al. 2014)
RcDGAT2	- Augmentation %(AGH/AGT) : 24%	

Tableau III.1.4 : Récapitulatif des modifications de productions d'acide gras hydroxylés (AGH) chez *A. thaliana* CL7 ou CL37 lors de la co-expression de transférases. Les codes d'accession sont les suivants :

- RcDGAT1 & RcDGAT2 (diacylglycérol acyltransférase de *R. communis*) : EU391591 & EU391592

AtDGAT2 (*A. thaliana*) : At3g51520

- RcLPAT2 (acide lysophosphatidique acyltransférase de *R. communis*) : ?

- RcLACS4 (longue chaîne acyl-CoA synthase de *R. communis*) : EU391593

- RcGPAT9 (glycérol-3-phosphate acyltransférase de *R. communis*) : EU391594

- RcPDAT (phospholipide : diacylglycérol acyltransférase de *R. communis*)

RcPDAT1-2 : NM_001323733 / HM807521

RcPDAT1-1 : NM_001323765 / HM807520

RcPDAT2 : NM_001323718 / HM807522

AtPDAT1 (*A. thaliana*) : At5g13640

- RcPDCT1 ou RcROD1 (phosphatidylcholine diacylglycérol cholinephosphotransférase de *R. communis*) : B9RV74

L'article de Lunn et al, 2019 (Lunn et al. 2019) n'a pas été ajouté au tableau, car il porte sur l'effet délétère des AGH lors de la germination selon l'expression de RcDGAT2 et RcPDAT1A.

Dans l'article de Hu et al, 2012 (Hu et al. 2012), d'autres lignées d'*A. thaliana* ont été utilisées, la lignée Columbia (lignée sauvage type) et certaines de ses descendantes. L'expression de RcFAH12 chez la lignée Columbia a permis d'obtenir 9,9% d'AGH totaux, dont 8,3% dans les TAG. La lignée ΔROD1 (une phosphatidylcholine:diacylglycérol cholinephosphotransférase) a permis d'obtenir un %(AGH/AGT) de 5,5% et un %(AGH/TAG) de 6,1%. Puis l'expression chez ces lignées de RcPDCT1 a permis chez Columbia d'avoir une augmentation de %(AGH/AGT) : 19,9% et de %(AGH/TAG) : 16%. La lignée ΔROD1 exprimant RcPDCT1 a donné une augmentation pour %(AGH/AGT) : 9,7% et pour %(AGH/TAG) : 8,1%.

Il existe aussi un article de Chen et al, 2016 (Chen et al. 2016) dans lequel la production a eu lieu directement chez *Lesquerella fendleri* (lignée WCL-LY2) qui accumule nativement des AGH (exprimé en pourcentage des acides gras totaux) : 51,74% d'acide lesquérolique (C20:1 Δ^{11c} OH¹⁴) ; 3,07% d'acide auricolique (C20:2 Δ^{11c,17c} OH¹⁴) ; 1,20% d'acide ricinoléique (C18:1 Δ^{9c} OH¹²) et 0,24% d'acide densipolique (C18:2 Δ^{9c,15c} OH¹²).

L'expression hétérologue de RcLPAT (acide lysophosphatidique acyltransférase 2 ; JQ796917) n'a pas modifié la quantité d'AGH totaux, mais a fait varier la composition des TAG : Il y a eu

une large augmentation des TAG à 1 et 3-AGH et une diminution de ceux à 2-AGH. Il y a en particulier une **augmentation de l'acide ricinoléique à la position sn2-TAG d'un facteur 7,3.**

Globalement, la **co-expression de transférase du ricin a permis non seulement d'améliorer la production d'acide gras hydroxylé, mais également d'améliorer la viabilité des graines lors de la germination.** Cela s'accompagne d'une augmentation des TAG, en particulier de ceux contenant des AGH aux positions sn2 ou sn1/3 selon la transférase exprimée (spécificité de la position et préférence pour AGH). Il y a également une diminution de la teneur en AGH des phospholipides.

Une autre manière d'améliorer la viabilité des embryons de plante a été de co-exprimer des phospholipases, cela enlève les AGH délétères des phospholipides (donc des membranes) et les rend disponibles pour être stockés dans les TAG (car ils ne peuvent être sécrétés chez les plantes). Bayon et al (Bayon et al. 2015) ont co-exprimé RcsPLA₂α dans, une phospholipase A2 issue de *Ricinus communis*. Cette phospholipase A2 a une meilleure activité sur l'acide ricinoléique que celle d'*A. thaliana* mais elle reste bien plus active avec l'acide oléique. Comme le substrat de conversion est hydrolysé, cela explique pourquoi il y a une diminution de la quantité d'acides gras hydroxylés produite. Mais cela permet de restaurer le taux de germination. Chez *Camelina sativa*, Aryal et ses collègues (Aryal and Lu 2018) ont exprimé une phospholipase C issue de *R. communis*, RcPLC1. Ils ont observé une amélioration de la quantité d'acide gras hydroxylés produite dans les triacylglycérols : les graines de *C. sativa* exprimant uniquement RcFAH12 ont environ 15% d'acides gras hydroxylés parmi les acides gras totaux alors que dans des graines co-exprimant RcPLC1, elles en contiennent environ 22%. Cette augmentation est concomitante avec une diminution de la quantité d'acides gras hydroxylés présents dans le pool de phosphatidylcholine (de 7,5% à 5%). Une amélioration du taux de germination a aussi été obtenue.

Les gènes du métabolisme exprimés sont ceux de *R. communis*, la plante actuellement cultivée pour l'acide ricinoléique dont est originaire l'hydroxylase (Van de Loo et al. 1995; McKeon et al. 2007; Mubofu 2016). Cette plante accumule jusqu'à 90% d'acide ricinoléique, principalement sous forme de triricinoléoyl (triacylglycérol avec trois résidus ricinoléoyls), dans l'huile de ses graines. Son métabolisme doit être orienté pour cette accumulation et il est donc pertinent de rechercher les enzymes de son métabolisme présentant une spécificité pour cet acide gras inhabituel. La disponibilité du génome est un outil précieux pour ces recherches (Chan et al. 2010) et des études sur le transcriptome de l'endosperme des graines ont permis de montrer quels étaient les gènes les plus exprimés (Lu et al. 2007). Parmi eux, certains participent au métabolisme lipidique, comme les oléosines (protéines structurales de la membrane des corps lipidiques). La co-expression d'une oléosine (RcOLE2) avec RcFAH12 chez *A. thaliana* a permis une amélioration d'environ 20% de la production d'acide ricinoléique (Lu et al. 2006). Les acyltransférases, l' « acyl-carrier protein » (ACP), la lipase RcTGL3 et l'hydroxylase RcFAH12 sont elles aussi davantage exprimées chez l'endosperme de ricin.

Pour les levures, des tentatives similaires ont été réalisées. La levure *Pichia pastoris* a été utilisée par Meesapyodsuk et ses collaborateurs, qui ont montré que l'expression d'une

diacylglycérol:acyl-CoA transférase augmente la quantité totale d'acide ricinoléique produit mais surtout la quantité estérifiée (Meesapyodsuk et al. 2015). À trois jours après induction (le maximum), la souche co-exprimant CpFAH12 et CpDGAT1 a produit $171 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'acide ricinoléique contre $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le témoin sans CpDGAT1. Le taux d'acide ricinoléique estérifié passe de 9,2% à 32% avec la co-expression de CpDGAT1.

Les groupes de Yazawa (Yazawa et al. 2013a; Yazawa et al. 2013b; Yazawa et al. 2014) et Holic (Holic et al. 2012) se sont concentrés sur *Schizosaccharomyces pombe*, où l'effet toxique de l'acide ricinoléique a été contré par la surexpression d'une phospholipase A2 endogène, plg7 et d'une triglycéride lipase, ptl2.

Tous ces résultats montrent qu'utiliser des enzymes du métabolisme lipidique pourrait réduire la toxicité de l'acide ricinoléique chez *Y. lipolytica*, et/ou augmenter la quantité produite. Cette stratégie sera employée et détaillée dans la partie III.3.

Une exception quant à la toxicité de l'acide ricinoléique existe pour la diatomée *Chaetoceros gracilis* (Kajikawa et al. 2016). Lorsque du méthyl-ricinoléate est ajouté directement au milieu, il est possible d'observer l'effet délétère sur la croissance comme pour les autres organismes. Mais lorsque *C. gracilis* exprime CpFAH12, elle n'a pas de déficience de croissance et l'acide ricinoléique est accumulé en triacylglycérol mono-estolide. Un estolide est un ester formé par un acide gras hydroxylé dont la fonction hydroxyle est estérifiée par un autre acide gras, qui peut être un autre acide ricinoléique. Ces composés sont rares dans la nature, mais certaines espèces de *Physaria* (ex-*Lesquerella*) sont capables d'en produire de manière non négligeable (Hayes et al. 1995).

La formation d'estolides masque la fonction hydroxyle et pourrait expliquer un effet délétère réduit comparé à la forme libre. Mais le ou les gène(s) derrières cette réponse restent inconnus et donc il serait possible de les rechercher pour réduire la toxicité de l'acide ricinoléique chez nos souches. De plus, les estolides ont également un intérêt industriel comme lubrifiants mais ils sont produits actuellement majoritairement par voie chimique. Quelques publications montrent que des lipases, sous certaines conditions particulières, sont capables d'en synthétiser (Aguieiras et al. 2011; Martin-Arjol et al. 2013). Développer une souche capable de produire des estolides pourrait être intéressant d'un point de vue industriel, ces esters seraient probablement accumulés de façon intracellulaire.

Notons cependant que l'accumulation de l'acide ricinoléique sous forme de triglycérides ou d'esters intracellulaires posera par la suite la question de l'extraction et de son coût. Ainsi, il faudra calculer si l'augmentation de la production compense l'augmentation du coût d'extraction pour déterminer quel procédé est le plus pertinent.

iv. Améliorer la stabilité en découplant la croissance et la production de la souche

L'absence de reproductibilité des souches au cours du temps est une énorme limitation et donc une méthodologie pour résoudre ce problème et pouvoir poursuivre les travaux de thèse a été mise en place. Malheureusement, devoir transformer les souches pour chaque culture augmente de manière significative le travail à réaliser. D'autre part, cette instabilité reste un problème majeur qui devra être résolu pour envisager une application industrielle et la poursuite du projet.

Pour remédier ce problème, des souches avec un promoteur inductible plutôt que constitutif pourrait permettre de découpler la production d'acide ricinoléique de la croissance et donc d'ignorer la pression de sélection négative. Des tentatives avec l'utilisation du promoteur de POX2, inductible aux acide gras et alcanes, n'a cependant pas permis de production d'acide ricinoléique dans un milieu sans phase décane et complémenté avec de l'acide oléique. Selon Juretzek et al (Juretzek et al. 2000), pPOX2 est inhibé par la présence de glucose et glycérol, mais l'étude ne précise pas son comportement en présence à la fois de glucose et d'acide oléique. Les souches OléoX n'ayant plus la β -oxydation, elles ne peuvent pas utiliser l'acide oléique comme source de carbone et donc le milieu contient du glucose, qui réprimerait pPOX.

Une possibilité serait d'essayer le promoteur synthétique EYK1-4AB – coreTEF, récemment décrit dans la littérature (Park et al. 2019). Il est formé d'un fragment du promoteur pTEF avec plusieurs copies des séquences régulatrices inductibles à l'érythritol. Cela devrait avoir pour conséquence de limiter l'expression de CpFAH12 lors de la pousse en glucose mais d'obtenir une expression en présence de l'inducteur (l'érythritol).

c. Effets bénéfiques de la phase décane

La sécrétion de l'acide ricinoléique par *Yarrowia lipolytica* nous a permis d'utiliser une phase décane pour l'accumuler. Ce procédé est avantageux car nous avons vu qu'il permet d'obtenir un meilleur état physiologique des cellules, un taux de croissance amélioré pour les souches productrices d'acide ricinoléique, des densités optiques plus élevées et reproductibles et une mesure de l'acide ricinoléique produit plus reproductible. L'objet de ce paragraphe est d'expliquer et discuter ces résultats.

Un point non abordé dans le développement de la nouvelle méthode de culture est la proportion idéale de phase décane à utiliser. Nous avons ici utilisé 10% du volume total mais peut-être que ce volume n'est pas le volume optimal pour la production. Enfin, aucune culture en bioréacteur n'a été tentée avec ces conditions, donc tenter l'augmentation d'échelle (« scale-up ») serait une première étape pour tester la méthode de production.

Ce nouveau mode de culture a été très utile pour réaliser une comparaison de différentes souches pour ma thèse. Cependant, un point important à considérer si nous nous plaçons à l'échelle de la production industrielle est la séparation de l'acide ricinoléique à partir de la phase décane. Des tentatives pour évaporer le décane n'ont pas donné de résultats concluants pour la récupération de l'acide ricinoléique et ce genre de procédé est énergivore, d'autant plus sur un

solvant peu volatile comme le décane. L'utilisation de solvants plus volatils devrait être investiguée dans ce cadre.

i. L'amélioration du transfert d'oxygène

Un des effets est que le dioxygène est d'avantage soluble dans la plupart des solvants apolaires car c'est une molécule symétrique où les deux atomes partagent équitablement leurs électrons. Cette apolarité fait que la concentration en dioxygène dans le décane est environ dix fois supérieure à celle dans l'eau (soit environ 52 mL de dioxygène par litre contre $5,95 \text{ mL.L}^{-1}$, tableau III.1.5). C'est pour cela que des travaux ont été réalisés pour utiliser des solvants apolaires comme « transporteur d'oxygène » (Rols et al. 1990; Skłodowska and Jakiela 2017). Skłodowska et al ont utilisé différents solvants plus ou moins dense que l'eau, et ils ont remarqué que les solvants les plus denses, bien que pouvant dissoudre davantage de dioxygène, ne permettaient pas d'atteindre les résultats des solvants moins dense comme l'hexadécane. Ils ont donc conclu que le contact avec l'atmosphère de la phase organique était important pour favoriser le transfert.

Solvant (nb de carbones si alcane)	Température	Pression	Solubilité donnée (homogénéité)	Références
Eau pure	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$2,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol/mol}$ $5,95 \text{ mL.L}^{-1}$	(Battino et al. 1983)
Décane (10)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$21,78 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$ Soit environ 52 mL.L ⁻¹	
Nonane (9)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$21,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$	
Octane (8)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$2,17 \cdot 10^{-3} \text{ mol/mol}$	(Sato et al. 2014)
			$21,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$	(Battino et al. 1983)
Heptane (7)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol/mol}$	(Sato et al. 2014)
			$20,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$	(Battino et al. 1983)
Hexane (6)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$2,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol/mol}$	(Sato et al. 2014)
			$20,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$	(Battino et al. 1983)
Pentane (5)	298,2K (25°C)	101,3kPa O ₂	$2,65 \cdot 10^{-3} \text{ mol/mol}$	(Sato et al. 2014)
			$20,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/mol}$	(Battino et al. 1983)

Tableau III.1.5 : Tableau récapitulatif de la solubilité du dioxygène dans différents alcanes.

Yarrowia lipolytica est une levure aérobie stricte et une limitation courante des cultures en erlenmeyer, et même en bioréacteur, est le transfert d'oxygène lorsque la biomasse est élevée. Donc améliorer le transfert du dioxygène est censé permettre d'obtenir une plus grande quantité de biomasse, ce qui a été observé au cours des cultures. L'amélioration de la DO peut ne pas être totalement due à la diminution de l'effet toxique, mais aussi à une meilleure oxygénéation

du milieu. Avec l'observation microscopique, il est possible de remarquer que les cellules forment une corolle de gouttelettes de décane sur leur pourtour. Ce mécanisme est dû à la production de surfactants cellulaires liés à la paroi (Pareilleux 1979). Ce contact direct entre la phase décane et *Y. lipolytica* favorise le transfert de dioxygène car il n'y a pas besoin de passer par la phase aqueuse pour le transfert air → décane → cellules.

Bellou et al (Bellou et al. 2014) ont étudié l'effet du dioxygène dissous sur la morphologie de *Y. lipolytica*. Quand la quantité de dioxygène chute (inférieure à $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), cela favorise la formation d'hyphe et de pseudo-hyphe indépendamment de la source de carbone ou d'azote utilisée. Cela pourrait expliquer le meilleur état physiologique de nos cellules en présence de décane, dû à une meilleure oxygénation en fin de culture lorsque la biomasse est élevée et donc la consommation de dioxygène forte. La modification des autres paramètres a aussi pu être bénéfique à obtenir la forme levure, comme le passage à un pH plus acide qui favorise cette forme.

Rols et Goma (Rols and Goma 1991) ont réalisé d'autres travaux où ils ont utilisé de l'huile de soja comme solvant vecteur de dioxygène et ils ont montré que le transfert de dioxygène était amélioré pour les cultures de la bactérie *Aerobacter aerogenes* (résultat aussi mesuré avec *Y. lipolytica* pour (Bellou et al. 2014)). Dans ces conditions, l'huile apportée sert à la fois de source de carbone, de substrat et de phase apolaire de manière analogue au décane dans nos conditions. *Y. lipolytica* possède un métabolisme orienté pour l'utilisation des composés hydrophobes, elle est donc efficace et tolère bien les huiles végétales (Fickers et al. 2005; Sestric et al. 2014). Si une huile riche en acide oléique est utilisée, comme de l'huile d'olive, de tournesol oléique ou de colza, cela apportera le substrat à convertir directement. De plus, l'absence de solvant organique dans le procédé est un point intéressant pour un industriel avec le développement des procédés dit « verts ».

Mais cette technique présente une limitation. D'un point de vue expérimental, lors d'une production d'acide ricinoléique ou d'une culture en présence d'huile, on observe que la partie surnageante aqueuse est blanche / laiteuse ce qui signifie qu'il s'agit d'une émulsion, probablement avec des surfactants produits par la souche. Cette solubilisation de la phase organique pourrait changer les propriétés du transfert d'oxygène, et rendre difficile la récupération de la phase organique. Également, purifier l'acide ricinoléique de ce mélange de détergents et d'huile sera très difficile du fait de leurs propriétés très similaires.

Il pourrait être envisageable d'attendre que la souche convertisse au maximum l'acide oléique pour avoir une meilleure pureté, mais à la vue de sa toxicité, il n'est pas certain qu'une large conversion puisse être atteinte. Une extraction de l'acide ricinoléique sécrété avec un solvant organique à la fin de la culture est envisageable, mais le reste de l'huile sera elle-aussi extraite. Une culture test avec 1 mL d'acide oléique avait été réalisée mais je n'avais pas réussi à analyser de manière fiable les concentrations en acide gras.

Enfin, les enzymes de la famille des désaturases membranaires telles que CpFAH12 sont des enzymes utilisant du dioxygène. Donc améliorer le transfert de dioxygène est aussi bénéfique pour la catalyse, et les modifications des acides gras en général.

ii. Rapidité d'analyse et seuil de détection

L'utilisation d'une phase décane permet aussi d'analyser rapidement la production d'acide ricinoléique, car la dérivatisation avec le bis(triméthylsilyl)acétamide est rapide et peut se faire directement après centrifugation de la culture et pipetage de la phase supérieure. Le protocole utilisé n'a pas été optimisé dans ce sens, mais il semble possible de construire un protocole rapide qui permettrait d'obtenir la quantité d'acide ricinoléique en moins d'une heure. Cette rapidité d'obtention de la concentration est pratique pour réaliser des suivis de culture et adapter les conditions aux besoins des cellules, par exemple lors d'une culture en bioréacteur. Avoir ce type de suivi est quelque chose d'important pour un procédé industriel.

Comme la phase décane accumule tous les acides gras sécrétés, ces acides gras sont concentrés dans 10% du volume total du milieu. Cela permet de détecter même de très faibles quantités d'acides gras, comme les acides oléique et linoléique, qui sont probablement issu de la lyse des cellules. Des tentatives afin d'apporter des acides gras avec la phase décane (acide oléique et laurique) ont été réalisées, mais il semblerait que *Yarrowia lipolytica* ne puisse assimiler les acides gras présents dans la phase décane.

Donc une souche possédant une β -oxydation fonctionnelle et sécrétant de l'acide ricinoléique ne pourra pas le consommer une fois sécrété. Mais peut-être qu'elle pourrait consommer d'autres types d'acide gras, comme le substrat de la conversion l'acide oléique néosynthétisé, et la phase décane comme source d'énergie.

iii. Effet sur la production des acides gras

L'utilisation d'une phase organique permet généralement de diminuer la toxicité des produits excrétés, cette stratégie a été utilisées dans divers cas dans la littérature, comme le butanol (Brevet US 9,156,760 B2) ou le 6-pentyl- α -pyrone (Serrano-Carreón et al. 2002).

Ainsi, Ledesma-Amaro et al (Ledesma-Amaro et al. 2016) ont également utilisé le décane ou le dodécane comme phase organique pour extraire en continu les acides gras sécrétés par leur souche, et les résultats ont montré une augmentation de la quantité d'acides gras sécrétés. Dans notre cas, la production des acides gras conventionnels est diminuée. Cela est probablement dû à leur souche (accumulatrice) et aux conditions de culture qui diffèrent.

Dans notre cas, si l'on compare des souches OléoX zéta témoins ou exprimant la désaturase CpFAD2 (produisant de l'acide linoléique) avec celles exprimant l'hydroxylase de *Claviceps purpurea*, les densités optiques (DO) finales obtenues après 48 heures de cultures en phase décane donnent respectivement des DO finales d'environ 80 et 60 selon les cultures. Cette différence montre bien que l'acide ricinoléique reste délétère pour la souche même avec une phase décane. Cela est probablement dû à la présence résiduelle dans les membranes de phospholipides portant de l'acide ricinoléique à la position sn2.

Afin que nos concentrations d'acide ricinoléique (de l'ordre du g.L⁻¹ de culture) soient fiables, nous avons également choisi de quantifier le décane en fin de culture par l'ajout d'un étalon interne (mC12) lors du prélèvement. Environ 120 µL sur le millilitre de décane introduit sont ainsi utilisés par *Yarrowia lipolytica* dans nos conditions. Les travaux de Iida et al (Iida et al. 1998) ont montré que la consommation de décane n'est pas réprimée par le glucose mais par le glycérol donc cela confirme la consommation observée.

En dehors de l'acide ricinoléique, acide gras majoritaire de la phase décane, les autres acides gras les plus présents dans la phase décane sont les acides gras à seize carbones (acide palmitique et palmitoléique, C16). Si l'on compare les ratios d'acides gras méthylés (acide gras du culot cellulaire) avec ce qui est obtenu pour ceux de la phase décane (acide gras silylés) hors acide ricinoléique, on remarque que le ratio n'est pas du tout le même. S'il n'y avait uniquement la lyse pour conduire à la présence des acides gras silylés, les mêmes ratios que ceux des acides gras cellulaire seraient obtenus. Comme il y a une surreprésentation des C16, ils doivent eux aussi être sécrétés par la souche.

Cette sécrétion pourrait venir de l'activité de la phospholipase supposée qui libère l'acide ricinoléique. Si celle-ci est une phospholipase B (lysophospholipase), alors il y a libération des deux chaînes d'acides gras du phospholipide. Or la composition des phospholipides de la souche *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 a été déterminée dans plusieurs conditions de culture (Daskalaki et al. 2018). Il est possible de remarquer que la composition des phospholipides dépend de la composition de l'huile/graisse apportée mais que souvent les acides gras majoritaires sont l'acide oléique, linoléique et palmitique. Or dans notre souche et nos conditions, il n'y a pas d'huile apportée et la synthèse native d'acide linoléique a été inactivée. De plus, l'acide oléique est la cible pour être converti en acide ricinoléique. Cela doit conduire à augmenter la teneur des phospholipides en C16 et donc l'hydrolyse des phospholipides pourrait conduire à libérer des C16, et une partie de ce qui est libérée peut ne pas être pris en charge par les acyls-CoA synthase, ce qui conduit à leur sécrétion. Le couple d'acyles sn1-pamitoyl,sn2-oléoyl est un des plus commun sur la phosphatidylcholine chez les eucaryotes. Donc une fois converti en acide ricinoléique, cela laisse un C16 sur la position sn1. Pour confirmer cette hypothèse, la détermination fine de la composition de *Y. lipolytica* pourrait être obtenue avec des expériences de lipidomique.

De manière anecdotique, nous avons également trouvé dans la littérature que la présence de décane semble faire proliférer le réticulum endoplasmique (Iida et al. 2000), cela peut être bénéfique pour la production de l'enzyme d'intérêt CpFAH12 car les désaturases membranaires (et les enzymes de la chaîne de transport d'électron) y sont normalement exprimées.

d. Vers une amélioration de la souche châssis avec l'outil CRISPR-Cas9

i. OléoX : une souche affectée par les multiples modifications de son génome

La construction de la souche OléoX zêta avait pour but de réduire la variabilité mais la tentative de la montrer par une expérience n'a pas donné de résultats concluants. Il aurait fallu tester plus de clones. Mais comme la présence de la plateforme zêta a facilité l'étape de transformation et que moins de faux positifs ont été observés lors des diverses expériences réalisées, cette souche a été utilisée pour le reste de ma thèse. Dans la partie suivante (la partie III.2), nous allons étudier différents mutants de CpFAH12 et donc un seul gène sera à intégrer par souche. La souche OléoX zêta est adaptée à ces conditions et cela facilitera la mise en place de ces expériences.

Mais cette souche n'a pas que des avantages, et la principale limitation est qu'après avoir été lourdement modifiée (Beopoulos et al. 2014), elle présente des taux de transformation bien plus bas que la souche d'origine (W29 ou Po1d). Cela peut être dû aux gènes délétés directement, mais aussi aux multiples étapes de transformation qui ont conduit à des « cicatrices » dans le génome de la souche. En effet, pour chacune des dix délétions réalisées, l'excision des marqueurs a laissé des sites Lox à tous les endroits ciblés. Cela pourrait déstabiliser le génome par des éventuelles recombinaisons, en particulier lorsque la recombinase CreI est exprimée. Les dernières excisions des marqueurs ont été difficiles à obtenir ce qui confirme ce problème. D'autres expériences au laboratoire tendent à corroborer que les taux de transformations de *Y. lipolytica* diminuent fortement après plusieurs intégrations chromosomiques avec le système Cre-lox et que l'intégration séquentielle de multiples gènes dans la levure n'est pas aisée.

ii. Le système CRISPR-Cas9 pour redésigner une souche OléoX plus performante

Comme dit dans le paragraphe précédent, les propriétés de la souche OléoX sont affectées probablement à cause des multiples zones Lox qui peuvent recombiner dans son génome. Vu le développement ces dernières années du système CRISPR-Cas9 pour l'ingénierie des génomes, il apparaît que l'utilisation de ce système pour redésigner complètement la souche permettrait de travailler sur de meilleures bases. En effet, lorsque la souche OléoX a été construite, ce nouveau système n'était pas développé pour *Yarrowia lipolytica*.

Ainsi, en parallèle d'autres groupes (Schwartz et al. 2016; Gao et al. 2018), notre groupe a développé en interne les outils et les méthodes du système CRISPR-Cas9 pour la levure *Y. lipolytica* (Borsenberger et al. 2018). L'utilisation conjointe de la nucléase Cas9 et d'un ARN guide de 20 pb spécifique de la séquence à cibler va permettre des coupures double brin ciblées dans le génome de la levure. La forme levure est haploïde, donc la souche ne possède pas de second allèle pour la correction et utilisera le système NHEJ (« Non-Homologous End-Joining » ou en français jonction d'extrémités non-homologues) pour la réparation de cette coupure (la cellule ne pouvant pas se diviser de manière viable avec une coupure). Si *Y. lipolytica* répare à l'identique le locus, cela régénère la séquence cible qui sera coupée à nouveau. Mais le système NHEJ est non-conservatif et génère fréquemment des erreurs de corrections, en particulier des indels (insertion et/ou délétion de bases au niveau de la coupure). Ces erreurs rendent généralement le gène non-fonctionnel par décalage du cadre de lecture et le changement de séquence de la cible empêche de futures coupures. La cellule avec la mutation/délétion est donc libre de pousser.

Une stratégie utilisant deux guides peut permettre de déléter le fragment entre les deux guides et de lier les deux extrémités (données non-publiées). C'est ce que nous avons choisi d'utiliser pour être certain d'avoir une perte irréversible de la fonctionnalité du gène. Dans un premier temps, nous avons utilisé ce système pour réaliser la délétion des trois gènes de transférases : Yl.DGA1 (YALI0E32769g), Yl.DGA2 (YALI0D07986g) et Yl.LRO1 (YALI0E16797g) et Yl.FAD2 (YALI0B10153g). Les séquences des ARN guides de 20 nucléotides en amont ont été identifiées à l'aide du site <http://crispor.tefor.net/> (tableau II.2).

Grâce à ce système nous avons pu obtenir facilement des délétions pour les quatre gènes. La construction de la nouvelle souche NéOléoX, qui possède les délétions pour les mêmes gènes que OléoX, a été commencée et combine déjà quatre des dix délétions (les deux DGAT, Yl.LRO1 et Yl.FAD2). L'objectif est maintenant d'y rajouter la délétion de la β -oxydation. Une stratégie de multiplexage (ciblage et délétion simultanée de plusieurs séquences) pour les six gènes POX est en cours de développement. Des travaux de Ferreira et al (Ferreira et al. 2018) ont montré qu'il était possible de cibler quatre séquences de façon simultanée chez *S. cerevisiae*, accomplir une stratégie similaire chez *Y. lipolytica* semble donc réalisable. Une alternative serait de cibler les autres étapes de la bêta oxydation en ciblant le gène MFE2 (YALI0E15378g) (figure I.1.9 remise ci-dessous). Cette stratégie doit être cependant évaluée car ceci conduirait peut-être à l'accumulation d'intermédiaires comme des énoyls-CoA, avec de possibles effets délétères sur la physiologie de la souche. Les guides ont été commandés mais la délétion n'a pas été finalisée.

e. Vers le développement d'un procédé de conversion de la biomasse cellulosique en acide ricinoléique

En perspective à long terme, le développement d'un procédé durable pour la production d'acide ricinoléique nécessite de pouvoir utiliser des déchets lignocellulosiques. Cette biomasse végétale a l'avantage de ne pas rentrer en concurrence avec l'alimentation humaine et animale et d'être bon marché. Mais *Y. lipolytica* n'est pas un organisme capable d'utiliser la cellulose en temps normal, c'est pour cela qu'une souche cellulolytique est depuis quelques années en cours de développement par l'équipe (Guo et al. 2015; Guo et al. 2017a; Guo et al. 2017b). Dans l'optique du développement d'un procédé consolidé, un test de production d'acide ricinoléique a été réalisé. Cela a permis de montrer la faisabilité technique d'une telle production, il s'agit de la première production d'acide ricinoléique à partir de cellulose, une ressource renouvelable. Les quantités obtenues restent pour le moment assez limitées donc des améliorations futures de la production seront nécessaires pour que le procédé puisse être rentable et donc industrialisable. **Cette première publication a en outre permis de valoriser le travail réalisé sur l'optimisation de la méthode puisque l'utilisation de la nouvelle méthode de culture a aidé à la quantification de la production de l'acide ricinoléique produit.**

Article :

RESEARCH

Open Access



Developing cellulolytic *Yarrowia lipolytica* as a platform for the production of valuable products in consolidated bioprocessing of cellulose

Zhong-peng Guo*, Julien Robin, Sophie Duquesne, Michael Joseph O'Donohue, Alain Marty* and Florence Bordes*

Abstract

Background: Both industrial biotechnology and the use of cellulosic biomass as feedstock for the manufacture of various commercial goods are prominent features of the bioeconomy. In previous work, with the aim of developing a consolidated bioprocess for cellulose bioconversion, we conferred cellulolytic activity of *Yarrowia lipolytica*, one of the most widely studied “nonconventional” oleaginous yeast species. However, further engineering this strain often leads to the loss of previously introduced heterologous genes due to the presence of multiple *LoxP* sites when using *Cre*-recombinase to remove previously employed selection markers.

Results: In the present study, we first optimized the strategy of expression of multiple cellulases and rescued selection makers to obtain an auxotrophic cellulolytic *Y. lipolytica* strain. Then we pursued the quest, exemplifying how this cellulolytic *Y. lipolytica* strain can be used as a CBP platform for the production of target products. Our results reveal that overexpression of *SCD1* gene, encoding stearoyl-CoA desaturase, and *DGA1*, encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase, confers the obese phenotype to the cellulolytic *Y. lipolytica*. When grown in batch conditions and minimal medium, the resulting strain consumed 12 g/L cellulose and accumulated 14% (dry cell weight) lipids. Further enhancement of lipid production was achieved either by the addition of glucose or by enhancing cellulose consumption using a commercial cellulase cocktail. Regarding the latter option, although the addition of external cellulases is contrary to the concept of CBP, the amount of commercial cocktail used remained 50% lower than that used in a conventional process (i.e., without internalized production of cellulases). The introduction of the *LIP2* gene into cellulolytic *Y. lipolytica* led to the production of a strain capable of producing lipase 2 while growing on cellulose. Remarkably, when the strain was grown on glucose, the expression of six cellulases did not alter the level of lipase production. When grown in batch conditions on cellulose, the engineered strain consumed 16 g/L cellulose and produced 9.0 U/mL lipase over a 96-h period. The lipase yield was 562 U lipase/g cellulose, which represents 60% of that obtained on glucose. Finally, expression of the hydroxylase from *Claviceps purpurea* (CpFAH12) in cellulolytic *Y. lipolytica* procured a strain that can produce ricinoleic acid (RA). Using this strain in batch cultures revealed that the consumption of 11 g/L cellulose sustained the production of 2.2 g/L RA in the decane phase, 69% of what was obtained on glucose.

Conclusions: In summary, this study has further demonstrated the potential of cellulolytic *Y. lipolytica* as a microbial platform for the bioconversion of cellulose into target products. Its ability to be used in consolidated process designs

*Correspondence: zguo@insa-toulouse.fr; marty@insa-toulouse.fr; bordes@insa-toulouse.fr

LISB, CNRS, INSA/INRA UMR 792, Université de Toulouse, 135, Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

has been exemplified and clues revealing how cellulose consumption can be further enhanced using commercial cellulolytic cocktails are provided.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, Cellulolytic biocatalyst, Consolidated bioprocessing, Cellulose, Lipids, Recombinant protein production, Ricinoleic acid

Background

Key elements of the bioeconomy are the use of renewable biomass as raw material and industrial biotechnology as an enabling technology for advanced manufacturing. Accordingly, for decades research worldwide has focused on the use of lignocellulosic biomass as a feedstock for fermentation processes aimed at the production of a wide variety of commercial products, including fuels, chemicals and enzymes [1, 2]. Despite enormous efforts and considerable R&D expenditure, the use of lignocellulosic biomass (LCB) as a raw material for manufacturing has still not reached maturity, mainly because it is difficult to extract fermentable sugars from this composite matter in an economically viable way.

The three major components of LCB are cellulose, hemicelluloses and lignin. Cellulose accounts for 40–60% of LCB dry matter content and its extraction and conversion into glucose constitute the key initial steps in current LCB biorefinery concepts [3]. The basic macromolecular components of cellulose are linear β -1,4-glucan chains, with glucose being the only molecular constituent of these. Despite the fact that cellulose is chemically homogeneous, in plant cells it displays a high degree of structural complexity, because the β -1,4-glucan chains are tightly packed into microfibrils surrounded by hemicelluloses and embedded in a lignin matrix [4, 5]. Accordingly, for biorefinery strategies employing enzyme-based approaches, biomass must first be pretreated to break down the lignocellulose matrix, release cellulose microfibrils and increase the frequency of amorphous zones [6]. Although many different pretreatment strategies have been proposed, those belonging to the organosolv technology family are reputed for their ability to solubilize lignin and produce quite pure amorphous cellulose that is amenable to enzyme action [7, 8].

Once cellulose is obtained in a form suitable for enzyme hydrolysis, a variety of enzymes are required to produce glucose. In typical commercial cocktails based on the secretome of *Trichoderma* sp., chain cleaving endoglucanases (EGs) are associated with cellobiohydrolases (CBHs) that act at chain extremities and remove cellobextrins in a progressive fashion, and β -glucosidases (BGLs) that hydrolyze these latter, producing glucose [9]. Although the hydrolytic efficiency of cellulase cocktails has been greatly improved in recent years [4], hydrolysis of cellulose is still regarded as the major cost driver

[6]. Therefore, the reduction of enzyme costs in biorefining is still a key aim for research. In this respect, consolidated bioprocessing (CBP) represents a paradigm shift, since this strategy involves the internalization of enzyme production using a cellulolytic organism that is able to hydrolyze cellulose and convert glucose into a target product in a single integrated process step. Accordingly, the economic burden of enzyme production is drastically reduced and further gains are achieved through the reduction of capital costs [10]. Nevertheless, the main challenge in establishing CBP is the identification of a suitable bifunctional microorganism that displays both potent cellulolytic activity and the ability to produce target molecules in a commercially relevant manner (e.g., high yield and titer). Unfortunately, this is not an easy task, since very few naturally occurring microorganisms simultaneously satisfy these requirements [6].

Attempts so far to obtain process-ready CBP microorganisms have not yet provided a satisfactory solution [1]. In cases where cellulolytic activity has been conferred to microorganisms using strain engineering, low cellulose hydrolysis rates remain a problem. This is partly due to difficulties linked to the overexpression of multiple cellulase components (i.e., EGs, CBHs and BGLs). However, it is also due to failure to properly match the cellulase mixture to the target cellulose pulps, adjusting the ratio of the different components to suit the specific composition of the substrate [11].

As a potential candidate for CBP, the yeast *Yarrowia lipolytica* is interesting because it has been already used by industry for different applications and displays the ability to accumulate lipids, which are potential biofuel precursors [12–14]. Moreover, *Y. lipolytica* performs a wide range of post-translational modifications, secretes enzymes at high levels and is amenable to genetic manipulation [15]. Exploiting these attributes, we have recently developed a cellulolytic *Y. lipolytica* strain producing BGLs, EGs and CBHs, tailoring the relative proportions of these so that they optimally hydrolyze an Organosolv cellulose pulp [16]. To further engineer this strain, it is necessary to use *Cre*-recombinase to remove previously employed selection markers. However, this operation is complicated, because it often leads to the loss of previously introduced heterologous genes due to the presence of multiple *LoxP* sites [17, 18]. Therefore, in this work, while further optimizing the expression of

multiple cellulases, we have rescued selection makers to obtain an auxotrophic cellulolytic *Y. lipolytica* strain. Subsequently, we have further engineered the strains for the production of three different target products, namely lipase, lipids and ricinoleic acid. Accordingly, we have demonstrated how this microbial platform can be used for CBP, leading to the production of commercially valuable products (Fig. 1).

Methods

Strains and media

The genotypes of the microbial strains used in the present study are summarized in Table 1. *E. coli* DH5 were purchased from Invitrogen (Paisley, UK) and used for plasmid construction. Restriction enzymes and DNA polymerase were purchased from New England Biolabs (Evry, France). Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France).

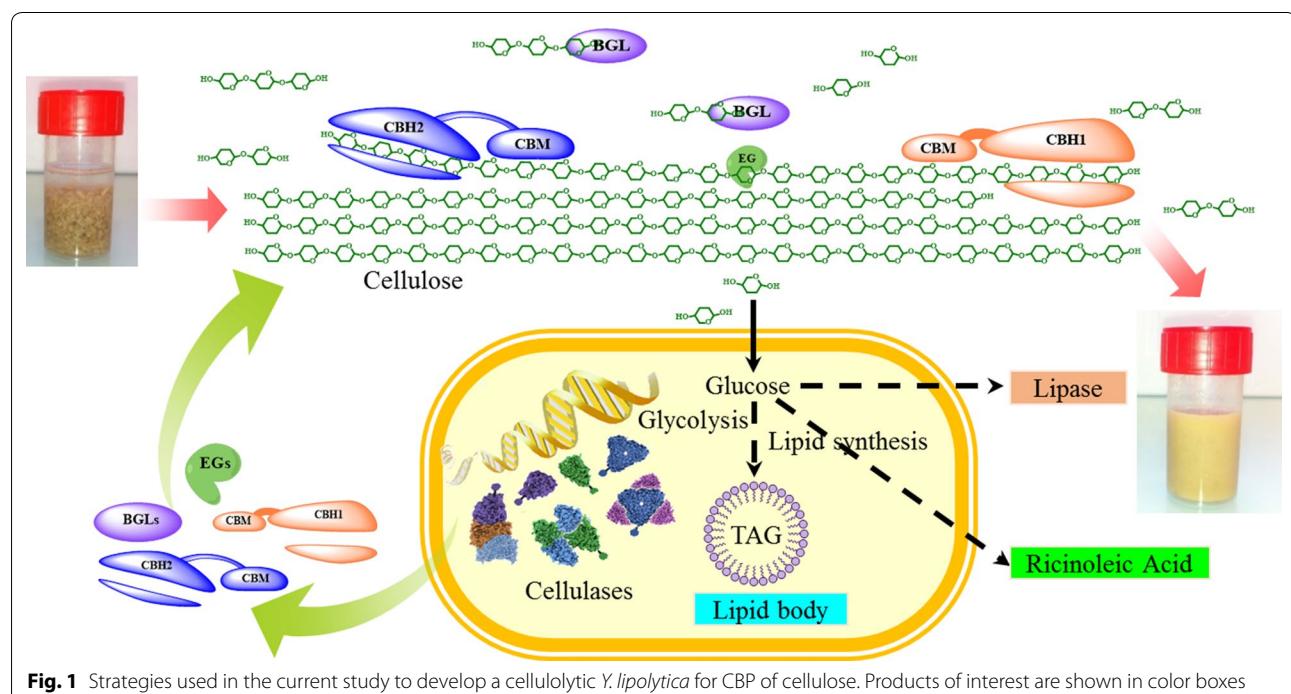


Fig. 1 Strategies used in the current study to develop a cellulolytic *Y. lipolytica* for CBP of cellulose. Products of interest are shown in color boxes

Table 1 Microbial strains used in the present study

Strain	Parental strain	Relevant genotype/expressed gene	Source of references
<i>E. coli</i> DH5		Φ80dlacZΔm15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169	Invitrogen
YLp	Po1d	MATA, <i>leu2-270</i> , <i>ura3-302</i> , <i>xpr2-322</i> , <i>Δpox1-6</i>	[27]
YLpW	YLp	<i>LEU2</i> , <i>URA3</i>	[32]
YLpO	YLp	<i>pTEF-SCD1-LEU2</i> , <i>pEXP-DGA1-URA3</i>	This investigation
YLpL	YLp	<i>LEU2</i> , <i>pTEF-LIP2-URA3</i>	This investigation
YLx	YLp	Δ <i>DGAT1-2</i> , Δ <i>LRO1</i> , Δ <i>FAD2</i>	[22]
YLxW	YLx	<i>LEU2</i> , <i>URA3</i>	This investigation
YLxR	YLx	<i>LEU2</i> , <i>URA3</i> , <i>pTEF-CpFAH12-Hygro</i> ^R	This investigation
CYLp	YLp	<i>pEXP-BGL1</i> , <i>pHTEF-BGL2</i> , <i>pHTEF-EG1</i> , <i>pEXP-EG2</i> , <i>pHTEF-CBH1</i> , <i>pHTEF-CBH2-LEU2</i>	This investigation
CYLpW	CYLp	<i>URA3</i>	This investigation
CYLpO	CYLp	<i>pTEF-SCD1</i> , <i>pEXP-DGA1-URA3</i>	This investigation
CYLpL	CYLp	<i>pTEF-LIP2-URA3</i>	This investigation
CYLx	YLx	<i>pEXP-BGL1</i> , <i>pHTEF-BGL2</i> , <i>pHTEF-EG1</i> , <i>pEXP-EG2</i> , <i>pHTEF-NcCBH1-URA3</i> , <i>pHTEF-TrCBH2-LEU2</i>	This investigation
CYLxR	CYLx	<i>pTEF-CpFAH12-Hygro</i> ^R	This investigation

Y. lipolytica strains were routinely cultivated in a medium composed of 10 g/L yeast extract, 10 g/L Bacto Peptone and 10 g/L glucose (YPD). Transformants were selected on solid YNB medium (1.7 g/L YNB, 10 g/L glucose or cellobiose, 5 g/L ammonium chloride, 50 mM sodium-potassium phosphate buffer at pH 6.8, and with (for Ura⁺) or without (for Leu⁺) 2 g/L casamino acids, supplemented with uracil (440 mg/L), leucine (440 mg/L) or hygromycin (200 µg/mL) depending on the selection marker requirements. Solid media contained 1.5% agar. The detection of endoglucanase activity in solid YNBcasa medium was achieved by incorporating 2 g/L Azo-CM-Cellulose (Megazyme). For lipid production in bioreactors, yeasts were first grown on minimal medium (MM) containing vitamins, trace elements [19] and salts, including 7.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 7.5 g/L K₂HPO₄, 7.5 g/L NaH₂PO₄ and 1.0 g/L MgSO₄·7H₂O with 50 g/L glucose, and then supplemented with 100 g/L Organosolv cellulose (cellulose content ≈ 91%), the latter being provided by CIMV S.A (Levallois-Perret, France). For lipid production in shake flasks, the minimal medium containing 80 g/L glucose or 72.8 g/L Organosolv cellulose, and 2.7 g/L (NH₄)₂SO₄ (C/N ratio ≈ 30:1) was used. Lipase and ricinoleic acid were produced in YTD (10 g/L yeast extract, 20 g/L tryptone, 25 g/L glucose and 100 mM citrate buffer, pH 5.5) and YTC media (10 g/L yeast extract, 20 g/L tryptone, 27.5 g/L Organosolv cellulose and 100 mM citrate buffer, pH 5.5). YT media containing yeast extract, tryptone and citrate buffer (100 mM, pH 5.5) were used as control.

Plasmid and strain construction

The plasmids constructed in the present study are summarized in Table 2 and primers are listed in Table 3. A schematic diagram of strain construction is shown in Additional file 1: Figure S1. The cellulolytic *Y. lipolytica* was constructed as described previously [16] with the following modifications. The TEF promoter present in plasmids JMP62UraTB1 and JMP62LeuTrEG2 (for the expression of *Y. lipolytica* BGL1 and *T. reesei* EG2, respectively) was replaced by the EXP1 promoter. This was achieved by fusing the EXP1 promoter, amplified from the genomic DNA of *Y. lipolytica* by PCR using primers F1/R1, with the PCR fragment amplified from the plasmid JMP62UraTB1 (primers F2/R2) and JMP62LeuTrEG2 (primers F3/R3), respectively, using In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, USA). Subsequently, the expression cassette *P_{EXP1}-BGL1*, amplified from the vector JMP62UraEXP-BGL1 by PCR (primers F4/R4), was fused with the vector JMP62LeuTrEG1 linearized by *Cla*I, yielded BGL1/EG1 co-expressing plasmid JMP62LeuEB1TE1 (Additional file 1: Figure S2). Similarly, fusing the expression cassette *P_{EXP1}-EG2*, amplified from

Table 2 Plasmids used or constructed in the present study

Plasmids	Description	Source of references
JMP62UraTEF	<i>URA3, pTEF</i>	[33]
JMP62LeuTEF	<i>LEU2, pTEF</i>	[33]
PUB4-CRE	<i>hph, hp4d-CRE</i>	[17]
JMP62UraTrEG1	<i>URA3, pTEF-EG1</i>	[16]
JMP62LeuTrEG2	<i>LEU2, pTEF-EG2</i>	[16]
JMP62UraHNCBH1	<i>URA3, pHTEF-NcCBH1</i>	[16]
JMP62LeuHTrCBH2	<i>LEU2, pHTEF-TrCBH2</i>	[16]
JMP62UraTB1	<i>URA3, pTEF-BGL1</i>	[32]
JMP62LeuB2	<i>LEU2, pTEF-BGL2</i>	[32]
JMP62UraEXP	<i>URA3, pEXP</i>	This investigation
JMP62LeuEB1TE1	<i>LEU2, pEXP-BGL1, pHTEF-EG1</i>	This investigation
JMP62UraTB2EE2	<i>URA3, pHTEF-BGL2, pEXP-EG2</i>	This investigation
JMP62UraED1	<i>URA3, pEXP-DGA1</i>	This investigation
JMP62UraTS1	<i>URA3, pTEF-SCD1</i>	This investigation
JMP62UraED1TS1	<i>LEU2, pEXP-DGA1, pTEF-SCD1</i>	This investigation
JMP62UraTEF-LIP2	<i>URA3, pTEF-LIP2</i>	[21]
JMP62UraTEF-CpFAH12	<i>URA3, pTEF-FAH12</i>	[22]

the vector JMP62LeuEXP-EG2 by PCR (primers F4/R4), with the *Cla*I-linearized vector JMP62UraB2, yielded the plasmid JMP62UraTB2EE2 that directs co-expression of BGL2 and EG2 (Additional file 1: Figure S3). Afterward, vectors JMP62LeuEB1TE1, JMP62UraTB2EEII, JMP62UraHNCBH1 (for expressing *N. crassa* CBH1) and JMP62LeuHTrCBH2 (for expressing *T. reesei* CBH2) were linearized by *Not*I and introduced into *Y. lipolytica* YLp and YLx strain using the lithium acetate method [20], resulting in strains CYLp and CYLx. Transformants were first screened on YNB plate based on auxotrophic genotype, and then tested for growth on cellobiose and for degradation of Azo-CMC. Clones displaying both activities were retained for further analysis. During strain construction, the *LoxP-Cre* recombination system was used for marker rescue and to ensure the multistep insertion of the target genes [17]. After each cycle of gene transformation, ten transformants of each construct were cultivated in liquid YNB media, and the transformants that showed the fastest growth rates and produced the highest level of cellulases were selected for further engineering.

To enhance lipid production, *DGA1* gene and *SCD1* gene (GenBank accession codes XM_504700.1 and XM_501496.1, respectively) that encode acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and stearoyl-CoA desaturase (catalyzes $\Delta 9$ -desaturation of palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA to palmitoleoyl-CoA and oleoyl-CoA), respectively, were PCR amplified from the genomic DNA of *Y. lipolytica* using primers F5/R5 and F6/R6,

Table 3 Sequences of oligonucleotide primers used in this study

Primer names	Sequence (5'-3'), 15-bp homologous sequence for infusion is underlined
F1	GAGTTGGCCCCGTTTTCG
R1	TGCTGTAGATGTCTGTGTAAGGGGG
F2	<u>GACATATCTACAGCAGGATCCCACAATGATCTCTCT</u>
R2	<u>ACGGGCGCCAAACTCATGATTCTAGGGATAACAGGGTAA</u>
F3	<u>GACATATCTACAGCAGGATCCCACAATGAAGCTTCC</u>
R3	<u>ACGGGCGCCAAACTCATGATTCTAGGGATAACAGGGTAA</u>
F4	<u>TTATCCCTAGAACATGGAGTTGGCGCCGTTTTCG</u>
R4	<u>CTTGGCGGGCATCGAATTGATTGTCTTAGAGGAACGCATATACA</u>
F5	<u>CAGCAGGATCCCACAATGACTATCGACTACAATACTACAAGTCG</u>
R5	<u>TGAGAACCCCCCTAGGTTACTCAATCATTGGAACTCTGG</u>
F6	<u>CCGAAGGATCCCACAATGGTAAAAACGTGGACCAAGTGG</u>
R6	<u>TGAGAACCCCCCTAGGCTAACGCAGCCATGCCAGACATACCG</u>
JMP1F	CCTAGGGGGTCTCACCATCATCAC
JMP1R	TGTGGGATCTGTGTAAGATATGTCTTG
JMP2F	CCTAGGGGGTCTCACCATCATCAC
JMP2R	TGTGGGATCTCGGGTGTGAGTTG

respectively. A 15-base pair sequence homologous to the target plasmid was introduced at the 3' and 5' ends of each gene during PCR amplification. Then, *DGA1* and *SCD1* genes were fused with the PCR fragment of vector JMP62UraEXP (primers JMP1F/JMP1R) and JMP62UraTEF (primers JMP2F/JMP2R), respectively. Afterward, the *P_{EXPI}-DGA1* expression cassette was PCR amplified from the vector JMP62UraEXP-DGA1 using primers F4 and R4, and was fused with the *Clal*-linearized vector JMP62UraTEF-SCD1 to yield JMP62UraED1TS1. This plasmid was transformed into *Y. lipolytica* YLp and CYLp strains, yielding YLpO and CYLpO, respectively.

For the expression of *Y. lipolytica* lipase 2, JMP62UraTEF-LIP2 [21] was transformed into YLp and CYLp strains, yielding YLpL and CYLpL, respectively.

For the production of ricinoleic acid, JMP62UraTEF-CpFAH12 containing the gene encoding *Claviceps purpurea* fatty acid Δ12-hydroxylase gene (*CpFAH12*) under the control of TEF promoter [22] was transformed into YLx and CYLx to yield strains YLxR and CYLxR, respectively.

After construction, all expression vectors were verified by DNA sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany). The successful integration of multiple genes into the genome of *Y. lipolytica* was verified by PCR using gene-specific primers (Additional file 1: Table S1; Figure S4). After that, ten transformants of each construct were cultivated in liquid YNB media, and the transformant that showed the highest growth rate and produced the highest level of cellulases was selected for further analysis. Table 1 summarizes the expressed cellulase genes and their corresponding *Y. lipolytica* transformants.

Lipid production in Erlenmeyer flasks

Yeasts were pre-cultivated in minimal media until stationary phase and then used to inoculate 100 mL minimal media containing 80 g/L glucose or 72.8 g/L Organosolv cellulose in 1 L Erlenmeyer flasks to yield an initial OD value of 1.0. Cellic® CTec2 (Novozymes) was added at the enzyme loading of 10 or 20 FPU/g cellulose for the cultures containing Organosolv cellulose. Cultures were grown at 28 °C under shaking at 140 rpm for 5 days. Samples were taken at regular intervals to quantify glucose, biomass, lipids and residual cellulose.

Lipid production in bioreactors

Yeasts were pre-cultivated in minimal medium until stationary phase and then used to inoculate 1.2 L minimal medium in 5 L stirred-tank BIO-STAT B-PLUS bioreactors (Sartorius, Frankfurt, Germany) to yield an initial OD value of 1.0. The pH was maintained at 5.5 by automatic addition of 2 M KOH. An aeration of 1.0 vvm was used and the stirring speed was set to 1200 rpm to ensure a dissolved oxygen tension of at least 20% of air saturation. The batch phase was designed to produce biomass and cellulases on glucose (50 g/L) under normal growth conditions (nitrogen was not limited). An initial Organosolv cellulose addition of 50 g/L was conducted when the concentration of glucose dropped around 20 g/L. Organosolv cellulose addition (50 g/L) together with vitamins and trace elements was carried out for a second time when the carbon dioxide concentration of off-gas dropped and remained unchanged as determined by the Prima PRO process mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK). In addition, NH₄Cl was added

to the medium to yield a C/N ratio of 30:1 for each cellulose feeding. For the control experiments, the fed-batch phase was started with exponential feeding of glucose at a concentration of 500 g/L into the bioreactors at a specific feed rate of 0.1 h⁻¹ with the initial feed rate of 20 mL/h for 10 h. Then a constant feed rate of 20 mL/h was applied for 8 h, after which the concentration of glucose in bioreactors dropped below 20 g/L. In addition to vitamins and trace elements, NH₄Cl was added to yield a C/N ratio at 30:1. Foaming was controlled automatically by the addition of TEGO Antifoam KS911 (Evonik Goldschmidt GmbH, Germany). Samples were taken regularly to quantify glucose, cellulose, lipids, extracellular protein and biomass, as well as cellulase activities. The results are shown as the mean value of three independent experiments.

Lipase and ricinoleic acid production

Yeasts were pre-cultivated in YPD medium until stationary phase and then used to inoculate 100 mL YT, YTD or YTC in 1 L Erlenmeyer flasks to yield an initial OD value of 1.0. Cultures were grown at 28 °C under shaking at 140 rpm for 5 days. For ricinoleic acid production, decane was added into the medium at a ratio of 1–10 (v/v). Samples were taken at regular intervals to monitor enzyme activities and quantify biomass, residual cellulose and ricinoleic acid.

Cellulase and lipase activity assay

Total cellulase activity was measured using the filter paper assay (FPU) following National Renewable Energy Laboratory (NREL) standard biomass analytical procedures [23].

Lipase activity in the culture supernatant was measured by monitoring the release of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) as described previously [21].

All protein concentrations were measured using the Bradford method and bovine serum albumin as a standard [24]. All enzymatic activity measurements were performed in triplicate unless otherwise stated.

Analysis of glucose consumption and product formation

To determine the concentration of glucose, triplicate culture samples (1.5 mL each) were removed from growing cultures and rapidly frozen in liquid nitrogen, then thawed on ice before centrifugation (8000×*g* for 5 min at 4 °C) and recovery of supernatants. Glucose was measured using an Aminex HPX87-H column (Bio-Rad Laboratories, Germany), operating at 50 °C using a mobile phase (5 mM H₂SO₄) flowing at a rate of 0.5 mL/min. Glucose was detected using a Shodex RI-101 refractive index detector (Showa Denko, New York, NY).

Lipids were extracted from freeze-dried cells (~10 mg) and methylated as described previously [25]. During the lipid extraction, C17:0 (50 µg) was added as the internal standard and fatty acid methyl esters (FAMEs) were analyzed by gas chromatography (6890 N Network GC System, Agilent, USA). Fatty acids in the decane phase, including ricinoleic acid, were silylated by BSA (N,O-bis (trimethylsilyl) acetamide) before analysis. Briefly, 20 µL of samples from the decane phase were mixed with 180 µL decane and 5 µL of BSA. The mixture was incubated at room temperature for half an hour and then processed for GC analysis. Measurements were performed in split mode (1 µL at 250 °C), with helium as the carrier gas (2 mL/min). FAMEs were separated on an HP-5 GC column (30 m × 0.32 mm I.D., 0.5-µm film thickness, Agilent, USA). The temperature program was 120 °C, ramped up to 180 °C (10 °C/min) for 6 min, 183 °C (0.33 °C/min) for 9 min and 250 °C (15 °C/min) for 5 min. Detection was performed using a flame ionization detector (FID) at 270 °C (2.0 pA). FAMEs were quantified by comparing their profiles with that of standards of known concentrations.

Analysis of residual cellulose and determination of dry cell weight

To determine the dry cell weight for cultures grown on glucose, triplicate samples (2 mL each) were removed and filtered using pre-weighed PES filters (0.45 µm; Sartorius Biolab, Germany). The biomass retained on the filters was washed, dried in a microwave oven at 150 W for 15 min and then placed in a desiccator before weighing.

For cultures grown on cellulose, the quantification of cellulose residues and dry cell matter was conducted as previously described with slight modifications [26]. Briefly, yeast cell biomass and residual cellulose were recovered from samples using centrifugation at 8000×*g* for 10 min at 4 °C. After supernatant removal, the pellet (*P*) was washed two times with distilled water, using centrifugation between each wash and the pellet was freeze dried and weighed. Afterward, pellets were treated independently with Cellic® CTec2 and (1.0% w/v) dilute sulfuric acid at 121 °C for 1 h, and the amount of glucose released in each case was quantified using HPLC analysis as described above. Dry cell weight was deduced by subtracting the amount of cellulose from the weight of *P*. The biomass yield was calculated as the ratio of the amount of biomass obtained divided by the amount of carbon source consumed.

Fluorescence microscopy

A Leica DM 4000B microscope was used to capture phase contrast and fluorescence images at 100× oil immersion magnification. Yeast cells were stained with

BODIPY dye (0.1 μ g/mL for 5 min). Samples were excited at 505 nm and fluorescence emission (around 515 nm) was collected for analysis.

Results and discussion

Construction of a cellulolytic *Y. lipolytica* as a platform for consolidated bioprocessing of cellulose to produce valuable products

In previous work, we have shown that efficient cellulolytic activity can be conferred to *Y. lipolytica* [16] by simultaneously expressing two BGLs, two EGs and two CBHs in specific ratios. To achieve this, relevant enzyme-encoding sequences under the control of strong promoters (e.g., TEF and HTEF containing multiple repeats of upstream activation sequence) were inserted into the *Y. lipolytica* genome. Each insertion was followed by the removal of selection markers using *Cre*-recombinase. Therefore, in the final construction we estimated that 8 *LoxP* sites remained on the genome (Additional file 1: Figure S5). However, we nevertheless observed definitive loss of one or several previously introduced heterologous genes during selection marker removal. This is probably caused by random recombination, which is due to the presence of multiple *LoxP* sites [18]. Therefore, to resolve this issue we set out to reduce the number of *LoxP* sites that are introduced during *Y. lipolytica* engineering. To achieve this, the different cellulolytic enzymes were introduced pairwise into the genome using extended gene cassettes containing two genes with different promoters (EXP and HTEF). The EXP promoter was chosen because it displays a strength similar to that of the TEF promoter (Additional file 1: Figure S6). Using this strategy, the number of *LoxP* sites introduced during the construction of cellulolytic *Y. lipolytica* was reduced by two (Additional file 1: Figure S5). More importantly, excision of the selection marker was achieved without causing the loss of previously integrated genes. Finally, cellulolytic

ability was successfully conferred to two different *Y. lipolytica* host strains, YLp and its derivative YLx, yielding strains CYLp (cellulolytic YLp) and CYLx (cellulolytic YLx). Cultivation of these strains in flasks on both minimal (MM) and rich medium (YTD) revealed that the expression of the six cellulases led to a small decrease in maximum specific growth rates (μ_{\max}) and biomass yields, compared with the corresponding parental strains (Table 4).

Lipid production by engineered *Y. lipolytica* strains in shake flasks

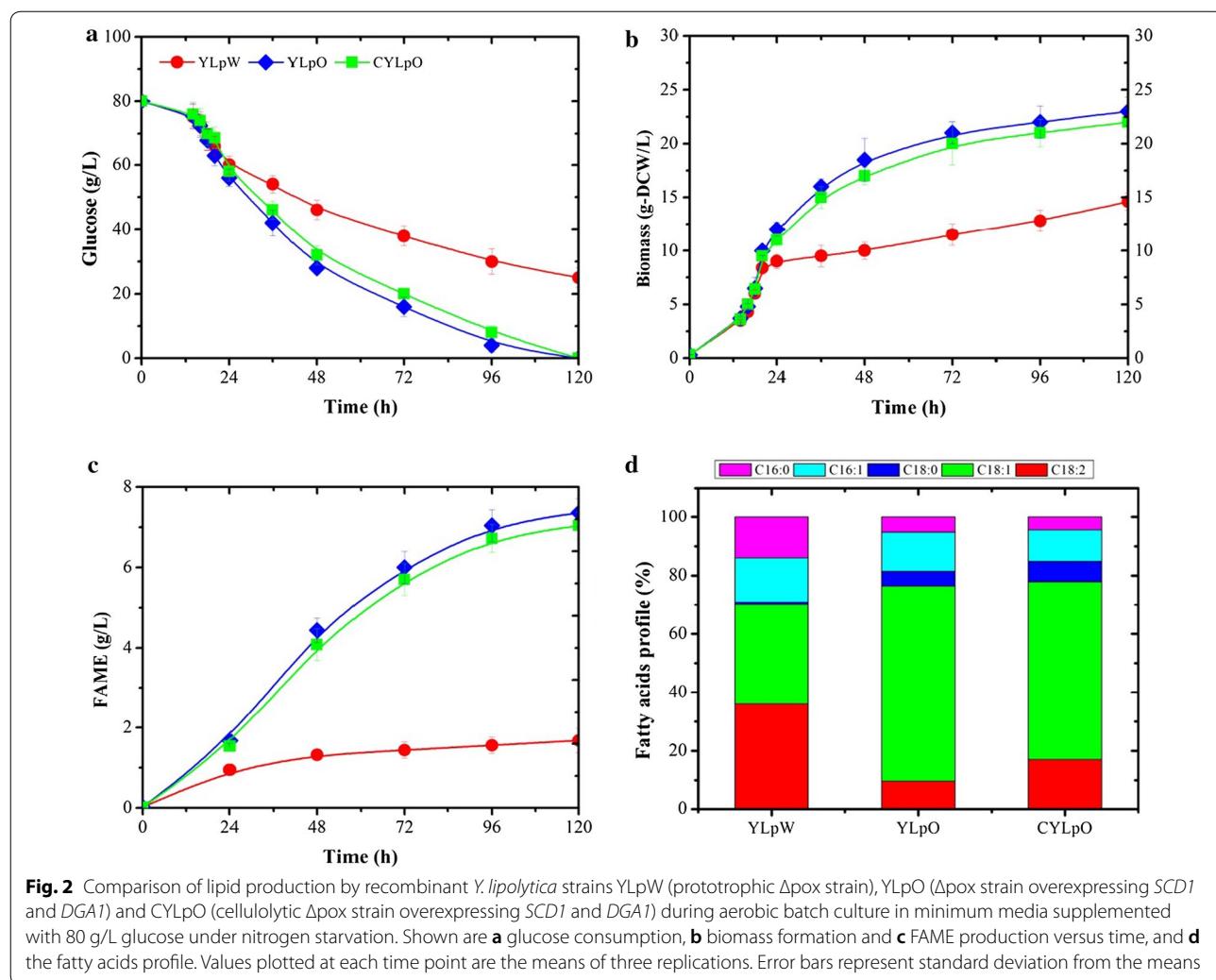
Previous work has shown that the deletion of the 6 *POX* genes (i.e., creation of *Y. lipolytica* YLp strain) that encode the peroxisomal acyl-coenzyme oxidases involved in lipid β -oxidation leads to increased lipid accumulation [27]. Additionally, it has been shown that the simultaneous overexpression of SCD1, DGA1 and acetyl-CoA carboxylase (ACC1) of *Y. lipolytica* yields an obese phenotype [28, 29]. Therefore, to investigate the use of CYLp as a CBP platform for cellulose to biofuel process, lipid biosynthesis was enhanced in CYLp by overexpressing SCD1 and DGA1, yielding strain CYLpO. Overexpression of the lipid biosynthesis pathway in CYLpO did not influence either the growth or enzyme production, irrespective of the culture medium used (Table 4). Moreover, batch cultivation of CYLpO in shake flasks and comparison with YLpW and YLpO (a YLp strain overexpressing SCD1 and DGA1) confirmed that the overexpression of SCD1 leads to faster glucose consumption and biomass production in lipid accumulation phase under nitrogen starvation (Fig. 2). Likewise, the use of fluorescence microscopy to observe intracellular lipids revealed that both YLpO and CYLpO displayed the obese phenotype (Additional file 1: Figure S6). However, contrary to previous reports [29], overexpression of SCD1 did not procure a significant increase in the exponential growth rate

Table 4 Comparison of growth and cellulase activity of recombinant *Y. lipolytica* strains grown on 25 g/L glucose in shake flasks under normal growth condition for 2 days

	YLpW	CYLpW	CYLpO	CYLpL	YLpW	CYLx	CYLxR
Minimal media							
μ_{\max} (h^{-1})	0.16 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00	0.08 \pm 0.01
Yx/s (g DCW/g)	0.55 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	0.26 \pm 0.00	0.24 \pm 0.01
Cellulase activity (FPU/mL)	n.d.	0.18 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	n.d.	0.15 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01
YTD							
μ_{\max} (h^{-1})	0.43 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.16 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
Yx/s (g DCW/g)	0.92 \pm 0.06	0.83 \pm 0.04	0.82 \pm 0.05	0.80 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	0.65 \pm 0.02	0.63 \pm 0.03
Cellulase activity (FPU)	n.d.	0.84 \pm 0.05	0.86 \pm 0.03	0.82 \pm 0.04	n.d.	0.70 \pm 0.02	0.64 \pm 0.03

n.d. not detectable

The results were calculated from at least three biological replicates and are given as the mean values \pm standard deviation



in this work. This is likely due to the use of different culture conditions and the fact that, unlike in previous work, the *ACC1* gene was not overexpressed, because of limitations imposed by the use of selection markers. Consequently, YLpO and CYLpO produced 7.3 g/L FAME (30% of DCW) and 7.0 g/L FAME (29% of DCW), respectively, which is higher than FAME production by YLpW (1.7 g/L FAME, 12% of DCW) but less than the previously reported results (45% of DCW) (Fig. 2c, Table 5) [29]. In addition, the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids in strains YLpO and CYLpO was increased as a result of the conversion by *SCD1* of palmitoyl-CoA and stearoyl-CoA substrates to their respective monounsaturated fatty acyl-CoAs (Fig. 2d).

We further studied the lipid production of the engineered strains with cellulose as carbon source instead of glucose. CYLpO consumed 12 g/L of cellulose and accumulated lipids up to 14% of its DCW (as measured by FAME), demonstrating that cellulolytic potency of

CYLpO was insufficient to completely hydrolyze the cellulose, and consequently lipid production was limited by insufficient glucose availability (Fig. 3a). Since high carbohydrate to lipid conversion yields and high productivity will be essential to achieve the cost-effective production of biodiesel, we investigated how these parameters can be enhanced using CYLpO. For this, different loadings of Cellic® CTec2 (5–30 U/g cellulose) were added to the culture medium to assist cellulose hydrolysis. In the presence of an external cellulase loading of 20 FPU/g cellulose (Fig. 3c), YLpO was able to achieve rates of biomass and lipid production that are similar to those achieved by YLpO grown on glucose (Figs. 2, 3). Complete degradation of cellulose was achieved within less than 96 h and the final lipid concentration reached 31% of its DCW. Remarkably, in similar conditions CYLpO only required 10 FPU/g cellulose to maintain a performance equivalent to that when this strain is grown on glucose. Moreover, it is noteworthy that comparing the growth of CYLpO

Table 5 Comparison of lipid and biomass yield of recombinant *Y. lipolytica* strains grown on 80 g/L glucose or 72.8 g/L cellulose (C/N ratio ≈ 30:1) in shake flasks for 5 days

	$Y_{X/S}$ (g DCW/g)	$Y_{FAME/S}$ (g/g)	$Y_{FAME/X}$ (g/g DCW)	P_{FAME} (g/L/h)
MM-glucose				
YLpW	0.26 ± 0.02	0.030 ± 0.004	0.12 ± 0.02	0.016 ± 0.002
YLpO	0.28 ± 0.01	0.092 ± 0.005	0.30 ± 0.02	0.073 ± 0.003
CYLpO	0.27 ± 0.02	0.088 ± 0.003	0.29 ± 0.01	0.070 ± 0.004
MM-cellulose ^a				
YLpO + 10 FPU/g	0.26 ± 0.02	0.058 ± 0.004	0.22 ± 0.01	0.024 ± 0.004
YLpO + 20 FPU/g	0.27 ± 0.00	0.091 ± 0.003	0.31 ± 0.03	0.073 ± 0.003
CYLpO	0.25 ± 0.03	0.036 ± 0.002	0.14 ± 0.02	0.005 ± 0.001
CYLpO + 10 FPU/g	0.26 ± 0.01	0.085 ± 0.004	0.30 ± 0.02	0.069 ± 0.002

Results were calculated from at least three biological replicates and are given as the mean values ± standard deviation

^a Yields were calculated from the glucose consumption deduced from the cellulose degradation

and YLpO in the presence of 10 FPU external cellulase/g cellulose revealed that yeast growth and lipid production in the latter strain were rather limited (Fig. 3b, d). This clearly highlights the added value of the endogenous cellulase production in CYLpO. Based on literature data regarding simultaneous saccharification and fermentation (SSF) processes, and the results presented herein, we estimate that the use of CYLpO would lead to a 50% reduction in the requirement for external cellulases in an SSF process. Additionally, it is important to note that the endogenous expression of cellulases by CYLpO did not alter the obese phenotype of the engineered strain when it was grown on glucose (i.e., the final fatty acid concentration for YLpO and CYLpO was essentially equivalent) (Figs. 2, 3, Table 4). Overall, these data reveal that cellulolytic CYLpO is an excellent candidate for the further development of a cellulose-based CBP for lipid production.

Lipid production of recombinant *Y. lipolytica* strains in bioreactors

To further explore the potential use of CYLpO as a CBP microorganism with autonomic feature, we evaluated the growth and lipid production of CYLpO in a 5.0-L bioreactor in minimal medium. Considering the recalcitrance of cellulose to cellulases degradation, CYLpO was first grown on glucose which allowed the strain to produce a certain amount of starter cellulases and then cellulose was supplemented into the bioreactors as carbon source. Fed-batch experiment with glucose feeding was used as control for comparison. During this control experiment, enhanced lipid biogenesis was observed for CYLpO, and a final FAME concentration of 19 g/L (43% of DCW) was achieved in 108 h (Fig. 4a, Table 6). A remarkable enhancement of biomass production was achieved by exponential glucose feeding (33–42 h) to a concentration

that can be hardly reached in batch fermentation in shake flasks due to limited mixing (Fig. 4a, b). This accumulation of biomass observed for CYLpO is correlated with continuous increase in cellular fatty acid content. Indeed, 2.5-fold higher lipid productivity was achieved than that of shake flask fermentation, due to the fast establishment of a large amount of biomass (Tables 5 and 6).

For fatty acid production on cellulose, CYLpO consumed 50 g/L of cellulose and produced 5.0 g/L FAME in 96 h (Fig. 4c). Continuous cellulase production was observed for CYLpO grown on glucose and this was accompanied by an increase in extracellular protein concentration in the culture medium (Fig. 4d). However, cellulase activity decreased greatly when cellulose was added to the culture medium and in the, meanwhile, the extracellular protein concentration remained low and constant, which indicated that most of the cellulases were absorbed onto the substrate. Our results also showed that further cultivation did not yield significant utilization of the residual cellulose after 120 h, which illustrated that the process was limited by the availability of sufficient free cellulase activity (Fig. 4d). The cellulose to lipid (measured as FAME) conversion yield was 0.05 g/g in cellulose feeding phase after glucose depletion, 50% of which was obtained on glucose (Table 6). If the entire process is taken into account, including cell growth on glucose, the lipid productivity was 0.04 g/L/h, although lower than the previously reported engineered *Y. lipolytica* strains [13, 29, 30]; further improvement of lipid production could be expected by overexpressing ACC1 in CYLpO, as shown previously [13]. In the future, further studies will focus on process optimization, either determining the exact glucose/cellulose ratio required to produce the highest cellulase titer during the early culture phase, or in the case of external cellulases, refining the enzyme loading to achieve maximum cellulose

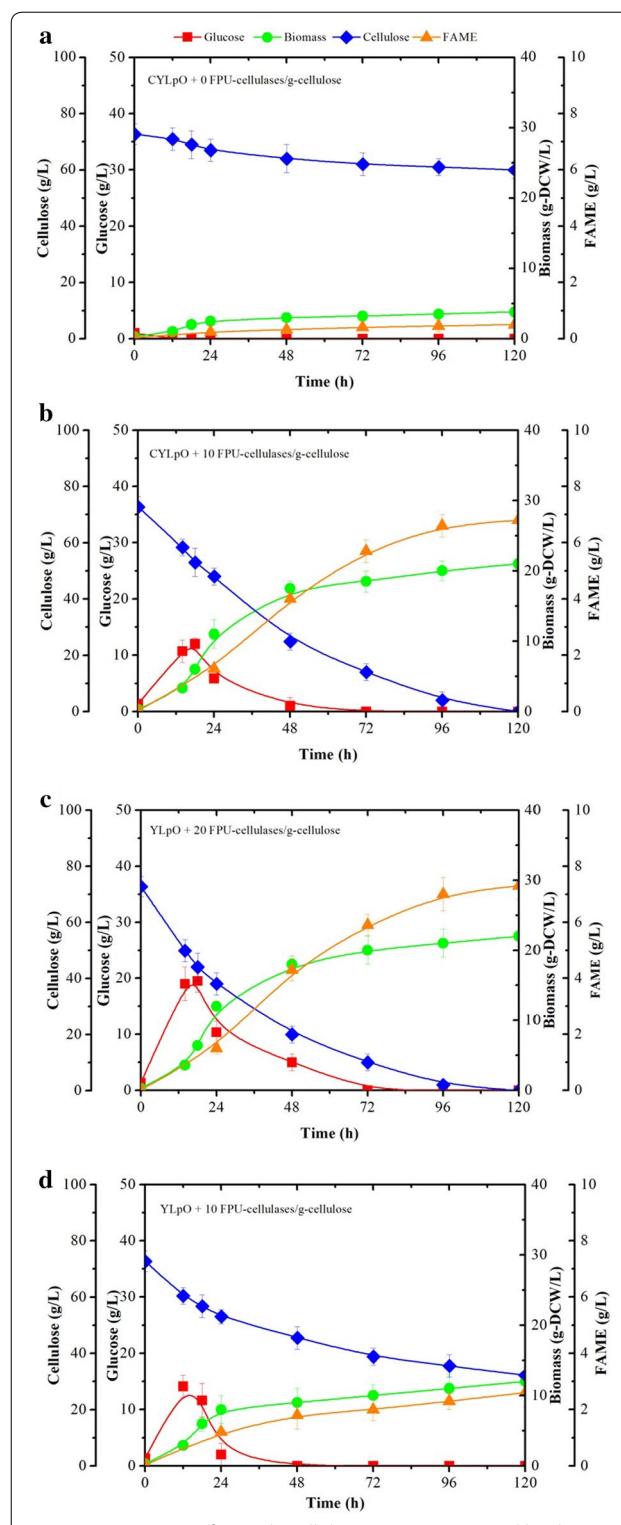


Fig. 3 Comparison of growth, cellulose consumption and lipid production of recombinant *Y. lipolytica* strains. **a** CYLpO, **b** CYLpO with the addition of 10 FPU cellulases/g cellulose, **c** YLpO with the addition of 20 FPU cellulases/g cellulose and **d** YLpO with the addition of 10 FPU cellulases/g cellulose during aerobic batch culture in minimum media containing 72.8 g/L cellulose

hydrolysis at the lowest enzyme cost. In addition, a continuous process will be developed to reuse the leftover cellulose, because this will already contain bound recombinant cellulases. In summary, our work has revealed the potentiality of the engineered cellulolytic *Y. lipolytica* for the bioconversion of cellulose to biodiesel ingredients.

Lipase production using recombinant *Y. lipolytica* strains

Proteins are high value products of great interest for both research and commercial purposes. *Y. lipolytica* is an attractive host for protein production, because it exhibits remarkable ability to secrete a whole range of heterologous proteins [22]. Moreover, our previous studies aimed at conferring cellulolytic ability to *Y. lipolytica* have revealed that this yeast can simultaneously produce multiple proteins, secreting several of these into the culture medium. In this study, a native lipase (lipase 2), an enzyme that is widely used in wastewater treatment, chemical synthesis and pharmaceutical industries [21, 31], was overexpressed in CYLp, resulting in strain CYLpL. Using this strain, we have investigated how simultaneous cellulase production affects lipase production and how this strain can be used to drive cellulose-based recombinant protein production.

Both CYLpL and the control strains, YLpW and YLpL, were able to grow on YT medium (6.0 g DCW/L in 16 h) even when glucose was absent (Fig. 5a). However, recombinant strains YLpL and CYLpL grown on YTD produced five times higher lipase activity (22.0 U/mL in 24 h) than YLpW (Fig. 5). It is likely that the background activity of lipase for YLpW (4.5 U/mL) is indicative of the low level expression of the native lipases 2, 7 and 8, which are expressed at high level upon the induction with fatty acids [21] (Fig. 5). Significantly, lipase production did not affect growth rate, biomass yield, sugar consumption and cellulase production, since these were approximately the same for the strains tested when these were grown in YTD minimal medium (Table 4). Overall, the cellulolytic *Y. lipolytica* proved to be an efficient host for protein production, producing 800 U lipase/g glucose and, in parallel, multiple cellulases.

Logically, attempts to perform cellulose-based lipase production on YTC using YLpL (Figs. 5a; 6a) led to the accumulation of only 3.0 g DCW/L, low lipase production (even after 120 h) and no cellulose consumption. Contrastingly, the use of CYLpL led to the consumption of 16 g/L of cellulose, which correlated with better growth (10 g DCW/L) and lipase production (9.0 U/mL after 96 h). In terms of lipase yield, CYLpL produced 562 U lipase/g cellulose. Unsurprisingly this is lower than the optimal yield (880 U lipase/g glucose) obtained using glucose, but the achievement is nonetheless remarkable, because to our knowledge this is the first time that a CBP

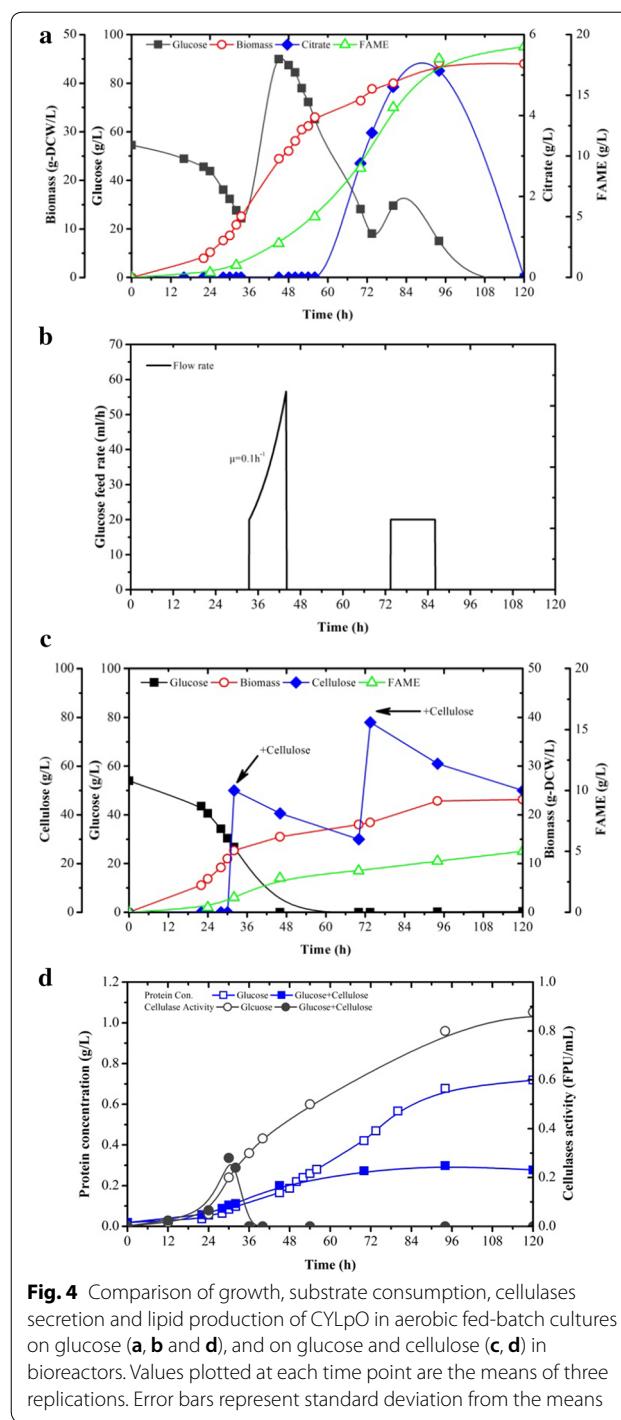


Fig. 4 Comparison of growth, substrate consumption, cellulases secretion and lipid production of CYLpO in aerobic fed-batch cultures on glucose (**a, b** and **d**), and on glucose and cellulose (**c, d**) in bioreactors. Values plotted at each time point are the means of three replications. Error bars represent standard deviation from the means

approach has been used to produce recombinant proteins (other than cellulases) using cellulose as the carbon feedstock. Building on this proof of concept, it is easy to imagine how this platform could be used to produce a variety of valuable proteins or multifunctional peptides, for example for pharmaceutical applications. For future work, it might be necessary to improve the efficiency

and/or productivity of the cellulolytic arsenal produced by CYLpL, either by replacing certain components with alternative enzymes, or using enzyme engineering techniques to improve the existing ones. However, prior to this it will be necessary to perform a detailed physiological study of the engineered strains to acquire systemic understanding of how engineering has impacted the metabolic pathways and regulation networks. This is vital to better satisfy energy requirements and anticipate competition for growth intermediates and protein production.

Ricinoleic acid production of recombinant *Y. lipolytica* strains

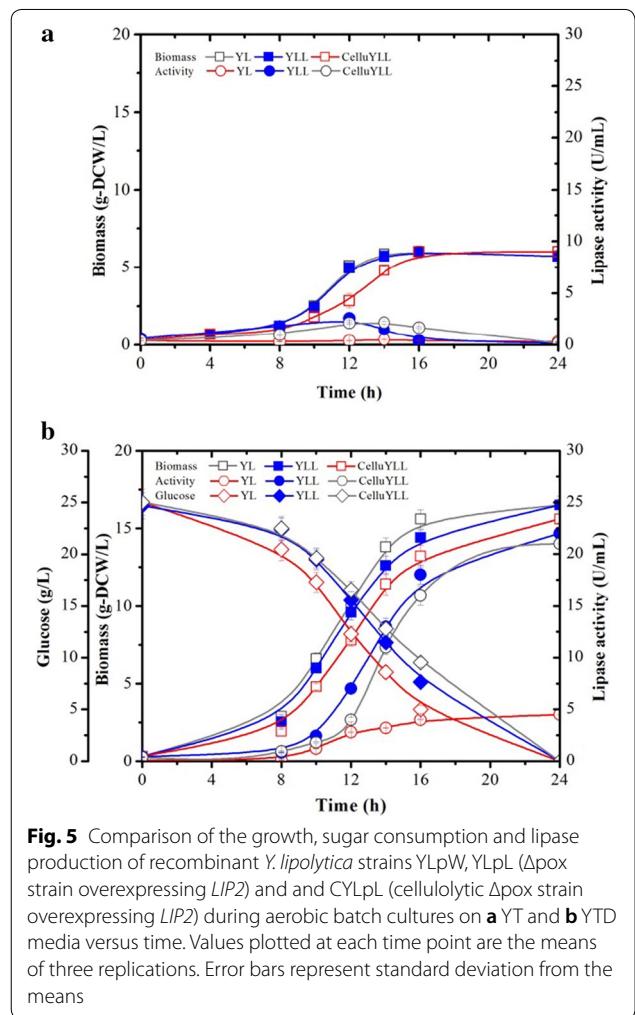
The parental strain YLx, which is deprived of the native triacylglycerol (TAG) acyltransferases (Dga1p, Dga2p, and Lro1p) and the $\Delta 12$ desaturase (Fad2p), is a promising host for the specific production of unconventional fatty acid, such as ricinoleic acid (RA, C18:1 12-OH). This fatty acid and its derivatives are important oleochemicals which have numerous applications. A previous study has demonstrated that the expression of *CpFAH12* in YLx enabled RA production [22]. In the current study, we first endowed YLx with cellulolytic capability (i.e., creating CYLx) and then introduced *CpFAH12*, thus creating CYLxR, which is designed to allow CBP of cellulose to RA (Table 1). Secretion of RA into the culture medium was achieved by adding 10% of decane, which normally yielded more than 95% of RA recovery (data not shown).

Cultivation of the prototrophic YLxW strain, YLxR (expressing *CpFAH12*) and CYLxR in MM and YTD media revealed that the expression of *CpFAH12* led to a 27% decrease in μ_{max} , but similar biomass yield and cellulolytic activity (for CYLxR) compared to the parental strain CYLx (Table 4). For all the cultures, no consumption of citrate was observed in 5 days of cultivations. Additionally, although YLxR and CYLxR showed lower growth rates than YLxW when grown on YT and YTD, probably due to the toxicity of RA accumulation [22], the final biomass yield of the three strains was essentially the same (Fig. 7). Consequently, CYLxR produced 1.3 and 3.2 g RA/L decane in 36 h on YT and YTD respectively, while YLxR produced higher amounts over a shorter period (1.5 and 4.4 g RA/L decane in 28 h, respectively), thus illustrating the effect of the cellulase production burden (Fig. 7c). However, the control strain YLxW did not produce RA on either media. When grown on YT containing cellulose as carbon source (YTC), CYLxR consumed 11 g/L cellulose and produced 7.0 g/L biomass and 2.2 g RA/L decane in 96 h, while YLxR produced maximum 4.0 g/L biomass and 1.3 g/L RA without the consumption of cellulose (Fig. 8). Moreover, the fatty acid profiles in the decane phases of CYLxR and YLxR were different, especially regarding the amount of oleic acid (C18:1), which was four to ten times higher in the case

Table 6 Comparison of lipid and biomass yield of recombinant *Y. lipolytica* grown on glucose and cellulose (C/N ratio \approx 30:1) in aerobic fed-batch cultivations in bioreactors for 5 days

	$Y_{X/S}$ (g DCW/g)	$Y_{FAME/S}$ (g/g)	$Y_{FAME/X}$ (g/g DCW)	P_{FAME} (g/L/h)
Glucose (200 g/L)	0.22	0.10	0.43	0.18
Glucose (50 g/L) + cellulose (50 g/L) ^a	0.22	0.05	0.22	0.04

^a Yields were calculated from the consumption of glucose deduced from cellulose degradation

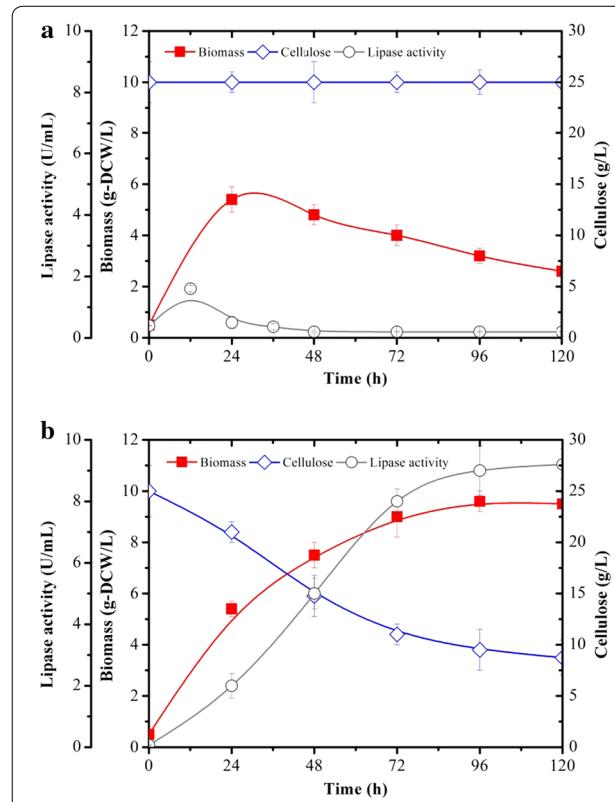


of CYLxR when grown on the different media (YT, YTD and YTC). However, the reason for the increased secretion of level of oleic acid in CYLxR remains to be elucidated. This higher level of oleic acid production (a RA precursor) by CYLxR might explain why RA production is lower than

that in YLxR (Figs. 7c and 8b). The CYLxR-mediated production yield of RA on cellulose (0.18 g RA/g glucose, calculated from the cellulose consumed) was similar to that of YLxR grown on glucose (0.19 g RA/g glucose), which was close to the highest reported RA yield so far [22]. However, the productivity of RA on cellulose was about 0.02 g/L/h, which only represents 25.8% of that obtained on glucose (0.09 g/L/h). Since RA production is growth dependent, the low RA productivity of CYLxR can be ascribed both to the low robustness of the YLx background strain and the insufficient cellulolytic activity of CYLxR, which both combine to limit growth on cellulose. Robustness is a vital attribute for strains that are used in lignocellulosic biorefineries, since the pretreated biomass hydrolysates create challenging process conditions. In future work, further engineering of YLx derivatives will be required to boast strain robustness.

Conclusion

Herein, we describe the further engineering of a cellulolytic *Y. lipolytica* strain aimed at optimizing cellulase production and conferring the ability to produce a number of target products. Accordingly, we have exemplified the potential



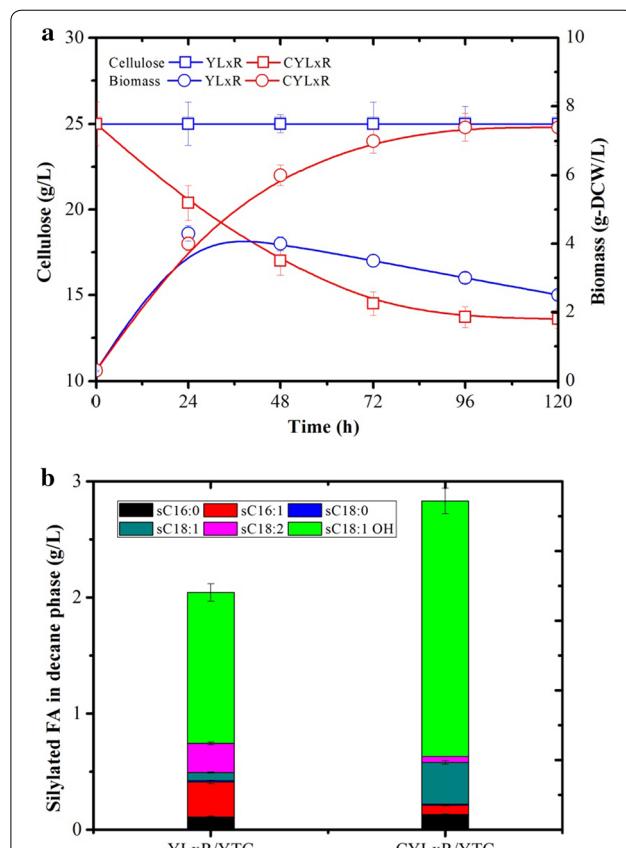
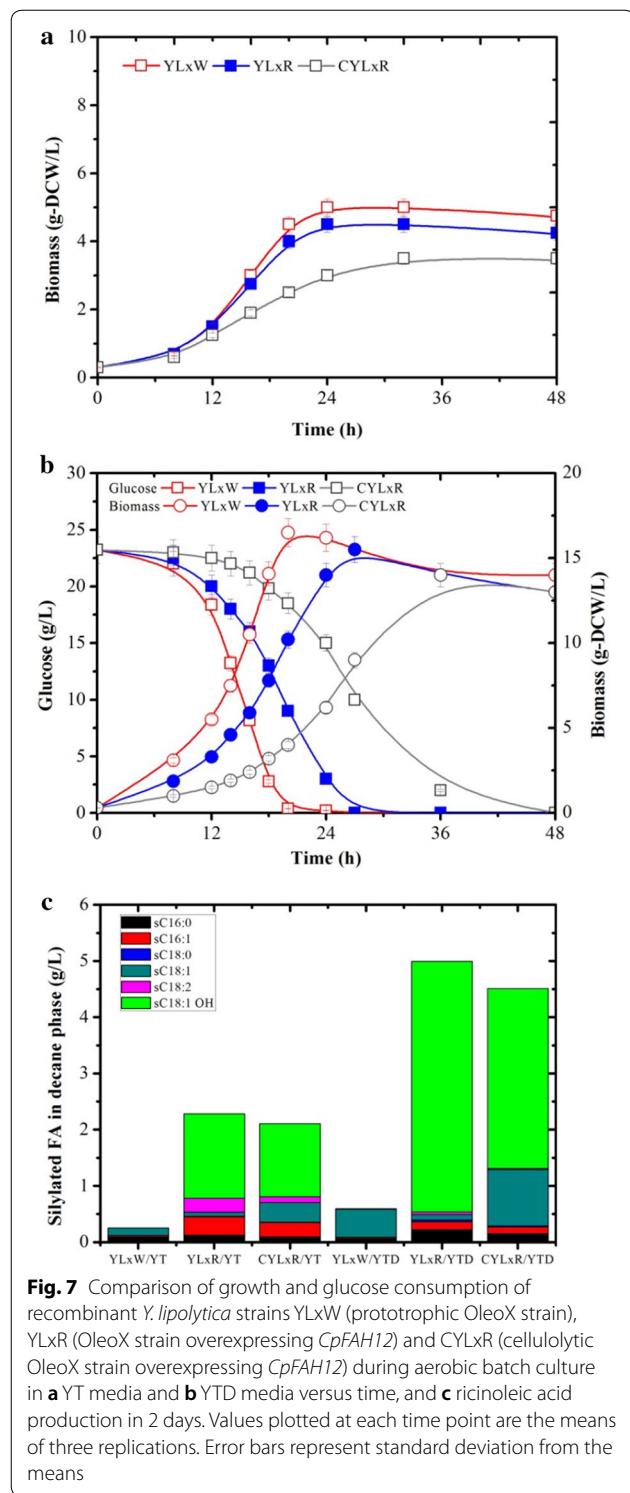


Fig. 8 Ricinoleic acid production of recombinant *Y. lipolytica* strains YLxR and CYLxR during aerobic batch culture in YTC media. **a** Comparison of growth and cellulose consumption and **b** ricinoleic acid production in 5 days. Values plotted at each time point are the means of three replications. Error bars represent standard deviation from the means

have been highlighted as remaining challenges that will require further work. Improvement of the cellulase arsenal will probably require both enzyme engineering and the recruitment of other “accessory” enzymes. However, a prerequisite for further strain engineering is a systems-level analysis aimed at carefully identifying and studying metabolic bottlenecks and rate-limiting steps. Moreover, in addition to further strain improvement, economic analysis of hybrid process scenarios including a continuous process might also be worthwhile to determine whether it is feasible to reinforce the inherent cellulolytic capability of engineered *Y. lipolytica* by the addition of external cellulases. Overall, the engineered cellulolytic *Y. lipolytica* strain described herein can be described as a promising prototype for the development of CBP aimed at converting cellulose into a wide variety of commercially relevant products.

of this strain for use as a CBP host for the production of recombinant proteins, lipids and ricinoleic acid. Shortcomings, such as the suboptimal rate of cellulose hydrolysis,

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Schematic diagram of the strain constructions. **Figure S2.** Schematic diagram of the construction of the plasmid JMP62LeuEB1TE1 for co-expressing BGL1 and EG1. **Figure S3.** Schematic diagram of the construction of the plasmid JMP62UraTB2EE2 for co-expressing BGL2 and EG2. **Figure S4.** PCR verification of *Y. lipolytica* transformants expressing multiple cellulases and genes for producing target products (A) CYLpL, Lane 1 to 7: *YIBGL1*, *YIBGL2*, *TrEG1*, *TrEG2*, *NcCBH1*, *TrCBH2*, *YILP2*; (B) CYLpO, Lane 1 to 8: *YIBGL1*, *YIBGL2*, *TrEG1*, *TrEG2*, *NcCBH1*, *TrCBH2*, *YISCD1*, *YIDGA1*; (C) CYLxR, Lane 1 to 7: *YIBGL1*, *YIBGL2*, *TrEG1*, *TrEG2*, *NcCBH1*, *TrCBH2*, *CpFAH12*. **Figure S5.** The schematic diagram of the strain construction strategies (A) the previous strategy which easily caused gene loss; (B) the current strategy to avoid gene loss by reducing *LoxP* sites. **Figure S6.** Comparison the production of (a) BGL1 and (b) EG2 under the control of EXP and TEF promoter by *Y. lipolytica* grown on YTD media. **Figure S7.** Phase contrast and fluorescence microscopy of intracellular stored lipids stained with Bodipy dye of the recombinant strains during aerobic batch culture in minimal media supplemented with glucose or cellulose. (a, b) YLpW, (c, d) YLpO and (e, f) and CYLpO on glucose; (g, h) CYLpO on cellulose with supplementation of cellulases at 10 FPU/g cellulose, (i, j) YLpO on cellulose with supplementation cellulases at 20 and (k, l) 10 FPU/g cellulose. **Table S1.** The sequences of the oligonucleotide primers used for PCR verification of *Y. lipolytica*-transformants.

Abbreviations

ACC1: acetyl-CoA carboxylase; BGL: β -glucosidase; CBH: cellobiohydrolase; CBP: consolidated bioprocessing; CMC: carboxymethyl cellulose; CpFAH12: *Claviceps purpurea* fatty acid $\Delta 12$ -hydroxylase; DCW: dry cell weight; DGA1: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1; EG: endoglucanase; FAMEs: fatty acid methyl esters; FPU: filter paper units; LCB: lignocellulosic biomass; MM: minimal medium; NREL: National Renewable Energy Laboratory; P_{FAME} : productivity of FAMEs; pNPB: *p*-nitrophenyl butyrate; RA: ricinoleic acid; SCD1: stearoyl-CoA desaturase; SSF: simultaneous saccharification fermentation; YL: *Y. lipolytica*.

Authors' contributions

ZPG, FB, SD, MJO and AM conceived the study and participated in its design. ZPG designed the constructs, carried out all the experiments and drafted the manuscript. JR has been involved in ricinoleic acid production and fatty acid analysis. JR, SB, SD, MJO and AM revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Nelly Monties for her help with chromatographic analyses. We thank CIMV S.A. and Françoise Ouarne for kindly providing us with CIMV-cellulose. We thank the ICEO facility dedicated to enzyme screening and discovery, and part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA) for providing access to its screening, protein purification and analytical facilities.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of supporting data

All data generated or analyzed in the present study are included in this published article and a supporting material "Additional file 1".

Consent for publication

All authors consent for publication.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (Investissements d'Avenir program; Reference ANR-11-BTBR-0003). Dr. Guo is a recipient

of a postdoctoral fellowship from the Institut National de la Recherche Agronomique.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 18 February 2018 Accepted: 7 May 2018

Published online: 15 May 2018

References

1. Mazzoli R. Development of microorganisms for cellulose-biofuel consolidated bioprocesses: metabolic engineers' tricks. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012;3:e201210007.
2. Brethauer S, Studer MH. Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. *Energy Environ Sci*. 2014;7:1446–53.
3. Gnansounou E. Fuel ethanol. In: Pandey A, editor. *Handbook of plant-based biofuels*. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 57–72.
4. Frommhagen M, Sforza S, Westphal AH, Visser J, Hinz SW, Koetsier MJ, van Berkel WJ, Gruppen H, Kabel MA. Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:101.
5. Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv*. 2012;30(6):1458–80.
6. Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progr Energy Combust Sci*. 2012;38:522–50.
7. Delmas M. *Vegetal refining and agrochemistry*. Chem Eng Technol. Wiley. 2008;31:792–7. <http://doi.wiley.com/10.1002/ceat.200800052>. Accessed 28 Feb 2011.
8. Delmas M, Benjelloun MB. Process for producing bioethanol by enzymatic hydrolysis of cellulose. E.U. Patent EP 2627775 A2, Aug 21; 2013.
9. Merino S, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;108:95–120.
10. Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16:577–83.
11. den Haan R, van Rensburg E, Rose SH, Görgens JF, van Zyl WH. Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;33:32–8.
12. Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijken PW, Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40(3):187–206.
13. Blaize J, Hill A, Liu L, Knight R, Miller J, Pan A, Otoupal P, Alper HS. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. *Nat Commun*. 2014;5:3131.
14. Rigouin C, Gueroult M, Croux C, Dubois G, Borsenberger V, Barbe S, Marty A, Daboussi F, André I, Bordes F. Production of medium chain fatty acids by *Yarrowia lipolytica*: combining molecular design and TALEN to engineer the fatty acid synthase. *ACS Synth Biol*. 2017;6(10):1870–9.
15. Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*. 2004;109(1–2):63–81.
16. Guo ZP, Duquesne S, Bozonnet S, Cioci G, Nicaud JM, Marty A, O'Donohue MJ. Conferring cellulose-degrading ability to *Yarrowia lipolytica* to facilitate a consolidated bioprocessing approach. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:132.
17. Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, Thonart P, Nicaud J-M. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods*. 2003;55(3):727–37.
18. Guo ZP, Duquesne S, Bozonnet S, Nicaud JM, Marty A, O'Donohue MJ. Expressing accessory proteins in cellulolytic *Yarrowia lipolytica* to improve the conversion yield of recalcitrant cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:298.
19. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study

- on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 1992;8:501–17.
20. Duquesne S, Bordes F, Fudalej F, Nicaud J-M, Marty A. The yeast *Yarrowia lipolytica* as a generic tool for molecular evolution of enzymes. *Methods Mol Biol*. 2012;861:301–12.
 21. Bordes F, Tarquis L, Nicaud JM, Marty A. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *J Biotechnol*. 2011;156(2):117–24.
 22. Beopoulos A, Verbeke J, Bordes F, Guicherid M, Bressy M, Marty A, Nicaud JM. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(1):251–62.
 23. Adney B, Baker J. Standard biomass analytical procedures: measurement of cellulase activities. Golden: National Renewable Energy Laboratory; 1996.
 24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
 25. Browne J, McCourt PJ, Somerville CR. Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem*. 1986;152:141–5.
 26. Wei H, Wang W, Alahuhta M, Vander Wall T, Baker JO, Taylor LE II, Decker SR, Himmel ME, Zhang M. Engineering towards a complete heterologous cellulase secretome in *Yarrowia lipolytica* reveals its potential for consolidated bioprocessing. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):148.
 27. Beopoulos A, Mrozoa Z, Thevenieau F, Le Dall MT, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud JM. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(24):7779–89.
 28. Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19:248–56.
 29. Qiao K, Imam Abidi SH, Liu H, Zhang H, Chakraborty S, Watson N, Kumaran Ajikumar P, Stephanopoulos G. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*. 2015;29:56–65.
 30. Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng*. 2013;15:1–9.
 31. Gérard D, Guérout M, Casas-Godoy L, Condoret J-S, André I, Marty A, Duquesne S. Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase. *Tetrahedron Asymmetry*. 2017;28(3):433–41.
 32. Guo Z, Duquesne S, Bozonnet S, Cioci G, Nicaud JM, Marty A, O'Donohue MJ. Development of cellobiose-degrading ability in *Yarrowia lipolytica* strain by overexpression of endogenous genes. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:109.
 33. Nicaud J-M, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*. 2002;2(3):371–9.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Chapitre III. Résultats

Partie 2.

Déterminants de la spécificité
de l'hydroxylase et de la désaturase
de *Claviceps purpurea*

A. Étude des déterminants de la spécificité de l'hydroxylase de *Claviceps purpurea*

Ce travail a donné lieu à un article en premier auteur (Robin et al. 2019) dans le journal « Biotechnology and Bioengineering ». Il retrace les stratégies et résultats obtenus pour la caractérisation des déterminants de la spécificité chez l'hydroxylase bifonctionnelle de *C. purpurea*, CpFAH12.

Pour étudier ces déterminants, nous avons tiré avantage de l'existence chez ce même organisme d'une désaturase monofonctionnelle, CpFAD2, possédant une forte homologie avec CpFAH12 (86% d'identité). En s'appuyant sur un modèle topologique basé sur les prédictions de structures secondaires des deux enzymes, des domaines ont été échangés entre CpFAH12 et CpFAD2 et le ratio hydroxylation versus désaturation a été mesuré pour chaque construction. Cela a permis de révéler une position importante pour l'hydroxylation qui a ensuite été étudiée par mutagénèse de saturation. Pour aller plus loin dans les conclusions quant à l'effet de cette position, un modèle tridimensionnel a été construit pour CpFAH12 à partir des dernières données structurales obtenues pour d'autres désaturases membranaires apparentées (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015). Nous avons brièvement décrit les principales étapes et conclusions de ce travail dans les deux sous-parties suivantes. Et l'article dans son intégralité est fourni dans une troisième sous-partie.

- a. La construction des chimères CpFAH12/CpFAD2 et l'identification d'une position critique pour la désaturation

Grâce à un modèle topologique et aux **prédictions de structures secondaires réalisées sur CpFAH12 et CpFAD2**, différents domaines équivalents ont été déterminés sur les deux séquences. À l'aide de ce découpage, les chimères ont été construites à partir de la séquence de CpFAH12 utilisée comme châssis, dans lequel des domaines ont été échangés par ceux de CpFAD2. Nous avons montré dans un premier temps que **l'échange des domaines transmembranaires n'avait aucun effet sur la spécificité d'hydroxylation et de désaturation ou sur l'activité**. Par contre, lorsque des zones cytosoliques sont échangées, un effet sur l'activité et/ou la spécificité désaturation/hydroxylation est systématiquement observé. Les déterminants de la spécificité sont donc bien portés par un ensemble de zones cytosoliques sur la totalité de la séquence.

Une zone critique cytosolique (Cyt2) a pu être identifiée, elle est située de la première hélice amphiphile jusqu'à la deuxième paire d'hélices transmembranaires (position Leu181 à Ala294) et elle contient la deuxième histidine-box (His191 à His195). Pour rappel les désaturases membranaires contiennent toutes trois histidines-box indispensables à la catalyse. Les autres chimères montraient une diminution de l'activité et/ou de la spécificité d'hydroxylation, alors

que la chimère CpFAH12 Cyt2_Des (châssis CpFAH12 dans lequel le domaine Cyt2 a été échangé par celui de la désaturase CpFAD2) a perdu toute capacité à produire de l'acide ricinoléique mais en conservant une forte activité de désaturation. Cette zone a été ensuite redécoupée en deux parties, et les acides aminés cruciaux sont dans la partie en amont proche de la seconde histidine-box. Cette zone comporte seulement quatre acides aminés différents entre CpFAH12 et CpFAD2.

Des expériences de mutagénèse « de remplacement » sur ces quatre positions ont montré que l'une d'elles est absolument nécessaire à l'hydroxylation. Le changement de **la position 198 abolit seule toute l'hydroxylation comme la chimère CpFAH12 Cyt2_Des**. Cette position 198 contient une isoleucine chez CpFAH12 et une thréonine chez CpFAD2.

b. Exploration de la position 198 et interprétation à l'aide d'un modèle tridimensionnel de CpFAH12

Une mutagénèse de saturation a été réalisée sur la position 198 pour mieux comprendre quels étaient les déterminants de la spécificité d'hydroxylation/désaturation de cette position précise. Cela n'a pas permis de trouver un acide aminé permettant une amélioration de la production d'acide ricinoléique, mais **plusieurs mutants ont montré une large amélioration de l'acide linoléique produit**. Deux mutants, I198V et I198C, ont conduit à une amélioration de la conversion (respectivement 82% et 76%) à cause de la large augmentation de la production d'acide linoléique (respectivement 342% et 375% de celle du témoin CpFAH12).

Pour mieux comprendre les résultats obtenus, **un modèle basé sur les structures des stéaroyl-CoA désaturases a été construit**. Grâce à lui, nous avons montré que la position 198 est située entre la surface de la protéine et des histidines liant le centre fer. Même si le mécanisme catalytique reste inconnu jusqu'à maintenant, cela a permis de formuler des hypothèses sur le fonctionnement des hydroxylases ou des désaturases membranaires en général. Il est fortement probable que les mutations sur **la position 198 interagissent et/ou déplacent les histidines coordonnant les fers**, ce qui modifierait profondément l'activité du mutant. Une seconde explication pourrait être que ces **zones cytosoliques autour de la position 198 pourraient être le lieu de liaison au cytochrome b5**. Cependant, contrairement à ce qui a été montré chez la stéaroyl-CoA de souris, il n'y a pas de surface avec une électrostaticité de surface compatible avec un cytochrome b5.

On notera également que le modèle, réalisé à partir des stéaroyl-CoA désaturases, associé à l'analyse de nombreuses séquences de type Δ^{12} -désaturases et des expériences de mutagénèse ont permis de proposer comme hypothèse que ces enzymes **possèdent une quatrième box composée d'une histidine et d'une thréonine**, elle serait placée à la fin de la quatrième hélice transmembranaire.

c. Article

Identification of a crucial amino acid implicated in the hydroxylation/desaturation ratio of CpFAH12 bifunctional hydroxylase

Julien Robin¹ | Marc Gueroult² | Randa Cheikhrouhou¹ | Marie Guicherd¹ |
Vinciane Borsenberger¹ | Alain Marty¹ | Florence Bordes¹ 

¹LISBP, CNRS, INRA, INSA, Université de Toulouse, Toulouse, France

²UMR URCA/CNRS 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne-Ardenne, France

Correspondence

Florence Bordes, INSA Toulouse LISBP, 135 avenue de rangueil, 31077 Toulouse Cedex, France.

Email: Florence.bordes@insa-toulouse.fr

Funding information

INSA of Toulouse

Abstract

Claviceps purpurea bifunctional $\Delta 12$ -hydroxylase/desaturase, CpFAH12, and monofunctional desaturase CpFAD2, share 86% of sequence identity. To identify the underlying determinants of the hydroxylation/desaturation specificity, chimeras of these two enzymes were tested for their fatty acid production in an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. It reveals that transmembrane helices are not involved in the hydroxylation/desaturation specificity whereas all cytosolic domains have an impact on it. Especially, replacing the CpFAH12 cytosolic part near the second histidine-box by the corresponding CpFAD2 part annihilates all hydroxylation activity. Further mutagenesis experiments within this domain identified isoleucine 198 as the crucial element for the hydroxylation activity of CpFAH12. Monofunctional variants performing the only desaturation were obtained when this position was exchanged by the threonine of CpFAD2. Saturation mutagenesis at this position showed modulation in the hydroxylation/desaturation specificity in the different variants. The WT enzyme was demonstrated as the most efficient for ricinoleic acid production and some variants showed a better desaturation activity. A model based on the recently discovered membrane desaturase structures indicate that these changes in specificity are more likely due to modifications in the di-iron center geometry rather than changes in the substrate binding mode.

KEY WORDS

hydroxylation-desaturation specificity, membrane desaturases, modeling, mutagenesis and chimeras, *Yarrowia lipolytica*

Abbreviation: %conv, Conversion percentage $\frac{RA + LA}{RA + LA + OA}$; %Hyd, Hydroxylation percentage $\frac{RA}{RA + LA}$; %LA/CpD, Percentage of LA titer compared with the titer of the wild-type CpFAD2 expressing strain $\frac{[LA]_{sample}}{[LA]_{CpFAH12}}$; %LA/CpH, Percentage of LA titer compared with the titer of the wild-type CpFAH12 expressing strain $\frac{[LA]_{sample}}{[LA]_{CpFAH12}}$; %RA/CpH, Percentage of RA titer compared with the titer of the wild-type CpFAH12 expressing strain $\frac{[RA]_{sample}}{[RA]_{CpFAH12}}$; CpFAD2, *Claviceps purpurea* fatty acid desaturase; CpFAH12, *Claviceps purpurea* fatty acid hydroxylase; FA, Fatty acid; FAD, Fatty acid desaturase; FAH, Fatty acid hydroxylase; FAME, Fatty acid methyl ester; His-Box, Histidine box; LA, Linoleic acid (C18:2 $\Delta^{9c,12c}$); MD(s), Membrane fatty acid desaturase(s); OA, Oleic acid (C18:1 Δ^{9c}); RA, Ricinoleic acid (C18:1 $\Delta^{9c} OH^{12}$); SCD1, Stearyl-CoA desaturase; TFA, Total fatty acids; TM, Transmembrane; WT, Wild-type.

1 | INTRODUCTION

Vegetable oils are commonly exploited for nutritional, medicinal, and/or energy purposes. Their properties depend on the kind of fatty acids (FAs) esterified on glycerol moieties. The most common FA modification is desaturation, which fulfills diverse physiological needs for the organism such as membrane fluidity. The main enzymes

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2019 The Authors *Biotechnology and Bioengineering* Published by Wiley Periodicals, Inc.

responsible for these modifications belong to two evolutionary distinct families called desaturases (Shanklin & Cahoon, 1998): the soluble fatty acid desaturases (Pfam: PF03405) only found in the stroma of chloroplasts and the cytosol of bacteria, and the membrane fatty acid desaturases (MDs; Pfam: PF00487) that are widespread in all organisms. Both families share an evolutionary convergence like a diiron cluster in their active site, and require an electron transfer chain as well as dioxygen for their catalytic activity.

The MDs are able to perform desaturation on a broad range of substrates (including acyls-CoA and phospholipids), and on different FAs positions. They have been named according to the localization of the desaturation in the FA chain. For instance, the widespread Δ^9 -stearoyl-CoA desaturases 1 (SCD1 family), that belong to the Δ^9 -FADs, synthesize oleoyl-CoA by introducing a double bond between carbons nine and ten on stearoyl-CoA, whereas the Δ^{12} -FADs act on the bond between carbons 12 and 13, mostly on oleic acid esterified on the sn2 position of phosphatidylcholine. Some desaturases of the Δ^{12} -FAD family have evolved to perform modifications other than desaturation (Qiu, Sept, Joseph, Holst, & McCammon, 2001; Shanklin & Cahoon, 1998), such as hydroxylation (Broun, Boddupalli, & Somerville, 1998; Dauk, Lam, Kunst, & Smith, 2007; Meesapyodsuk & Qiu, 2008; Van de Loo, Broun, Turner, & Somerville, 1995; Zhou, Singh, & Green, 2013), epoxidation (Lee et al., 1998; Zhou et al., 2006), or "acetylenization" (Cao et al., 2013; Lee et al., 1998; Minto & Blacklock, 2008; Sperling et al., 2000). The unusual FAs synthesized like the widely used ricinoleic acid (RA; C18:1 $\Delta^{9\text{cis}}$ OH $^{12\text{R}}$; RA) often present some interesting properties for industrial applications. The hydroxyl group confers some particular properties to the fatty acid that can prove useful in high-added value fields, such as cosmetics, lubricants, or chemistry synthon. Although MDs are more widespread than soluble desaturases, their structural data are less available due to their localization in the membrane. Only three structures of MDs have been currently described: two SCD1 (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015) and a sphingolipid α -hydroxylase (Zhu et al., 2015). Hence, there is no three-dimensional structure available for the Δ^{12} -FAD family and the determinant(s) responsible for their uncommon enzymatic activities are unknown.

The phytopathogenic fungus, *Claviceps purpurea*, possesses three Δ^{12} -FAD-like enzymes: CpFAD2, which preferentially produces linoleic acid (C18:2 $\Delta^{9\text{cis-12\text{cis}}$; LA) from oleic acid (C18:1 $\Delta^{9\text{cis}}$; OA), CpFADX, which is a $\nu + 3$ desaturase with a broad range of substrates (Meesapyodsuk, Qiu, Reed, Covello, & Qiu, 2007), and CpFAH12, which is the only characterized fungal Δ^{12} -hydroxylase and has been used to produce high quantities of RA in different recombinant organisms such as yeasts, microalgae, and plants (Beopoulos et al., 2014; Kajikawa et al., 2016; Meesapyodsuk & Qiu, 2008; Yazawa, Kumagai, & Uemura, 2013). CpFAH12 is a bifunctional Δ^{12} hydroxylase/desaturase and as such, it produces RA as well as LA. It shares only 38–41% of amino acid identity with other plant hydroxylases (*Ricinus communis*, *Physaria fendleri*, *Physaria lindheimeri*, and *Hiptage benghalensis*) but up to 86% with CpFAD2. Hence, comparing these two closely related *C. purpurea* enzymes may lead to the discovery of the determinant(s) responsible for the desaturation/hydroxylation specificity.

To do so, we decided to work with the *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast which has been shown to efficiently produce RA by expressing the CpFAH12 enzyme (Beopoulos et al., 2014). To identify the determinant(s) involved in the enzyme specificity, we used a chimera strategy, a method that has proved particularly efficient to study MDs substrate or region specificity (Broun et al., 1998; Hoffmann et al., 2007; Libisch, Michaelson, Lewis, Shewry, & Napier, 2000; Lim, Senger, & Vrinten, 2014; Meesapyodsuk et al., 2007; Sasata, Reed, Loewen, & Covello, 2004). The partition of CpFAH12 sequence was performed according to secondary structure predictions. The analysis of the chimera productions focused our attention on one particular domain where we identified an amino acid which seems to play a major role on the activity of CpFAH12. This position was submitted to a systematic substitution by all possible amino acids to better understand the role of this amino acid within the enzyme activity. We finally confronted the experimental results with those given by a three-dimensional model to gain deeper insights of the role of this amino acid on the specificity of the enzyme.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Molecular biology

The Table S1 lists the plasmids used in this study. The shuttle vector was a Jmp62 (Beopoulos et al., 2014), with kanamycin resistance for *Escherichia coli* amplification and Ura3 selection marker for *Yarrowia lipolytica* expression. The gene was expressed under the strong constitutive promoter pTEF. Plasmids containing either the wild-type (WT) CpFAH12 or the WT CpFAD2 or a CpFAH12 chimera, and optimized for *Y. lipolytica*, were synthetic plasmids ordered either from GenScript (Piscataway) or Synbio Technologies (Monmouth Junction). The accession numbers of both CpFAH12 and CpFAD2 are listed in Table S2.

Site-directed mutagenesis was performed by polymerase chain reaction (PCR) with primers ordered from Eurogentec (Liège, Belgium) listed in Table S3, on plasmid Jmp62 Ura3ex pTEF CpFAH12 or Cyt2' _Des and with CloneAmp HiFi PCR Premix (Clontech). The thermocycler used was a T100TM from Bio-Rad and the amplification conditions followed supplier specifications. Restrictions enzymes were ordered from New England Biolabs (Evry, France).

2.2 | Bacterial and yeast strains, transformation and culture

All chemicals, reagents, and substrates were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France) except if otherwise stated.

The *E. coli* XL1-Blue strain from Invitrogen (Paisley, UK) was used to amplify plasmid DNA. *E. coli* competent cells were made with Mix & Go!TM Transformation Buffer Set from Zymo Research (Freiburg, Germany) according to the supplier specifications. After transformation, the clones were screened on LB_{Kanamycin} (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, 40 mg/L kanamycin) plates (with 15 g/L

agar). Clones were cultured in LB_{Kanamycin} broth at 37°C during 20 hr under agitation. Plasmids extractions were performed with QIAprep Spin Miniprep Kit from Qiagen (Hilden, Germany). All sequences were checked by Sanger sequencing by Eurofins (Ebersberg, Germany) with sequencing primers (Table S3).

The *Y. lipolytica* chassis was derived from the modified strain JMY2159 (called OleoX) used in previous studies (Beopoulos et al., 2014). The OleoX strain is auxotrophic for leucine and uracil and combines 10 deletions: the two acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase DGAT1 and DGAT2, the phospholipid:diacylglycerol acyltransferase LRO1, the oleate Δ^{12} -desaturase YI.FAD2 and the six genes POX1-POX6. The deletion of POX genes disrupts the β -oxidation which impairs the consumption of lipids. The deletion of the acyltransferases and the Δ^{12} -desaturase should lead to an accumulation of sn2 oleoyl-phosphatidylcholine. The zeta docking platform was added to OleoX strain to obtain the chassis OleoX zeta (OXZ) strain, as described in Bordes, Fudalej, Dossat, Nicaud, & Marty (2007; Figure S1).

OXZ competent cells were made by Frozen-EZ Yeast Transformation II KitTM from Zymo Research. OXZ strain was transformed with a plasmid digested by *Not*I-HF to generate a cassette containing Ura3ex selection marker and the gene of interest surrounded by zeta sequence. After typically 72 hr at 30°C on YNB plates (1.7 g/L YNB_{wowo}, 5 g/L NH₄Cl, 10 g/L glucose, 50 mM NaKPO₄ buffer at pH 6.8, and 15 g/L agar), transformed OXZ clones were directly picked to start an inoculum for cultures.

2.3 | Ricinoleic acid production conditions in OleoX zeta strain

The inoculum used for the production of RA was prepared with freshly transformed cells. Two different clones were grown in 2 ml of YPD broth (10 g/L yeast extract, 10 g/L bactotryptone (Difco, Paris, France) and 10 g/L glucose) at 200 rpm at 28°C during 24–48 hr then the optical density (OD) was measured. The growth was performed in Erlenmeyer flasks of 100 ml containing 9 ml of YT₂D₅ (10 g/L yeast extract, 20 g/L bactotryptone and 50 g/L glucose, buffered at pH 4 with 100 mM citrate buffer) and 1 ml of decane (weighted). The flasks were shaken at 200 rpm at 28°C during 48 hr.

When cultures were stopped, 400 μ l of decane (weighted) with 1 g/L of methyl laurate (mC12) as internal standard was added to the whole 10 ml of media, then OD was measured. The medium was centrifuged at 4,000 g during 10 min and the decane phase was transferred to a glass vial and stored at room temperature until analysis. The supernatant was discarded, and then the cell pellet was freeze-dried, powdered by vigorous vortexing and conserved at –20°C until analysis.

2.4 | Quantification and analysis of produced fatty acids

Two different quantifications were performed: The free FAs in decane phase were quantified by silylation and the whole FAs contents in cell pellets were quantified by transmethylation.

For the silylation, 200 μ l of each sample of decane phase was derivatized with 5 μ l of N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA, weighted) and mixed thoroughly. The reactions were incubated at 45°C during approximately 1 hr, and the samples were analyzed by gas chromatography. Whenever the concentration of a sample was out of the calibration range of 0.1–1 g/L, a dilution was realized with decane.

The method for the transmethylation of powdered freeze-dried cells pellet was adapted from Browne, McCourt, & Somerville (1986). A solution of methanol containing 2.5% sulfuric acid (V/V) and 0.3 g/L of myristic acid (C14:0) as internal standard was prepared. About 4 ml of this solution was added to the cell pellets, and the tubes were vortexed to resuspend the powder. After 4 hr of incubation at 80°C with periodic mixing, they were cooled at room temperature. About 3 ml of NaCl at 50 g/L and 3 ml of decane with 0.3 g/L mC12 as internal standard were then added to the samples. After mixing, they were centrifuged during 10 min at 4,000 g. The organic upper phase was analyzed by gas chromatography.

Both analysis were made in GC-FID-MS (Thermo Fisher Scientific, Trace 1310-ISQ LT) with TG-5MS column (Thermo Fisher Scientific, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The injection volume was 1 μ l, the SSL injector was put in split mode 1:5 at 250°C and the FID detector was at 270°C. The FID output was used for quantification. Calibration solutions used for quantification were prepared from six FAs (silylated by the previously described protocol or methylated): palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1 $\Delta^{9\text{cis}}$), stearic acid (C18:0), OA, LA, and RA. The temperature programs used for analysis of lipids are shown in Table S4.

2.5 | Bioinformatics studies

PSI/TM-COFFEE (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000), PSIPRED (Buchan, Minneci, Nugent, Bryson, & Jones, 2013; Jones, 1999), and Interpro (Finn et al., 2017) were used to make secondary structure prediction (SSP), and Phyre2 (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015) and I-TASSER (Yang et al., 2015) were used to make predictive models also with SSP. The T-COFFEE package was used to make alignments between the two SCD1, CpFAH12, and CpFAD2 to infer the localization of secondary structure. The alignment with the 10 MDs were made by PROMALS3D (Pei, Kim, & Grishin, 2008).

2.6 | Homology modeling of CpFAH12

The CpFAH12 model was generated using the Rosetta software, which allowed us to combine threading and comparative approaches through RosettaCM protocol (Song et al., 2013). Regarding the threading approach, fragment libraries of three and nine amino residues were built using the Robetta server (Kim et al., 2004). To identify the best template for the comparative approach, we ran the sequence of CpFAH12 through HH server (Söding et al., 2005). This server uses hidden Markov motif to spot similarities within secondary structures even if sequences share a low percentage of identity. Despite sharing only 12% of identity with CpFAH12, the

secondary structure of SDC1 from *Mus musculus* (pdb: 4YMK) (Bai et al., 2015) was identified as the best template with its perfect coverage of the residues 105–399.

Since the chosen template had such a low percentage of identity, to build a likely CpFAH12 model, we had to implement some constraints: (a) Based on the predictions of both Octopus (Viklund & Elofsson, 2008) and the TMHMM2.0 software (Möller, Croning, & Apweiler, 2001), we put a constraint on the TM helices; (b) based on the structure of SCD1, we constrained the eight histidine residues (His155, His159, His191, His194, His195, His391, His394, and His395), which, thanks to sequence alignment, had been previously identified as part of the three histidine-box (His-Box) motifs, to keep intact ions coordination sites. All these constraints were added to the RosettaCM protocol and 250 models of the core domain (105–399 residues) were generated. All models were evaluated with ProQM (Ray, Lindahl, & Wallner, 2010) assessment program and the model with the best score and a good His/ion coordination was selected. To mimic the real substrate of CpFAH12, we added an oleic acid by superimposing it on the stearoyl-CoA of SCD1. The energy of new model was minimized to remove any steric clash.

2.7 | Electrostatic potential calculations

Electrostatic potential maps were calculated with the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (APBS; Baker, Sept, Joseph, Holst, & McCammon, 2001) on the model of CpFAH12 and the mutant I198T model, using APBS default parameters (physiological salt concentration of 150 mM, temperature of 298.15 K, solvent dielectric of 78.4, and solute dielectric of 2). The Van der Waals radii and partial charges of both the protein and the Fe²⁺ ions were those of the AMBER ff99 force field. Solute charges were distributed onto grid points using a cubic B-spline discretization. The molecular surface was defined by the interface between a 1.4 Å solvent probe, corresponding to the radius of a water molecule, and the solute the van der Waals radii.

3 | RESULTS

3.1 | Chimeras

3.1.1 | Activities of CpFAD2 and CpFAH12 chassis

We checked the functionality of CpFAD2 in a modified strain of *Y. lipolytica* (Figure S2) and compared it with the one of CpFAH12, an enzyme that had already been successfully expressed in this strain to produce RA (Beopoulos et al., 2014). As RA is largely secreted, cultures were advantageously performed in a biphasic system using decane, thus RA remains trapped in the organic phase which limits its toxic effect. As expected, CpFAD2 did not produce any RA, but its LA titer was greater by two-fold (220%) than the one of CpFAH12. The conversion percentage $\frac{[RA] + [LA]}{[RA] + [LA] + [OA]}$ (%Conv) was around 47% in this strain, which was lower than the 72% displayed in the strain expressing CpFAH12. Interestingly, the RA produced by the

CpFAH12 strain was mainly secreted ($\frac{[RA]}{total[RA]} = 93\%$) and was almost the only FA observed in the decane phase ($\frac{[RA]}{total[FAs]} = 90\%$). The CpFAD2 expressing strain presented only traces of FAs in decane ($\frac{[FAs]}{total[FAs]} = 0.63\%$), probably due to cell lysis.

3.1.2 | Dissection of CpFAH12 and CpFAD2 sequences

The secondary structure predictions (SSP) were performed for both CpFAD2 and CpFAH12 enzymes. First, the length and borders for the two pairs of transmembrane (TM) helices, TM1&2 (Ser99 to Ile153) and TM3&4 (Arg295 to His349), were defined from the SSP analysis (Figure 1). The cytosolic N-term part (Met1 to Lys98) was placed before TM1&2. We chose to split the two remaining large cytosolic parts to reduce their length and to separate the His-Boxes. The C-terminal part of two small helices (Phe167–Leu180 and Gly377–His385) were used as borders and led to the cytosolic parts Cyt1 (Gly154 to Leu180) and Cyt3 (Thr350 to His385). The two remaining cytosolic parts were named Cyt2 (Leu181 to Ala294) and C-term (Gly386 to Gln477). This dissection led to a total of seven main parts which had the same length in CpFAH12 and CpFAD2 (Figure 1).

3.1.3 | Implication of TM domains in hydroxylation

We first investigated whether the TM regions were involved in the hydroxylation activity. We designed a CpFAH12 TM_Des chimera composed with a sequence of CpFAH12 in which TM1&2 and TM3&4 have been exchanged with the ones found in CpFAD2. TM regions have identical length in both enzymes but differ in their respective sequence of amino acids: The difference touches 10 amino acids in TM1&2 but only one in TM3&4 (Table S5). Switching these TM regions did not affect the FAs concentration, nor the FA profile including RA (Figure 2). Hence, the amino acids found in the TM helices are not involved in catalytic efficiency and hydroxylation/desaturation specificity in CpFAH12.

3.1.4 | Implication of cytosolic domains in hydroxylation

We investigated the influence of cytosolic parts on hydroxylation activity with five chimeras carrying the CpFAH12 TM_Des chassis with one of the main cytosolic parts interchanged with CpFAD2 homologous regions. FAs analysis of these chimeras (Figure 2 and Table S6A) revealed a decrease of the RA titer for all chimeras. Compared with WT CpFAH12, Cyt1/TM_Des, and C-term/TM_Des chimeras had the lowest conversion rates and a heavily impacted RA titer. The chimera Cyt2/TM_Des gave the most significant outcome as the activity of OA modification was still high but with a total abolition of the RA production and a huge increase of the LA titer. These results suggest that amino acids involved in hydroxylation specificity and activity are distributed along the whole cytosolic

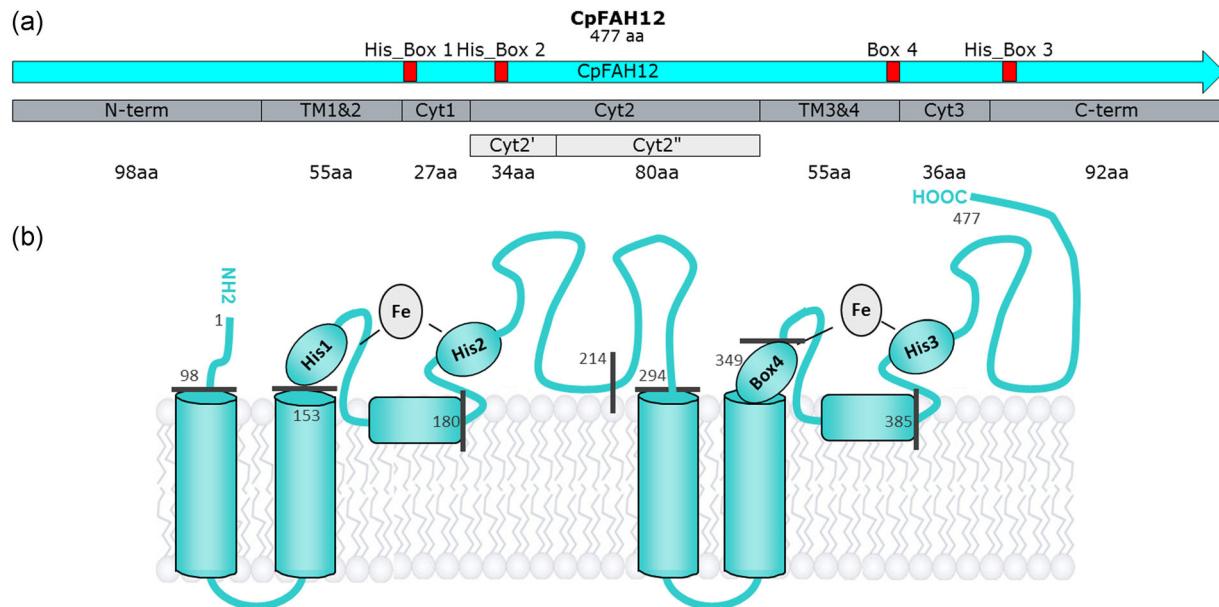


FIGURE 1 (a) Map of CpFAH12, with the partition determined by SSP in gray. The two lighter gray parts come from subpartitioning the Cyt2 part. Red boxes represent the three His-Boxes (His_Box 1, 2, and 3) plus the hypothetical fourth box (Box 4) binding the diiron cluster. (b) Topological model. The gray numbers correspond to the positions of amino acids right before the splitting of parts. As a reminder, boxes 1 and 4 coordinate both irons and boxes 2 and 3 bind only one iron [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

sequences. However, the parts containing the His-Boxes have the greatest impact on activity, especially the Cyt2 part, which contains His-Box no.2. Hence, some amino acids essential for the hydroxylation specificity of CpFAH12 must be located in this region.

3.2 | Identification of a key residue for hydroxylation activity

We further investigated the role of the rather large Cyt2 part by splitting it in two parts (Figure 1). A predicted helix (Phe207–Gln214)

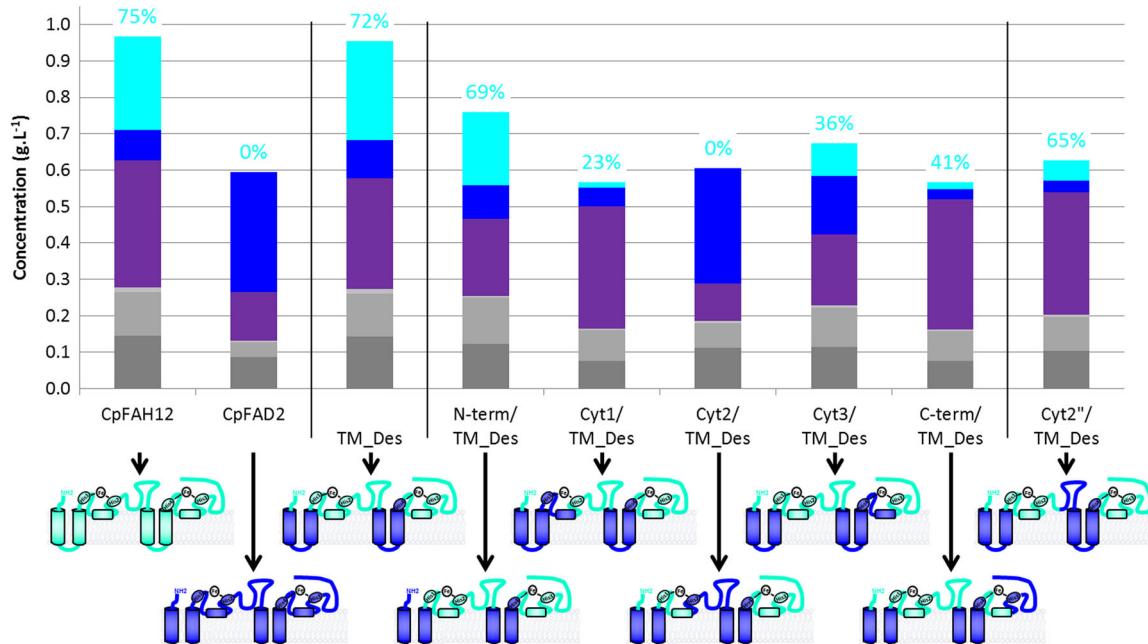


FIGURE 2 Total FA production in g/L by OXZ strain expressing either wild-type CpFAH12, wild-type CpFAD2, or chimeras. All chimeras are based on CpFAH12 chassis, which contains the two pairs of TM helices of CpFAD2 (TM1&2 and TM3&4), in addition to one of the five cytosolic parts of CpFAD2 (N-term, Cyt1, Cyt2, Cyt3, C-term, or Cyt2''). The %Hyd $([\text{RA}]/([\text{RA}] + [\text{LA}]))$ ratio is written above in cyan. Schematic representations of enzymes in topological model are shown below: blue parts correspond to CpFAD2 sequence and cyan parts correspond to CpFAH12 sequences. color code for FA is cyan: RA, blue: LA, violet: OA, light gray: stearic acid, gray: palmitoleic acid and dark gray: palmitic acid [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

served as border and led to the split in Cyt2' (Leu181 to Gln214) and Cyt2" (Gln215 to Ala294). Each part differed by only four amino acids between CpFAH12 and CpFAD2 (Figure S3 and Table S5). Compared with WT CpFAH12, the chimera CpFAH12 Cyt2"/TM_Des showed a decrease in its titer of RA and LA (Figure 2 and Table S6A), albeit less remarkable than the one observed with Cyt2/TM_Des chimera.

To identify which residue(s) were essential for hydroxylation/desaturation specificity, reciprocal-replacements of one, three or all of the four positions of Cyt2' in CpFAH12 – namely Gly197, Ile198, Asn200, and Glu213 (GINE) by CpFAD2 Ala197, Thr198, His200, and Ala213 (ATHA) – were made. The FA titer of OXZ strains expressing these mutants are shown in Figure 3 (Table S6B).

The mutant CpFAH12 ATHA (corresponding to CpFAH12 Cyt2'_Des), demonstrated no hydroxylation ability but maintained a desaturation capacity. This means that at least one of the four modified amino acids is crucial for the hydroxylation/desaturation specificity.

Comparing the triple mutants with the quadruple mutant CpFAH12 ATHA, only the mutant AIHA which conserved the CpFAH12 Ile198, had a hydroxylase activity, all the mutants that conserved the threonine became monofunctional desaturases. In the simple mutants, the effects of single replacement differed according to the target position. However, the CpFAH12 I198T mutant in which the CpFAH12 Ile198 was switched to a threonine is the only one that completely lost its hydroxylation ability. Hence, the replacement of isoleucine 198 by threonine is exclusively responsible for changing the bifunctional hydroxylase/desaturase CpFAH12 activity into a monofunctional desaturase CpFAD2-like activity. Such a drastic effect was unexpected, and to better investigate its

significance, we tested all the possible amino acids at this specific position.

However, when we tried to incorporate the Isoleucine at the position 198 in the CpFAD2 desaturase to see if it would confer a hydroxylation activity, this mutation resulted in the total loss of the desaturation activity for CpFAD2 mutant. Interestingly, when the four mutations GINE were integrated in CpFAD2, it recovers a weak desaturation activity (9.5% cf. to WT CpFAD2; data not shown). This confirms that hydroxylation activity is driven by multiple determinants that are distributed all along the sequence as we proved in our chimera experiment.

3.3 | Systematic exploration of position 198

The 18 other CpFAH12 variants at this position were thus constructed. The FA titer of OXZ strains expressing these mutants are shown in Figure 4 and Table 1.

Eight variants were found to be totally inactive, giving no traces of LA or RA. Six other variants showed either no hydroxylation activity (I198G, I198M, and I198H) or very little (I198P, I198A, and I198S), and for the former two, the desaturation activity was also really decreased. The four remaining variants, I198C, I198N, I198V, and I198L, kept a significant RA titer but none showed a better hydroxylation performance than the WT CpFAH12 strain that combines the best hydroxylation ratio of 79% and the best RA titer (0.35 g/L). Variant I198L had a similar decrease for both LA and RA titer, and thus a decreased conversion rate, whereas the hydroxylation ratio was maintained (%Hyd ratio 80%). For the three other mutants, a concomitant LA ratio augmentation with a higher (or

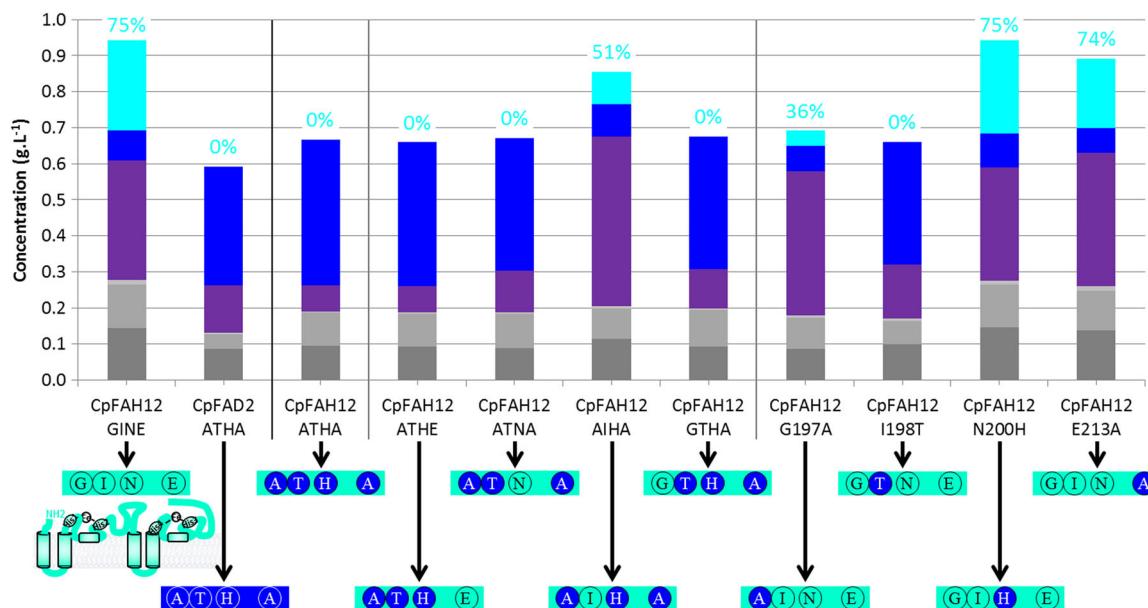


FIGURE 3 Total FAs production in g/L by OXZ strain expressing either WT CpFAH12, WT CpFAD2, or a CpFAH12 mutant in Cyt2' part. The four mutations CpFAH12-to-CpFAD2 are G197A, I198T, N200H, and E213A. Schematic representations of the mutations in CpFAH12 are shown under the bar charts. Blue spheres correspond to amino acids from CpFAD2 sequence, and cyan spheres, to amino acids from CpFAH12 sequence. The chassis is CpFAH12, as indicated by cyan color. The %Hyd ($\{[RA]\}/([RA] + [LA])$) are written above in cyan. color code for FA is cyan: RA, blue: LA, violet: OA, light gray: stearic acid, gray: palmitoleic acid and dark gray: palmitic acid [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

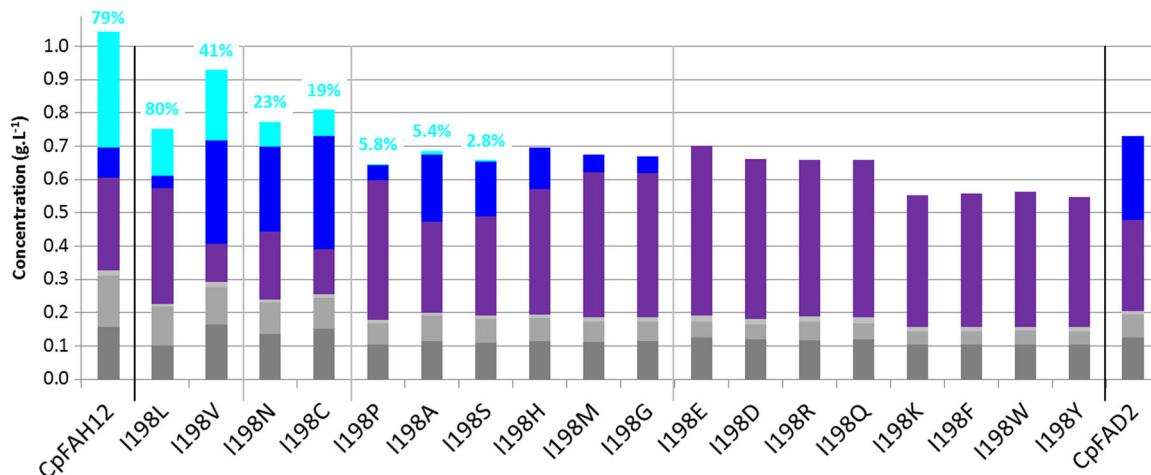


FIGURE 4 Total FAs production in g/L by OXZ strain expressing either WT CpFAH12, WT CpFAD2, or CpFAH12 variant for I198 position (named I198X, where X is the replaced amino acid). The %Hyd ($\frac{[RA]}{[RA] + [LA]}$) are written in cyan above the RA-productive strain. The mutants are ordered following their %Hyd. color code for FA is cyan: RA, blue: LA, violet: OA, light gray: stearic acid, gray: palmitoleic acid and dark gray: palmitic acid [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

conserved) conversion rate resulted in around a three-fold increase in LA production (342%, 281%, and 375% for I198V, I198N, and I198C mutants, respectively) compared with the WT CpFAH12 enzyme. Finally, these three mutants presented a LA production that was higher or equal to CpFAD2. The best LA production was obtained for the I198C variant, in which LA represented 42% of the total amount of fatty acids with a total of 0.34 g/L of culture in 48 hr.

3.4 | New insight from the recently resolved 3D structure of SCD

To better understand the crucial effects of position 198 on the hydroxylation/desaturation specificity, we took advantage of the

recently resolved structure of the MDs and built a three-dimensional model of CpFAH12.

3.4.1 | Alignments

As CpFAH12 and the SCD1 with solved 3D structures could not be aligned directly by their sequences, the alignments were based on their secondary structures. To improve the alignment quality, we used several Δ^{12} -FADs of *Plantae* and *Fungi*, including CpFAD2: the secondary structure of Δ^{12} -FADs and SCD1 were then well aligned, and the three His-Boxes (Figure 1, His-Box 1–3) coordinating the two iron ions of the active site, were also perfectly aligned. For CpFAH12 and CpFAD2, this corresponds to His155-His159 (His-Box no1),

TABLE 1 Overview of the percentages of ricinoleic acid (RA) and linoleic acid (LA) among the total number of fatty acids (TFA) in the strain expressing WT CpFAH12, WT CpFAD2, or a CpFAH12 active variant

	Ratios of RA or LA in total fatty acid		Conversion percentage	Sample RA and LA production compared with respective WT CpFAH12 or CpFAD2 production		
	RA TFA	LA TFA		RA (Sample) RA (CpFAH12)	LA (Sample) LA (CpFAH12)	LA (Sample) LA (CpFAD2)
CpFAH12	33%	8.7%	61%	100%	100%	36%
I198L	19%	4.7%	34%	41%	39%	14%
I198V	23%	33%	82%	61%	342%	122%
I198N	9.7%	33%	62%	22%	281%	101%
I198C	9.8%	42%	76%	23%	375%	134%
I198P	0.4%	6.9%	10%	0.8%	49%	18%
I198A	1.7%	29%	44%	3.3%	222%	80%
I198S	0.7%	25%	36%	1.4%	182%	65%
I198H	0%	18%	25%	0%	137%	49%
I198M	0%	7.9%	11%	0%	59%	21%
I198G	0%	7.6%	10%	0%	56%	20%
CpFAD2	0%	35%	48%	0%	279%	100%

His191-His194-His195 (His-Box no2), and His391-His394-His395 (His-Box no3). The alignments also showed a good conservation for a fourth putative di-iron binding box. Recently, this box composed of a NX_3H motif was identified in a SCD1 enzyme (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015). The multiple alignments of characterized Δ^{12} -FADs enzyme and mutagenesis experiments (see Supplementary Results and Figures S4, S5, and S6) on the position 345 and 349 of CpFAH12, lead us to propose that in Δ^{12} -FADs the fourth diiron binding-box is composed of a TX_3H motif composed of the Thr345 and His349 for CpFAH12 enzyme.

The TM regions that are supposed to accommodate the carbon chain of the FAs were also very well aligned. However, both CpFAH12 and CpFAD2 sequences are longer than the others, especially compared with SCD1, the shortest of the 10 sequences (Figure 5). As SCD1 acts on acyl-CoA and Δ^{12} -FADs on phospholipids, it was expected to find differences in the cytosolic regions that should be involved in the accommodation of their lipid head.

3.4.2 | 3D model

As stipulated in the methods, we generated models of the core structure (positions 105–399) of CpFAH12 by using the structure of stearoyl-CoA desaturase from *Mus musculus* (mSCD1) as template. To preserve the integrity of the iron boxes, we added constraints on the three His-Boxes. We replaced the stearoyl-CoA (in mSCD1) by superimposing an oleate molecule in the model and the energy of the system was minimized. In this final 3D representation, the four helices are well structured (Figure 6 and Figure S6). Each iron ion is correctly coordinated by the nitrogen of their respective binding histidines ($d_{\text{N-Fe}} = 2.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$) and the distance between the iron ions is 8.5 \AA , which is 2.1 \AA longer than the one observed in SCD1 structure (Bai et al., 2015). Interestingly, the distance between the iron and the C9 or C12 carbon atom of the substrate are in the same range for SCD1 structures and CpFAH12 model (5.2 \AA for both mSCD1 and hSCD1 and 4.8 \AA for the CpFAH12 model) whereas the distance between the iron ions and the other carbon atom (C10 or C13) is 2 \AA longer in the CpFAH12 model (4.7 \AA for mSCD1, 4.3 \AA for hSCD1, and 6.1 \AA for CpFAH12).

Evaluation of all these parameters confirms that the di-iron cluster and active site are well organized and allow going further in the understanding of mutation impacts. We thus focused our attention on the environment of the isoleucine 198, located at the end of an amphiphilic helix between two glycine residues (197 and 199, Figure S7). In the model, isoleucine 198 is covered by a loop and interacts tightly with two amino acids within it, Tyr357 and Glu360. On the other side, it is in the close vicinity of three histidines His194, His349, and His395, which coordinate the di-iron center (3.7 \AA , 4.3 \AA , and 3.2 \AA , respectively). We also generated the electrostatic map of the surface of the protein (Figure S8) and observed a negatively charged surface around this residue.

4 | DISCUSSION

The recently obtained structures of SCD1 with stearoyl-CoA complex (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015) confirmed a strong interaction between the substrate and the TM regions which form the binding pocket for the FA carbon chain. In other desaturases chimeras strategies (Libisch et al., 2000; Lim et al., 2014), the authors showed that mutations in TM regions were responsible for changes in regio-specificity and/or substrate-length specificity, probably due to different accommodation of the substrate in the binding pocket. On the contrary, in the present study, we found that the TM regions were not involved in the hydroxylation/desaturation specificity of the CpFAH12 bifunctional hydroxylase. This can be explained by the fact the two activities share the same substrate and the same position of modification. However, we demonstrated that all cytosolic regions have an effect on hydroxylation activity, meaning that these regions may interact with one another to sustain good enzyme functionality. This shows that hydroxylation activity is driven by multiple determinants that are distributed all along the sequence.

While working with chimeras to spot the determinant responsible for its bifunctional activity, CpFAH12_Cyt2/TM_Des drew our attention. While its LA titer remained similar to those observed in CpFAD2, the loss of all its hydroxylation capacity indicated that the large Cyt2 region played a major role in the hydroxylation function. When we further investigated the Cyt2 region through mutagenesis experiments to narrow down the crucial sequence responsible for this hydroxylation function, we identified isoleucine 198 as the key residue for this activity and we performed site saturation mutagenesis on this residue. Among the eight amino acids that led to inactive mutants, all were bulky (Phe, Tyr, Trp, and Gln) or charged (Asp, Glu, Lys, and Arg). Substitution by large hydrophobic amino acids like isoleucine, leucine or valine maintained a reasonable ratio of hydroxylation. The smaller hydrophobic amino acid alanine greatly diminished both the hydroxylation ratio and enzyme activity. Interestingly in the *Physaria fendleri* bifunctional hydroxylase (PfFAH12), this position (which corresponds to Asn149) had been formerly identified as having a role in the hydroxylation specificity of the enzyme (Broun, Boddupalli, & Somerville, 1998). The alignments of Δ^{12} -FADs at this position reveal that it is always a threonine that is found except for the ones having a hydroxylation activity in which either an isoleucine is found (RcFAH12 and CpFAH12), or an asparagine (PfFAH12 and *P. lindheimeri* FAH12; Dauk et al., 2007). Since lines of hydroxylases do not share a common ancestor, the factors involved in the desaturation/hydroxylation specificity should differ from one organism to the next. However, the systematic mutation of this position in hydroxylases of different organisms suggests a convergent evolution, which in turn, implies that this position is crucial for the hydroxylation mechanism.

To gain deeper insights into the role of this isoleucine in the hydroxylation, we generated a model of the enzyme based on the recently resolved structure of SCD1 (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015). To our knowledge, only two papers have proposed a model for Δ^{12} -FADs to perform studies on the molecular determinant

CpFAH12	1	MASATPAMSEAVLRHKAASTTGYDYEAAVSPAESPRTSASSTSLSSLDANEKKDEYAGLLDTYGNAPTP-----	75
CpFAD2	1	MAAATSAMPKNSVLRRTAASTNANDYESSAAVSPADSPRSPASSTSLSSLDANDKKDEYAGLLDTYGNAPTP-----	75
Y1FAD2	1	MDSTTQT-----NTGTG-----KVAVQPPATAFIK-----PIEKVSEPVYDTFGNEFTP-----43	
MaFAD2	1	MAPPNTI-----DAGLT-----QRHISTSAAPTS-----AKPAFERNYQL-----35	
AtFAD2	1	MGA-----G-----GRMPVPTSSKK-----ETDTTKRVCCEK-----28	
RcFAD2	1	MGA-----G-----GRMSVPPPSKKV-----ESDDLKRAPSSK-----28	
RcFAH12	1	MG-----G-----GRMSTVITSNNSEKKG-----GSSHLCRAPHTK-----32	
PfFAH12	1	MGA-----G-----GRIMVTPSSKK-----ETEALKRGPCEK-----28	
hSCD1	1	MPA-----HLL-----QDDISSSYTTT-----TITAPPSRVLQNG 31	
mSCD1	1	MPA-----HML-----QEISSSSYTTT-----TITAPPS-----GNE 27	
CpFAH12	76	-----PDFSIKDIR-----AAIPKHYERSTIK <u>SYAYVLRDILLC</u> CLSTTFYLFHNFVTPEPINS <u>NPLR-F</u> 133	
CpFAD2	76	-----PDFTIKDIR-----DAIPKHYERSAL <u>KGYGYIYLRDIAC</u> CLSTTFYLFNFTPENVPST <u>PLR-F</u> 133	
Y1FAD2	44	-----PDYSKDIL-----DAIPQECYKRSYVKSYSYVARDCFIAVFAYMAYAYLPLI--PSASGR-A 99	
MaFAD2	36	-----PEFTIKEIR-----ECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDLWASLLFLAATQIDKFE--NPLIR-Y 90	
AtFAD2	29	-----PPFSVGDLK-----KAIPPHCFKRSIPIRSFSYLSISDIIIASCFYYVATNYFSLL--PQPLS-Y 83	
RcFAD2	29	-----PPFTLQGIK-----KAIPPHCFKRSIPIRSFSYVYDLTIAFLVYVATNYFHLL--PEPLS-Y 83	
RcFAH12	33	-----PPFTLGDLK-----RAIPPHCFERSFVRSFSYVAYDVCLVSLFLFYSIATNFFPYI--SSPLS-Y 87	
PfFAH12	29	-----PPFTVKDLK-----KAIPQHCFQRSIPIRSFSYDITLVSFCFYYVATNYFSLL--PQPLSTY 84	
hSCD1	32	GDKLETMPLYLEDDIRPKDDIYDPTYKDKEGPSPKVE-----YV <u>WRNIIILMSLLHLLGALYGIT</u> LI--PTCK <u>FY-T</u> 100	
mSCD1	28	REKVKTVPVHLLEDIRPEMKEDIHDPTYQDEEGPPPKE-----YV <u>WRNIIILMVLHLGGLYIIIV</u> --PS <u>CKLY-T</u> 96	
His_Box n°1			
CpFAH12	134	<u>VLWSIYTVLQGLFATGLWV</u> <u>QH</u> EC-G <u>CAFSPSPFISDLTGWV</u> <u>IHSALL</u> VP <u>YFSWKFSHS</u> A <u>HKGIGN</u> MERDMVFLPRT <u>R</u> 212	
CpFAD2	134	<u>ALWGIYTVLQGLFGTGLWV</u> <u>I</u> HEC-G <u>HGAFSPSTLINDVTG</u> <u>WVHSALL</u> VP <u>YFSWKFSHS</u> A <u>HKGIGN</u> MERDMVFLPRT <u>R</u> 212	
Y1FAD2	100	VAWAMYSIVQGLFGTGLW <u>I</u> HEC-G <u>HS</u> A <u>FS</u> D <u>S</u> NTVNNVIG <u>WV</u> HL <u>HSSMLV</u> VP <u>YAWK</u> L <u>IHS</u> M <u>H</u> K <u>STG</u> H <u>L</u> TRD <u>MV</u> F <u>VP</u> K <u>D</u> R 178	
MaFAD2	91	LAWPMWIMQGIV <u>WV</u> LA <u>I</u> HEC-G <u>H</u> Q <u>A</u> <u>S</u> F <u>D</u> S <u>T</u> LNNTV <u>WV</u> W <u>I</u> LS <u>M</u> LLV <u>P</u> Y <u>WV</u> R <u>W</u> IS <u>H</u> K <u>K</u> A <u>T</u> G <u>H</u> M <u>T</u> K <u>D</u> Q <u>V</u> F <u>V</u> P <u>K</u> T <u>R</u> 169	
AtFAD2	84	LAWPLWACQGCVL <u>T</u> GI <u>WV</u> LA <u>I</u> HEC-G <u>H</u> A <u>F</u> S <u>D</u> Q <u>W</u> L <u>D</u> D <u>T</u> V <u>G</u> L <u>I</u> HF <u>S</u> L <u>F</u> S <u>P</u> Y <u>W</u> S <u>K</u> Y <u>S</u> H <u>R</u> R <u>H</u> S <u>N</u> T <u>G</u> S <u>L</u> ER <u>D</u> E <u>V</u> F <u>V</u> P <u>K</u> Q <u>K</u> 162	
RcFAD2	84	VAWFIYWA <u>Q</u> GC <u>V</u> L <u>T</u> GV <u>WV</u> W <u>I</u> HEC-G <u>H</u> A <u>F</u> S <u>D</u> Q <u>W</u> L <u>D</u> D <u>V</u> G <u>L</u> L <u>H</u> S <u>C</u> LL <u>V</u> P <u>Y</u> W <u>S</u> K <u>W</u> H <u>S</u> H <u>R</u> R <u>H</u> S <u>N</u> T <u>G</u> S <u>L</u> ER <u>D</u> E <u>V</u> F <u>V</u> P <u>K</u> Q <u>K</u> 162	
RcFAH12	88	VAWL <u>V</u> W <u>L</u> F <u>Q</u> G <u>C</u> IL <u>T</u> GL <u>WV</u> W <u>I</u> HEC-G <u>H</u> A <u>F</u> S <u>D</u> Y <u>Q</u> L <u>D</u> D <u>I</u> GL <u>V</u> H <u>S</u> AL <u>V</u> P <u>Y</u> W <u>S</u> K <u>Y</u> W <u>S</u> H <u>R</u> R <u>H</u> S <u>N</u> T <u>G</u> S <u>L</u> ER <u>D</u> E <u>V</u> F <u>V</u> P <u>K</u> S <u>K</u> 166	
PfFAH12	85	LAWPLWV <u>C</u> Q <u>G</u> C <u>V</u> L <u>T</u> GI <u>WV</u> W <u>I</u> HEC-G <u>H</u> A <u>F</u> S <u>D</u> Y <u>Q</u> W <u>V</u> D <u>T</u> D <u>F</u> G <u>F</u> W <u>F</u> S <u>L</u> L <u>V</u> P <u>Y</u> W <u>S</u> K <u>Y</u> W <u>S</u> H <u>R</u> R <u>H</u> S <u>N</u> N <u>G</u> S <u>L</u> E <u>D</u> E <u>V</u> F <u>V</u> P <u>K</u> K <u>K</u> 163	
hSCD1	101	<u>WLGWVFYY--FVSALGITAGA</u> <u>HRLW</u> <u>S</u> H <u>SY</u> K <u>ARL</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>ANT</u> <u>MA</u> F <u>Q</u> N <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>WARD</u> <u>HRAH</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>SE</u> <u>THA</u> -DP-HNSRRG 176	
mSCD1	97	<u>CLFGIFYY--MTSALGITAGA</u> <u>HRLW</u> <u>S</u> H <u>RT</u> Y <u>K</u> AR <u>P</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>ANT</u> <u>MA</u> F <u>Q</u> N <u>D</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>WARD</u> <u>HRAH</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>SE</u> <u>THA</u> -DP-HNSRRG 172	
CpFAH12	213	<u>EQQATR</u> <u>L</u> <u>G</u> R-----A <u>V</u> E <u>E</u> <u>LG</u> <u>D</u> <u>C</u> E <u>E</u> T <u>P</u> I <u>Y</u> T <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> V <u>G</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>Q</u> EGRGKGKKGNGGGVNHF 285	
CpFAD2	213	<u>ACQATR</u> <u>L</u> <u>G</u> R-----A <u>V</u> E <u>E</u> <u>LG</u> <u>D</u> <u>C</u> E <u>E</u> T <u>P</u> I <u>Y</u> T <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> V <u>G</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>Q</u> GRGKGKKGNGGGVNHF 285	
Y1FAD2	179	KEFMENR-----GAHDWSELAEDAPLMTLYGLITQQVFGWFLYLLSNTVGQKYPKLNK-----AVNHF 237	
MaFAD2	170	SQVGLPPKENAAAVQEE <u>DM</u> S <u>V</u> HL <u>D</u> EEA <u>P</u> IV <u>T</u> FL <u>W</u> VM <u>Q</u> LF <u>G</u> P <u>Y</u> L <u>I</u> MM <u>N</u> AS <u>Q</u> D <u>Q</u> Y <u>G</u> R-----WTSHF 233	
AtFAD2	163	SAIKWY-----G <u>K</u> Y <u>L</u> N <u>N</u> P <u>U</u> GR <u>I</u> ML <u>T</u> V <u>Q</u> F <u>V</u> FL <u>G</u> P <u>Y</u> L <u>A</u> F <u>N</u> V <u>S</u> GR <u>P</u> Y <u>D</u> G-----FACHF 210	
RcFAD2	163	SSIRWY-----SKYLN <u>N</u> PP <u>G</u> R <u>I</u> ML <u>T</u> V <u>U</u> TL <u>G</u> W <u>P</u> FL <u>A</u> F <u>N</u> V <u>S</u> GR <u>P</u> Y <u>D</u> R-----FACHY 210	
RcFAH12	167	SKISWY-----SKYLN <u>N</u> PP <u>G</u> R <u>V</u> LT <u>A</u> AT <u>L</u> LL <u>G</u> W <u>P</u> FL <u>A</u> F <u>N</u> V <u>S</u> GR <u>P</u> Y <u>D</u> R-----FACHY 214	
PfFAH12	164	AAVKWY-----V <u>K</u> Y <u>L</u> NN <u>P</u> LG <u>R</u> IL <u>V</u> L <u>T</u> V <u>Q</u> F <u>I</u> LG <u>W</u> FL <u>A</u> F <u>N</u> V <u>S</u> GR <u>P</u> Y <u>D</u> G-----FASHF 211	
hSCD1	177	F-----FFSHVGW <u>L</u> VR <u>K</u> HP <u>AV</u> KE <u>G</u> ST <u>L</u> -----DLSDL 205	
mSCD1	173	F-----FFSHVGW <u>L</u> VR <u>K</u> HP <u>AV</u> KE <u>G</u> KK <u>L</u> -----DMSDL 201	
Presumptive Box			
CpFAH12	286	DPRSPFE <u>ARQAKYIVLSDIGL</u> <u>G</u> LA <u>I</u> A <u>L</u> V <u>Y</u> I <u>G</u> R <u>F</u> G <u>W</u> <u>N</u> A <u>M</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Q</u> TDPTLPHYNREEWNFV 365	
CpFAD2	286	DPRSPFE <u>ARHAKYIVLSDIGL</u> <u>G</u> LA <u>I</u> A <u>L</u> V <u>Y</u> I <u>G</u> R <u>F</u> G <u>W</u> <u>N</u> A <u>M</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Q</u> TDPTLPHYTAEEWNFV 365	
Y1FAD2	238	NPNAPLFEKKDW <u>N</u> I <u>W</u> S <u>N</u> V <u>G</u> I <u>G</u> IT <u>M</u> S <u>V</u> IA <u>S</u> Y <u>I</u> N <u>R</u> W <u>G</u> LA <u>S</u> VT <u>L</u> Y <u>L</u> I <u>P</u> Y <u>L</u> W <u>N</u> H <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>I</u> T <u>Y</u> <u>L</u> Q <u>H</u> TDPTLPHY <u>H</u> AD <u>Q</u> WNFT 317	
MaFAD2	234	HTYSP <u>I</u> FE <u>P</u> RN <u>F</u> ED <u>D</u> I <u>I</u> IS <u>D</u> LG <u>V</u> IA <u>AL</u> GA <u>L</u> Y <u>Q</u> AS <u>Q</u> ML <u>S</u> L <u>I</u> LT <u>V</u> T <u>K</u> Y <u>I</u> V <u>P</u> Y <u>F</u> V <u>N</u> F <u>W</u> L <u>V</u> <u>L</u> I <u>F</u> Q <u>L</u> Q <u>H</u> TD <u>P</u> K <u>L</u> PH <u>Y</u> REG <u>A</u> WN <u>F</u> Q 313	
AtFAD2	211	FPN <u>A</u> <u>P</u> Y <u>I</u> ND <u>R</u> ER <u>E</u> R <u>L</u> Q <u>I</u> Y <u>L</u> S <u>D</u> AG <u>I</u> LA <u>V</u> C <u>F</u> G <u>Y</u> R <u>Y</u> AA <u>Q</u> G <u>M</u> AS <u>M</u> IC <u>L</u> Y <u>G</u> V <u>P</u> L <u>I</u> LN <u>V</u> A <u>F</u> U <u>L</u> V <u>I</u> Y <u>L</u> Q <u>H</u> TH <u>P</u> SL <u>PH</u> Y <u>D</u> S <u>S</u> E <u>W</u> D <u>W</u> 290	
RcFAD2	211	D <u>P</u> Y <u>G</u> P <u>I</u> Y <u>N</u> DR <u>E</u> R <u>E</u> R <u>L</u> Q <u>I</u> Y <u>L</u> S <u>D</u> AG <u>I</u> LA <u>V</u> C <u>F</u> G <u>Y</u> R <u>Y</u> AA <u>Q</u> G <u>M</u> AS <u>M</u> IC <u>L</u> Y <u>G</u> V <u>P</u> L <u>I</u> LN <u>V</u> A <u>F</u> U <u>L</u> V <u>I</u> Y <u>L</u> Q <u>H</u> TH <u>P</u> AL <u>P</u> HY <u>D</u> S <u>S</u> E <u>W</u> D <u>W</u> 290	
RcFAH12	215	D <u>P</u> Y <u>G</u> P <u>I</u> Y <u>S</u> ER <u>E</u> R <u>L</u> Q <u>I</u> Y <u>I</u> Y <u>D</u> AG <u>I</u> LA <u>V</u> C <u>Y</u> G <u>Y</u> R <u>Y</u> RA <u>Q</u> G <u>L</u> T <u>A</u> M <u>C</u> Y <u>V</u> G <u>P</u> L <u>I</u> LN <u>F</u> V <u>L</u> V <u>T</u> F <u>L</u> Q <u>H</u> TH <u>P</u> SL <u>PH</u> D <u>S</u> T <u>E</u> WE <u>W</u> I 294	
PfFAH12	212	FPH <u>A</u> <u>P</u> IF <u>K</u> DR <u>E</u> R <u>E</u> R <u>L</u> Q <u>I</u> Y <u>I</u> Y <u>D</u> AG <u>I</u> LA <u>V</u> C <u>Y</u> G <u>Y</u> R <u>Y</u> RA <u>Q</u> G <u>L</u> T <u>A</u> M <u>C</u> Y <u>V</u> G <u>P</u> L <u>I</u> LN <u>F</u> V <u>L</u> V <u>T</u> F <u>L</u> Q <u>H</u> TH <u>P</u> SL <u>PH</u> D <u>S</u> T <u>E</u> WE <u>W</u> I 291	
hSCD1	206	EAE <u>K</u> L <u>V</u> M <u>F</u> Q <u>R</u> Y <u>Y</u> K <u>P</u> G <u>L</u> M <u>M</u> C <u>F</u> I <u>L</u> T <u>L</u> V <u>P</u> W <u>Y</u> E <u>W</u> G <u>E</u> T <u>F</u> Q <u>Q</u> N <u>S</u> V <u>F</u> V <u>A</u> T <u>F</u> L <u>R</u> Y <u>A</u> V <u>V</u> L <u>N</u> A <u>T</u> W <u>L</u> V <u>N</u> S <u>A</u> A <u>H</u> <u>L</u> F <u>Y</u> R <u>P</u> Y <u>D</u> K <u>N</u> I <u>S</u> P <u>R</u> -- 283	
mSCD1	202	KAE <u>K</u> L <u>V</u> M <u>F</u> Q <u>R</u> Y <u>Y</u> K <u>P</u> G <u>L</u> M <u>M</u> C <u>F</u> I <u>L</u> T <u>L</u> V <u>P</u> W <u>Y</u> E <u>W</u> G <u>E</u> T <u>F</u> V <u>N</u> S <u>L</u> F <u>V</u> ST <u>F</u> L <u>R</u> Y <u>T</u> L <u>V</u> N <u>A</u> T <u>W</u> L <u>V</u> N <u>S</u> A <u>H</u> <u>L</u> F <u>Y</u> R <u>P</u> Y <u>D</u> K <u>N</u> I <u>Q</u> S <u>R</u> -- 279	
His_Box n°3			
CpFAH12	366	<u>RGGACT</u> <u>T</u> <u>IR</u> DL <u>G</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> R <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>G</u> I <u>A</u> <u>D</u> <u>J</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>W</u> 445	
CpFAD2	366	<u>RGAA</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>W</u> 445	
Y1FAD2	318	R <u>GA</u> A <u>A</u> T <u>I</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>B</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>D</u> ---NFI <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>V</u> 393	
MaFAD2	314	R <u>GA</u> L <u>C</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>S</u> ---PIV <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>V</u> 389	
AtFAD2	291	R <u>GA</u> L <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>-</u> K <u>V</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>G</u> ---PW <u>V</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>Y</u> 365	
RcFAD2	291	R <u>GA</u> L <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>-</u> K <u>V</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>G</u> ---SF <u>Y</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>Y</u> 365	
RcFAH12	295	R <u>GA</u> M <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>-</u> K <u>V</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> ---PF <u>Y</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> 369	
PfFAH12	292	R <u>GA</u> L <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>-</u> K <u>V</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>G</u> ---PW <u>V</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>Y</u> 366	
hSCD1	284	-----E <u>N</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>-</u> S <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>-</u> Y <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>-</u> Y <u>R</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>-</u> F <u>T</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>A</u> 333	
mSCD1	280	-----E <u>N</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>-</u> S <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>-</u> Y <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>-</u> Y <u>R</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>-</u> F <u>T</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>A</u> 329	
CpFAH12	446	EPS-----A <u>D</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>Q</u> -----477	
CpFAD2	446	EPS-----A <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>N</u> -----476	
Y1FAD2	394	E <u>G</u> K-----E <u>G</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> -----419	
MaFAD2	390	E <u>D</u> H-----G <u>D</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>K</u> -----400	
AtFAD2	366	E <u>P</u> D-----R <u>E</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> -----383	
RcFAD2	366	E <u>K</u> D-----D <u>A</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> -----383	
RcFAH12	370	E <u>P</u> D-----E <u>G</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>K</u> -----387	
PfFAH12	367	E <u>P</u> D-----T <u>E</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> -----384	
hSCD1	334	Y <u>D</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>S</u> -----359	
m			

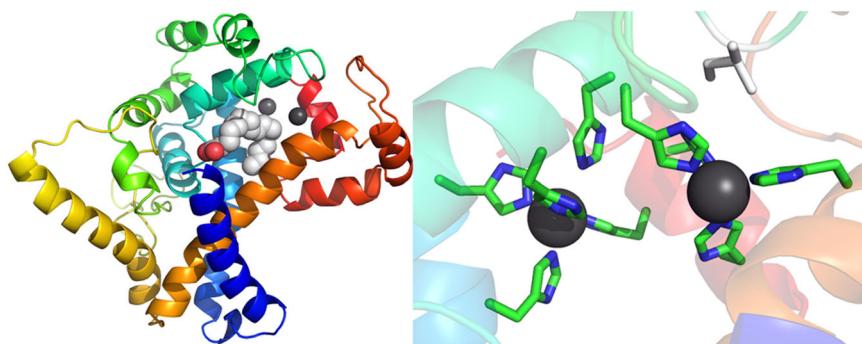


FIGURE 6 Pymol pictures obtained from the CpFAH12 model. (a) The whole enzyme is shown in ribbon mode in rainbow colors (From N-term in blue to C-term in red), the oleic acid is shown in balls representation where light gray stands for the carbon atoms, red for the oxygen, and dark gray for the irons. (b) Closer view of the di-iron center with histidines that belong to the His-Boxes shown in green sticks. The Ile198 is displayed in sticks at the top right corner in light gray. In both figures, hydrogen is not represented for clarity [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

implicated in the Δ^{15} desaturase activity for bifunctional fungal $\Delta^{12/15}$ desaturases (Cai, Yu, Liu, Liu, & Shanklin, 2018; Rong et al., 2018). Even if our model gives some pertinent global information on the general fold of the protein, the positioning of the substrate, the position of the iron atoms, and even on the position of the amino acid we identified, we have to keep in mind that it is still a model with a limited accuracy, as it is based on a limited data set of only two structures of distantly related enzymes in terms of sequence, cofactor and activity.

In the model, the OA substrate was docked in the active site with the C12-C13 carbon positioned in a catalytically relevant distance from the two iron ions. It showed that the isoleucine 198 has no contact with the substrate but is located at 4.3 Å from one of the iron ion and in the close vicinity of three histidines that coordinate the two iron atoms. If we refer to the two 3D structures of SCD1, the equivalent position of CpFAH12 Ile198 bears a serine that is buried in a groove on the protein external surface. Bai et al. (2015) suggest that this groove, localized in a predominantly positive surface near the active site, may be the place where the electron transfer occurs with cytochrome b5. An analysis of the electrostatic surface of the CpFAH12 protein does not show a positively charged region near the isoleucine 198. However, this surface of interaction was not found in the related structure of ScS7p sphingolipid α -hydroxylase (Zhu et al., 2015) and thus the interaction with redox partners could be located elsewhere. Interestingly, the electrostatic surface map shows a positive pocket located 15–20 Å far from Ile198.

We have shown that Ile198 was densely packed with three histidines belonging to His-Boxes (His194, His349, and His395). Mutation of this residue may modify the location of these histidines and could explain the drastic impact observed on enzyme activity and specificity. It is difficult to go deeper in the reason the hydroxylation/desaturation ratio is modified but the di-iron center geometry is certainly modified. This could lead to several modifications, such as an effect on the redox potential of iron atoms, the distance between iron atoms, and the substrate or their distance with the dioxygen that could all explain the changes in activity and specificity. Mutation of the adjacent and flexible Gly197 by an alanine (mutant CpFAH12

G197A) has also effect on the activity and specificity. It is possible that modification of this flexible residue will generate displacement in the Ile198 position.

For FAD2 enzymes, it is commonly accepted that the desaturation and hydroxylation reactions share a first common oxidation reaction at the carbon closest to the C1 and that the divergence between these two reactions occurs in a second step (Behrouzian & Buist, 2003; Buist, Behrouzian, Alexopoulos, Dawson, & Black, 1996). Interestingly, our observations fit this mechanism since the same distance is found between this carbon (the C9 or C12 of SCD1 or CpFAH12, respectively) and the iron center for both the CpFAH12 hydroxylase and SCD1 desaturases. The divergence between the two reactions could perhaps be explained by the distance between the other iron ion and the other carbon of the substrate (C10 of SCD1 or C13 of CpFAH12, respectively) that is higher in our model of the bifunctional CpFAH12 than in SCD1 desaturases.

In conclusion, we found that the hydroxylase activity of CpFAH12 does not originate from the transmembrane helices, but is dispatched in the cytosolic parts. The isoleucine at position 198 is essential for the hydroxylation specificity, but substituting it by any other amino acid do not improve the RA titer in any CpFAH12 mutant. The localization of this residue suggests that hydroxylation specificity does not depend on substrate accommodation in the binding pocket, but more likely results from a modification of the geometry of the di-iron center.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the INSA of Toulouse, the doctoral school SEVAB and the Occitanie region. Special thanks to ICEO Platform and Nelly MONTIES for the GC-MS support. We are also grateful to Gilles Truan for the interesting conversation we had about the diiron-enzymes.

ORCID

Florence Bordes  <http://orcid.org/0000-0002-6078-8616>

REFERENCES

- Bai, Y., McCoy, J. G., Levin, E. J., Sobrado, P., Rajashankar, K. R., Fox, B. G., & Zhou, M. (2015). X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase. *Nature*, 524(7564), 252–256. <https://doi.org/10.1038/nature14549>
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Behrouzian, B., & Buist, P. H. (2003). Mechanism of fatty acid desaturation: A bioorganic perspective. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00260-0](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00260-0)
- Beopoulos, A., Verbeke, J., Bordes, F., Guicherd, M., Bressy, M., Marty, A., & Nicaud, J. -M. (2014). Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 251–262. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5295-x>
- Bordes, F., Fudalej, F., Dossat, V., Nicaud, J. -M., & Marty, A. (2007). A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.008>
- Broun, P., Boddupalli, S., & Somerville, C. (1998). A bifunctional oleate 12-hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella fendleri*. *The Plant Journal*, 13(2), 201–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00023.x>
- Broun, Pierre, Shanklin, J., Whittle, E., & Somerville, C. (1998). Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science*, 282(5392), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1315>
- Browse, J., McCourt, P. J., & Somerville, C. R. (1986). Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Analytical Biochemistry*, 152(1), 141–145. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90132-6)
- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W349–W357. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>
- Buist, P. H., Behrouzian, B., Alexopoulos, K. A., Dawson, B., & Black, B. (1996). Fluorinated fatty acids: New mechanistic probes for desaturases. *Chemical Communications*, 23, 2671–2672. <https://doi.org/10.1039/cc9960002671>
- Cai, Y., Yu, X. -H., Liu, Q., Liu, C. -J., & Shanklin, J. (2018). Two clusters of residues contribute to the activity and substrate specificity of Fm1, a bifunctional oleate and linoleate desaturase of fungal origin. *Journal of Biological Chemistry*, 293(51), 19844–19853. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005972>
- Cao, S., Zhou, X. -R., Wood, C. C., Green, A. G., Singh, S. P., Liu, L., & Liu, Q. (2013). A large and functionally diverse family of Fad2 genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 13(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-5>
- Dauk, M., Lam, P., Kunst, L., & Smith, M. A. (2007). A FAD2 homologue from *Lesquerella lindheimeri* has predominantly fatty acid hydroxylase activity. *Plant Science*, 173(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.03.015>
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., ... Mitchell, A. L. (2017). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D190–D199. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1107>
- Hoffmann, M., Hornung, E., Busch, S., Kassner, N., Ternes, P., Braus, G. H., & Feussner, I. (2007). A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity of membrane-bound fatty acid desaturases from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26666–26674. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705068200>
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(195–202), 8–202.
- Kajikawa, M., Abe, T., Ifuku, K., Furutani, K., Yan, D., Okuda, T., ... Fukuzawa, H. (2016). Production of ricinoleic acid-containing mono-estolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Scientific Reports*, 6(1), <https://doi.org/10.1038/srep36809>. Article no. 36809.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), W526–W531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
- Lee, M., Lenman, M., Banas, A., Bafor, M., Singh, S., Schweizer, M., ... Stymne, S. (1998). Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science*, 280(5365), 915–918. <https://doi.org/10.1126/science.280.5365.915>
- Libisch, B., Michaelson, L. V., Lewis, M. J., Shewry, P. R., & Napier, J. A. (2000). Chimeras of $\Delta 6$ -fatty acid and $\Delta 8$ -sphingolipid desaturases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 779–785. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4023>
- Lim, Z. L., Senger, T., & Vrinten, P. (2014). Four amino acid residues influence the substrate chain-length and regioselectivity of *Siganus canaliculatus* $\Delta 4$ and $\Delta 5/6$ desaturases. *Lipids*, 49(4), 357–367. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3880-0>
- Meesapodydsuk, D., & Qiu, X. (2008). An oleate hydroxylase from the fungus *Claviceps purpurea*: Cloning, functional analysis, and expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(3), 1325–1333. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117168>
- Meesapodydsuk, D., Qiu, X., Reed, D. W., Covello, P. S., & Qiu, X. (2007). Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20191–20199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702196200>
- Minto, R. E., & Blacklock, B. J. (2008). Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Progress in Lipid Research*, 47(4), 233–306. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.02.002>
- Möller, S., Croning, M. D. R., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), 646–653.
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Pei, J., Kim, B. -H., & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2295–2300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>
- Qiu, X., Reed, D. W., Hong, H., MacKenzie, S. L., & Covello, P. S. (2001). Identification and analysis of a gene from *Calendula officinalis* encoding a fatty acid conjugase. *Plant Physiology*, 125(2), 847–855. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.847>
- Ray, A., Lindahl, E., & Wallner, B. (2010). Model quality assessment for membrane proteins. *Bioinformatics*, 26(24), 3067–3074. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq581>
- Rong, C., Chen, H., Wang, M., Gu, Z., Zhao, J., Zhang, H., ... Chen, Y. Q. (2018). Molecular mechanism of substrate preference for ω -3 fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* by mutational analysis and molecular docking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9679–9689. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9321-x>
- Sasata, R. J., Reed, D. W., Loewen, M. C., & Covello, P. S. (2004). Domain swapping localizes the structural determinants of regioselectivity in membrane-bound fatty acid desaturases of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39296–39302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405712200>

- Shanklin, J., & Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and related modifications of Fatty Acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 611–641. Retrieved from Stage.
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33, W244–W248. <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y. -R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., ... Baker, D. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*, 21(10), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>
- Sperling, P., Lee, M., Girke, T., Zähringer, U., Stymne, S., & Heinz, E. (2000). A bifunctional $\Delta 6$ -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*: A new member of the cytochrome b5 superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3801–3811. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01418.x>
- Van de Loo, F. J., Broun, P., Turner, S., & Somerville, C. (1995). An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 6743–6747. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>
- Viklund, H., & Elofsson, A. (2008). OCTOPUS: Improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics*, 24(15), 1662–1668. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn221>
- Wang, H., Klein, M. G., Zou, H., Lane, W., Snell, G., Levin, I., ... Sang, B. -C. (2015). Crystal structure of human stearoyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(7), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3049>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The iTASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8.
- Yazawa, H., Kumagai, H., & Uemura, H. (2013). Secretory production of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(19), 8663–8671. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5060-1>
- Zhou, X. -R., Singh, S., Liu, Q., & Green, A. (2006). Combined transgenic expression of $\Delta 12$ -desaturase and $\Delta 12$ -epoxyenase in high linoleic acid seeds leads to increased accumulation of vernolic acid. *Functional Plant Biology*, 33, 585–592. <https://doi.org/10.1071/FP05297>
- Zhou, X. -R., Singh, S. P., & Green, A. G. (2013). Characterisation of the FAD2 gene family from *Hiptage benghalensis*: A ricinoleic acid accumulating plant. *Phytochemistry*, 92, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.006>
- Zhu, G., Koszelak-Rosenblum, M., Connelly, S. M., Dumont, M. E., & Malkowski, M. G. (2015). The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29820–29833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680124>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Robin J, Gueroult M, Cheikhrouhou R, et al. Identification of a crucial amino acid implicated in the hydroxylation/desaturation ratio of CpFAH12 bifunctional hydroxylase. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;116: 2451–2462. <https://doi.org/10.1002/bit.27102>

Supplementary data

Identification of a crucial amino acid implicated in the hydroxylation/desaturation ratio of CpFAH12 bifunctional hydroxylase

Julien Robin, Marc Gueroult, Randa Cheikhrouhou, Marie Guicherd, Vinciane Borsenberger, Alain Marty and Florence Bordes

Supplementary Figure 1: Schematic representation of the zeta docking platform integration at LEU2 locus.

Supplementary Figure 2: Total FAs production of two biological replicates of OXZ strains expressing either WT CpFAH12 or CpFAD2.

Supplementary Figure 3: Alignment of Cyt2's parts from CpFAH12 and CpFAD2.

Supplementary Figure 4: Multiple alignments of 28 characterised Δ12-FADs with a focus on the 4th box.

Supplementary Figure 5: Total FAs production in g.L⁻¹ of OXZ strain expressing WT CpFAH12 or CpFAH12 mutated for the hypothetical 4th box.

Supplementary Figure 6: View of active site in CpFAH12 model.

Supplementary Figure 7: Closer view of isoleucine 198 and its surrounding in CpFAH12 model.

Supplementary Figure 8: Representation of electrostatic surface of the CpFAH12 model.

Supplementary Table 1: List of plasmids used in this study.

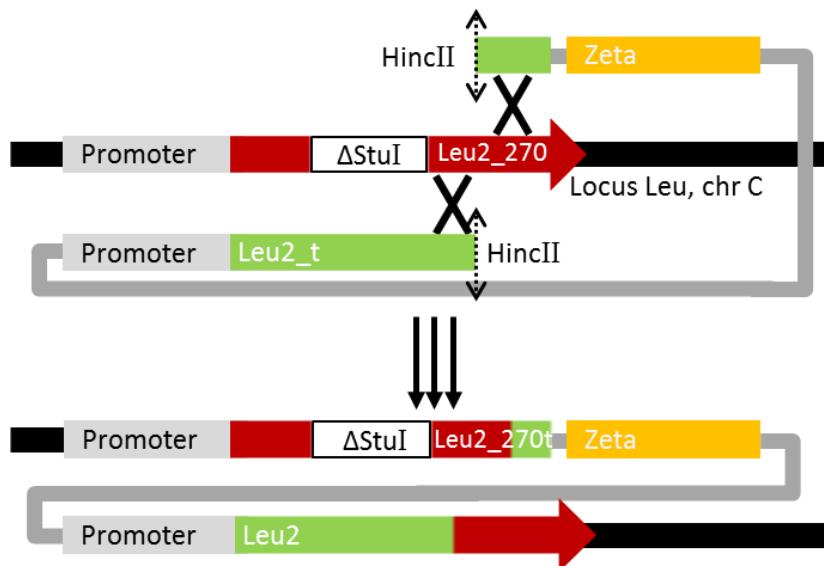
Supplementary Table 2: List of accession numbers and pdb ids of the proteins referenced in this paper.

Supplementary Table 3: List of primers used in this study.

Supplementary Table 4: Oven program during the fatty acid analysis with gas chromatography.

Supplementary Table 5: Length and number of differences between CpFAH12 and CpFAD2 parts.

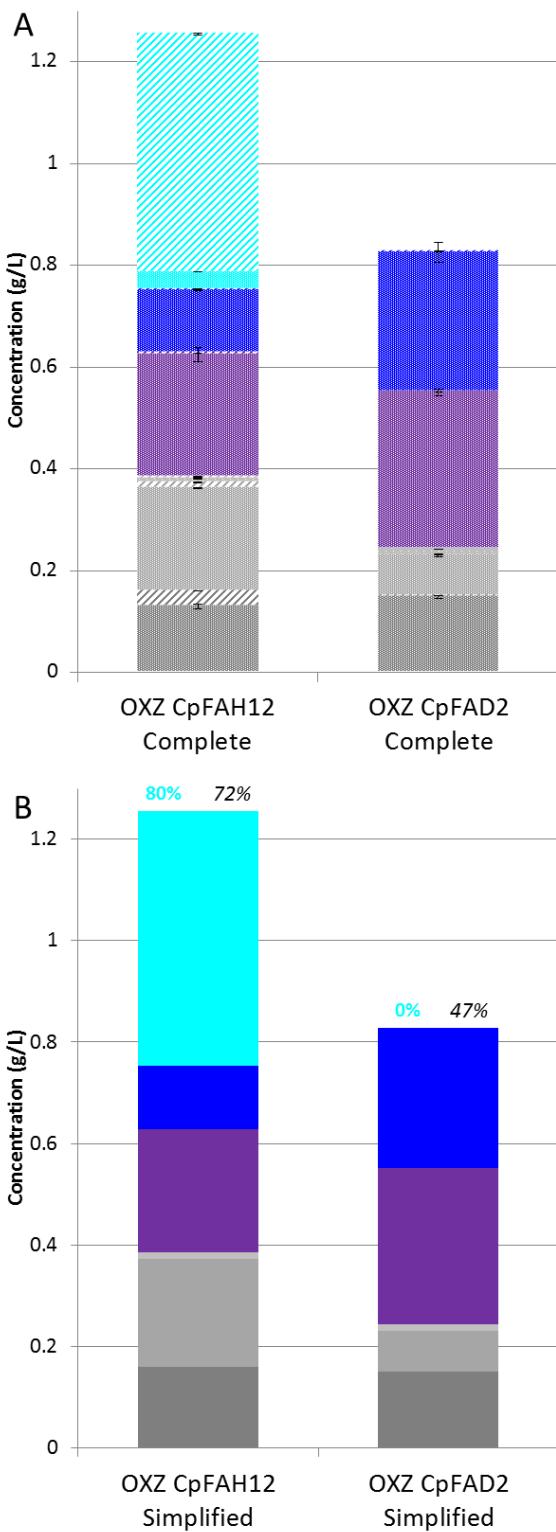
Supplementary Table 6: Overview of ricinoleic acid (RA) and linoleic acid (LA) percentages among the total fatty acids (TFA) of different strains. A: Strains expressing WT CpFAH12, WT CpFAD2 or a CpFAH12_Des chimera. B: Strains expressing WT CpFAH12, WT CpFAD2 or a CpFAH12 Cyt2'_Des mutant.



Supplementary Figure 1: Schematic representation of the zeta docking platform integration at LEU2 locus. The black line shows the chromosome C at the LEU2 locus which bears the inactivated Leu2 gene with a StuI deletion represented with a red arrow with white box. The orange box is the zeta docking platform initially in the plasmid that is shown as a grey line. The green line represents the 3' truncated form of Leu2 gene, cut by HincII prior to the transformation. After correct homologous recombination, two copies of LEU2 gene are present: one inactive with the StuI deletion and 3' truncation, and one fully functional with a WT sequence.

To reduce the expression variability due to random integration of the expression cassette in the genome, we built the OleoX zeta strain (OXZ). It is derived from the Po1d strain, which does not contain Ylt1 or zeta sequence (1). The auxotrophy for leucine came from an inactive StuI-deleted LEU2 gene (Leu2-270). The zeta docking platform was formed by the fusion of the two LTR domains from retrotransposon Ylt1 (2). The zeta plasmid also carried an inactive 3'-truncated LEU2 gene (Leu2-t) for the screening. The transformation was performed after linearization by HincII restriction that cut inside the LEU2 sequence. Non-specific integration didn't restore a functional LEU2 gene. In case of homologous recombination between the two partial LEU2 genes, the zeta cassette was integrated in the LEU2 locus where it could form a functional LEU2 gene. The strain was validated by PCR at the LEU2 locus. The integrated zeta region will allow for a targeted integration of the expression cassette at this particular locus in order to decrease the variability due to protein expression level.

- 1 : T. Juretzek, M.T. Le Dall, S. Mauersberger, C. Gaillardin, G. Barth and J.M. Nicaud (2001). Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Yeast 18:97-113
 2 : N. Schmin-Berger, B. Schmid and G. Barth (1994). Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. J. Bacteriol. 176:2477-2482 DOI: 0021-9193/94/\$04.00+0



Supplementary Figure 2: Total FAs production of two biological replicates of OXZ strains expressing either WT CpFAH12 or CpFAD2. All lipids productions were measured after 48h of culture in YT₂D₅, in citrate buffer at pH4 with 10% of decane.

The different FAs displayed were summarised with the corresponding colour code: cyan: RA, blue: LA, violet: OA, light grey: stearic acid, grey: palmitoleic acid and dark grey: palmitic acid.

The methylated FAs are represented with white dots, the silylated FAs are represented as hatched lines, and the sum of the methylated and silylated FAs is represented in plain colour.

A) Complete version. FAs from the decane layer with silylated FAs and FAs from the cell pellet with methylated FAs are differentiated. Error bars for each FAs is represented on the graph.

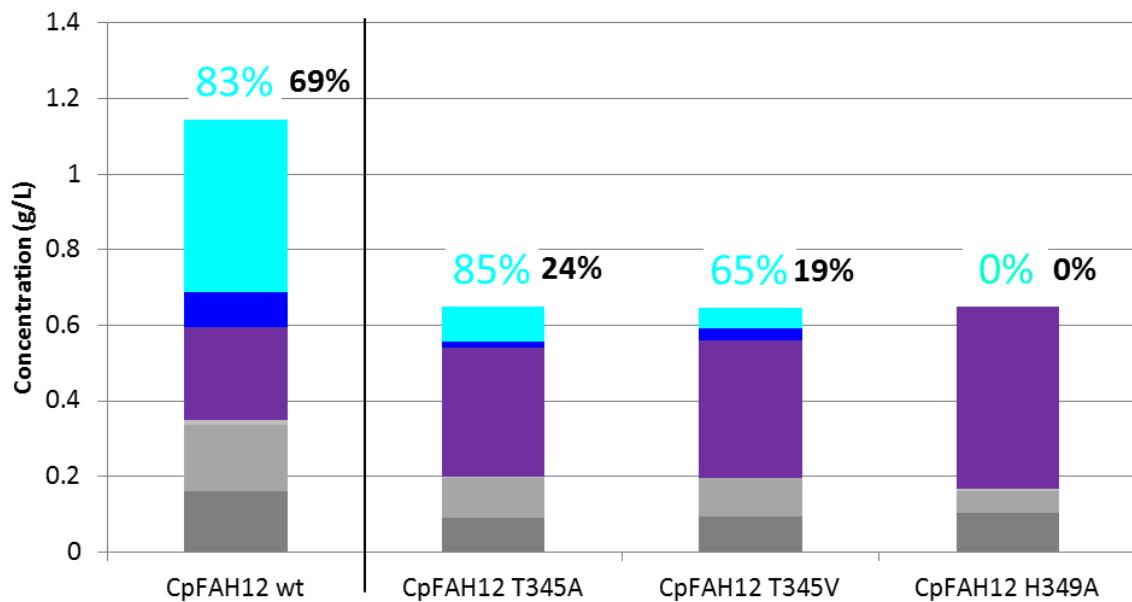
B) Simplified representation of the FAs production. In order to clarify the results, methyl-FA and silyl-FA were summed and the error bars were removed since they are always lower than 6%. The hydroxylation percentage (%Hyd: $\frac{RA}{RA+LA}$) and the conversion percentage (%Conv: $\frac{RA+LA}{RA+LA+OA}$) were written above, in cyan or black italic respectively. The simplified representation will be used for others figures.



Supplementary Figure 3: Alignment of Cyt2's parts from CpFAH12 and CpFAD2. The total length is thirty-four amino acids and four of them differ between the two enzymes. They are highlighted in cyan for CpFAH12 and blue for CpFAD2. The 2nd His-Box is in red and underlined.

Recently, a fourth putative box composed of one histidine and one asparagine has been identified in a SCD1 enzyme (11, 12). There, the iron coordination is ensured by histidine and a molecule of water bound to asparagine. The alignments revealed a conserved and similar-organized box in characterised Δ^{12} -FADs with threonine instead of asparagine (Supplementary Figure 4).

In order to validate this putative fourth box and to get deeper insights into the catalysis of these enzymes, site-directed mutagenesis was performed at T345 and H349. These amino acids were replaced by alanine, and FAs production was performed with these mutants (Supplementary Figure 5). The replacement H349A led to a total disruption of both hydroxylase and desaturase activities, supporting the hypothesis of an essential 9th crucial histidine. The T345A mutation led to a decrease of the conversion percentage, with 24% instead of 69% for WT CpFAH12. The decreasing of both hydroxylase and desaturase activities were similar (thus the %Hyd remains unchanged). The alanine, apolar but smaller than threonine, may still allow the presence of a molecule of water but not the possibility for hydrogen to bond with it, leading to a partial inactivation. Replacement by an apolar valine, similar to threonine in term of steric hindrance, further impaired but didn't deactivate CpFAH12. The decrease of %Conv (19%) was even more pronounced than with alanine and the hydroxylation ratio was reduced. Given the conservation of this threonine among so many Δ^{12} -FADs desaturase (Supplementary Figure 4), and the loss of activity of the mutants when this position is modified, it is reasonable to assume that this amino acid is involved in the iron binding-box.



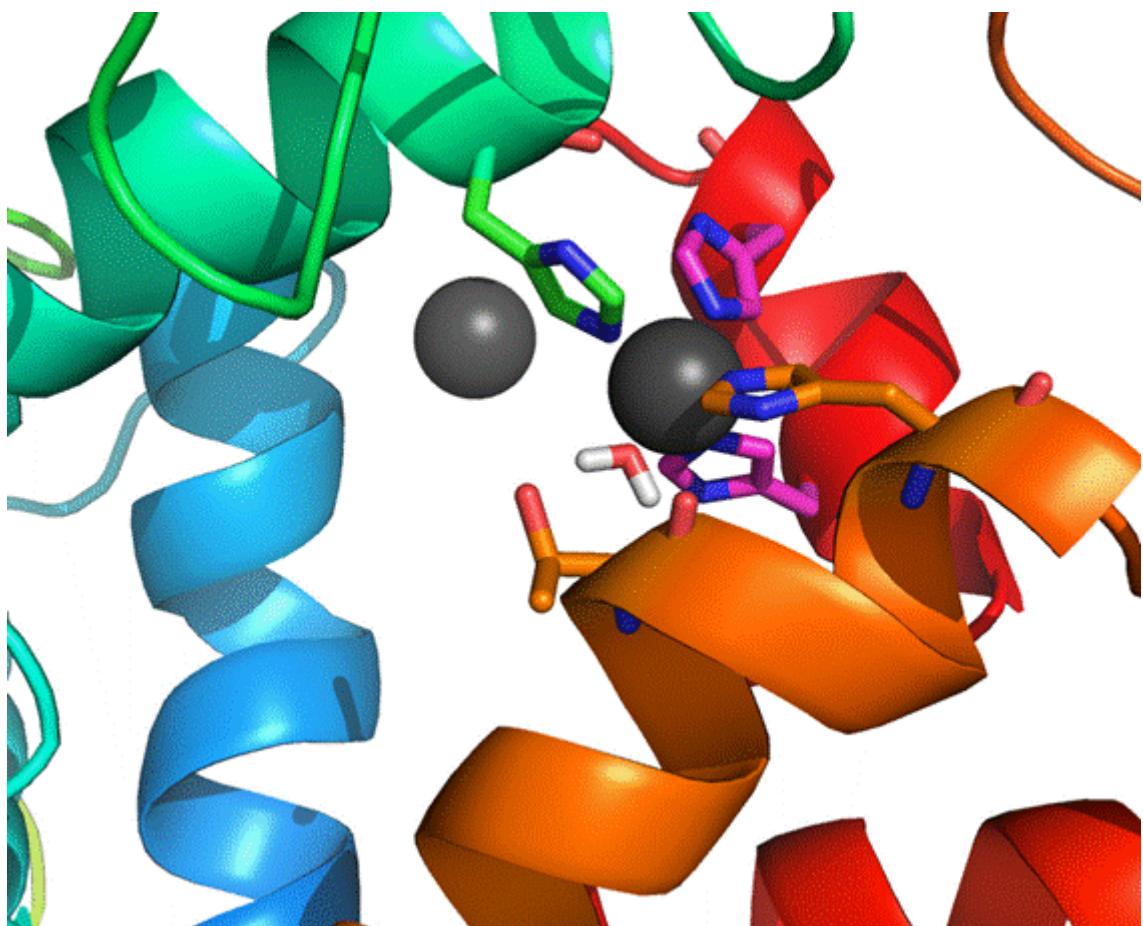
Supplementary Figure 5: Total FAs production in g.L⁻¹ of OXZ strain expressing WT CpFAH12 or CpFAH12 mutated for the hypothetical 4th box. The hydroxylation percentage (%Hyd: $\frac{RA}{RA+LA}$) and the conversion percentage (%Conv: $\frac{RA+LA}{RA+LA+OA}$) are written above in cyan or black bold respectively.

<i>Claviceps purpurea</i> FAH12	VLSDIGLGLAIAALVYLGNGFWANMAWYFLPYLWVNHWLVAIT TFLQH TDPTLPHYNREENFVRGGACTIDRDLFIGRHLFHGIA DT HVVHHYVSRI PFYNADEASEAIK
<i>Claviceps purpurea</i> FAD12	VLSDIGLGLAIAALVYLGNGFWANMAWYFLPYLWVNHWLVAIT TFLQH TDPTLPHYTAEENYVRGAAATIDREMFIGRHLHGII ET HVLHHYVSSIP FYNADEASEAIK
<i>Claviceps purpurea</i> FAD12/15	VLSDIGLGLAIAALVYLGNGFWANVAVWYFVPYLWVNHWLVAIT TFLQH TDPTLPHYTAEENFVRGAAATIDREMFIGRHLF HGIVET HVLHHYVSSIP FYNADEASEAIK
<i>Yarrowia lipolytica</i> FAD12	WISNVGIGITMSVIAYISINRWGLASVTLYLIPYLWVNHWLVAIT TYLQH TDPTLPHYADQWNFTRGAAATIDREFFIGSFCFHD IIET HVLHHYVSRIP FYNARIATEKIK
<i>Mortierella alpina</i> FAD12	IIISDLGLVLAALGALIYASMQSLLTVTKYYIVPYLFVNFWLVLIT TFLQH TDPKLPHYREGAWNQRGALCTVDRSFGKFLD HMFGIVHT HVAHHLF SQMPFYHAEEATYHLK
<i>Aspergillus parasiticus</i> FAD12	VLSDLGLAITGSVLYIGSTYGLWNLWVYGIPLWVNHWLVAIT TYLQH TDPTLPHYQPEVWNFARGAAATIDRDFGVGR HILHGIIET HVLHHYVSTIP FYHADEASEAIQ
<i>Mucor circinelloides</i> FAD12	MSSTAGVLMIGFLAYCGQVFGSLAVIKYYVPIYLNVNFWLVLIT TYLQH TDPKLPHYRENWNFQRGAALT TVDRSYGFLLDYFHHHISDT HVAHHLF STMPHYHAEEATVHIK
<i>Rhizopus oryzae</i> FAD12	VSSSVGVGVMGVGLGYCGQIFGSLSNMKYYVPIYLCVNFWLVLIT TYLQH TDPKLPHYRENWNFQRGAALT TVDRSYGALINYFHHHISDT HVAHHLF STMPHYHAEEATVHIK
<i>Ricinus communis</i> FAH12	YIADLGIFATTEFVLYQATMAKGLAWVMRIYGVPLLIVNCFLVMI TYLQH THPAIPRGSS SEWDWLRGAMTVDRDYGVLN-KVFHN IADT HVAHHLF ATVPHYHAMEATKAIK
<i>Ricinus communis</i> FAD12	FISDAGVLAVTFGLYQLAIAKGLAWVV CVYGVPLLIVNSFLVLI TFLQH THPALPHYDS SEWDWLRGALATVDRDYGILN-KVFHN ITDT HVAHHLF STMPHYHAMEATKAIK
<i>Physaria fendleri</i> FAH12	YISDAGILAVCYGLYRYAASQGLTAMIC CVYGVPLLIVNFFLVLV TFLQH THPSLPHYD STEWIRGALVTVDRDYGILN-KVFHN ITDT HVAHHLF ATVPHYHAMEATKAIK
<i>Hiptage benghalensis</i> FAH12-1	YITDASIYATIFILYRAAAAKGLTWL ICVYGVPLIVNALLVLV TYLQH THPV LPHYDNSEWDWLRGALVTVDRDYGILN-EV FHHITDT HVAHHLF SKIPQYHAME EVTKAIK
<i>Hiptage benghalensis</i> FAH12-2	YITDAGIYATTFILYRAAAAKGLT WLICVYGVPLIVN AFLVLV TYLQH THPV LPHYDNSEWDWLRGALVTVDRDYGILN-EV FHHIADT HVAHHLF SKIPQYH GMEATKAIK
<i>Hiptage benghalensis</i> FAD12-1	YISDVGVLAVTYGLYRL LAVAEGLAWV ICVYGGPLL VNAFLV TI TYLQH THPSL PHYDS SEWDWL RGALAT VDRDY GILN-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEATKAIK
<i>Hiptage benghalensis</i> FAD12-2	YISDVGVLAVTYGLYRL LAVA AKGLAWV LCVYGGPLL VNAFLV MI TYLQH THPSL PHYDS SEWDWL RGALAT VDRDY GILN-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEATKAIK
<i>Hiptage benghalensis</i> FAD12-3	CISDIGIFITSFVLYQVF MLKG LSWV C I Y G V P L I V N A F L V M I TYLQH THPAL PHYDS SEWDWL RGAL STAD R D Y G V L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KVIK
<i>Euphorbia lagascae</i> FAD12	YISDIGMFV TTYI LYQAA AVKG FAW L C T Y G I P L I V N S F L V T I TYLQH THPSL PHYD S SEWD WL RG AL ST V D R D Y G V L N-K VFHN ITDT HIAHHLF STMPHYH ALEAT KAIK
<i>Vernicia fordii</i> FAD12	YISDAGVL AVTF G LYR LAA A A K G L A W V C V Y G V P L I V N A F L V M TYLQH THPS I P H Y D S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Vernicia montana</i> FAD12	FISDAGVL AVTF G LYR LAA A A K G L A W V C V Y G V P L I V N A F L V M TYLQH THPS L P H Y D S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAS KAIK
<i>Cucurbita pepo</i> FAD12	FISDAGL LAV SYGLY RLAK GLAW VV CVY G V P L I V N G F L V I TYLQH THPAL PHYD S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Linum usitatissimum</i> FAD12	YLS DAG I F T C V Y I L Y R L V L T K G L V W V V S I Y G V P L I V N G F L V L I TFLQH THPSL PHYK S S E W D W L R G A L S T V D R D Y G L L-N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Hevea brasiliensis</i> FAD12	CIS DAG VL AV TY G L Y R L A A A K G L A W V C V Y G V P L I V N A F L V M TYLQH THPS L P H Y D S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Punica granatum</i> FAD12	YISDVG IMA TY T L Y K I A A R G L A W L C V Y G V P L I V N A F L V M TYLQH THPAL PHYD S S E W D W L R G A L A T A D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Triadica sebifera</i> FAD12	YISDAGVL AVTF G LYR LAA A A K G L A W V C V Y G V P L I V N G F L V I TYLQH THPSL PHYN S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Tropaeolum majus</i> FAD12	YLS DAG V L A M S Y G I Y R L V L A K G L A W A F C V Y G G P L L V V N A F L V M TYLQH THPSL PHYD S S E W D W F R G A L A T V D R D Y G V L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Arabidopsis thaliana</i> FAD12	YLS DAG I L A V C F G L Y R Y A A Q G M A S M I C L Y G V P L I V N A F L V L I TYLQH THPSL PHYD S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G I L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Olea europaea</i> FAD12	YISDVC VI A T S Y I L Y R V A L Q G L V W L T C V Y G V P L I V N G F L V L I TYLQH THP PL PHYD S S E W D W L R G A L A T V D R D Y G V L N-K VFHN ITDT HVAHHLF STMPHYH AMEAT KAIK
<i>Caenorhabditis elegans</i> FAD12	VIS G I C C C V C A Y I -- A L T I A G S Y S N W F W Y W V P L S F F G L M L V I V TYLQH VD D A E V Y E A D E W S F V R G O T O T I D R Y G L G L D T T M H I T D G HVAHHFF FN K I P H Y L I A T E G V K

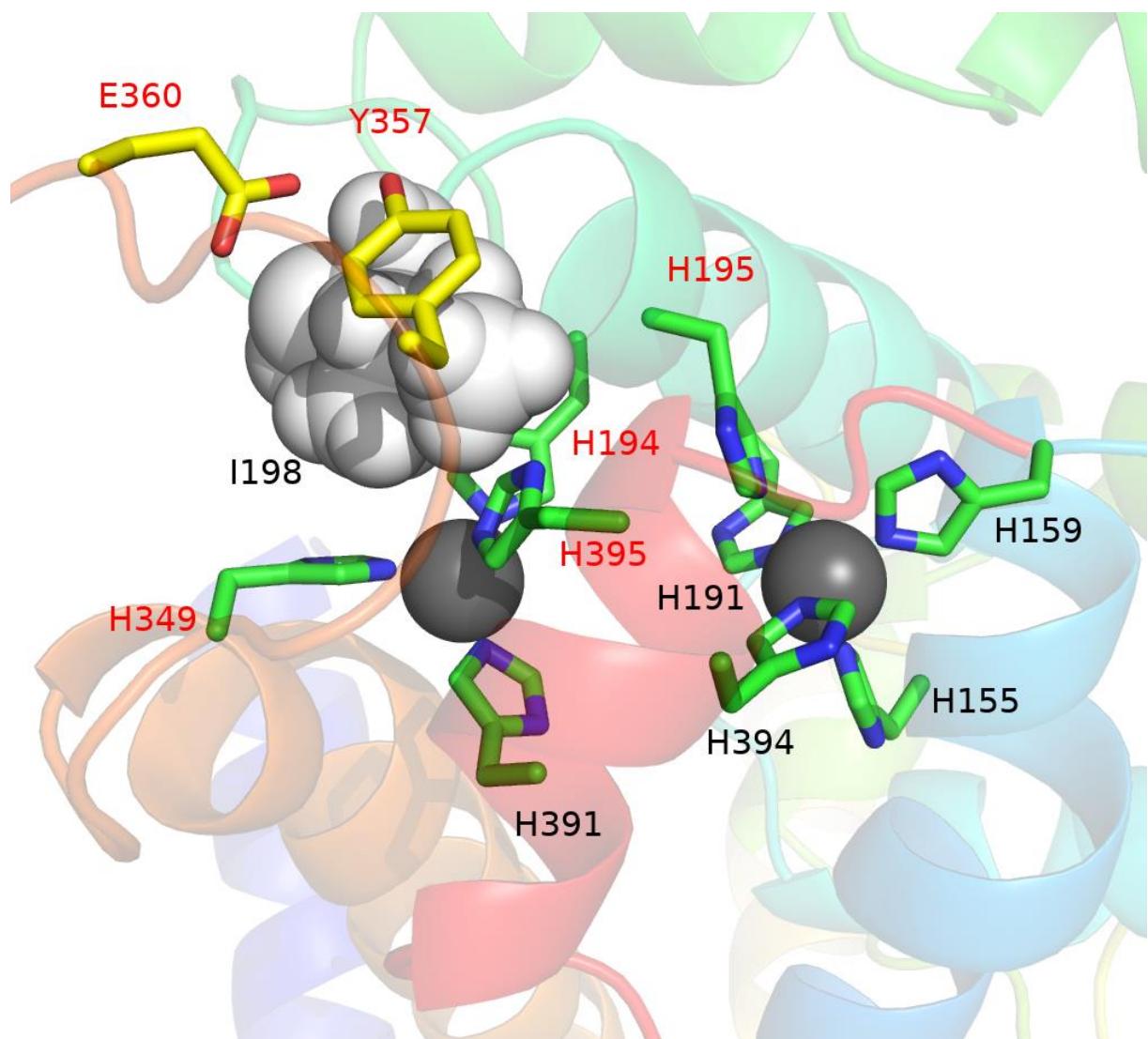
Supplementary Figure 4: Multiple alignments of 28 characterised Δ^{12} -FAD enzymes with a focus on the the 4th box. The histidine box n°3 (**HX₂HH**) and hypothetical 4th box (**TXLQH**) are aligned among all MDs. The accession numbers of the Δ^{12} -FAD12 or Δ^{12} -FAH12 are:

Claviceps purpurea FAH12: B4YQU1.1; *Claviceps purpurea* FAD12: ABS18716.1; *Claviceps purpurea* FAD12/FAD15: ABS18717.1; *Yarrowia lipolytica* FAD12: XP_500707.1; *Mortierella alpina* FAD12: AAF08684.1; *Aspergillus parasiticus* FAD12: AAP23194.1; *Mucor circinelloides* FAD12: BAB69056.1; *Rhizopus oryzae* FAD12: AAV52631.1; *Ricinus communis* FAH12: XP_002528127.1; *Ricinus communis* FAD12: NP_001310648.1; *Physaria fendleri* FAH12: AAC32755.1; *Hiptage benghalensis* FAH12-1: AGN95845.1; *Hiptage benghalensis* FAH12-2: AGN95846.1; *Hiptage benghalensis* FAD12-1: AGN95841.1; *Hiptage benghalensis* FAD12-2: AGN95842.1; *Hiptage benghalensis* FAD12-3: AGN95843.1; *Euphorbia lagascae* FAD12: AAS57577.1; *Vernicia fordii* FAD12: Q8GZC3.1; *Vernicia montana* FAD12: ABL86147.1; *Cucurbita pepo* FAD12: AAS19533.1; *Linum usitatissimum* FAD12: ACF49508.1; *Hevea brasiliensis* FAD12: AAY87459.1; *Punica granatum* FAD12: AAO37754.1; *Triadica sebifera* FAD12: ABI96919.1; *Tropaeolum majus* FAD12: AAV52834.1; *Arabidopsis thaliana* FAD12: NP_187819.1; *Olea europaea* FAD12: AAW63040.1; *Caenorhabditis elegans* FAD12: AAA67369.1.

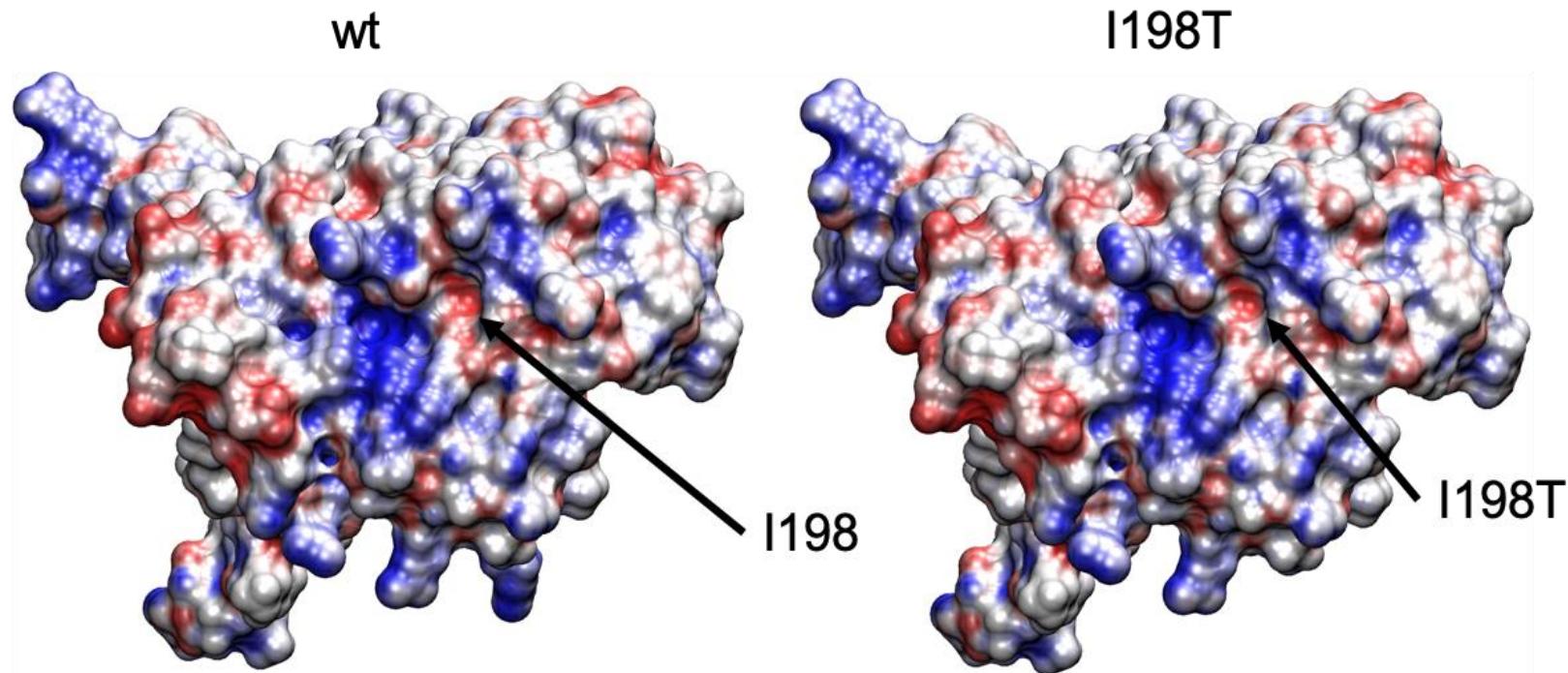
In order to replicate the coordination found in the SCD1 enzyme, we added a molecule of water in the model. The His349 and the molecule of water interact with one of the two iron ions (Supplementary Figure 6). The Thr345 sidechain which had the lowest conformational energy cannot form a hydrogen bond with the molecule of water, but one of its sidechain rotamer can.



Supplementary Figure 6: View of active site in CpFAH12 model, with the histidine coordinating one iron ion. The iron ions are showed in grey, the His194 of His-Box 2 is showed in green, and His391 and His395 of the 3th His-Box are showed in magenta. The fourth putative binding-box and its bounded water molecule are displayed in orange. Hydrogen atoms (in white) are not represented for clarity, except for the molecule of water.



Supplementary Figure 7: Closer view of isoleucine 198 and its surrounding in CpFAH12 model. The isoleucine 198 is shown in light grey spheres. The histidines of His-Boxes are shown in green sticks. Tyrosine 357 and glutamic acid 360 are shown in yellow sticks. The amino acids written in red are located within 4 Å from isoleucine 198.



Supplementary Figure 8: Representation of electrostatic surface of CpFAH12 model. Electrostatics potential maps coloured from -5 kT/e in red to +5 kT/e in blue. The position 198 is indicated with black arrow. Left and right figures correspond to respectively wild type CpFAH12 and I198T mutant.

<u>Wild-type sequence and CpFAH12-CpFAD2 chimeras</u>	<u>Saturation mutagenesis of CpFAH12 at 198 position</u>
62U.Tf CpFAH12	62U.Tf CpFAH12 I198A
62U.Tf CpFAD2	62U.Tf CpFAH12 I198C
62U.Tf CpFAH12 TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198D
62U.Tf CpFAH12 N-term/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198E
62U.Tf CpFAH12 Cyt1/AH1/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198F
62U.Tf CpFAH12 Cyt2/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198G
62U.Tf CpFAH12 Cyt3'/AH3/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198H
62U.Tf CpFAH12 C-term/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198K
62U.Tf CpFAH12 Cyt2''/TM_Des	62U.Tf CpFAH12 I198L
	62U.Tf CpFAH12 I198M
CpFAH12 mutants of Cyt2'/AH2 part	62U.Tf CpFAH12 I198N
62U.Tf CpFAH12 ATHA	62U.Tf CpFAH12 I198P
62U.Tf CpFAH12 ATHE	62U.Tf CpFAH12 I198Q
62U.Tf CpFAH12 ATNA	62U.Tf CpFAH12 I198R
62U.Tf CpFAH12 AIHA	62U.Tf CpFAH12 I198S
62U.Tf CpFAH12 GTHA	62U.Tf CpFAH12 I198V
62U.Tf CpFAH12 G197A	62U.Tf CpFAH12 I198W
62U.Tf CpFAH12 I198T	62U.Tf CpFAH12 I198Y
62U.Tf CpFAH12 N200H	
62U.Tf CpFAH12 E213A	Mutagenesis of hypothetical 4th box
	62U.Tf CpFAH12 T345A
	62U.Tf CpFAH12 H349A
	62U.Tf CpFAH12 H356A

Supplementary Table 1: List of plasmids used in this study. 62U.Tf is the abbreviation for Jmp62 plasmid, Ura3ex yeast selection marker and pTEF promoter.

Gene name	NCBI/GenBank Protein ID:	UniProtKB ID:	PDB ID (Structure):
CpFAH12		B4YQU1	
CpFAD2	ABS18716		
YI.FAD2	XP_500707		
MaFAD2		Q9Y8H5	
AtFAD2	NP_187819		
PfFAH12	AGT36606		
RcFAD2	NP_001310648/ EEF31658	(A0T1K2)	
RcFAH12	XP_002528127/ Q41131		
mSCD1	NP_033153	P13516	4YMK
hSCD1	NP_005054	O00767	4ZY0

Supplementary Table 2: List of accession numbers and pdb ids of the proteins referenced in this paper. Cp: *Claviceps purpurea*; YI: *Yarrowia lipolytica*; Ma: *Mortierella alpina*; At: *Arabidopsis thaliana*; Pf: *Physaria fendleri* (formerly *Lesquerella*); Rc: *Ricinus communis*; m: mouse; h: human.

Utilisation	Primer name	Sequence 5'→ 3'	Comment
Leu2 locus verification	ChromC YI.Leu2-amont_d	TAGTTGCTGTCGAATTCCGTG	Verification of zeta platform integration
	ChromC YI.Leu2-aval_r	CCTACAACATCATATACCAGACAC	
Sequencing of gene in Jmp62 plasmid	Tef_amont	AGCCAAGGGTATAAAAGAC	Forward sequencing
	Lipaval	CGGATGACTAACTCTCCAGAGCG	Reverse sequencing
Targeted mutagenesis of CpFAH12 Cyt2'/AH2_Des, restoration of CpFAH12 native amino acid	CpFAD2_MutA-fwd	CACCATAAGGgTACGGCCATATGGAG	Mutation A197G
	CpFAD2_MutB-fwd	CACCATAAGGCTACGGCCATATGGAG	Mutation T198I
	CpFAD2_MutC-fwd	GCTACCGGCaacATGGAGCGAGATATGG	Mutation H200N
	CpFAD2_MutD-fwd	CCGAACCCGAGagCAGCAGGCTACTCG	Mutation A213E
	CpFAD2_MutAB-fwd	CCACCATAAGGgTAtCGGCCATATGG	Mutation A197G and T198I
	CpFAD2_MutBC-fwd	CCATAAGGCTAtCGGCaacATGGAGCGAG	Mutation T198I and H200N
Targeted mutagenesis of CpFAH12 at Ile198	CpFAH12_I198V-fwd	CCACAAGGGCgTCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198L-fwd	CCACAAGGGCtGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198A-fwd	CCACAAGGGCgcCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198M-fwd	CCACAAGGGCATggGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198N-fwd	CCACAAGGGCAaCGGCAACATGGAG	
Saturated mutagenesis of CpFAH12 at Ile198	CpFAH12_I198R-fwd	CCACAAGGGCgagGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198K-fwd	CCACAAGGGCAaggGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198D-fwd	CCACAAGGGCgaCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198E-fwd	CCACAAGGGCgaggGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198Q-fwd	CCACAAGGGCaggGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198S-fwd	CCACAAGGGCtcCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198C-fwd	CCACAAGGGCtgCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198P-fwd	CCACAAGGGCccCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198G-fwd	CCACAAGGGCggCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198H-fwd	CCACAAGGGCcaCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198F-fwd	CCACAAGGGCtCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198Y-fwd	CCACAAGGGCtaCGGCAACATGGAG	
	CpFAH12_I198W-fwd	CCACAAGGGCtggGGCAACATGGAG	

Supplementary Table 3: List of primers used in this study. For the mutagenesis primers, only forward sense was presented and the lowercase letters correspond to unpaired bases. The reverse primers used were always reverse-complementary to the forward primers.

A)

Target value [min]	Rate [°C.min ⁻¹]	Hold time [min]	Retention time [min]
150	0	0	0
180	5	0	6
185	2	8	16.5
204	10	5.1	23.5
300	80	0.3	25

B)

Target value [min]	Rate [°C.min ⁻¹]	Hold time [min]	Retention time [min]
80	0	2	2
140	80	0	2.75
175	10	11.5	17.75
208	100	4	22.08
300	80	0.27	23.5

Supplementary Table 4: Oven program during the fatty acid analysis with gas chromatography. A) Parameters used for analysis of silylated fatty acids and B) Parameters used for analysis of methylated fatty acids.

CpFAH12 part name		nb_mutations / total length	Remarks:
N-term part		17 / 98	
TM1&2 part		10 / 55	
Cyt1 part		7 / 27	Included histidine-box 1 and a hypothetical amphiphilic helix
Cyt2 part	Zone Cyt2'	4 / 34	Included histidine-box 2 and the Gly197, Ile198, Asp200, Glu123
	Zone Cyt2''	4 / 80	
TM3&4 part		1 / 55	Included hypothetical 4 th box Thr345 and His349
Cyt3 part		8 / 36	
C-term part		17 / 92	Included histidine-box 3
Whole sequence		68/477	86% of identity

Supplementary Table 5: Length and number of differences between CpFAH12 and CpFAD2 parts.

A	Ratios of RA or LA in total fatty acid		Conversion percentage	Sample RA and LA production compared to respective WT CpFAH12 or CpFAD2 production		
	RA TFA	LA TFA		RA + LA RA + LA + OA	RA (Sample) RA (CpFAH12)	LA (Sample) LA (CpFAH12)
					LA (Sample) LA (CpFAD2)	
CpFAH12	27%	9%	35%	100%	100%	26%
CpFAD2		55%	55%	0%	391%	100%
TM_Des	28%	11%	40%	106%	125%	32%
N-term/TM_Des	27%	12%	39%	78%	109%	28%
Cyt1/TM_Des	3%	9%	12%	6%	61%	15%
Cyt2/TM_Des		52%	52%	0%	376%	96%
Cyt3/TM_Des	13%	24%	37%	35%	190%	49%
C-term/TM_Des	3%	5%	8%	7%	33%	8%
Cyt2''/TM_Des	9%	5%	14%	22%	36%	9%

B	Ratios of RA or LA in total fatty acid		Conversion percentage	Sample RA and LA production compared to respective WT CpFAH12 or CpFAD2 production		
	RA TFA	LA TFA		RA + LA RA + LA + OA	RA (Sample) RA (CpFAH12)	LA (Sample) LA (CpFAH12)
					LA (Sample) LA (CpFAD2)	
CpFAH12 GINE (WT)	27%	8.7%	49%	100%	100%	26%
CpFAD2 ATHA (WT)		55%	71%		391%	100%
CpFAH12 ATHA		60%	84%		481%	123%
CpFAH12 ATHE		60%	84%		476%	122%
CpFAH12 ATNA		54%	75%		436%	112%
CpFAH12 AIHA	10%	10%	27%	35%	106%	27%
CpFAH12 GTHA		54%	77%		439%	112%
CpFAH12 G197A	5.9%	10%	21%	16%	85%	22%
CpFAH12 I198T		51%	69%		406%	104%
CpFAH12 N200H	29%	9.7%	53%	109%	113%	29%
CpFAH12 E213A	21%	7.4%	40%	75%	80%	21%

Supplementary Table 6: Overview of ricinoleic acid (RA) and linoleic acid (LA) percentages among the total of fatty acids (TFA) in the different strains. A: Strains expressing WT CpFAH12, WT CpFAD2 or a CpFAH12_Des chimera. B: Strains expressing WT CpFAH12, WT CpFAD2 or a CpFAH12 Cyt2'_Des mutant.

B. Évaluation des déterminants de la spécificité de la désaturase de *Claviceps purpurea*

Nous venons de décrire une approche consistant à réaliser des échanges de domaines de la désaturase CpFAD2 de *C. purpurea* dans l'hydroxylase CpFAH12 du même organisme pour identifier les déterminants de la spécificité d'hydroxylation (Robin et al. 2019). Nous avons réalisé ensuite l'approche complémentaire consistant à réaliser des échanges de domaines de l'hydroxylase vers la désaturase. Cela a pour objectif d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues sur CpFAH12 et éventuellement d'obtenir une désaturase plus active.

a. Des chimères de CpFAD2 deviennent des hydroxylases/désaturases

L'étude bio-informatique des séquences avait été réalisée avant que les structures tridimensionnelles des stéaroyl-CoA désaturases ne soient disponibles, c'est-à-dire antérieurement à ce qui a été réalisé dans l'article. Les zones échangées sont donc légèrement différentes de celles décrites dans Robin et al (Robin et al. 2019), bien que certaines se recoupent (tableau III.2.1 et figure III.2.1). **Les quatre zones cytosoliques échangées dans cette approche s'appellent H1, H2, H3, Cter** et les trois premières contiennent chacune une histidine-box (la quatrième box présumée n'avait pas encore été identifiée). La zone H2 est strictement identique à la zone Cyt2' en terme de séquence protéique et H1 n'a qu'un seul acide aminé de différence avec Cyt1. Les zones H3/Cter et Cyt3/C-term recouvrent la même séquence mais ne sont pas organisées de la même manière : le domaine H3 a été découpé en deux parties, H3 gauche (H3g) et H3 droite (H3d). Le domaine H3g correspond approximativement à Cyt3 et les zones H3d/Cter correspondent à la zone C-term.

Zone CpFAD2	Équivalent à :
H1 A154-V171	Cyt1 : A154-L180 Mutation supplémentaire : L176I
H2 F189-T233	Cyt2' : L181-Q214 Séquences identiques
H3 T358-A394	H3 gauche T358-T390 Cyt3 : T350-H385 Mutations : I388A ; E389D non retrouvées dans la zone cyt3
	H3 droite H391-A434 C-term : G386-N476 I388A ; E389D non retrouvées dans la zone Cterm contient la 3 ^{ème} histidine-box
Cterm L435- N476	

Tableau III.2.1 : Récapitulatif des délimitations des zones pour les chimères CpFAD2 et CpFAH12 (Robin et al. 2019). Les acides aminés indiqués sont ceux de CpFAD2. Les positions indiquées sont exactement les mêmes entre CpFAH12 et CpFAD2, mis à part l'acide aminé final qui est la position 477 pour l'hydroxylase (un acide aminé de plus).

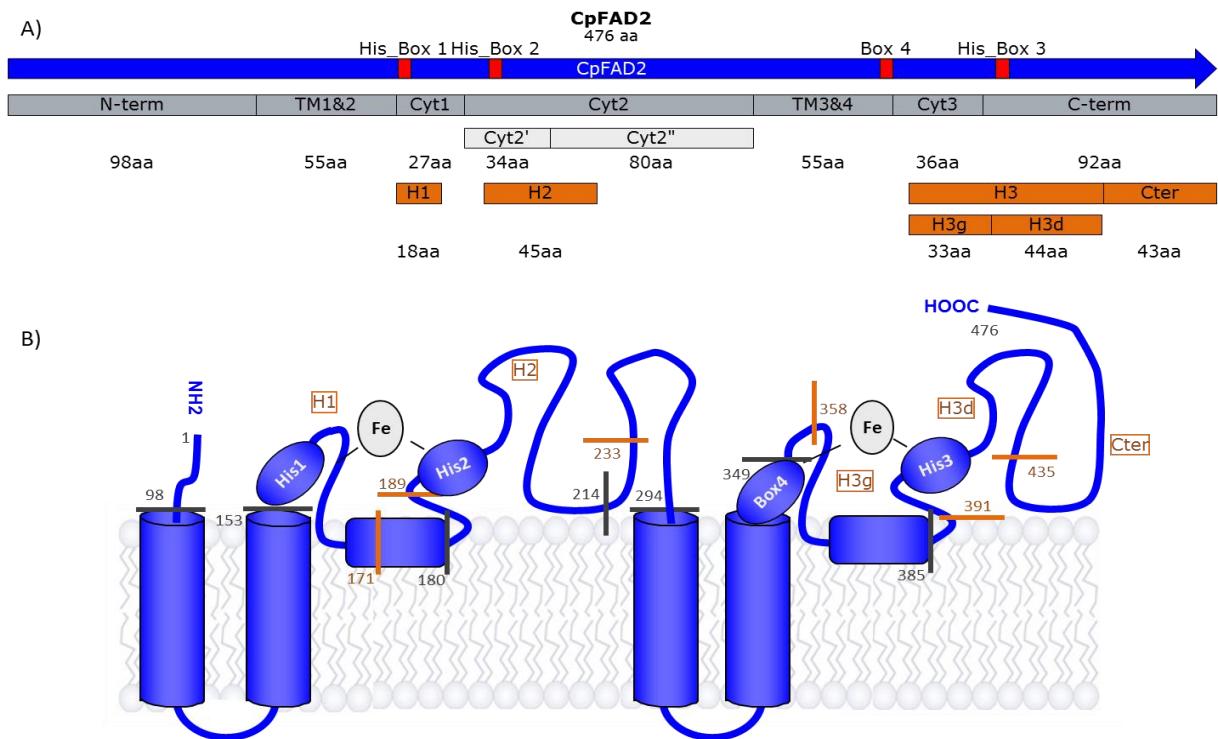


Figure III.2.1 : A) Représentation de la séquence de CpFAD2 en bleu avec la position relative des histidines-box en rouge (nommés His_Box ou Box pour celle présumptive). Les encadrés gris en dessous correspondent aux zones partitionnées selon Robin et al (Robin et al. 2019). Les encadrés orange représentent le découpage antérieur correspondant à cette partie. La zone H3 a été subdivisée en deux parties : H3g et H3d (respectivement pour gauche et droite). B) Modèle topologique de CpFAD2. Les nombres et barres grises correspondent à la position des acides aminés avant les séparations des zones. Les nombres et barres en orange indiquent la position des séparations pour les zones H1, H2, H3 et Cter. Un nombre situé respectivement N- ou C-term de la séquence par rapport à la séparation correspond à la position avant ou après la séparation. Les histidines-box n°2 et 3 lient les deux ions fers tandis que l'histidine-box n°1 et la box présumptive n'en lient qu'un seul. Figures adaptées et modifiées inspirées de Robin et al. 2019.

Après avoir partitionné les enzymes, des chimères CpFAH12_Des avaient été commandées et mis à part pour le domaine H1, les résultats obtenus pour ces chimères étaient cohérents avec ceux de l'article (Robin et al. 2019), c'est-à-dire que H2, la zone située aux alentours de la seconde histidine-box contenait au moins un acide aminé crucial pour l'activité d'hydroxylation (I198, voir partie III.2.A.) mais que les autres zones cytosoliques étaient également impliquées dans l'hydroxylation. Dans cette expérience, la chimère CpFAH12 H1_Des avait donné une activité assez proche de celle de CpFAH12 sauvage. Ce résultat est différent de ce qui a été obtenu pour la chimère CpFAH12 Cyt1 et cela sera discuté ultérieurement. À partir de ces résultats, **les chimères CpFAD2 impliquant la zone H2 et une ou plusieurs autres zones ont donc été désignées puis testées en culture (figure III.2.2 et tableau III.2.2)**. Comme la zone H1 ne semblait pas avoir d'influence sur l'hydroxylation, elle avait été écartée de l'étude.

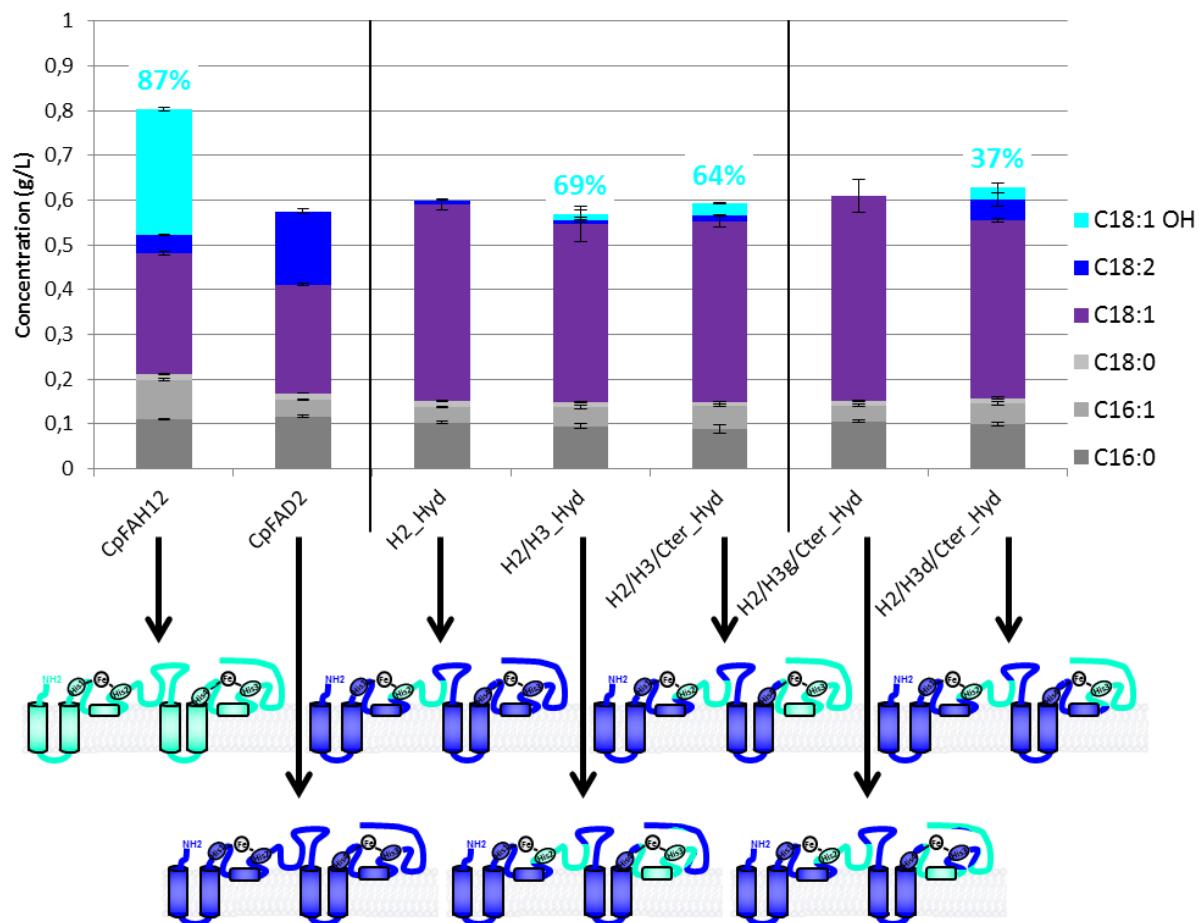


Figure III.2.2 : Production d'acides gras des souches OléoX zéta exprimant sous le promoteur pTEF une chimère de CpFAD2 dans le milieu riche YT₂D₅, Tp.citrate. Un modèle topologique récapitulatif de chaque enzyme est donné en dessous, les parties en bleu correspondent à celles de CpFAD2 et les parties en cyan à celles de CpFAH12. Le code couleur des acides gras est indiqué à droite du graphique et le pourcentage d'hydroxylation est indiqué en gras au-dessus de chaque mutant ayant produit de l'acide ricinoléique.

	Ratio AR total	Ratio AL total	Pourcentage de conversion	Taux d'AR comparé à CpFAH12	Taux d'AL comparé à CpFAH12	Taux d'AL comparé à CpFAD2
	AR AG Total	AL AG Total		AR (échantillon) / AR (CpFAH12)	AL (échantillon) / AL (CpFAH12)	AL (échantillon) / AL (CpFAD2)
CpFAH12	35%	5,0%	54%	100%	100%	25%
CpFAD2		28%	40%		405%	100%
H2_Hyd		1,5%	2,0%		23%	5,6%
H2/H3_Hyd	2,8%	1,3%	5,5%	5,7%	18%	4,5%
H2/H3/Cter_Hyd	4,2%	2,4%	8,9%	8,9%	36%	8,8%
H2/H3d/Cter_Hyd	4,4%	7,3%	16%	9,7%	114%	28%

Tableau III.2.2 : Paramètres des cultures des souches OléoX zéta pTEF exprimant une chimère CpFAD2. La chimère inactive H2/H3g/Cter n'a pas été intégrée dans ce tableau. AR : acide ricinoléique. AL ; acide linoléique. AO ; acide oléique. AG : acides gras.

La chimère CpFAD2 H2_Hyd seule est pratiquement inactive (2,0% de conversion) et ne montre que des traces d'acide linoléique et aucune de ricinoléique. Mais lorsque les deux zones H2/H3 de l'hydroxylase sont combinées dans la désaturase, une faible production d'acide ricinoléique est observée. L'ajout de la zone Cter n'a qu'un faible impact non-significatif sur la conversion. Vue la grande taille de la zone H3 et son effet déterminant pour le changement d'activité, elle a été partitionnée en deux et les deux chimères ont donné des résultats très différents. La chimère H2/H3g/Cter_Hyd perd toute activité tandis que la chimère avec la partie droite conserve une activité bifonctionnelle. Il est intéressant de noter que cette enzyme chimérique a une activité de bioconversion plus importante que celle comprenant toute la zone H3, mais en contrepartie le taux d'hydroxylation de ce mutant chute de par la plus grande production d'acide linoléique.

Les cultures de ces chimères ont permis de montrer qu'il est **possible de convertir la désaturase monofonctionnelle CpFAD2 en hydroxylase/désaturase**, mais l'activité reste très faible et les déterminants semblent complexes à appréhender avec ces chimères. La partie H2 possède les quatre mêmes positions que celles révélées par la partie Cyt2' de CpFAH12, elles semblent elles-aussi critiques pour la désaturation. Elles ont donc aussi été ciblées chez CpFAD2.

b. La mutagénèse de la zone H2 de CpFAD2

Comme il a été vu pour CpFAH12 (Robin et al. 2019), quatre acides aminés proches de la seconde histidine-box semblent cruciaux pour l'activité. Il s'agit des acides aminés alanine 197, thréonine 198, histidine 200 et alanine 213. Chez CpFAH12, ces acides aminés aux mêmes positions sont respectivement une glycine, une isoleucine, une asparagine et un glutamate. Pour comparer l'effet des quatre mutations A197G, T198I, H200N et A213E, des mutants de CpFAD2 pour une ou plusieurs de ces positions ont été réalisés par mutagénèse dirigé, puis une culture dans les nouvelles conditions a été réalisée.

Pour toutes ces expériences, la phase décane ne contient pratiquement aucun acide gras (<0,5% des acides gras totaux). Aucun des mutants ne produit d'acide ricinoléique et les mutants inactifs donnent tous des profils quasi-identiques (teneur en acide oléique des souches sans activité : 71%). Pour les souches exprimant une enzyme active, la somme des acides linoléique et oléique donne aussi environ 70% des acides gras totaux, ce qui permet également de confirmer la reproductibilité.

Les résultats (figure III.2.3 et tableau III.2.3) montrent que l'effet le plus drastique est obtenu lors du **changement de la thréonine à la position 198 par une isoleucine qui abolit complètement l'activité de l'enzyme** (plus de production d'acide linoléique). De même, lorsque cette mutation est combinée avec l'une des trois autres, l'activité n'est pas rétablie. Par contre le mutant CpFAD2 GINE, qui possède les quatre acides aminés de CpFAH12, récupère une très faible activité désaturase (l'acide linoléique représente 3,7% des acides gras totaux). Il a la même séquence protéique que la chimère H2_Hyd, ce qui explique que le profil en acide

gras obtenu soit le même (figure III.2.2). Ainsi, la position 198 joue un rôle crucial et seules certaines combinaisons pour ces acides aminés proches peuvent permettre d'obtenir une activité. Par ailleurs l'échange A197G ou H200N impacte assez fortement l'activité de désaturation, avec respectivement 59% et 56% de production comparé à la séquence CpFAD2 sauvage. Le mutant A213E ne montre aucun changement de profil lipidique comparé à la souche sauvage.

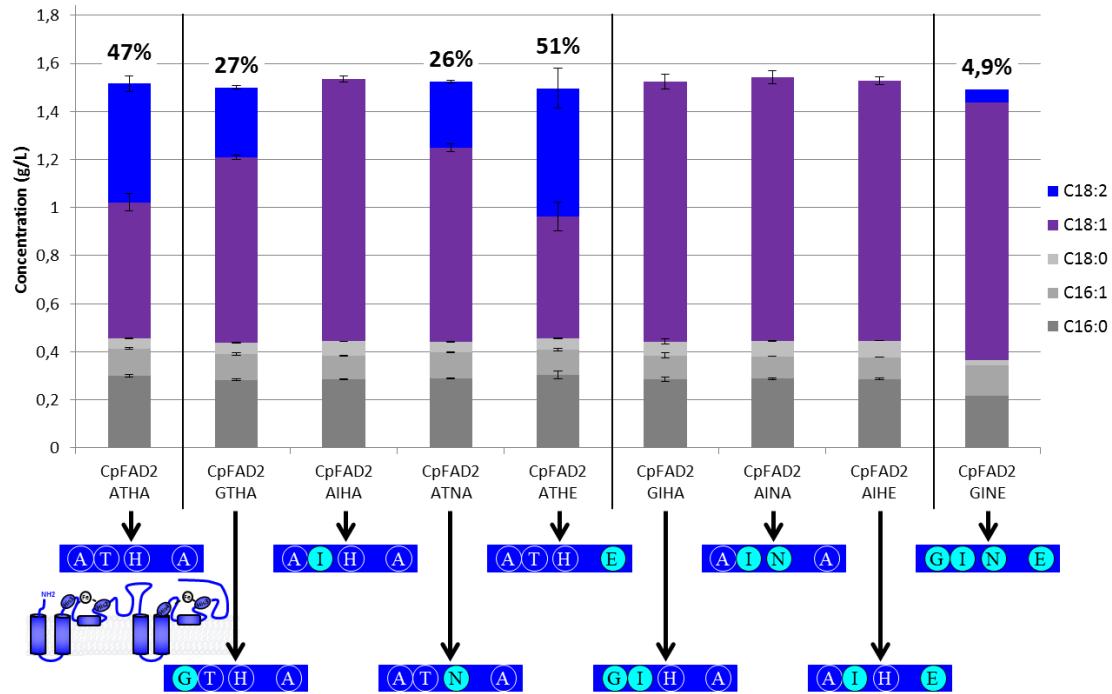


Figure III.2.3 : Production d'acides gras des souches OléoX zéta exprimant sous le promoteur pTEF un mutant de CpFAD2 dans le milieu riche YT₂D₅, Tp.citrate. Un encart donne la séquence des quatre acides aminés ciblés de chaque mutant ou témoin testé, avec en bleu ceux correspondant à CpFAD2 (ATHA) et en cyan ceux de CpFAH12 (GINE). Un modèle topologique récapitulatif de CpFAD2 sauvage est donné en dessous de celui-ci (gauche). Le code couleur des acides gras est indiqué à droite du graphique et le pourcentage de conversion est indiqué en gras au-dessus de chaque mutant ayant produit de l'acide linoléique.

	Ratio AL total	Ratio AO total	Taux d'AL comparé à CpFAD2
	AL AG Total	AO AG Total	AL (échantillon) AL (CpFAD2)
CpFAD2 ATHA	33%	37%	100%
CpFAD2 GTHA	19%	51%	59%
CpFAD2 ATNA	18%	53%	56%
CpFAD2 ATHE	36%	34%	108%
CpFAD2 GINE	3,7%	72%	11%

Tableau III.2.3 : Paramètres des cultures des souches OléoX zéta pTEF exprimant sous le promoteur pTEF un mutant de CpFAD2 dans le milieu riche YT2D5, Tp.citrate + phase décane. AR : acide ricinoléique. AL ; acide linoléique. AO ; acide oléique. AG : acides gras. L'ensemble des mutants ne produisant pas d'acide linoléique possèdent une teneur en acide oléique de 71%.

c. Mutagénèse de saturation de la thréonine 198

Tout comme pour CpFAH12, la position 198 de CpFAD2 est cruciale pour son activité de désaturation. Pour l'étudier, et dans l'objectif d'améliorer son activité de désaturation, une stratégie identique à celle suivie pour CpFAH12 a été suivie pour CpFAD2 : la mutagénèse de saturation sur la position T198 est réalisée avec les dix-huit autres acides aminés. Puis les souches ont été cultivées avec le nouveau protocole de culture et d'analyse (phase décane et souches OléoX zéta).

Les quantifications des acides gras des différentes cultures ont été rassemblées dans la figure III.2.4 récapitulative. La mutation de la thréonine par une cystéine donne le même taux de conversion et la même production d'acide linoléique que la désaturase sauvage, c'est-à-dire 0,29 g.L⁻¹. Les mutants CpFAD2 T198V/S/A/N/P gardent une activité de désaturation non-négligeable, mais amoindrie par rapport à la désaturase sauvage, respectivement 48% / 38% / 32% / 31% / 21% de la production d'acide linoléique du sauvage. Neuf mutants ont perdu la totalité de leur activité (mutants T198Q/E/D/K/F/Y/W/L/I) et quatre ne produisent plus que des traces d'acide linoléique (mutants T198H/M/G/R).

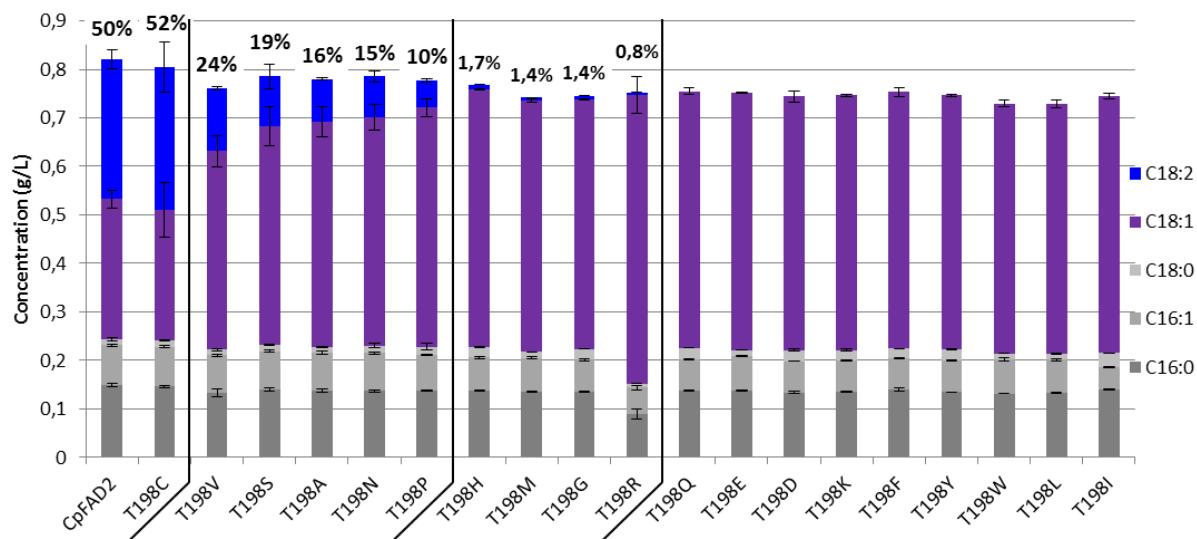


Figure III.2.4 : Production d'acides gras des souches OléoX zéta exprimant sous le promoteur pTEF un mutant CpFAD2 de la position T198 dans le milieu riche YT₂D₅, Tp.citrate. Le code couleur des acides gras est indiqué à droite du graphique et le pourcentage de conversion est indiqué en gras au-dessus de chaque mutant ayant produit de l'acide linoléique. Les mutants ont été rangés par ordre décroissant de production d'acide linoléique.

d. Discussion

i. Comparaison des résultats entre hydroxylase et désaturase

Les mutations de la zone H2

Pour comparer les résultats des mutants uniques avec ceux de CpFAH12, nous avons réalisé un tableau qui récapitule pour chaque mutant les taux de conversion obtenus (tableau III.2.4).

	position	Sauvage	197	198	200	213
CpFAH12	mutation	/	G→A	I→T	N→H	E→A
	% Conversion	49%	21%	69%*	53%	40%
CpFAD2	% Conversion	47%	27%	0%	26%	50%
	mutation	/	A→G	T→I	H→N	A→E

Tableau III.2.4 : Taux de conversion des mono-mutants de la zone Cyt2' pour CpFAH12 et CpFAD2. Les acides aminés présents chez l'hydroxylase sont respectivement GINE, et ceux chez la désaturase sont ATHA. Ils ont été échangés un à un. L'étoile dans la colonne 198 représente un changement de spécificité : de l'hydroxylation vers la désaturation.

Les mutations sur la position 197 entraînent une diminution d'un facteur 2 du taux de conversion des deux enzymes. Pour ce qui est de la mutation sur la position 198, pour CpFAH12 elle ne conduisait qu'à la perte de la spécificité d'hydroxylation, alors que la perte d'activité est totale pour CpFAD2. Elle est donc cruciale dans les deux cas. Pour CpFAH12, le remplacement de la position 200 conduit à un taux de conversion divisé par deux alors que la mutation inverse ne conduit à aucun effet sur CpFAD2. Pour les deux enzymes, la mutation à la position 213 n'a qu'un faible impact sur le taux de conversion de l'enzyme.

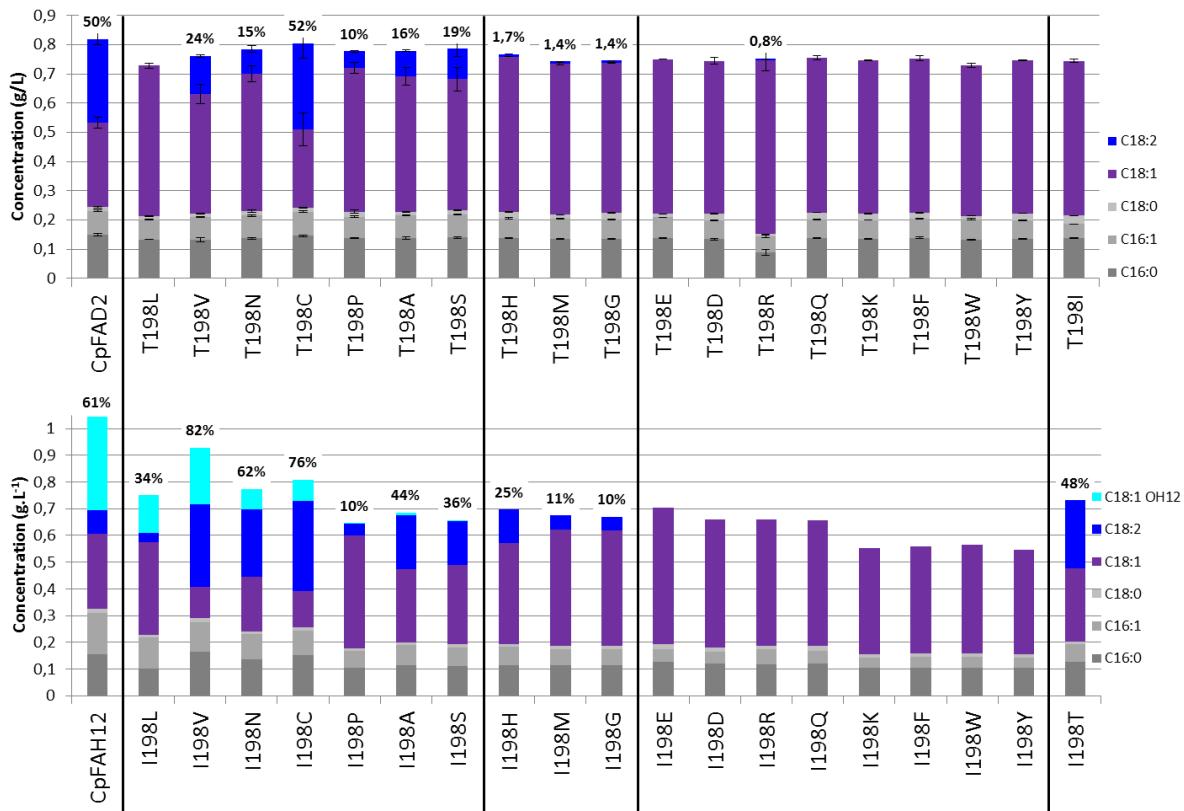
La mutagénèse de saturation

Si on se concentre sur les acides aminés ayant permis une activité substantielle, seuls des résidus avec des chaînes latérales de taille inférieure à trois atomes sont trouvés. **L'encombrement stérique de l'acide aminé localisé à la position 198 semble devoir être assez faible.** De plus, les résidus leucine et isoleucine, de taille pourtant adaptée, ne permettent pas d'obtenir une activité. Leur apolarité pourrait être un facteur expliquant leur inactivité. Parmi les résultats surprenants, la faible activité visible pour le mutant T198R est inattendue, car cet acide aminé est assez volumineux.

Pour comparer plus facilement les effets des mutations chez l'hydroxylase et la désaturase, nous rappelons ici les résultats obtenus lors des mêmes mutations sur CpFAH12 (figure III.2.5). Dans la globalité, les résultats sont assez similaires mais pour l'hydroxylase davantage de clones ont conservé une activité de désaturation significative : onze chez CpFAH12 contre seulement six pour CpFAD2. De plus, trois mutants CpFAH12 ont eu un taux de conversion conservé ou

amélioré (I198V/C/N), alors que seul le clone T198C a conservé le taux de désaturation de CpFAD2. Ces résultats tendent à supposer que **l'activité générale serait plus robuste chez l'hydroxylase que chez la désaturase, mais l'hydroxylation reste une activité originale car seuls quatre mutants CpFAH12 conservent une activité d'hydroxylation significative.**

Figure III.2.5 : Comparaison entre les résultats issus de la mutagénèse de saturation de CpFAH12 avec



ceux de CpFAD2. Le code couleur des acides gras est indiqué à droite du graphique et le pourcentage de conversion est indiqué en gras au-dessus de chaque mutant actif. Les mutants ont été rangés par ordre décroissant de production d'acide ricinoléique des mutants CpFAH12. Figures adaptées et modifiées issues de Robin et al. 2019.

Il est intéressant de remarquer que les acides aminés des mutants ayant donné les meilleures productions d'acide linoléique chez CpFAH12 sont aussi ceux ayant permis les conservations les plus élevées de l'activité chez CpFAD2. Le mutant CpFAH12 I198C en particulier présentait la plus grande augmentation de l'activité de désaturation, ayant même une activité supérieure par rapport à la désaturase sauvage CpFAD2 (134%). Chez la désaturase, la cystéine est le seul acide aminé ayant donné une activité désaturase équivalente à la désaturase sauvage.

Analyse des résultats au regard du modèle tridimensionnel

D'un point de vue structural, les conclusions que nous avons tirées du modèle de CpFAH12 peuvent également s'appliquer à ce qui est obtenu pour CpFAD2, car les deux enzymes partagent 86% d'identité. L'acide aminé en position 198 doit également être étroitement entouré et à proximité de l'histidine-box n°2 liant le centre fer. Donc des modifications dans cette zone pourraient impacter l'organisation du site actif et pourraient expliquer les fortes modifications catalytiques observées chez CpFAD2. Ainsi de petites modifications au niveau du positionnement des centres fer pourraient modifier la spécificité de la réaction ou avoir un rôle sur l'activité (taux de conversion) de l'enzyme.

Si on s'intéresse maintenant au positionnement des mutations de la zone H2 (équivalente à Cyt2') sur le modèle tridimensionnel, on constate que les positions 197 et 200 sont en étroite interaction avec l'isoleucine 198 et que la position 213 se trouve localisée sur une hélice assez éloignée de la position 198 (figure III.2.6). Comme nous venons de le voir, l'acide aminé en position 198 est très proche de deux histidines liant le centre fer, et des **modifications de la nature de cet acide aminé ont un rôle drastique sur l'activité de l'enzyme** et sur la nature de la réaction catalysée (hydroxylation ou désaturation). **De même, des modifications sur le positionnement de cet acide aminé auront également des conséquences sur ces mêmes paramètres** et cela explique comment la nature des acides aminés au contact de la position 198 (197 et 200) modifie également l'activité de l'enzyme.

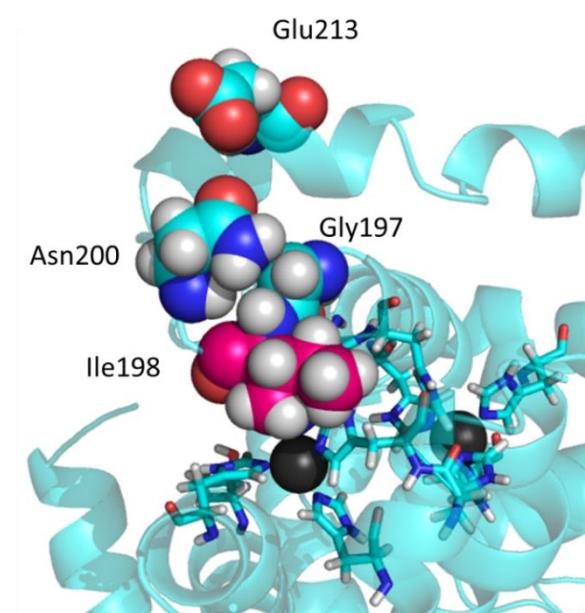


Figure III.2.6 : Représentation de la zone H2 (Cyt2') sur le modèle de CpFAH12. Les quatre acides aminés étudiés sont indiqués en sphères sur le modèle : glycine 197, asparagine 200 et glutamate 213 (carbones cyan) et isoleucine 198 (carbones rose). Les ions fers sont indiqués par les sphères noires, et sont entourée des 4 histidines-box (représenté en format « stick », carbones cyan).

ii. Implication de la zone C-terminale dans l'hydroxylation

Le remplacement dans la désaturase des parties H2 et H3 issues de celles de l'hydroxylase de *C. purpurea* est suffisante pour permettre une bifonctionnalité avec une faible activité d'hydroxylation, alors que H2 seul ne le permet pas. Donc on peut conclure que certains acides aminés spécifiques de ces zones interagissent les uns avec les autres pour permettre cette double activité. La perte d'activité de la chimère H2/H3g/Cter_Hyd par rapport à H2/H3/Cter_Hyd est surprenante et pose question, sachant que les deux enzymes châssis ont toutes deux une activité de désaturation. Il est difficile de conclure sans structure de l'enzyme, car pour rappel le modèle construit ne modélise pas les parties terminales. La partie droite quant à elle possède plutôt des acides aminés impliqués dans la catalyse, à la fois pour la désaturation et l'hydroxylation. H3d contient la troisième histidine-box, et d'après le modèle construit précédemment (Robin et al. 2019), elle se place à proximité de H2 qui elle contient la seconde histidine-box. Il est possible que l'effet de certaines mutations de cette zone soit dû comme pour la position 198 au déplacement du centre fer. La zone H3g d'après le modèle est située plus loin, donc elle n'impacte probablement pas le placement des histidines-box mais un autre facteur.

iii. Comparaison des anciennes chimères « H1 » avec les nouvelles chimères « Cyt1 » : La position 176

Préalablement à la construction des chimères CpFAD2 présentées dans la partie III.2.B.a, des chimères CpFAH12 avec un seul domaine de la désaturase (H1_Des, H2_Des, H3_Des et Cter_Des) ont été construites. Le découpage avait été réalisé sur la base de l'analyse de la littérature autour des histidines-box et de la partie C-terminale. Les résultats obtenus permettent globalement d'arriver aux mêmes conclusions sur les déterminants : ils sont répartis sur toutes les zones cytosoliques testées et la zone H2 semble particulièrement impliquée. Il existe des nuances entre les résultats mais il est difficile de déterminer si elles sont pertinentes car ces anciennes chimères CpFAH12_Des ont été réalisées par d'autres manipulateurs dans les anciennes conditions, donc avec de la variabilité et possiblement de la dérive des souches. Les graphiques ne sont donc pas montrés. Une nuance intéressante est que la chimère CpFAH12 H1_Des semble avoir conservé la totalité de son activité, alors que CpFAH12 Cyt1_Des a perdu beaucoup de son activité (-94% d'hydroxylation et -39% de désaturation), or ces deux constructions ne diffèrent que par un seul acide aminé : la présence de la mutation I176L chez CpFAH12 Cyt1_Des. Il est possible que cette isoleucine intervienne dans l'activité de l'enzyme, et que son remplacement par la leucine, un acide aminé pourtant proche, conduisent à une large diminution de l'activité.

Ainsi CpFAD2 possède une leucine et CpFAH12 un acide aminé plus volumineux, une isoleucine. Si on regarde le positionnement de cette mutation dans le modèle tridimensionnel, celle-ci se trouve dans une hélice amphiphile proche de l'hélice transmembranaire TM2. La chaîne latérale de l'acide aminé à cette position se trouve proche de la queue ω terminale de

l'acide oléique positionné dans le substrat. Si on regarde les alignements multiples des désaturases et hydroxylases dans cette zone, on note que la position diffère également entre l'hydroxylase et la désaturase du ricin. De la même manière, on retrouve un acide aminé plus petit, dans la désaturase (une valine) par rapport à celui présent chez l'hydroxylase (une leucine).

C. Conclusions générales et perspectives

a. Synthèse des résultats obtenus

Les résultats obtenus pour les chimères de CpFAH12 et de CpFAD2 ont montré que les déterminants de la spécificité étaient repartis sur l'ensemble des zones cytosoliques de la protéine. En effet, les chimères CpFAH12 où des zones cytosoliques de CpFAD2 sont introduites perdent toutes plus ou moins d'activité d'hydroxylation. Il a par ailleurs été possible d'obtenir des chimères de CpFAD2 (CpFAD2 H2/H3_Hyd par exemple) avec une faible activité et présentant un taux d'hydroxylation non-négligeable (37%). Les expériences de mutagénèse de saturation sur ces positions uniques n'ont cependant pas permis d'améliorer la production d'acide ricinoléique de CpFAH12 ou celle d'acide linoléique de CpFAD2. Nous avons cependant été surpris d'observer des mutants de CpFAH12 avec une production d'acide linoléique supérieure à celle de CpFAD2 (CpFAH12 I198C par exemple).

Cela semble montrer que même s'il reste de la marge de progression pour les activités « secondaires », leur activité principale est déjà plutôt bien optimisée dans l'enzyme sauvage et l'améliorer ne pourra pas se faire en ne changeant qu'une seule position. Pour obtenir une réelle amélioration de l'activité, plusieurs acides aminés en simultané devront être modifiés. Mais pour savoir quels acides aminés et comment ils interagissent précisément entre eux, il est nécessaire d'avoir une structure tridimensionnelle disponible ou un modèle plus fin basé sur une autre Δ^{12} -désaturase.

b. Les zones autour des histidines-box sont cruciales pour la spécificité

Les chimères réalisées aussi bien à partir de CpFAH12 que de CpFAD2 montrent que les acides aminés autour des histidines-box ont un rôle crucial dans l'activité et la sélectivité de l'enzyme. Plusieurs articles avaient déjà ciblés des zones proches avec succès :

- Le remplacement des positions T148N (correspondant à la position 198 chez CpFAH12), A296V, S322A, M324I chez la Δ^{12} -désaturase d'*Arabidopsis thaliana* par des acides aminés issus de la Δ^{12} -hydroxylase bifonctionnelle de *Physaria fendleri* (ex-*Lesquerella*) permet d'obtenir une production d'acide gras hydroxylé dans les graines d'*A. thaliana* (Broun et al. 1998). Le ratio d'acide gras hydroxylé total est d'environ 7,5% mais les données de l'article ne donnent pas l'activité de désaturation obtenue. Ces quatre positions sont situées à proximité des histidines-box et elles ont été trouvées par comparaison entre deux hydroxylases (RcFAH12 et LfFAH12) et six désaturases de plantes, car ces positions étaient conservées mais différentes entre les désaturases et hydroxylases.
- La désaturase Δ^{12}/Δ^{15} bifonctionnelle de *Fusarium verticillioides* (Fm1) a été l'objet d'étude de mutagénèse (Cai et al. 2018). Parmi les sites testés, plusieurs sont proches du site actif

ou des histidines liants les fers : la mutation de I290V (proche de la quatrième box présumptive) a conduit à une perte totale d'activité et des mutants de F157H/W ont conduit à l'amélioration de l'activité. Les mutants L153R et H194Q ont permis d'obtenir une amélioration de l'activité de 106% et 90% respectivement, avec une augmentation du ratio Δ^{12}/Δ^{15} . Aucun mutant équivalent aux positions 197 et 198 de CpFAH12/CpFAD2 n'a cependant été testé mais les positions L153 et F157 sont situées dans la même zone (juste après l'histidine-box n°2). La position H194 de Fm1 est elle située loin de toute histidine-box au niveau de la séquence.

- L'acétylénase de *Crepis alpina* (Crep1) a été la cible de mutagénèse pour onze positions, dont sept sont proches des histidines-box (Gagné et al. 2009). Trois positions en particulier, A139, N146 et Y150, sont situées juste après la seconde histidine-box comme les quatre positions de la zone Cyt2/H2. La mutation Y150F a fortement augmenté l'activité de l'enzyme et a diminué son ratio C16:2/C18:2 (donc une meilleure affinité pour les C18). Les mutations A139S et N146H ont eu elles assez peu d'effet sur l'activité.

Parmi les raisons expliquant les modifications, l'une d'elle serait l'impact du dioxygène sur le site actif, car en fonction de sa géométrie l'activation et/ou l'accès pourraient être plus ou moins aisés. Sans structure tridimensionnelle, il est impossible d'étudier quels pourraient être les accès au site actif du dioxygène. Mais ce type de recherche a été mené chez une autre famille d'enzymes, les lipoxygénases, car il existe des structures tridimensionnelles pour certaines d'entre-elles. Elles partagent avec les désaturases plusieurs points communs : ce sont des enzymes membranaires à centre fer (non-hémique) qui utilisent le dioxygène et les acides gras comme substrat. Chez la Δ^{12} - Δ^{15} lipoxygénase du lapin, il a été possible par modélisation de révéler plusieurs poches pouvant lier le dioxygène, qui sont enfouies profondément dans la protéine (Saam et al. 2007). Suite à cela, quatre accès par lesquels le dioxygène pourrait accéder au site actif ont été déterminés. Deux voies passent par la poche de liaison au substrat (dans ce cas l'acide arachidonique), lorsque ce dernier est présent, il n'est plus possible pour le dioxygène à l'extérieur d'accéder au site actif via la poche de liaison au substrat, mais si un oxygène était « piégé » dans la poche de liaison, alors il peut accéder au site actif. Une troisième voie apparaît uniquement lorsque le substrat se lie au site actif. Enfin, la dernière voie est un accès transitoire qui traverse la protéine, c'est-à-dire que la voie d'accès évolue en fonction de la conformation de la protéine (flexibilité). L'étude de l'accès du dioxygène au site actif pourrait aussi apporter des informations sur la catalyse, car il est possible que de son orientation dépende la réaction catalysée (abstraction d'hydrogène puis soit une seconde abstraction, soit un transfert de l'hydroxyle formé).

c. Autres cibles de mutagénèse

L'effet de la mutation à la position 176 (position différente entre les chimères de la zone Cyt1 et H1) mériterait également de plus amples investigations.

Lorsque l'on regarde le modèle topologique, on constate une symétrie. Deux domaines transmembranaires, une histidine-box, une hélice amphiphile et une autre histidine-box. Nous avons identifié la position 198 trois acides aminés après l'histidine box n°2. Ainsi, si nous nous intéressons à cette même position dans l'histidine box n°4, nous trouvons la sérine 298. Cet acide aminé est le même chez CpFAD2 et CpFAH12. Cependant il est intéressant de noter que chez le ricin l'hydroxylase et la désaturase diffèrent sur cette position, la désaturase présentant une sérine et l'hydroxylase une alanine. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'une alanine sur cette position et éventuellement réaliser de la mutagénèse de saturation. Cet acide aminé est l'avant dernier modélisé mais il apparaît effectivement proche d'une histidine coordonnant un des ions fers.

De manière plus générale, il conviendrait d'étudier de manière plus systématique les acides aminés proche des histidines et susceptible de modifier leur positionnement et de réaliser de la mutagénèse de saturation. Une fois les résidus critiques pour l'activité et la spécificité révélés, il conviendrait dans un second temps de modifier les acides aminés se trouvant en première sphère des acides aminés critiques et de réaliser des combinaisons entre eux.

Le modèle tridimensionnel obtenu a permis de fournir des hypothèses intéressantes pour expliquer les effets des mutations obtenues. Cependant, il faut souligner que ce modèle présente certaines limites. En effet seule une partie de la protéine est modélisée (entre les positions 105 et 399), en particulier la zone C-terminale n'est pas prédite alors que nos expériences montrent que c'est une zone impliquée dans l'hydroxylation. D'autre part, la zone cytosolique centrale a été modélisée par des approches de threading ce qui rend la prédiction de cette zone moins fiable que le reste du modèle. Ainsi, pour faire de telles prédictions, il conviendrait d'abord d'avoir une structure de l'enzyme d'intérêt.

d. Obtenir la structure tridimensionnelle

L'obtention de la structure tridimensionnelle de cette protéine, qui était initialement un objectif de la thèse qui n'a pu être initié faute de temps, reste donc toujours cruciale pour poursuivre l'étude de ces enzymes. La résolution récente des structures de deux stéaroyl-CoA désaturase et d'une sphingolipide α -hydroxylase montre bien qu'il est possible de purifier et cristalliser les enzymes de la famille des désaturases membranaires. Pour les Δ^{12} -désaturases, aucune structure n'est actuellement disponible mais la procédure pour les purifier puis les cristalliser pourrait être similaire aux précédentes.

L'obtention de structures de protéines membranaires se heurte à deux verrous, le premier est la difficulté à les purifier et les extraire des membranes en maintenant la structuration et l'activité de la protéine ; le second est l'obtention de cristaux bien ordonnés pour permettre d'obtenir une bonne résolution.

Les deux stéaroyl-CoA désaturases, appartenant à des mammifères, ont été produites dans des cellules d'insectes (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015), alors que la sphingolipide α -hydroxylase de *Saccharomyces cerevisiae* a été produite chez cette même levure (Zhu et al. 2015). Enfin, un autre article (Chen et al. 2013) a montré qu'il était possible de produire chez *Pichia pastoris* trois désaturases membranaires de *Mortierella alpina* appartenant à trois sous-familles différentes (Δ^9 -, Δ^{12} - et Δ^{15} -désaturases). La lyse a été faite par un tampon hypotonique pour les cellules d'insectes, par un homogénéisateur haute-pression pour *S. cerevisiae* et par une lyse aux billes chez *P. pastoris*.

Ensuite les protocoles utilisés partagent beaucoup de similitudes : une première centrifugation « faible » permet de séparer les gros débris, puis une ultracentrifugation permet de récupérer les microsomes. Ces microsomes sont ensuite solubilisés avec des tensioactifs, généralement glycolipidiques, qui sont similaires à des phospholipides. Enfin, les enzymes sont purifiées grâce à leur étiquette histidine, qui est ensuite clivée, et une dernière purification d'exclusion stérique est réalisée pour les obtenir. Ces purifications ont lieu en présence du détergent pour assurer le maintien de la structure.

La production d'enzymes membranaires chez *S. cerevisiae* n'est pas très efficace, car ils n'obtiennent qu'environ 2,5 mg de sphingolipide α -hydroxylase à partir de dix litres de culture en bioréacteur. En utilisant une souche modifiée de *P. pastoris*, les quantités de désaturases obtenues sont plus intéressantes, elles oscillent entre 2,5 et 37,5 mg_{désaturases}.L⁻¹ culture. Dans notre cas, si on utilise *Yarrowia lipolytica* pour la production d'une protéine membranaire, par exemple YIFAD2 ou CpFAH12, la délétion de PAH1 pourrait être réalisée pour augmenter la production de membranes et de ses protéines enchâssées (Guerfal et al. 2013).

Un point commun entre les trois enzymes cristallisées est qu'elles ont dû être délétées en N-terminal pour obtenir une protéine plus stable pour la cristallisation. La longue partie cytoplasmique en N-terminal est supposée être trop flexible pour donner des structures de qualité. Donc il est probable que ce soit aussi le cas pour les Δ^{12} -désaturases.

Plusieurs articles sont sortis ces dernières années sur la cristallisation de protéines membranaires (Clark et al. 2010; Andersson et al. 2019; Cheng et al. 2019) et l'un d'eux présente un logiciel capable de prédire si une séquence protéique est membranaire, et s'il sera possible de la cristalliser (Varga and Tusnády 2019). Les séquences de la stéaroyl-CoA désaturase humaine et celle la sphingolipide- α -hydroxylase de *S. cerevisiae* donnent des prédictions selon lesquelles elles ne pourraient pas être cristallisables (le score « Whole process » est de respectivement 0,624 et 0,546). CpFAH12 et YI.FAD2 non plus ne donnent pas de scores positifs (scores : 0,528 et 0,619, figure III.2.7), et la stéaroyl-CoA désaturase de souris est la seule avec une prédition positive (score : 0,662). Comme tous ces scores sont assez proches, et que la structure sphingolipide α -hydroxylase a pu être résolue malgré son score, la résolution de la structure d'une Δ^{12} -désaturase semble envisageable mais cela sera certainement difficile.



Figure III.2.7 : Résultats généraux obtenus pour CpFAH12 avec le serveur TMcrys (<http://tmcrys.enzim.ttk.mta.hu/>). Ce logiciel de prédition des segments transmembranaires donne des résultats en accord avec nos prédictions. Il semble que pour les trois étapes-clefs du procédé d'obtention des structures (solubilisation, purification et cristallisation), CpFAH12 ne donne pas de score suffisant.

Une technique très utilisée pour la cristallisation des protéines membranaires est l'utilisation d'une « Lipidic Cubic Phase » (Andersson et al. 2019), généralement composée de monooléïne (glycérol estérifié par un acide oléique). Le mélange entre ce lipide et la solution aqueuse, contenant l'agent précipitant et la protéine membranaire solubilisée, permet de déclencher la cristallisation de microcristaux de protéine dans la phase lipidique (qui forme une bicouche à l'instar des membranes cellulaires). Les nombreux microcristaux formés peuvent ensuite être analysés par « femtosecond crystallography », une approche où plusieurs milliers de microcristaux sont analysés avec des impulsions ultracourte de rayon X, et les clichés obtenus sont assemblés pour obtenir une image après traitement numérique.

Une dernière technique très intéressante en plein essor est la cryo-microscopie électronique (Autzen et al. 2019). Cette technique permet obtenir des images d'échantillons sans avoir besoin de recourir à de la cristallisation/rayon X. De plus, les conditions d'observation peuvent se faire dans les membranes natives, ce qui permet d'avoir une meilleure conservation de la structure. La limitation de cette technique est qu'elle ne donne que des résultats de la surface des protéines, ce qui n'est pas un problème pour les désaturases car les domaines transmembranaires sont conservés et correctement prédits.

e. L'évolution dirigée pour explorer la diversité

Une perspective pour la poursuite de l'étude des hydroxylases et désaturases de *Claviceps purpurea* consisterait à suivre une stratégie d'évolution dirigée, qui est un cycle de trois étapes : 1) une étape de mutagénèse introduisant de la variabilité 2) un crible pour sélectionner quels sont les clones ayant obtenu des activités d'intérêts et 3) l'isolation et l'amplification du gène muté, qui pourra ensuite être réutilisé comme matrice pour la mutagénèse du cycle suivant.

Différentes stratégies de mutagénèse aléatoire peuvent être utilisées, une **première stratégie comme l' « error-prone PCR »** pourrait être appliquée à CpFAH12. Elle pourrait permettre d'obtenir des constructions plus actives ou ayant une spécificité d'hydroxylation meilleure que CpFAH12 sauvage. Cette stratégie utilise des polymérasées avec un taux d'erreur « élevé » (environ 10^{-3} ou moins, soit environ 1-2 bases pour CpFAH12) et sans mécanisme de correction.

Le taux d'erreur peut être modulé par la présence de certaines molécules ou ions ($MgCl_2$, $MnCl_2$, analogues ou déséquilibre de bases...), cela dépend de la taille ou du nombre de modifications recherchées. Cependant le nombre de variants à tester serait trop important.

Une deuxième stratégie « DNA shuffling » semble intéressante pour révéler des zones ou groupes de zones importantes. Le principe de cette méthode est de réaliser des fragments de courte taille (environ 100pb) qui se recoupent à partir de la séquence de plusieurs gènes. Puis les fragments sont assemblés par PCR, permettant la formation aléatoire de chimères entre les différents gènes. Comme CpFAH12 et CpFAD2 ont en tout 68 acides aminés de différence, il est possible de faire des fragments portants quatre à cinq acides aminés de différents entre les deux enzymes. Cette stratégie a un but similaire de celle de la construction de chimères, mais avec un découpage plus fin et non basé sur la structure des protéines et permettant de multiples combinaisons aléatoires et sans à priori. Le but est d'essayer de trouver des zones importantes pour l'activité ou la spécificité désaturation / hydroxylation. Une fois ces zones identifiées des banques de mutagénèse pourront être envisagées.

Comme dit précédemment, l'évolution dirigée nécessite d'avoir un cible haut-débit pour pourvoir rapidement sélectionner les séquences avec les nouvelles propriétés d'intérêt. Or, le développement d'un cible haut-débit est actuellement un verrou technologique majeur. Auparavant l'analyse des lipides se faisait par transméthylation du milieu total de culture. Le point critique dans ce travail était la miniaturisation (par exemple en plaque 96 puits) et la robotisation de la transméthylation, car l'étape de chauffage à 80°C nécessitait une étanchéité parfaite pour ne pas avoir d'évaporation et l'utilisation d'un robot capable de tolérer les solvants organiques (méthanol, décane... et une aspiration/ventilation). Aujourd'hui, l'utilisation d'une phase décane en microplaques pour récupérer les acides gras sécrétés simplifie le problème. Il faut ensuite envisager une technique d'analyse permettant le haut-débit. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse nécessite au minimum une dizaine de minutes par échantillon, soit minimum 16 heures d'analyses pour 96 clones. Des analyses directes dans séparation préalable (« shotgun lipidomic ») permettraient d'améliorer grandement les cadences de criblage. Une analyse sur le spectromètre RMN 800 MHz du laboratoire, avec passeur d'échantillons, nécessiterait une quinzaine de minutes par échantillon si une quantité suffisante est obtenue, et donc cela ne permet qu'un faible débit de criblage. Pendant ma thèse, une nouvelle méthodologie de criblage pour quantifier des acides gras sécrétés a été mise au point par la plateforme de criblage ICEO (indépendamment de mon sujet de thèse). C'est avec cette technique que les plus fortes cadences de criblages pourraient être atteintes car le cible est adaptable à un format 96 puits. Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur l'absorbance d'un colorant, le « Nile red » en présence d'acide gras sécrété dans le surnageant. Comme l'acide ricinoléique est le seul acide gras largement sécrété chez la souche OléoX, une augmentation d'acide gras dans le surnageant pourra être reliée à une augmentation de la sécrétion d'acide ricinoléique. Plusieurs cibles à moyen et haut débit pourraient donc être utilisés et les techniques de création de banques doivent donc être raisonnées en fonction du débit de criblage qui peut être atteint.

Chapitre III. Résultats

Partie 3.

Ingénierie du métabolisme lipidique de *Yarrowia lipolytica* pour améliorer la production d'acide ricinoléique

Les résultats concernant l'amélioration de la production d'acide ricinoléique en agissant sur l'enzyme responsable de la conversion ont permis de mieux comprendre certains déterminants de sa spécificité mais n'ont pas conduit à l'amélioration des titres en acide ricinoléique. Dans ce chapitre, nous allons investiguer une seconde stratégie pour améliorer la production d'acide ricinoléique. Il s'agira **d'optimiser les conditions de conversion pour l'enzyme en modifiant le métabolisme lipidique de la souche châssis**. Deux aspects habituellement ciblés lorsqu'une amélioration de la production est souhaitée sont soit l'augmentation de la quantité de substrat disponible (*sn2*-oléoyl phosphatidylcholine), soit de retirer du système le produit formé (*sn2*-ricinoléoyl phosphatidylcholine). Ce dernier aspect semble particulièrement adéquat dans notre cas, car nous avons vu dans la première partie des résultats que l'acide ricinoléique était toxique pour la levure.

Ces deux stratégies ont pour objectif de forcer la conversion en déplaçant l'équilibre du système (figure III.3.1). Dans cette partie les modifications apportées ne toucheront que les gènes endogènes de *Yarrowia lipolytica*.

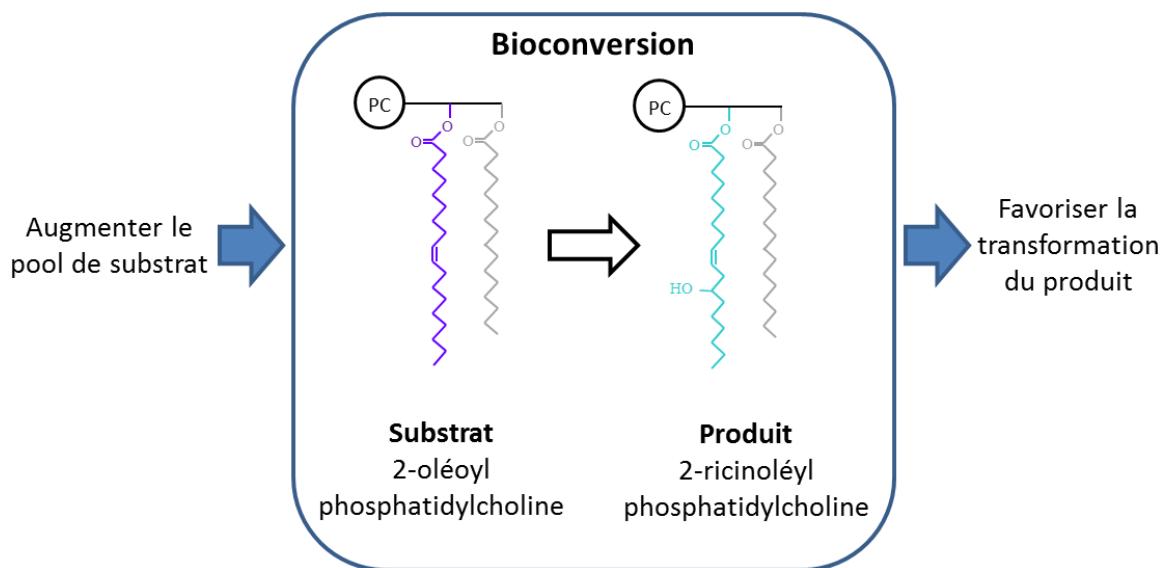


Figure III.3.1 : Schéma représentant les deux stratégies envisagées pour améliorer les capacités de conversion de l'enzyme *in vivo*.

A. Améliorer la quantité de substrat en augmentant la quantité de phospholipides synthétisés :

a. Voies de synthèse des phospholipides chez les levures.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les phospholipides proviennent de deux voies métaboliques différentes (Klug and Daum 2014) qui ont toutes deux l'acide phosphatique (PA) comme précurseur (figure III.3.2). D'une part, celui-ci peut être activé en cytidine diphosphate diacylglycérol (CPD-DAG), qui donnera les principaux phospholipides : phosphatidylinositol (PI) ; phosphatidylglycérol (PG) puis les cardiolipides (CL) ; phosphatidylsérine (PS) ; phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylcholine (PC). D'autre part, le PA peut être hydrolysé en DAG qui permet la synthèse de PC et PE par la voie de Kennedy (« Kennedy pathway », (Kennedy and Weiss 1956; Gibellini and Smith 2010)). Dans cette voie, la choline et l'éthanolamine libres sont phosphorylées par des kinases puis activées par des cytidyltransférases en cytidine diphosphocholine (CPD-Cho) et cytidine diphosphoéthanolamine (CDP-Etn). Ces précurseurs activés servent ensuite de substrat aux choline-phosphotransférases et éthanolamine-phosphotransférases pour transférer les groupements phosphocholine et phosphoéthanolamine sur des DAG, et former les PC et PE.

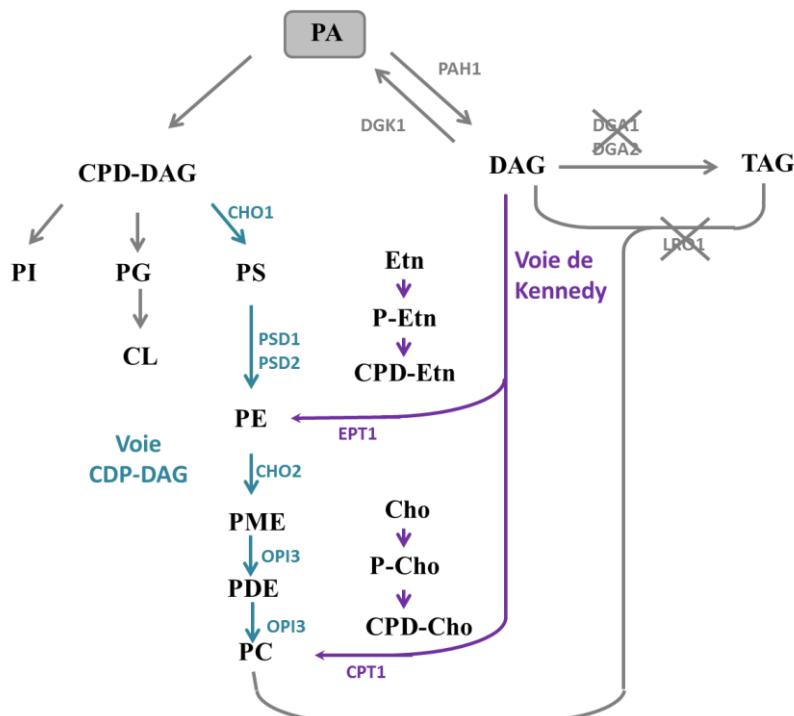


Figure III.3.2 : Schéma simplifié des voies de biosynthèse des phospholipides dans la souche OléoX de *Y. lipolytica* par homologie avec les voies connues chez *S. cerevisiae* (adapté de (Carman and Han 2011)). Les voies de synthèse et certaines enzymes impliquées sont indiquées par la couleur bleu-vert pour la voie CDP-DAG et en violet pour la voie de Kennedy, la synthèse des TAG est indiquée en gris. La synthèse de PE et PC à partir respectivement de lysophosphatidyléthanolamine (lysoPE) et lysophosphatidylcholine (lysoPC), n'est pas indiqué sur la figure. PA : acide phosphatidique, DAG : diacylglycérol, TAG : triacylglycérol, CPD : cytidine diphosphate, PI : phosphatidylinositol, PG :

phosphatidylglycérol, CL : cardiolipides, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, Etn : éthanolamine, Cho : choline.

Chez *Y. lipolytica*, la voie principale de synthèse des phospholipides n'est pas connue, les deux voies seront donc explorées pour voir si l'une ou l'autre est capable d'améliorer la conversion en acide ricinoléique.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons choisi de surexprimer les phosphotransférases Yl.CPT1 et Yl.EPT1 dans le but d'augmenter les phospholipides produits par la voie de Kennedy. D'autre part, pour rediriger le flux vers la voie CPD-DAG, la délétion de Yl.PAH1 a été évaluée dans la souche OléoX. En effet, le PA est considéré comme un nœud métabolique important entre le métabolisme des triacylglycérols et celui des phospholipides. Le choix de cette stratégie a été basée sur une étude de la littérature (Guerfal et al. 2013) montrant que la délétion de cette voie chez *Y. lipolytica* avait un double effet : non seulement les triacylglycérols diminuent au profit des PC et PE qui augmentent, mais ceci conduit également à une prolifération du réticulum endoplasmique qui conduit à améliorer la production et l'activité de plusieurs protéines membranaires. Dans notre cas avec cette stratégie, nous espérons à la fois une augmentation du substrat et de la quantité d'enzyme CpFAH12.

b. Effet de la délétion de Yl.PAH1 sur la production d'acide ricinoléique

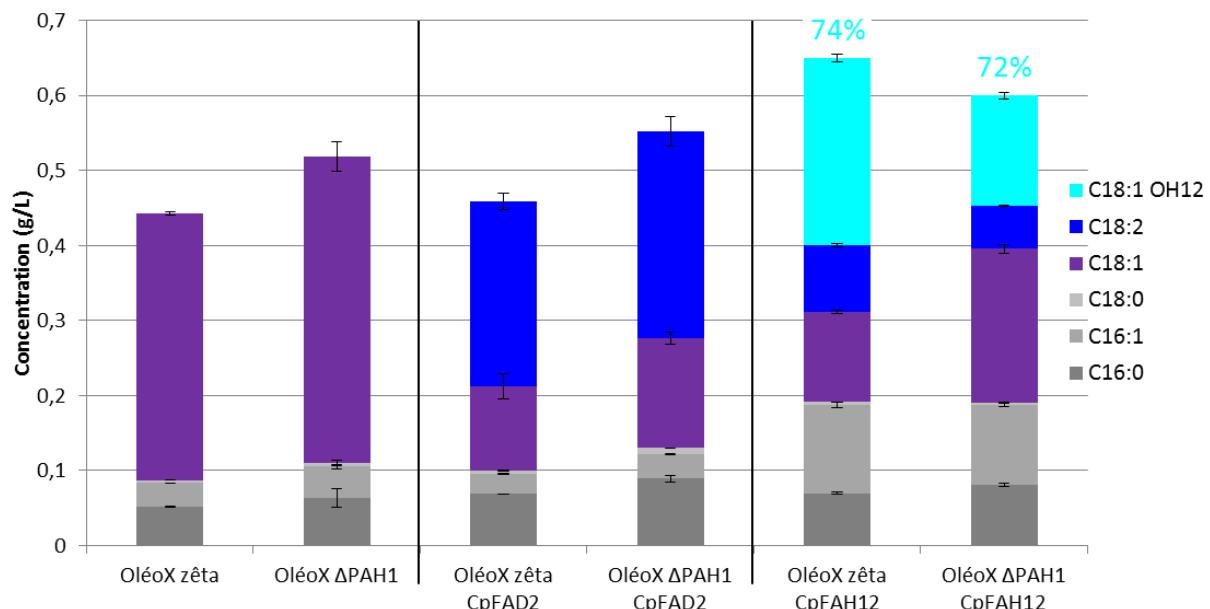
La délétion dans la souche OléoX est réalisée par transformation avec une cassette de délétion comportant environ 1kpb de chaque côté de la séquence codante du gène de Yl.PAH1 (YALI0D27016g1), et le marqueur de sélection LEU2. Les transformants prototropes sont criblés par PCR au niveau du locus de Yl.PAH1 et deux clones délétés sont conservés comme souche châssis.

Pour évaluer l'effet de la délétion de Yl.PAH1 sur la souche, trois constructions ont été réalisées, à la fois dans la souche témoin OléoX zéta et dans la souche à tester OléoX Δ PAH1 : la première est un témoin avec seulement la cassette de transformation vide (sans séquence codante). Les deux autres constructions sont des souches exprimant soit CpFAH12, soit la désaturase de *Claviceps purpurea*, CpFAD2. Une culture avec les deux souches châssis OléoX zéta et OléoX Δ PAH1 a été réalisée avec les conditions de culture mises au point au chapitre précédent.

La mesure des densités optiques (DO) montre que les souches délétées pour Yl.PAH1 donnent des DO du même ordre de grandeur que celle des souches OléoX zéta, soit environ 38-41 pour les souches exprimant CpFAH12 et 45-50 pour les autres souches (témoin et CpFAD2). On retrouve l'effet négatif sur la croissance des souches produisant de l'acide ricinoléique.

La quantification des acides gras totaux est affichée dans la figure III.3.3, les souches OléoX Δ PAH1 et OléoX Δ PAH1 CpFAD2 montrent une augmentation de la quantité totale des acides gras de 17% et 20% respectivement comparativement aux souches n'ayant pas la délétion YI.PAH1. Pour la souche OléoX Δ PAH1, tous les acides gras montrent une augmentation significative de leur concentration, entre 15 et 31%. Pour la souche OléoX Δ PAH1 exprimant la désaturase CpFAD2, on observe également des augmentations de 29%, 24%, 80% et 30% respectivement des concentrations en acides palmitique, palmitoléique, stéarique et oléique. Un test de Student est réalisé sur les moyennes des concentrations en acide gras et la différence est significative pour les trois premiers acides gras. La production d'acide linoléique a augmenté de 12%, mais l'augmentation est trop faible pour être significative.

Figure III.3.3 : Concentration totale des acides gras produits par les deux souches OléoX zêta et OléoX



Δ PAH1 transformée avec la cassette vide (gauche), la cassette CpFAD2 (centre) et la cassette CpFAH12 (droite). Des duplicats sont réalisés pour toutes les souches. Les concentrations sont mesurées après 48h de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé est 9mL de YT₂D₅, avec tampon citrate pH4 et une phase décane de 1 mL. Le pourcentage d'hydroxylation est indiqué en cyan.

La souche exprimant CpFAH12 se comporte différemment des deux souches précédentes. Les variations des concentrations en acides gras entre la souche OléoX Δ PAH1 et OléoX zêta ne sont pas significatives pour les acides gras palmitique, palmitoléique et stéarique (respectivement +17%, -10% et -18%). Mais les acides linoléique et ricinoléique présentent une diminution significative de respectivement -36% et -41% alors que l'acide oléique montre une augmentation significative de 70%.

Le fait que la souche OléoX Δ PAH1 exprimant CpFAH12 donne des résultats si différents de CpFAD2 porte à discussion. En effet, les deux enzymes sont des désaturases membranaires utilisant les mêmes substrats et cofacteurs. **Pour conclure, cibler la voie CPD-DAG par la délétion de YI.PAH1 n'a pas permis d'augmenter la production d'acide ricinoléique.**

c. Effet de la surexpression des phosphotransférases de la voie de Kennedy sur la production d'acide ricinoléique

La voie métabolique de Kennedy fait intervenir trois réactions enzymatiques successives (figure III.3.2) et la dernière étape est catalysée par une phosphotransférase (Kennedy and Weiss 1956; Gibellini and Smith 2010). Ces enzymes catalysent le transfert de groupement phosphocholine ou phosphoéthanolamine sur le groupement hydroxyle libre d'un DAG. Le substrat activé utilisé est un cofacteur CPD-Cho et CPD-Etn synthétisé lors des deux étapes précédentes à partir de choline ou d'éthanolamine phosphorylée.

Chez *Y. lipolytica*, les deux phosphotransférases responsables de la synthèse de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylethanolamine ont été prédites selon leur homologie avec celles de *S. cerevisiae*. Les deux séquences protéiques CPT1 et EPT1 de *S. cerevisiae* partagent entre-elles 57% d'identité (99% de couverture), et elles ont été blastées contre le génome de *Y. lipolytica*. Deux séquences protéiques annotées comme étant homologues à celles de CPT1 et EPT1 ont été trouvées (tableau III.3.1). Les noms ont été attribués en fonction du plus fort taux d'homologie de chaque séquence, mais comme les fonctions biologiques de ces deux enzymes n'ont pas encore été caractérisées chez *Y. lipolytica*, leur attribution est peut-être erronée.

Séquences de <i>S. cerevisiae</i>	CPT1		EPT1	
Séquences de <i>Y. lipolytica</i>	Couverture	Identité	Couverture	Identité
YALI0C10989p (Yl.CPT1)	99%	44%	99%	41%
YALI0E26565p (Yl.EPT1)	80%	34%	82%	34%

Tableau III.3.1 : Résultats des alignements (fait avec BLAST) des séquences protéiques de CPT1 (NP_014269) et EPT1 (NP_011991) de *S. cerevisiae* contre le génome de *Y. lipolytica*.

Des plasmides contenant la séquence codante de ces deux gènes présumés, la cholinephosphotransférase Yl.CPT1 (YALI0C10989p) et de l'éthanolaminephosphotransférase Yl.EPT1 (YALI0E26565p), ont été obtenus auprès d'un laboratoire partenaire (Institut Micalis). L'hydroxylase CpFAH12 a été co-exprimée avec l'un des deux gènes précédent dans la souche OléoX (et non OléoX zéta puisqu'il est nécessaire d'avoir les deux marqueurs de sélection URA3 et LEU2 pour la co-transformation). Deux expériences de cultures ont été réalisées, la première a été faite dans les anciennes conditions de culture en présence d'une émulsion d'acide oléique. La souche châssis utilisée pour la transformation est la souche OléoX CpFAH12 conservée à -80°C. Les résultats obtenus étaient difficilement exploitables de par la variabilité très élevée. Mais la production d'acides linoléique et ricinoléique semblait être légèrement supérieure pour la souche co-exprimant Yl.CPT1. La co-expression de Yl.EPT1 ne permettait pas d'observer la moindre différence par rapport à l'expression de CpFAH12 seul.

Une autre culture a donc été réalisée dans les nouvelles conditions (phase décane) pour la souche co-exprimant Yl.CPT1 car c'est elle qui semblait la plus prometteuse. La souche châssis utilisée est cette fois-ci la souche OléoX prototrophe transformée simultanément avec les deux

cassettes de transformation issues des digestions NotI des plasmides Jmp62 URA3ex pTEF YI.CPT1 et Jmp62 LEU2ex pTEF CpFAH12. Les transformants ont été criblés sur gélose YNB avant de réaliser les cultures.

La figure III.3.4 montre que la production d'acide gras est assez similaire entre les deux souches, mais la concentration en acide ricinoléique augmente de 26% et celle de l'acide oléique diminue de 19% pour la souche co-exprimant YI.CPT1. La production d'acide linoléique reste identique entre les deux souches (moins de 1% de différence entre les deux souches).

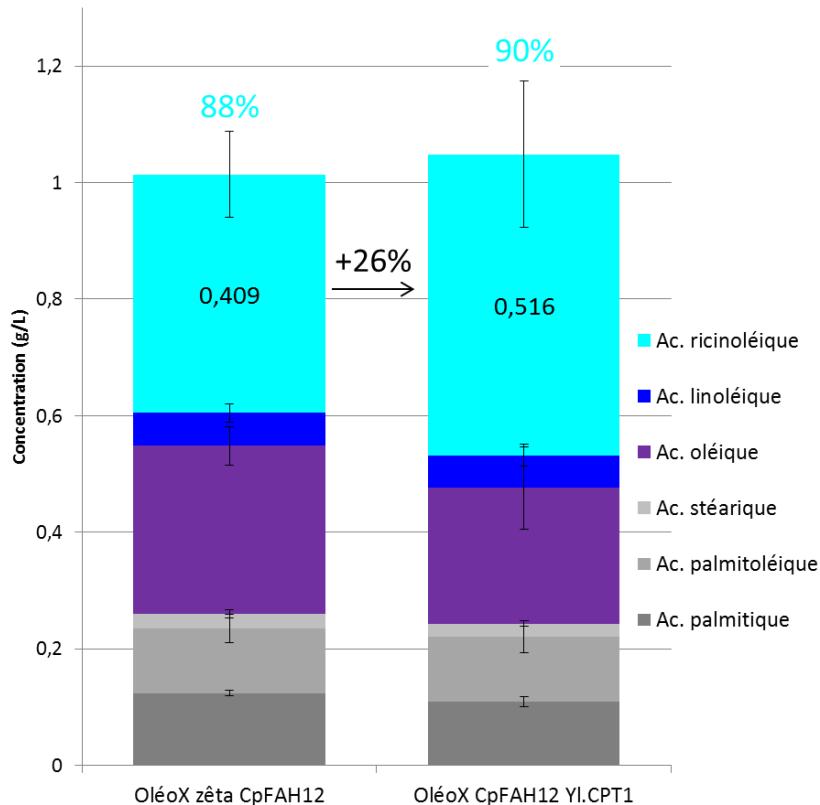


Figure III.3.4 : Concentration totale des acides gras produits par les deux souches OléoX zêta CpFAH12 et OléoX CpFAH12 YI.CPT1. Les concentrations sont mesurées après 48h de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé est 9mL de YT₂D₅, avec tampon citrate pH4 et une phase décane de 1 mL. Des duplicats sont réalisés pour les deux souches. La concentration d'acide ricinoléique en g.L⁻¹ est affichée sur le graphique en noir. Le pourcentage d'hydroxylation est indiqué en cyan.

La concentration totale moyenne en acide ricinoléique est donc de 0,52 g.L⁻¹ dans le milieu total, soit un plus de 5 g.L⁻¹ dans la phase décane. Le taux de conversion est augmenté de 62% à 71%. Cependant, la variabilité de la souche OléoX zêta est plus importante qu'habituellement pour cette culture (pour le témoin donc), mais celle de la souche OléoX est comparable aux autres cultures (car pas de plateforme zêta intégrée à la souche et double intégration). Ainsi, les augmentations observées ne sont pas significatives. Il convient de noter cependant que sur deux lots de culture (anciennes et nouvelles conditions), cette amélioration a pu être observée.

d. Discussion et perspectives

i. Effet de la délétion de Yl.PAH1

La délétion de Yl.PAH1 a eu un effet positif concernant la quantité totale des acides gras produits par les souches OléoX et OléoX exprimant la désaturase CpFAD2. Cependant, la souche OléoX exprimant l'hydroxylase CpFAH12 montre un comportement différent avec une diminution de la quantité totale des acides gras produits.

Si nous nous intéressons maintenant aux variations observées au niveau de chaque acide gras, elles ne sont pas toujours significatives au regard des tests statistiques réalisés (tests de Student) et elles sont donc plus difficiles à interpréter. Concernant l'acide linoléique synthétisé par la souche OléoX Δ PAH1 CpFAD2, on observe une légère augmentation de 12% de la concentration (non significative). Celle-ci peut s'expliquer par l'augmentation du pool d'acide oléique de 30% (substrat de conversion). Dans les deux souches (avec et sans délétion de Yl.PAH1), on note respectivement une conversion de l'enzyme d'environ 65% et 68%. Ceci semble corréler avec l'hypothèse de départ consistant à augmenter le pool de substrat pour augmenter la quantité de produit.

Cependant un comportement différent est observé avec l'acide ricinoléique, une augmentation (de 70%) du pool d'acide oléique est observée mais plus probablement à cause de la diminution du taux de conversion de l'enzyme. Celui-ci est clairement affecté (d'environ 74% dans la souche témoin contre 50% dans la souche portant la délétion) puisqu'on voit une diminution des acides linoléique et ricinoléique par rapport à la souche ne possédant pas de délétion.

La délétion de Yl.PAH1 ne semble pas impacter la souche châssis puisque les DO des cultures OléoX zêta et OléoX Δ PAH1 ne sont pas très différentes entre-elles. Comme attendu, les souches exprimant CpFAH12 ont une DO inférieure aux autres qui s'explique certainement par la toxicité de l'acide ricinoléique, mais cela ne permet pas de déterminer pourquoi la production d'acide ricinoléique est plus faible dans la souche Δ PAH1.

Plusieurs études montrent que l'activité acide phosphatidique phosphatase est augmentée lors de la production de triacylglycérols (Hardman et al. 2017; Hardman et al. 2018). Dans la littérature (Guerfal et al. 2013), la délétion de Yl.PAH1 chez *Y. lipolytica* (dans une souche ayant la capacité de produire des triglycérides) induit une augmentation des PE et PC et une prolifération des membranes internes de la cellule, conduisant à une surexpression de protéines membranaires endogènes ou exogènes. Dans notre cas, la souche OléoX ne peut déjà plus former de triacylglycérols, on peut imaginer que dans cette dernière il y a une accumulation de DAG ou/et il y a déjà eu une réorientation du flux de PA vers la voie CPD-DAG. Ainsi, la délétion de Yl.PAH1 n'a qu'un effet limité dans la souche OléoX, la délétion de ce gène codant pour une acide phosphatidique phosphatase ne serait favorable que dans le cas où les DAG s'accumuleraient dans la souche.

On notera également que l'un des points forts de ce dernier papier était la prolifération des membranes du réticulum endoplasmique. D'une part, cette prolifération peut être favorisée par le décane (Iida et al. 2000) dans nos nouvelles conditions de culture. D'autre part, la formation de triacylglycérols dans la souche OléoX ayant été inactivée, il est probable que la réorientation des flux conduise déjà à une prolifération des membranes chez cette levure oléagineuse. Ainsi, la délétion de Yl.PAH1 n'a qu'un effet limité dans la souche OléoX.

Pour conclure, les manipulations avec la souche exprimant la désaturase montrent que la stratégie de délétion de Yl.PAH1 pourrait être efficace pour la surproduction d'acides gras modifiés. Il semble que le pool d'acide oléique servant de substrat à l'enzyme ait été augmenté pour la souche témoin et la souche exprimant la désaturase. D'autres expériences poursuivies actuellement au laboratoire pour la production d'acide linoléique vont également dans ce sens. L'augmentation du pool de substrat et par conséquent de produit n'est pas délétère dans le cas d'accumulation d'acide linoléique, mais par contre l'est pour l'accumulation d'acide ricinoléique (probable toxicité de l'acide ricinoléique estérifié sur les phospholipides). Cette stratégie doit donc être combinée avec une stratégie assurant le relargage spécifique de l'acide ricinoléique du pool de phospholipides.

ii. La surexpression des phosphotransférases de la voie de Kennedy

L'absence d'effet sur la production d'acides gras lors de la surexpression de Yl.EPT1 signifie qu'elle ne permet pas ou n'a pas une activité suffisante pour la synthèse du précurseur sn2-oléoyl-phosphatidylcholine (directement ou indirectement). En revanche, une amélioration de 26% de la production d'acide ricinoléique est obtenue lorsque Yl.CPT1 est surexprimée, même si la variabilité observée dans cette expérience ne permet pas de l'affirmer avec certitude. Néanmoins, cette augmentation a été observée dans deux cultures indépendantes, donc cette tendance est encourageante. Des cultures avec davantage de réplicats devront confirmer cet effet positif.

○ Intérêt de tester les deux phosphotransférases

Y. lipolytica étant un organisme oléagineux, le flux de carbone allant vers les triacylglycérols est donc important dans les souches sauvages. Dans la souche OléoX, du fait de la délétion des transférases, il est possible que les diacylglycérols (DAG) s'accumulent car non consommés pour la formation des triacylglycérols. Ces délétions conduisent également à la perte des corps lipidiques (Beopoulos et al. 2012), les DAG ne peuvent donc plus être stockés et sont probablement disponibles pour la conversion par la voie de Kennedy. Il a été montré que la disponibilité en DAG et sa composition en acide gras est cruciale pour promouvoir la synthèse de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) (Sundler and Akesson 1975). Parmi les deux phosphotransférases, il semble plus logique que ce soit Yl.CPT1

(cholinephosphotransférase) qui donne un résultat positif car CpFAH12 est supposé agir sur la PC. Il nous a semblé tout de même intéressant de tester Y1.EPT1 (éthanolaminephosphotransférase) pour trois raisons :

- Si chez *Saccharomyces cerevisiae*, EPT1 catalyse principalement la synthèse de PE, elle est également capable de synthétiser de la PC (Hjelmstad and Bell 1988). Ceci s'explique par l'homologie entre les deux séquences. Ainsi, même si Y1.EPT1 a été annotée comme telle du fait de son homologie légèrement meilleure avec EPT1 de *S. cerevisiae*, il est possible qu'elle ait également cette double activité. Ce même raisonnement peut être envisageable pour Y1.CPT1, il serait possible qu'elle ne soit pas spécifique pour la PC mais pour la PE.
- La PE est un précurseur de la PC et donc une amélioration du pool de PE pourrait avoir un effet positif sur le pool de PC.
- La question de la spécificité des Δ^{12} -désaturases membranaires (« FAD2-like ») pour la PC mérite d'être questionnée. En effet, il est intéressant de noter que même si de nombreuses introductions d'article ou des articles de revues en font état, peu d'études biochimiques démontrent strictement cette spécificité. Dans l'article originel étudiant la spécificité de l'hydroxylase de ricin RcFAH12, des extraits microsomaux contenant l'hydroxylase montrent une action sur l'acide oléique en position 2 de la PC. Cependant les autres types de phospholipides n'ont pas été testés. Ainsi, s'il est clairement établi que les Δ^{12} -désaturases membranaires agissent sur les PC, il n'est pas exclu qu'elles agissent également sur d'autres phospholipides comme les PE.

- Les autres voies d'amélioration de la voie de Kennedy

Il est possible que dans la souche OléoX, les DAG s'accumulent et cela pourrait déjà provoquer une synthèse de phospholipides accrue via la voie de Kennedy, ce qui explique que Y1.CPT1 ait un effet assez mineur. L'ajout de choline au milieu (décris dans la partie I.1.A.f de ce manuscrit), n'a pas eu d'effet positif sur la production d'acide ricinoléique et ne semble donc pas limitante dans nos conditions.

Selon Gibellini et Smith (Gibellini and Smith 2010), l'étape limitante de la voie de Kennedy est la deuxième étape (Sundler and Akesson 1975), c'est à dire la formation de CDP-Cho par la cytidyltransférase, et c'est également cette étape qui est régulée. Avoir agi sur la troisième étape ne permet peut-être pas d'augmenter largement le pool de PC. **Pour obtenir une amélioration plus importante, une voie intéressante serait donc de surexprimer la choline-phosphate cytidyltransférase.**

Une autre possibilité est que **chez la souche OléoX, il y ait eu une réorganisation des flux vers la synthèse des phospholipides par la voie CPD-DAG**, mais celle-ci conduisant à beaucoup plus de diversité dans les phospholipides synthétisés (PI, PG, CL, PS, PE et PC), cela diminue au final la quantité de PC produite et donc le substrat disponible pour l'hydroxylase. Cette hypothèse expliquerait aussi pourquoi la délétion de Y1.PAH1 n'a permis qu'une

amélioration limitée pour la production d'acide linoléique. Pour améliorer la voie de Kennedy, il s'agirait alors de surexprimer Yl.PAH1 (ou/et déléter PGK1) pour assurer à la souche un pool de DAG suffisant.

iii. Poursuites futures de l'augmentation de la production de phosphatidylcholine

Bien qu'une augmentation ait été observée lors de la surexpression de la cholinephosphotransférase Yl.CPT1 et que la délétion de Yl.PAH1 donne aussi une faible amélioration pour la production d'acide linoléique, la stratégie consistant à améliorer la synthèse de la phosphatidylcholine pour améliorer la conversion de l'acide oléique en acide ricinoléique n'a pas permis d'avancée significative.

Ainsi la modification d'une seule étape de la synthèse des phospholipides est insuffisante pour obtenir une large amélioration et donc des modifications additionnelles dans cette voie sont indispensables pour une amélioration. Cependant ces modifications supplémentaires n'ont pas pu être réalisées dans cette thèse. Des modifications éventuelles pourraient être par exemple de limiter la synthèse de PI ou PG, ou de favoriser les étapes de conversion de PS en PE ou PE en PC.

Ainsi au regard de ces résultats, la stratégie suivante consistant à favoriser la libération de l'acide ricinoléique de la PC semble particulièrement pertinente. Comme les souches OléoX exprimant CpFAH12 sont capables de sécréter l'acide ricinoléique, elles doivent posséder une phospholipase endogène. Différentes phospholipases endogènes supposées ont donc été surexprimées pour vérifier leur effet sur la production d'acide ricinoléique.

B. Augmenter la libération de l'acide ricinoléique : lipases et phospholipases

Les phospholipides forment un pool de lipides très important chez les cellules. Ils ont un rôle structural indispensable dans les membranes cellulaires et ils peuvent aussi servir dans différentes voies métaboliques ou de signalisation (Henry et al. 2012). À cause de la diversité des phospholipides présents, la réorganisation de ce pool fait intervenir un grand nombre de phospholipases différentes. La spécificité de ces dernières dépend de la tête polaire du phospholipide et des chaînes d'acyles estérifiées, ainsi que de la localisation de l'enzyme (sécrété, membranaire...). Parmi les quatre grands types d'activités (cf partie I.2.D), nous nous intéresserons seulement aux phospholipases A2 et B, assurant respectivement la libération du résidu acyle estérifié à la position sn2 ou des deux résidus acyles.

Le phospholipide ciblé ici est la phosphatidylcholine avec un résidu ricinoléoyl estérifié en position sn2. Le premier effet bénéfique escompté est une libération de l'acide ricinoléique du pool des phospholipides et donc une diminution de son effet délétère sur les membranes, comme ce qui a été obtenu chez *Schizosaccharomyces pombe* (Yazawa et al. 2013b) et certaines plantes (Bayon et al. 2015; Aryal and Lu 2018). Le second effet bénéfique est la libération du cosubstrat (la lysophosphatidylcholine) pour le rendre à nouveau disponible pour synthétiser le substrat, c'est-à-dire le sn2-oléoyl-PC.

a. Choix des séquences à tester

Aujourd'hui, seules trois lipases extracellulaires (Lip2, Lip7 et Lip8 (Pignede et al. 2000; Fickers et al. 2005; Fickers et al. 2011)) et une lipase intracellulaire (Dulermo et al. 2013) ont été caractérisées chez *Y. lipolytica*, mais aucune phospholipase n'a été caractérisée chez cette levure. Donc des phospholipases d'intérêt ont été recherchées par homologie avec les enzymes caractérisées chez *S. cerevisiae*.

Le gène NTE1 chez *S. cerevisiae* code pour une phospholipase B agissant sur la phosphatidylcholine (Fernández-Murray et al. 2009). Son activité impactera l'activité de Opi1p, le facteur de transcription principal de la répression de la transcription des gènes de synthèse des phospholipides. La surexpression de NTE1 permet de lever l'inhibition de la synthèse de phospholipides dans des conditions de répression. Par alignement, une séquence homologue a été trouvée chez *Y. lipolytica*, YI.NTE1 (YALI0B11044p). Les deux séquences partagent 45% d'identité.

Trois phospholipases B / lysophospholipases ont été caractérisées chez *S. cerevisiae* : PLB1 à PLB3 (Lee et al. 1994; Merkel et al. 1999). Elles ont toutes des caractéristiques différentes, comme leur localisation ou leur type de phospholipide / lysophospholipide préférentiel. PLB3 est particulièrement intéressante car son activité phospholipase A2 est plus importante que son

activité lysophospholipase, ce qui conduit à une accumulation de lysophosphatidylcholine, qui peut donc être acylée à nouveau avec de l'acide oléique pour la conversion en acide ricinoléique. Les blast des trois PLB contre le génome de *Y. lipolytica* a permis de trouver six protéines putatives homologues chez cette levure. Mais à partir des scores d'alignement, il n'est pas possible de déterminer quelle sera l'activité de ces protéines (car les trois PLB donnent des scores similaires pour chacune des protéines, tableau III.3.2). **Les deux séquences ayant le meilleur score d'identité ont été sélectionnées pour être testées. Elles ont été appelées Yl.PLBsc1 (YALI0E16060p, respectivement 46%, 44% et 44% d'identité avec PLB1, PLB2 et PLB3) et Yl.PLBsc2 (YALI0D08206p respectivement 37%, 36% et 38% d'identité avec PLB1, PLB2 et PLB3).**

Séquences de <i>S. cerevisiae</i>	PLB1		PLB2		PLB3	
Séquences de <i>Y. lipolytica</i>	Couverture	Identité	Couverture	Identité	Couverture	Identité
YALI0E16060p (Yl.PLBsc1)	96%	46%	82%	44%	95%	44%
YALI0D08206p (Yl.PLBsc2)	86%	37%	78%	36%	83%	38%
YALI0B01771p	83%	35%	81%	33%	83%	35%
YALI0E22462p	83%	34%	82%	32%	83%	34%
YALI0F14113p	83%	33%	78%	34%	81%	34%
YALI0F19228p	79%	39%	76%	38%	78%	39%

Tableau III.3.2 : Résultats des alignements (fait avec BLAST) des séquences protéiques de PLB1 (NP_013721), PLB2 (NP_013719) et PLB3 (NP_014632) de *S. cerevisiae* contre le génome de *Y. lipolytica*. Les PLB de *S. cerevisiae* partagent entre-elles une identité de : PLB1/PLB2 : 67% PLB1/PLB3 : 68% PLB2/PLB3 : 61%.

La lipase intracellulaire Tgl4p de *S. cerevisiae* possède plusieurs activités, dont des activités phospholipase (Rajakumari and Daum 2010). Les homologues à TGL4 ont également été recherchés dans le génome de *Y. lipolytica*, et trois séquences ont été identifiées (tableau III.3.3). Or l'homologue à TGL4 caractérisée chez *Y. lipolytica*, Yl.TGL4 (YALI0F10010p), partageant 47% d'identité (tableau III.3.3) avec celle de *S. cerevisiae* a été caractérisée uniquement sur son activité lipase (Dulermo et al. 2013) et pas pour ses activités secondaires. Il est donc possible que Yl.TGL4 ait elle aussi d'autres activités secondaires, qui peuvent être d'autant plus importantes que la souche OléoX ne produit plus de triacylglycérols, son principal substrat. Une autre séquence protéique putative homologue disponible dans le laboratoire du Docteur Jean-Marc Nicaud est elle aussi testée et elle est appelée Yl.TGL5 (YALI0D16379p).

Séquences de <i>S. cerevisiae</i>	TGL4	
Séquences de <i>Y. lipolytica</i>	Couverture	Identité
YALI0F10010p (Yl.TGL4)	53%	47%
YALI0D16379p (Yl.TGL5)	51%	30%
YALI0D17534p	47%	31%

Tableau III.3.3 : Résultats des alignements (fait avec BLAST) de la séquence protéique de TGL4 (NP_013015) de *S. cerevisiae* contre le génome de *Y. lipolytica*.

Enfin, la co-expression d'une enzyme de *Schizosaccharomyces pombe*, Sp.PLG7 avait réduit la toxicité liée à la production d'acide ricinoléique observée chez cet organisme lorsqu'elle avait été surexprimée (Yazawa et al. 2013a). Cette diminution de la toxicité était liée à la sécrétion de l'acide gras d'intérêt. Ainsi cette enzyme a également été sélectionnée pour être testée chez *Y. lipolytica*.

Ainsi, cinq enzymes de *Y. lipolytica* (NTE1, deux phospholipase PLB, et deux TGL lipase) et une enzyme de *S. pombe* (Sp.PLG7) seront testées en les co-exprimant avec CpFAH12 pour observer si la production d'acide ricinoléique est améliorée.

b. La lipase Y1.TGL5 est celle qui donne les résultats les plus encourageants

Le plasmide portant la séquence de Y1.TGL5 a été obtenu auprès d'un laboratoire partenaire (Institut Micalis), le gène synthétique Sp.PLG7 a été commandé et les quatre autres séquences codantes ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique de la souche OléoX (séquence des amorce dans tableau II.2). Après vérification des constructions par séquençage, les cassettes d'expression des lipases/phospholipase et celle de CpFAH12 ont été co-transformées dans la souche OléoX. Pour chaque transformant, l'intégration des deux gènes a été vérifiée par PCR.

Une première culture réalisée avec les anciennes conditions de cultures (pas de phase organique et en présence d'acide oléique pour la conversion) n'a pas permis d'obtenir de variations significatives de la concentration en acide ricinoléique pour les gènes testés. Seule l'expression de Y1.TGL5 permettait une production d'acide ricinoléique légèrement supérieure et ce pour tous les temps de culture (24h à 72h).

Pour confirmer cet effet, une autre culture a été réalisée dans les nouvelles conditions (phase décane). Les résultats sont affichés dans la figure III.3.5. Une augmentation de 45% de la quantité d'acide ricinoléique ainsi qu'une diminution de 25% de la quantité d'acide oléique est observée dans la souche exprimant Y1.TGL5 par rapport à ce qui a été obtenu pour la souche témoin exprimant CpFAH12 seule. Ainsi le taux de conversion passe de 62% à 75% lorsque Y1.TGL5 est co-exprimé. On notera tout de même qu'il s'agit de la même culture que celle de Y1.CPT1, et durant celle-ci la variabilité est plus importante qu'habituellement.

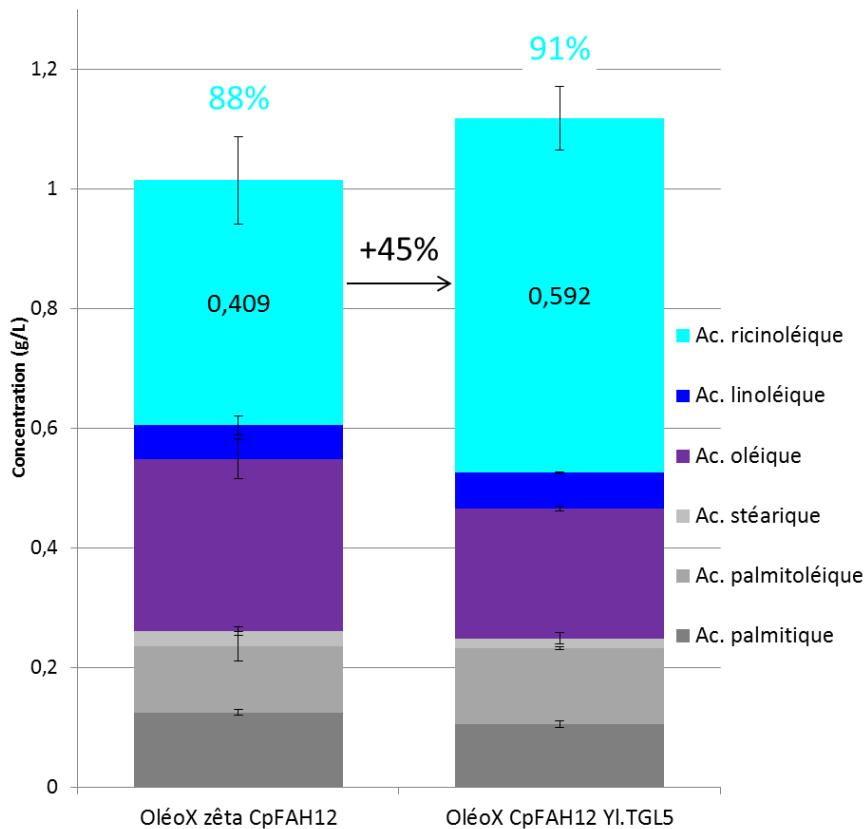


Figure III.3.5 : Concentration totale des acides gras produits par les deux souches OléoX zéta CpFAH12 et OléoX CpFAH12 YI.TGL5. Les concentrations sont mesurées après 48h de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé est 9mL de YT₂D₅, avec tampon citrate pH4 et une phase décane de 1 mL. Des duplicats sont réalisés pour les deux souches. La concentration d'acide ricinoléique en g.L⁻¹ est affichée sur le graphique en noir. Le pourcentage d'hydroxylation est indiqué en cyan.

c. Discussion et perspectives

Sur les six enzymes testées, la co-expression avec la lipase YI.TGL5 a permis d'obtenir la plus forte augmentation d'acide ricinoléique durant ces travaux de thèse. Cependant, ces résultats sont à nuancer car les résultats ne sont pas significatifs. Pour trancher et valider définitivement ces résultats, une culture avec davantage de réplicats devra être réalisée. D'autre part, la DO finale entre les souches avec et sans YI.TGL5 sont similaires. Il sera également intéressant de suivre la croissance de ces deux souches pour voir si l'augmentation de la production d'acide ricinoléique est couplée avec une amélioration des capacités de croissance de la souche et donc à une diminution de sa toxicité.

La plupart des TGL de *S. cerevisiae* (dont TGL4) sont membranaires et sont localisées spécifiquement dans les corps lipidiques (Rajakumari and Daum 2010; Dulermo et al. 2013). Rappelons que la souche OléoX ne permet pas leur formation de par l'absence d'accumulation de triacylglycérols (Beopoulos et al. 2012), mais que les corps lipidiques sont issus du réticulum

endoplasmique. Il serait donc intéressant de confirmer si Yl.TGL5 (et les autres) se relocalise dans le réticulum endoplasmique, car les désaturases membranaires comme CpFAH12 y sont localisées. Cette proximité spatiale entre les enzymes pourrait favoriser la libération de l'acide ricinoléique. L'enzyme responsable de la libération de l'acide ricinoléique est probablement une enzyme avec une activité phospholipase. Pour déterminer quelle serait cette ou ces enzyme(s), des études protéomiques et/ou transcriptomiques pourraient permettre de trouver respectivement quelles sont les protéines ou les ARNm surexprimés lorsque CpFAH12 est exprimée. Cela permettrait peut-être de trouver des cibles pertinentes plutôt que de cibler aléatoirement des gènes putatifs de (phospho)lipases.

C. Conclusion générale et perspectives

a. Variabilité et souche OléoX

Comme discuté dans la partie III.1.D, la souche OléoX donne des résultats après culture (concentration, DO...) plus variables que la souche OléoX zéta en temps normal. Au cours de l'expérience avec les gènes Yl.TGL5 et Yl.CPT1, les souches OléoX CpFAH12 Yl.TGL5/Yl.CPT1 (figure III.3.4 et .5) ont montré une variabilité similaire à ce qui est obtenu habituellement. Nous avons choisi de ne pas refaire les cultures car la variabilité des souches OléoX est un problème qui n'a pas encore été résolu. Aujourd'hui, il n'est pas vraiment possible d'utiliser OléoX zéta car le marqueur de sélection URA3 est le seul disponible. On pourrait cependant envisager des cassettes d'expression contenant un seul marqueur de sélection et plusieurs gènes. De tels outils sont en cours de développement au laboratoire et dans d'autres équipes (Celińska et al. 2017; Larroude et al. 2019).

En revanche, la souche OléoX zéta CpFAH12 témoin a montré une variabilité bien plus importante. Cette culture a été réalisée pendant la transition de la méthode de culture, donc certains points de la méthode n'étaient pas encore complètement rodés. Un point qui a été modifié par la suite est la présence de 30 g.L^{-1} d'acide oléique dans la phase décane. C'est cet excès d'acide gras qui a probablement perturbé les analyses de la phase silylée contenant l'acide ricinoléique et a induit davantage de variabilité. Nous avons abandonné cette méthode car les acides gras présents dans le décane ne sont pas assimilables par les souches.

Même en ayant une variabilité habituelle pour OléoX zéta, nous ne sommes pas sûrs que l'augmentation visible puisse être significativement démontrée sans utiliser de nombreux clones. Il nous a semblé plus pertinent de dédier mon temps à d'autres approches en attendant d'obtenir une souche moins variable que la souche OléoX.

b. Une méthode d'analyse (trop) globale pour une réalité complexe

La stratégie choisie initialement était volontairement simpliste, il s'agissait de surexprimer ou de déléter certaines enzymes impliquées dans la voie des phospholipides pour augmenter le pool de substrat ou la libération du produit. Le travail n'a pas pu être exhaustif mais s'est focalisé sur certaines enzymes.

Pour présenter ces résultats, nous avons simplifié la vision du métabolisme des phospholipides en ne présentant que les voies de biosynthèse majoritaires. Cependant la réalité est beaucoup plus complexe car il y a de nombreux échanges de groupements acyles entre les pools (figure III.3.6).

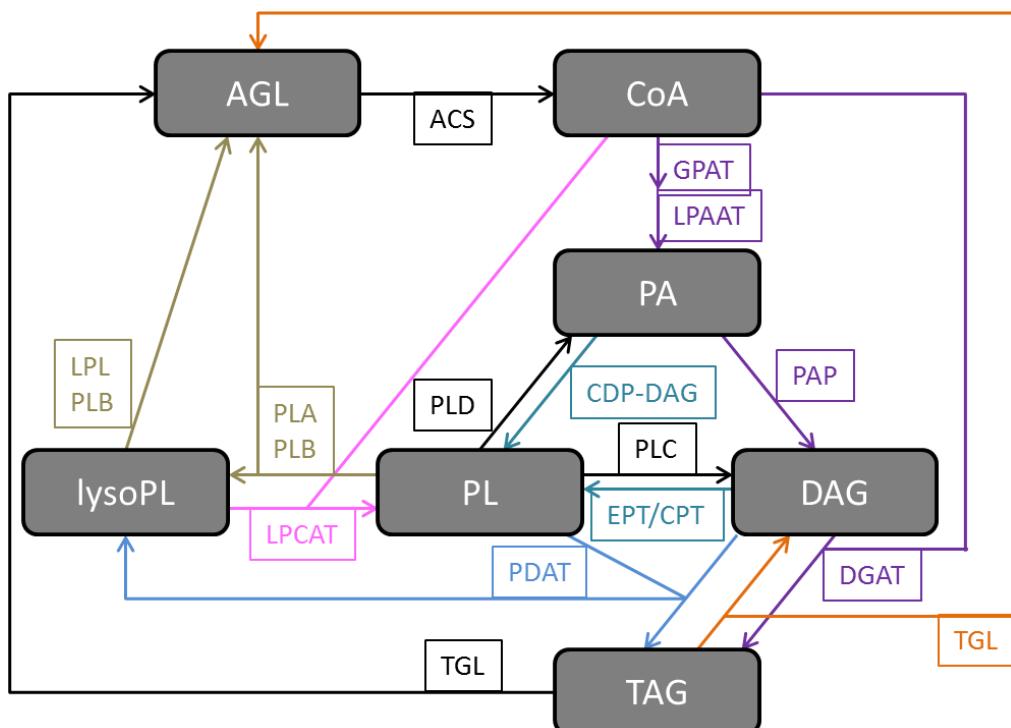


Figure III.3.6 : représentation schématique des transferts entre les différents pools d'acide gras. Les sept pools représentés (carrés gris foncés) sont AGL : acide gras libre, CoA : acyl-Coenzyme A, PA : acide phosphatidique, PL : phospholipide, Lyso-PL : lysophospholipide, DAG : diacylglycérol, TAG : triacylglycérol. Le pool des stéryl-ester n'est pas représenté. Les noms des familles d'enzymes qui réalisent les conversions sont encadrés de la même couleur que leur flèche. ACS : acyl-CoA synthase ; GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase ; LPAAT : acide lysophosphatidique acyltransférase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase ; DGAT : diacylglycérol acyltransférase ; PDAT : phospholipide:diacylglycérol acyltransférase ; TGL : triacylglycérol lipase ; EPT/CPT : éthanolamine/choline phosphotransférases ; CDP-DAG : cytidine-diphosphate-diacylglycérol synthase ; LPCAT : lysophospholipide acyltransférase ; PLA/PLB/PLC/PLD : phospholipase A/B/C/D ; LPL : lysophospholipase.

Tout au long de nos discussions, de nombreuses hypothèses ont été avancées sur la possible répartition des flux et des classes de lipides. Cependant, la méthode de transméthylation totale utilisée (même si elle a l'avantage d'être assez simple) présente un désavantage majeur, elle ne permet de quantifier que les acides gras totaux et elle ne différencie pas sur quel type de molécules ils étaient estérifiés. À l'issue de cette thèse, il semble évident qu'une vision plus fine de ces pools est nécessaire pour mieux comprendre les réorganisations qui ont lieu d'une part dans la souche châssis OléoX (pour savoir si le flux de lipides a été réorienté vers les DAG ou vers les CPD-DAG par exemple), et d'autre part dans les souches modifiées. Est-ce que l'on retrouve effectivement du sn2-ricinoléoyl-PC dans la souche exprimant CpFAH12 qui pourrait effectivement expliquer la toxicité ? Est-ce que l'amélioration observée lors de l'expression de la lipase Yl.TGL5 est due à la diminution des phospholipides portant de l'acide ricinoléique ? Tout cela permettrait d'avoir une vision plus fine de l'effet des modifications sur les pools et de cibler des modifications pertinentes. **Ainsi des études de lipidomique et de fluxomique semblent vraiment appropriées pour poursuivre ce travail.**

Ces stratégies nécessitent de connaître parfaitement les interactions entre la/les voie(s) métabolique(s) intégrée(s) et le métabolisme natif de l'hôte. Des cartes métaboliques et des outils de modélisation sont nécessaires. Aujourd'hui certaines études ont permis d'étudier le métabolisme central de cette levure via des modèles métaboliques et des études de fluxomique. Ces outils sont en cours de développement avec un essor depuis 2012 dans diverses équipes au niveau mondial (Zhao et al. 2015; Liu et al. 2016; Kerkhoven et al. 2017). Cependant aucune étude en lipidomique n'a encore été réalisée à ce jour.

Ces études de flux sont surtout utiles lorsque que des métabolites des étapes intermédiaires sont toxiques, comme l'acide ricinoléique dans notre situation. Une fois ces études de flux réalisées, la souche pourrait être optimisée finement en modulant la conversion de chaque étape pour améliorer l'efficacité de la conversion. Mais cela nécessitera d'utiliser des promoteurs qu'il est possible de finement réguler pour adapter la vitesse de conversion à celle de l'étape précédente.

De plus, nous avons ciblé une approche basée uniquement sur la surexpression ou la délétion de certains gènes, cependant l'activité d'une protéine n'est pas seulement régulée par son niveau d'expression, en effet de nombreuses modifications post-traductionnelles jouent sur le niveau d'expression.

c. La spécificité des enzymes : La clef de la réussite

Toute la question est de favoriser le pool d'oléoyl-PC et de favoriser la libération du ricinoléoyl-PC. En d'autres termes, il s'agit de favoriser le pool de PC et de favoriser l'hydrolyse du pool de PC mais de façon spécifique. Se pose ainsi la question de la spécificité des enzymes à utiliser. Ainsi pour favoriser le pool d'oléoyl-PC, des enzymes d'organismes oléagineux « classiques » pourront être utilisées. Pour favoriser la libération du ricinoléoyl-PC, il conviendra plutôt d'utiliser des enzymes d'organismes accumulant d'importantes quantités d'acide ricinoléique comme le ricin ou *Claviceps purpurea*.

Bien que la séquestration de l'acide ricinoléique dans les triacylglycérols ou dans d'autres formes estérifiées ait permis d'augmenter les capacités d'accumulation chez les plantes et dans la microalgue (cf partie biblio III.1.D.b), nous avons décidé de ne pas investiguer cette stratégie dans le cadre de ma thèse. En effet, même si l'accumulation venait à être améliorée, les triacylglycérols produits seraient intracellulaires et cela irait à l'encontre de la stratégie de sécrétion envisagée.

Cependant, le travail de Ledesma-Amaro et al. (Ledesma-Amaro et al. 2016) sur la sécrétion d'acide gras chez la levure *Y. lipolytica* ouvre de nouvelles perspectives. Les auteurs ont ainsi montré que l'expression conjointe de Y1.DGA2 et de lipases (YL.TGL4 et TGL3) permettait d'augmenter la sécrétion des acides gras d'une souche sécrétrice (Δ MEF1 Δ FAA1). Ainsi, avec une stratégie analogue nous pourrions favoriser l'accumulation spécifique d'acide ricinoléique dans les triacylglycérols et ensuite le libérer sous forme d'acide gras libre. Il serait possible de tester cette hypothèse avec des acyl-CoA:diacylglycérol acyltransférases spécifiques de l'acide ricinoléique, par exemple celle du ricin et celle de *C. purpurea* qui ont déjà fait la preuve de leur spécificité pour améliorer l'accumulation d'acide ricinoléique sous forme de triacylglycérols dans les plantes ou chez *Pichia pastoris* (Burgal et al. 2008; Mavraganis et al. 2010; Meesapyodsuk et al. 2015). Une cible préférentielle serait de tester des phospholipide:diacylglycérol acyltransférases (PDAT, appelé LRO1 chez *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*) de plantes. Cette enzyme transfère l'acide gras en position sn2 d'un phospholipide sur les diacylglycérols et permettrait de limiter la toxicité de l'acide ricinoléique produit. La PDAT de ricin pourrait être testée puisqu'elle a permis d'améliorer la production d'acides gras hydroxylés dans des plantes transgéniques (Kim et al. 2011; van Erp et al. 2011).

d. Conclusion générale

Dans ce paragraphe, nous avons testé la délétion d'un gène et la surexpression de sept autres pour tenter d'améliorer la production d'acide ricinoléique. La délétion de Y1.PAH1 pour la production globale d'acides gras et d'acides gras insaturés laisse supposer que l'augmentation du pool de substrat visée a pu être atteinte. Mais cette stratégie a donné des résultats négatifs pour l'acide ricinoléique. Si une faible augmentation a été obtenue avec la surexpression de l'enzyme Y1.CPT1, les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le gène Y1.TGL5 a été surexprimé. Ainsi, il semble que la stratégie visant à favoriser la libération du produit soit celle qui ait le mieux fonctionné.

Toutes nos conclusions vont dans le même sens : la délétion ou l'expression d'un seul gène ne permettent pas d'obtenir une souche hyperproductrice. Pour la suite, **c'est donc la combinaison de plusieurs gènes et délétions avec une analyse plus fine des pools de lipides présents dans la cellule qui permettra d'obtenir cette souche**. Pour la partie délétion, nous avons déjà initié le redesign d'une souche « propre » avec la technologie CRISPR-Cas9 et espérons ainsi avoir une souche plus robuste et plus facilement transformable. Pour ce qui est de l'expression combinée de multiples gènes, il existe de nombreux outils (Celińska et al. 2017; Larroude et al. 2019) et le groupe dont je fais partie travaille aussi sur la mise au point de nouvelles méthodologies.

Chapitre III. Résultats

Partie 4.

Les enzymes de modification
originaires de plantes
pour produire de nouveaux acides gras

Le dernier point sur lequel je me suis focalisé est l'utilisation de diverses enzymes issues de plantes pour diversifier les types d'acides gras qui peuvent être produits chez la levure *Yarrowia lipolytica*. C'est en effet chez les plantes que le plus grand nombre de désaturases membranaires avec des activités inhabituelles ont été identifiées (figure III.4.1). Ceci peut être dû au fait que leur métabolisme lipidique est particulièrement important, car les végétaux utilisent les acides gras pour de nombreuses voies métaboliques, telle celle de la synthèse d'acide jasmonique, une phytohormone dérivé de l'acide α -linolénique (acide octadéca-9c,12c,15c-triénoïque, C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$, (Stenzel et al. 2003)). Les polyacétylènes sont également largement présents chez les végétaux chez qui ils servent de composés de défense (Minto and Blacklock 2008). Ils sont synthétisés à partir de la désaturation d'acides gras en acides acétyléniques. Et parmi les plantes avec des désaturases inhabituelles, certaines sont capables d'accumuler de grandes quantités d'acides gras inhabituels sous forme de triacylglycérol dans les graines, comme le ricin (*Ricinus communis*) qui accumule plus de 80% d'acide ricinoléique (C18:1 Δ^{9c} OH¹²) dans l'huile de ses graines (Bafor et al. 1991). Ces plantes possèdent donc non seulement l'enzyme permettant la modification de l'acide gras mais également un métabolisme permettant l'accumulation de ces acides gras inhabituels.

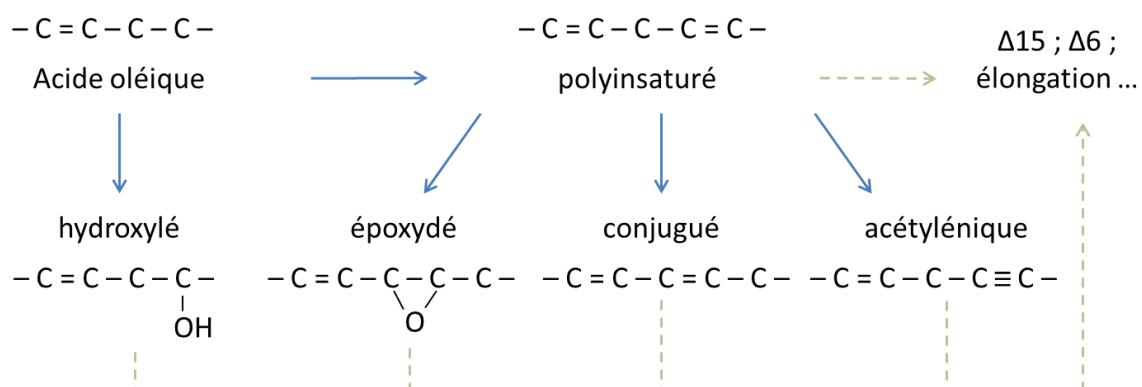


Figure III.4.1 : Récapitulatif des modifications des acides gras par des enzymes de la sous-famille des Δ^{12} -désaturases (flèches en trait continu). Les acides gras Δ^9 -mono-insaturés, comme l'acide oléique, ne sont pas synthétisés par cette sous-famille mais en sont le substrat. Les principaux produits issus de l'acide oléique sont les acides linoléique (polyinsaturé) et ricinoléique (hydroxylé). Les différents produits peuvent à leur tour subir des modifications par d'autres sous-familles de désaturases ou d'autres enzymes (flèches claires en pointillées).

L'expression de ces désaturases aux activités originales chez *Y. lipolytica* est donc intéressante pour obtenir de nouvelles activités de synthèse d'acides gras inhabituels et ainsi étoffer le catalogue des produits synthétisés par cette levure. Comme la souche châssis est déjà construite et que les Δ^{12} -désaturases membranaires sont toutes similaires dans leur fonctionnement (cofacteurs, etc.), obtenir une souche produisant un autre acide gras inhabituel à partir de l'acide oléique consistera « juste » à exprimer la désaturase inhabituelle dans la souche châssis.

A. État des lieux : les enzymes de plantes de la famille des désaturases membranaires sont peu ou pas actives chez *Yarrowia lipolytica*

a. Les Δ^{12} -désaturases et Δ^{12} -hydroxylase de *Ricinus communis* sont très peu actives chez OléoX zéta

Ricinus communis (le ricin) est une plante tropicale cultivée pour son huile riche en acide ricinoléique (Bafor et al. 1991). Cette plante contient deux Δ^{12} -désaturases apparentées, une désaturase conventionnelle appelée RcFAD2 (code d'accession : NM_001323719.1) et une hydroxylase appelée RcFAH12 (code d'accession : HG326648.1). Cette dernière a été la première hydroxylase caractérisée et elle a l'avantage d'être monofonctionnelle (Van de Loo et al. 1995; Broun and Somerville 1997), ce qui est particulièrement intéressant si on la compare à l'hydroxylase fongique CpFAH12 qui coproduit de l'acide linoléique (hydroxylase/désaturase). L'hydroxylase RcFAH12 et la désaturase RcFAD2, dont la séquence a été synthétisée pour cette expérience, ont été exprimées chez OléoX zéta sous contrôle du promoteur constitutif pTEF pour comparer leurs productions d'acide ricinoléique et linoléique avec celle de CpFAH12 ou CpFAD2.

Les résultats de la culture montrent que les enzymes de *R. communis* sont très peu actives comparées à celles de *C. purpurea* (figure III.4.2). Pour les enzymes de *C. purpurea*, les pourcentages de conversions sont de 58% et 50% pour respectivement l'hydroxylase et la désaturase alors que pour *R. communis* ils sont respectivement de seulement 1,3% et 16%. Dans nos conditions, l'acide ricinoléique représente moins de 1% des acides gras totaux. Une faible activité était attendue d'après les résultats précédemment publiés (Beopoulos et al. 2014), où seulement 7% d'acide ricinoléique dans les acides gras totaux avait été obtenu.

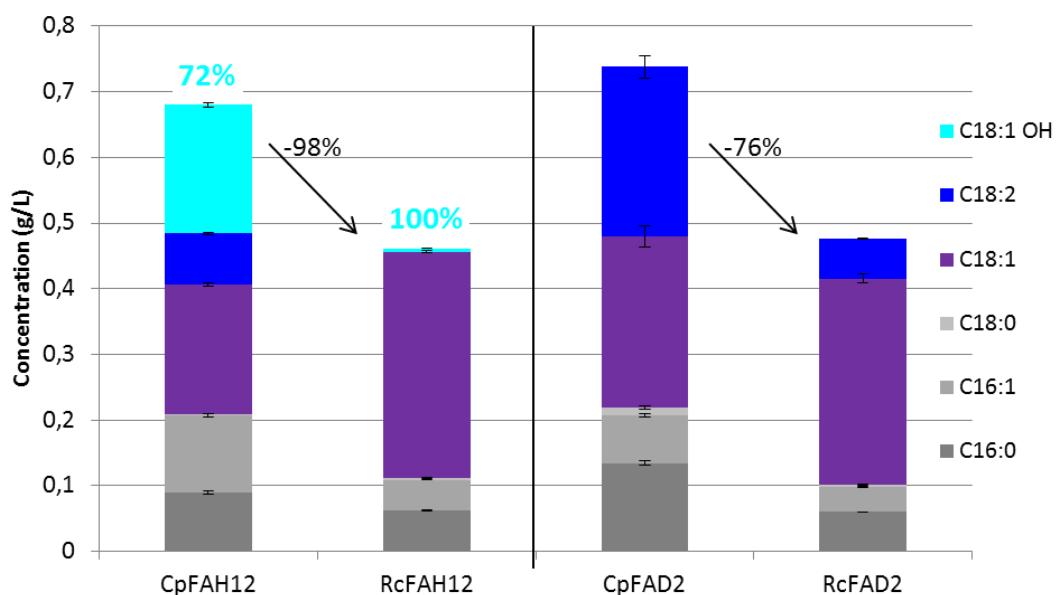


Figure III.4.2 : Concentration totale des acides gras produits par des souches OléoX zêta au cours de la culture. Les concentrations sont mesurées après 48 heures de culture à 28°C et une agitation de 140 rpm. Le milieu utilisé est le YT₂D₅, Tp.citrate et toutes les cultures ont une phase décane de 1 mL (10%). Le gène exprimé par la souche est affiché sous les colonnes. Les flèches et nombres en noir correspondent à la perte de production entre les enzymes de *R. communis* comparé à celles de *C. purpurea*. Le pourcentage d'hydroxylation est indiqué en cyan.

Alors que l'enzyme du champignon montre une bonne activité, les très faibles activités des enzymes de *R. communis* sont problématiques et cela pourrait avoir plusieurs origines. La première vérification est de confirmer si le problème vient spécifiquement de l'expression de RcFAH12 et RcFAD2 ou si le problème d'activité est plus global. Des désaturases membranaires d'autres plantes ont donc été testées pour vérifier s'il est possible d'observer une activité.

b. Des conjugases et époxydases de la sous-famille Δ¹²-désaturase originaires de diverses plantes ne présentent aucune activité dans la souche OléoX zêta

Dans le but de vérifier si la souche est capable de produire d'autres types d'acides gras originaux à partir de Δ¹²-désaturases de plantes, plusieurs enzymes aux activités diverses et d'organismes différents ont été exprimées. Nous avons sélectionné quatre conjugases issues des plantes *Calendula officinalis* (CoFADX12, accession : Q9FPP8.1, (Qiu et al. 2001)), *Impatiens balsamina* (IbFADX12, accession : Q9SP62.1, (Cahoon et al. 1999)), *Momordica charantia* (MoFADX12, accession : Q9SP61.1, (Cahoon et al. 1999)) et *Vernicia fordii* (VfFADX12, accession : Q8GZC2.1, (Dyer et al. 2002)) et trois époxydases issues des plantes *Crepis palaestina* (CpFAE12, accession : CAA76156.1, (Singh et al. 2001)), *Stokesia laevis* (SIFAE12, accession : AAR23815.1, (Kaprakkaden et al. 2017)) et *Vernonia galamensis* (VgFAE12, brevet WO1998056922A1).

Ces enzymes agissent sur l'acide linoléique estérifié en position sn2 de la phosphatidylcholine. Les produits principaux formés pour les conjugases sont les acides α-éléostéarique (C18:3 Δ^{9c,11t,13t}), et l'acide calendique (C18:3 Δ^{8t,10t,12c}). Les époxydases donnent quant à elles principalement de l'acide vernolique (C18:1 Δ^{9c} Epox¹²).

Les séquences protéiques des désaturases, hydroxylases, conjugases et époxydases utilisées sont alignées et présentées dans la figure III.4.3. Les histidines-box, indispensables pour avoir une activité, s'alignent correctement entre les différentes enzymes. Mais il y a assez peu d'identité entre les séquences et la principale différence est la longueur des protéines. Il y a environ entre 77 et 103 acides aminés de différence entre les séquences de *C. purpurea* et celles des plantes. Cette différence est principalement localisée au niveau des parties terminales et au cœur de la protéine correspondant aux acides aminés 264-280 de CpFAH12.

Partie cytosolique N-term		
Y1FAD2	1 -----MDSTTQNTGTGVAVQPP-----TAFIKPIEK	28
CpFAD2	1 --MAAATSAMPKNSVLRRTAASTNANDYESSAAVSPADSPRPSASSTSLS	49
CpFAH12	1 --MASATPAMSENAVLRHKAASSTGIDYESSAAVSPAESPRTSASSTSLS	49
RcFAH12	1 --MGGGGRMST-----VITSNNSEK-----	18
RcFAD2	1 --MGAGGRMSV-----PPPSKKV-----	16
VfFADX12	1 --MGAGGRMSV-----APNNSKCEK-----	18
McFADX12	1 --MGGRGAIGV-----LRNGGPKK-----	18
IbFADX12	1 --MGEVGPTNR-----TKTKLKD-----	16
CoFADX12	1 --MGKG-----ASNK-----	8
CpaFAE12	1 --MGAGGRGR-----TSEKS-----	13
S1FAE12	1 --MSDSYDDR-----MKDHD-----	13
VgFAE12	1 MMMSDSCDDHD-----QLVKDDHN-----	19
consensus	1	51
Partie cytosolique N-term		
Y1FAD2	29 V---SEP-----VYDTFGNEFTPDPYSIKDILDAIPQECYKRSY	64
CpFAD2	50 LSSLDANDKKDEYAG---LLDTYGNAFTPDPDFIKDIRDAIPKHCYERSA	96
CpFAH12	50 LSSLDANEKKDEYAG---LLDTYGNAFTPDPDFSIKDIRAAIPKHCYERST	96
RcFAH12	19 -----KGG---SSHAKRAPHTKPPFTLGLDKRAIPPHCFERSF	53
RcFAD2	17 -----E---SDDLKRAPSSKPPFTLQGIKKAIIPPHCFKRSI	49
VfFADX12	19 -----K-E---SRSVKRVPHTKPPFTLQLQKQAIIPSHCFKRSL	52
McFADX12	19 -----KMGPQGLGPGERITHARPPFSISQIKKAIIPPHCFQRSL	57
IbFADX12	17 -----Q---QESENRPVHEPPPFTLSDLKKAIPPHCFERSL	49
CoFADX12	9 -----KVLERVPITKPPFEYNDLKKAVPPHCFSRPL	39
CpaFAE12	14 -----VMERVSVDPTFSISELKQAIIPPHCFQRSV	43
S1FAE12	14 -----MDERAPIDPAPFSLSDLKKAIPAHCFRRSA	43
VgFAE12	20 -----INERAPVDAAPFSLSDLKKAIPPHCFQRSA	49
consensus	52 : :: *: * .*: * .	102
Domaine Transmembranaire n°1		
Y1FAD2	65 VKSYSYVARDcffIAVFAYMAYALP--LIPSASGRAVAMYSIVQGLFG	113
CpFAD2	97 LKGYGYILRDIACLSTTFYLFH NFVTPENVPST PLRFALWGIYTTLQGLFG	147
CpFAH12	97 IKSYAYVLRDLLCILSTTFYLFHNF VTPENIPS NPILRFVILWSIYTTLQGLFA	147
RcFAH12	54 VRSF SYVAYDVCLSFLFYSIAT NFFP--YISSP-LSY VAWL VVWL FQGCIL	101
RcFAD2	50 PRSF SYVYDLTIAFLFYVYAT NYFH--LLPEP-LSY VAWPIY WALQGCVL	97
VfFADX12	53 LRSFSYVYDLSLSFIFYSIATTYFH--LLPSP-ITYIAWPVYWAFQGCIL	100
McFADX12	58 RRSFSYLLSDIALVSAYVYVADTYFH--RLPHPLLHYLAWPVYWFCQGAVL	106
IbFADX12	50 VKSFYHVIHDIIILSFFYYVAANYIP--MLPQN-LRYVAWPIYWAIQGCVQ	97
CoFADX12	40 FRSFYFLLHDIIVTCILFYVASNYIP--MLPGF-LSYIVWPVYWISQGVFL	87
CpaFAE12	44 IRSSYYVVQDLIIAYIFYFLANTYIP--TLPTS-LAYLAWPVYWFCQASVL	91
S1FAE12	44 VWSSCYVVQDLIITFLLYTVANTYIP--HLPPP-LVYLAWPVYWFCQSCIL	91
VgFAE12	50 IRSSCYVVQDLIITFLLYTLANSYIP--LLPPP-LPYLAWPVYWFCQSSIL	97
consensus	103 . .: * : : .. : . * : * * . .	153
Partie cytosolique centrale		
Y1FAD2	114 TGLWVIA HECGH SAFSDSNTVNNVTGWLHSSMLVPYYAWKLT HSMHH KST	164
CpFAD2	148 TGLWVIA HECGH GAFSPSTLINDVTGWLHSALLVPYFSWKFS HSAHH KAT	198
CpFAH12	148 TGLWVIG HECGH CAFSPSPFISDLTGVVIHSALLVPYFSWKFS HSAHH KGI	198
RcFAH12	102 TGLWVIG HECGH HAFSEYQLADDIVGLIVHSALLVPYFSWKYS HRRHH SNI	152
RcFAD2	98 TGVWVIA HECGH HAFSDYQLLDDVVGLILHSCLLVPYFSWKHS HRRHH SNT	148
VfFADX12	101 TSVWVLG HECGH HAFSEYNWLDDTIGLILHSSLLVPYFSFKIS HRRHH SNI	151
McFADX12	107 TGMWGLIA HDCGH HAFSDYQLVDDVVGLIHLSSLVFPYFSFKIS HRRHH SNT	157
IbFADX12	98 LGILVLG HECGH HAFSDYQWVDDMVGFLVHSSQLIIPYFSWKHS HRRHH SNT	148
CoFADX12	88 GRLWMIG HECGH HSFSNYRWVDDSVGFLIHTATLTPYFSFKYS HRNHH HAHT	138
CpaFAE12	92 TGLWILG HECGH HAFSNYTFDDTVGFLIHSFLLTPYFSWKFS HRNHH SNT	142
S1FAE12	92 TGLWVLG HECGH HAFSEYQWIDNAVGFLVHSALLTPYFSWKYS HRKHH ANT	142
VgFAE12	98 TGLWVIG HECGH HAYSEYQWVDNTVGFILHSFLLTPYFSWKYS HRKHH ANT	148
consensus	154 : .: *: ** : : * .: * : : * : * : * **	204

Partie cytosolique centrale

Y1FAD2	165	GHLTRDMVFPVKDRKEFMENRGAH--DWSELAEDAPLMLTLYGLITQQVFGW	213
CpFAD2	199	GHMERDMVFLPRTREQQATRLGRAVEELGDLCEETPIYTALHLVGQQLIGW	249
CpFAH12	199	GNMERDMVFLPRTREQQATRLGRAVEELGDLCEETPIYTALHLVGKQLIGW	249
RcFAH12	153	GSLERDEVFVPKS KS-KISWY-----SKYLNN-PPGRVLTAA TLLL GW	194
RcFAD2	149	GSLERDEVFVPKK KS-SIRWY-----SKYLNN-PPGRIMTIAVTL TL GW	190
VffFADX12	152	ASLERDEVFVPRL KS-AIPWY-----SKYLNN-PPGRALTLVATL FIGW	193
McFADX12	158	SSVDRDEVFVPKPKA-KMPWY-----FKYLTN-PPARVFII FIFTL TL GW	199
IbFADX12	149	ASIERDEVYPPAYKN-DLPWF-----AKYLRN-PVGRFLMIFGALLFGW	190
CoFADX12	139	NSMEYDEVHIPKR KS-EALDL---Y--FEFLGNNPMLIMITMLCKLTFGY	182
CpaFAE12	143	SSIDNDEVYIPKS KS-KLAR-----I--YKLLNN-PPGRLLVLIIIMFTL GF	184
SlFAE12	143	NSLENEEVYIPRTQS-QLRTY---ST--YEFLDN-TPGRILILVIML TL GF	186
VgFAE12	149	NSLENEEVYIPKA KS-QLRNY---SN--FKFLDN-TPGRIFILLIML TL GF	192
consensus	205	: : * : * : . : . : . : * : .	255

Partie cytosolique centrale

Y1FAD2	214	PLYLLSNTGQKYPKLNK-----	WAVNFNPNAPLFEEKKDWFNI	252	
CpFAD2	250	PSYLMANVTGHNFHERQREGRKGKKNFGGSVNVHDFPRSPIFE	ARHAKYI	300	
CpFAH12	250	PSYLMNTATGHNFHERQREGRKGKKNFGGGVNVHDFPRSPIFE	RAOKYI	300	
RcFAH12	195	PLYLAFNVSGR PYD-----	R--FACHYDPYGPIFSERER	<u>LOT</u>	229
RcFAD2	191	PLYLAFNVSGR PYD-----	R--FACHYDPYGPYIYNDRER	<u>TEI</u>	225
VffFADX12	194	PLYLAFNVSGR YYD-----	R--FACHYDPYSPYIYSDRERLQI		228
McFADX12	200	PMYLTTFNISGRYYG-----	R--FTSHFDPNSPIFSPKERVLV		234
IbFADX12	191	PSYLLFNANGR LYD-----	R--FASHYDPQSPIFNNRERLQV		225
CoFADX12	183	AAYIMFNYTGKKHK-----	SGGLASHFYPPQSPLFNDSERNHV		219
CpaFAE12	185	PLYLLTNTISGKKYD-----	R--FANHFDPMSPIFKERERFQV		219
S1FAE12	187	PLYLLTNVSGKKYD-----	R--FTNHFDPLSPIFTERERIqv		221
VgFAE12	193	PLYLLTNTISGKKYQ-----	R--FANHFDPMSPIFSE	ERERIqv	227
consensus	256	. *: * . *: .	. *: * . *: .		306

Domaine Transmembranaire n°2

Partie cytosolique C-term

Partie cytosolique C-term					
Y1FAD2	354	FYNARIA TEKIKKVMGKHYRHDDTN	---	FIKS LYTVARTCQFVEG	-----
CpFAD2	402	FYNA DEASEA IKPVMGKHYR	SETKDG	PVG FIRALWKTARWCQWVEPSAE	-----
CpFAH12	402	FYNA DEASEA IKPIMGKHYR	SDTAHGPVGFLHALWKTARWCQWVEPSAD	-----	450
RcFAH12	330	HYHAMEATKA	IKPIMGEYYRYD	---G-TPFYKALWREAKECLFVEPDE	-----
RcFAD2	326	HYHAMEATKA	IKPILGEYYQFD	---G-TSFYKAMWREAKECIYVEKDD	-----
VfFADX12	329	HYHGVEATRAIKPILGDYYLFD	---D-TPIHVALWREAKECLFVEPDE	-----	372
McFADX12	336	HYNGKEATVAAKRILGEYYQFD	---G-TPIWKA	AWREFREC VYVEPDED	DG
IbFADX12	326	HYRAKEATEVIKPILG	DYYKFD	---D-TPFLKALW	KDMGKCIYVESDVP
CoFADX12	317	EYHAQEATEA IKPILGQYYKYD	---G-TPFLKALW	REM KDCIYVESDQG	-----
CpaFAE12	320	HYHAKEARDA IKPILGDFY	MID	---R-TPILKAMW	REGRECMYIEPDS
SlFAE12	322	HYHAKEASEA IKPILGDY	YRMID	---R-TPFFKAMW	REAKECIYIEQDAD
VgFAE12	328	HYHAKEASDA IKPVLGEY	YRMID	---R-TPFYKAMW	REAKECIYIEPDED
consensus	409	*	..	*	..
		:	..	:	..
		:	..	:	..
		*	..	*	..
		:	..	:	..
					459
Partie cytosolique C-term					
Y1FAD2	396	-----KEGIQMFRNVNGVG	VAPDGLPSKK	-----	419
CpFAD2	451	--AEGAGKGVLFFRN	RNLGTPISMK	--N	476
CpFAH12	451	--AQGAGKG	IILFYRN	RNLGTPISMKT	-Q
RcFAH12	374	--GAPTQGVFWYRNK	-----	-----Y	387
RcFAD2	370	--AEQNGGVFWYNNK	-----	-----F	383
VfFADX12	373	--GDNNNGGVFWYSNK	-----	-----F	386
McFADX12	383	ATSGSSSKGVFWYHNK	-----	-----L	399
IbFADX12	371	--GKNKGVYWYNND	-----	-----I	383
CoFADX12	362	--QKKQGIYWFKNK	-----	-----I	374
CpaFAE12	364	--KLKGVYWYHK	-----	-----L	374
SlFAE12	367	--SKHKGTWYHK	-----	-----M	378
VgFAE12	373	--KKHKGVYWYHK	-----	-----M	384
consensus	460	*	..	:	489

Figure III.4.3 : Alignement entre les diverses Δ^{12} -désaturases exprimées chez OléoX zéta. Les histidines-box sont encadrées et écrites en rouge et les zones transmembranaires prédites de CpFAH12, CpFAD2, RcFAH12 et RcFAD2 sont indiquées en souligné italique gras (Robin et al. 2019). FAD2 : désaturase ; FAH12 : hydroxylase ; FADX12 : conjugase ; FAE12 : époxydase. Y1 : *Yarrowia lipolytica* ; Cp : *Claviceps purpurea* ; Rc : *Ricinus communis* .Vf : *Vernicia fordii* ; Mc : *Momordica charantia* ; Ib : *Impatiens balsamina* ; Co : *Camelina sativa* ; Cpa : *Crepis palaestina* ; Sl : *Stokesia laevis* ; Vg : *Vernonia galamensis*.

Les séquences avec le biais de codon optimisé pour *Y. lipolytica* ont été commandées puis exprimées dans la souche OléoX zéta. Comme cette souche ne peut pas produire d'acide linoléique, ce dernier a été directement apporté au milieu pour réaliser la conversion. Dans ce cadre, l'utilisation d'une phase décane n'est pas appropriée car elle séquestrerait l'acide linoléique et le rendrait indisponible à l'assimilation. L'analyse après transméthylation du milieu de culture total lyophilisé est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et permettra de déterminer si de nouveaux acides gras sont produits.

L'analyse des acides gras après 48 heures de culture ne montre aucun nouveau pic sur les chromatogrammes, donc il est probable que ces enzymes soient très peu actives (en dessous du seuil de détection) ou totalement inactives chez *Y. lipolytica*. Nous supposons que le problème d'activité des enzymes de la famille des désaturases de plantes soit global et lié à l'expression de ces enzymes dans un hôte hétérologue (levures). Comme la majeure partie des activités inhabituelles ne sont trouvées que chez les plantes, il serait intéressant de déterminer à quel niveau s'effectue la limitation.

c. Exploration des hypothèses expliquant la non-activité des désaturases membranaires de plantes

Le problème d'inactivité des désaturases de plantes est présent chez *Y. lipolytica*, mais il est aussi visible pour les autres levures. Les tableaux III.4.1 et III.4.2 récapitulent les publications scientifiques montrant l'expression des Δ^{12} -désaturases ou des Δ^9 -désaturases avec des activités inhabituelles issues de plantes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il est possible de remarquer que les quantités produites sont souvent très faibles, de l'ordre du pourcent, sauf à quelques exceptions pour les Δ^{12} -désaturases conventionnelles (*A. thaliana*, *T. kirilowii*, *H. brasiliensis*, *S. acuminatum*, *E. cupressiformis*, *S. sebiferum*). L'unique désaturase inhabituelle ayant permis une accumulation significative d'acide gras est l'hydroxylase de *Lesquerella fendleri* (> 10%), toutes les autres ont montré une très faible activité malgré l'apport, parfois conséquent, de substrat. Il est aussi intéressant de noter que la grande majorité des désaturases testées ont au moins une activité parallèle par rapport à leur activité supposée principale, en particulier lorsque leur substrat préférentiel est absent.

Malgré les limitations observées, *S. cerevisiae* est souvent utilisée pour la caractérisation des désaturases car sa composition en acide gras est simple (principalement C18 et C16 mono-insaturés et saturés), puisqu'elle ne possède qu'une seule désaturase membranaire, la Δ^9 -désaturase Ole1 (Stukey et al. 1990).

Désaturase	Substrat de conversion	Produit	% conversion (wt/wt)	Référence
Tung FAD2 <i>Vernicia fordii</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	5,1%	(Dyer et al. 2002)
CtFAD2-1 <i>Carthamus tinctorius</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	2,8%	(Cao et al. 2013)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,3%	
	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,1%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,6%	
	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	5,5%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,2%	
CtFAD2-11	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,3%	
		C18:2 $\Delta^{9c,12t}$	0,5%	
LuFad2 <i>Linum usitatissimum</i>	C18:1 Δ^{9c}	endogène exogène	2,3%	(Khadake et al. 2009)
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$		0,52%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	0,67%	
LuFAD2-2	C18:1 Δ^{9c}	endogène exogène	1,4%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$		0,44%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	0,17%	
FAD2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	26,1%	(Broadwater et al. 2002)
	C16:1 Δ^{9c}	C18:1 $\Delta^{9c} OH^{12}$	0,16%	
	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	1%	
TkFad2 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	~19%	(Iwabuchi et al. 2003)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	Plus faible	
PgFad2 <i>Punica granatum</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	Data not shown	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	Data not shown	
PuFAD12 <i>Punica granatum</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	5%	(Hornung et al. 2002)
DsFAD2-1 <i>Dimorphotheca sinuata</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12t}$	3,1%	(Cahoon and Kinney 2004)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	<0,2%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12t}$	1,4%	
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	<0,1%	
OepFAD2-1 <i>Olea europaea</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	2,6%	(Hernández et al. 2005)
OepFAD2-2	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,5%	
desat1 <i>Hevea brasiliensis</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	11,06%	(Cipak et al. 2006)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	6,79%	
HbFAH2-1 <i>Hiptage benghalensis</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,7%	(Zhou et al. 2013)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,1%	
HbFAH2-2	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,7%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,2%	
HbFAH2-3	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,4%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,1%	

SaFAD2 <i>Santalum acuminatum</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	63,3%	(Okada et al. 2013)
	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,12t}$	35%	
		C18:2 $\Delta^{9a,11t}$	1,3%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	26,7%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	0,2%	
SaFADX	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,13c}$	18,7%	
EcFAD2-1A <i>Exocarpos cupressiformis</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	23%	
	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,12t}$	4,8%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	4,1%	
EcFAD2-2A	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	34%	
	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,12t}$	18%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	10%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	Traces	
EcFAD2-1B	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,13c}$	0,7%	
EcFAD2-2	C18:1 Δ^{9a}	C18:2 $\Delta^{9a,13c}$	0,8%	
FAD2 <i>Tropaeolum majus</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	4%	(Mietkiewska et al. 2006)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,2%	
Ssd12 <i>Sapium sebiferum</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	22%	(Niu et al. 2007)
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	10%	

Tableau III.4.1 : Gènes de désaturases conventionnelles de plante exprimés chez *S. cerevisiae*. Cette levure ne contient que des mono-insaturés C18 et C16, les autres acides gras utilisés sont donc exogènes (sinon cela est indiqué dans le tableau). Les noms des codes d'acides gras donnés dans ce tableau sont :

Ac. palmitoléique : C16:1 Δ^{9c} Ac. oléique : C18:1 Δ^{9c} Ac. stéarolique C18:1 Δ^{9a}
 Ac. linoléique : C18:2 $\Delta^{9c,12c}$ Ac. α -linolénique : C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$
 Ac. ricinoléique : C18:1 Δ^{9c} OH¹² Acide ximénynique : C18:2 $\Delta^{9a,11t}$

Hydroxylases	Substrat de conversion	Produit	% conversion (wt/wt)	Référence
<i>Ricinus communis</i> hydroxylase	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	0,8%	(Smith et al. 2003)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,2%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,6%	
		C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	Traces	
RcFAH12 <i>Ricinus communis</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	4,1%	(Zhou et al. 2013)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,6%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	2,9%	
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,2%	
<i>Lesquerella fendleri</i> hydroxylase	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	1,6%	(Smith et al. 2003)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,4%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	2,2%	
		C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	Traces	
LFAH12 <i>Lesquerella fendlerii</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	~1,5%	(Broun et al. 1998)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	~0,7%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	~0,7%	
LFAH <i>Lesquerella fendleri</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	18,2%	(Broadwater et al. 2002)
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	6,7%	
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	1%	

LfFAH12 <i>Lesquerella fendleri</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	1,1%	(Zhou et al. 2013)	
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,3%		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	0,2%		
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,2%		
LlinFAH12 <i>Lesquerella linhemeris</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	Majoritaire	(Dauk et al. 2007) Pas de quantification	
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	Faible		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	Faible		
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	Faible		
HbFAH12-1 <i>Hiptage Benghalensis</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	3,9%	(Zhou et al. 2013)	
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,1%		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	1,7%		
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,3%		
HbFAH12-2	C18:1 Δ^{9c}	C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	4,5%	(Zhou et al. 2013)	
		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,7%		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:1 Δ^{9c} OH ¹²	2,9%		
		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,2%		
Conjugases Époxydases	Substrat de conversion	Produit	% conversion (wt/wt)	Référence	
DsFAD2-2 <i>Dimorphotheca sinuata</i>	C18:2 $\Delta^{9c,12t}$ co-expression DsFAD2-1	C18:2 $\Delta^{10t,12t}$ OH ⁹	~0,5%	(Cahoon and Kinney 2004)	
	C16:2 $\Delta^{9c,12t}$ co-expression DsFAD2-1	C16:2 $\Delta^{10t,12t}$ OH ⁹	Traces		
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$ co-expression <i>E. lagascae</i> FAD2	C18:2 $\Delta^{10t,12c}$ OH ⁹	<0,05%		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	10%		
ImpFadX <i>Impatiens balsamina</i> (IbFADX12)	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,11t,13t}$	0,6%	(Cahoon et al. 1999)	
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	C18:4 $\Delta^{9c,11t,13t,15c}$	0,9%		
MomoFadX <i>Momordica charanica</i> (McFADX12)	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	Pas d'activité chez <i>S. cerevisiae</i> Activité dans embryons de <i>Glycine max</i> (soja)			
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$				
CoFac2 <i>Calendula officinalis</i> (CoFADX12)	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{8t,10t}$	0,29%	(Qiu et al. 2001)	
	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{8t,10t}$	0,09%		
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{8t,10t,12c}$	0,56%		
CoFADX-1 <i>Calendula officinalis</i> (CoFADX12)	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{8t,10t,12c}$	4,1%	(Cahoon et al. 2001)	
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	C18:4 $\Delta^{8t,10t,12c,15c}$	1,6%		
CoDes8.11 <i>Calendula officinalis</i>	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{8t,10t,12c}$	Pas de quantification	(Fritsche et al. 1999)	
Tung FADX <i>Vernicia fordii</i> (VfFADX12)	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12t}$	1,3%	(Dyer et al. 2002)	
	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12t}$	2,3%		
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$ co-expression Tung FAD2	exogène C18:3 $\Delta^{9c,11t,13t}$	2,1%		
			0,3%		
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	C18:4 $\Delta^{9c,11t,13t,15c}$	2,3%		
	C18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$	C18:4 $\Delta^{6c,9c,11t,13t}$	0,64%		
PuFADX <i>Punica granatum</i>	C18:1 Δ^{9c}	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	1,2%	(Hornung et al. 2002)	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	1,6%		
	C18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$	C18:4 conjugué	0,5%		
	C16:1 Δ^{9c}	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	N.D.		

PgFac <i>Punica granatum</i>	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	exogène expression PgFac seul	C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	0,8%	(Iwabuchi et al. 2003)
	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$		C16:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	Traces	
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$		C18:4 conjugué	Traces	
	C18:1 Δ^{9c}		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	~0,2%	
	C16:1 Δ^{9c}		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	~1%	
	C16:1 Δ^{9c}		C16:2 $\Delta^{9c,12t}$	1,4%	
	C16:1 Δ^{9c}		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	<0,1%	
TkFac <i>Trichosanthes kirilowii</i>	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	exogène expression TkFac seul	C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	0,1%	
	C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	Expression TkFac seul	C16:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	Traces	
	C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$		C18:4 conjugué	Traces	
	C18:1 Δ^{9c}		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	~0,1%	
	C16:1 Δ^{9c}		C16:2 $\Delta^{9c,12c}$	~0,2%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$		C18:2 $\Delta^{9c,12a}$	0,3%	
Crep1 <i>Crepis alpina</i>	C18:1 Δ^{9c}		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,4%	(Lee et al. 1998)
	C16:1 Δ^{9c}		C16:2 $\Delta^{9c,12t}$	0,11%	
Crep1 <i>Crepis alpina</i>	C18:1 Δ^{9c}		C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	0,06%	(Gagné et al. 2009)
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$		C18:2 $\Delta^{9c,12t}$	0,03%	
	C18:2 $\Delta^{9c,12c}$		C18:2 $\Delta^{9c,12a}$	0,2%	

Tableau III.4.2 : Gènes de désaturases inhabituelles de plantes exprimés chez *S. cerevisiae*. Cette levure ne contient que des mono-insaturés C18 et C16, les autres acides gras utilisés sont donc exogènes (sinon cela est indiqué dans le tableau). Les noms des enzymes sont ceux utilisés dans l'article de référence et les noms des codes d'acides gras donnés dans ce tableau sont :

Ac. palmitoléique : C16:1 Δ^{9c}	Ac. oléique : C18:1 Δ^{9c}
Ac. linoléique : C18:2 $\Delta^{9c,12c}$	Ac. crépénynique C18:2 $\Delta^{9c,12a}$
Ac. α -linolénique : C18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	Ac. γ -linolénique C18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$
Ac. punique C18:3 $\Delta^{9c,11t,13c}$	Ac. α -éléostéarique C18:3 $\Delta^{9c,11t,13t}$
Ac. calendique C18:3 $\Delta^{8t,10t,12c}$	Ac. α -parinarique C18:4 $\Delta^{9c,11t,13t,15c}$
Ac. ricinoléique : C18:1 Δ^{9c} OH ¹²	Ac. dimorphécolique C18:2 $\Delta^{10t,12t}$ OH ⁹

L'absence ou la très faible activité peut provenir de plusieurs facteurs, et trois hypothèses nous semblant pertinentes ont été envisagées :

- **Des problèmes de glycosylation.** Pour toute production de protéine hétérologue, la glycosylation est un facteur courant de perte d'activité (mauvais repliement, instabilité...). Les plantes ont une N-glycosylation assez complexe (core sur lequel des résidus N-acétylglucosamine, xylose et/ou fucose sont liés) et leurs O-glycosylations sont généralement formées de un à quatre arabinoses ou d'un galactose (Strasser 2016). *Y. lipolytica* comme la plupart des levures fait de l'hypermannosylation (Park et al. 2011; De Pourcq et al. 2012). On peut imaginer que si cette hypermannosylation a lieu, des problèmes d'interactions puissent avoir lieu avec les partenaires rédox de la chaîne de transport des électrons. Les sites de N-glycosylation sont similaires chez tous les organismes et correspondent à des glycosylations sur les asparagines contenues dans les motifs NxS et NxT dans les séquences protéiques. Ainsi, il est possible de les prévoir, et nous avons réalisé cette analyse sur les douze séquences de protéines de plantes étudiées (tableau III.4.3). Les outils existants permettant la prédition des

sites de O-glycosylation sont spécialisés pour les protéines de mammifères et ils ne sont donc pas adaptés pour ces enzymes végétales.

Désaturase	Position	Site	Score	Désaturase	Position	Site	Score
YIFAD2	136 (Centre)	NVTG	0.6638	RcFAH12	201 (Centre)	NVSG	0.7684
YIFAD2	220 (Centre)	NVTG	0.8073	RcFAD2	197 (Centre)	NVSG	0.7633
CpFAD2	256 (Centre)	NVTG	0.7800	RcFAD2	310 (Term)	NITD	0.7107
CpFAH12	256 (Centre)	NATG	0.7193	McFADX12	156 (Centre)	NTSS	0.6673
SIFAE12	193 (Centre)	NVSG	0.6780	McFADX12	206 (Centre)	NISG	0.6942
VgFAE12	167 (Centre)	NYSN	0.6107	IbFADX12	8 (Term)	NRTK	0.8054
VgFAE12	199 (Centre)	NISG	0.6406	IbFADX12	310 (Term)	NVTD	0.7317
CpaFAE12	108 (Centre)	NYTW	0.7246	CoFADX12	189 (Centre)	NYTG	0.6546
CpaFAE12	141 (Centre)	NTSS	0.6952	CoFADX12	301 (Term)	NKTH	0.6862
CpaFAE12	191 (Centre)	NISG	0.6378	VfFADX12	12 (Term)	NNSK	0.6509
				VfFADX12	200 (Centre)	NVSG	0.7467
				VfFADX12	313 (Term)	NATD	0.6957

Tableau III.4.3 : Prédiction des sites de N-glycosylation chez les douze Δ^{12} -désaturases exprimées chez *Y. lipolytica*. Il s'agit des mêmes séquences et noms d'enzymes que celles décrite dans la figure III.4.3. La localisation dans l'un des trois domaines cytoplasmiques est indiquée par Centre ou Term, respectivement le domaine central entre TM1-2 et TM3-4 ou dans l'un des deux domaines situés aux extrémités (avant TM1-2 ou après TM3-4).

Le tableau III.4.3 montre que toutes les enzymes possèdent de un à trois sites de glycosylation supposés situés en dehors des zones transmembranaires (voir alignements figure III.4.3). Les époxydases de plantes et les enzymes de champignons ont leurs sites uniquement dans le domaine cytosolique central, alors que les autres désaturases de plantes ont aussi des sites dans les domaines cytosoliques en N-term et C-term. Aucune donnée de la littérature ne porte sur la glycosylation et ses effets chez les désaturases membranaires et il est donc difficile de conclure sur cette hypothèse. Or la plupart des enzymes de plantes sont testées et caractérisées chez *Saccharomyces cerevisiae* (tableaux III.4.1 et III.4.2), et elle aussi est connue pour faire de l'hypermannosylation. La différence de glycosylation pourrait donc impacter l'activité des enzymes de plantes, mais elle n'explique pas l'absence totale observé chez *Y. lipolytica*, comparée à *S. cerevisiae*.

-Un problème d'intégration dans les membranes. Il existe peut-être des différences entre la composition et l'épaisseur des membranes de levures et de plantes (surtout pour les enzymes chloroplastiques, mais aucune n'a été testée ici). Ceci pourrait conduire à une déstabilisation ou à un mauvais enchaînement des désaturases membranaires de plantes. Malheureusement, je n'ai pas trouvé d'article caractérisant le réticulum endoplasmique des cellules de plante. L'alignement (figure III.4.3) montre que les hélices transmembranaires des désaturases de plantes et de levures s'alignent correctement et ont une taille semblable.

-Un problème dans la chaîne de transport des électrons. Pour accomplir la réaction, il est nécessaire que la désaturase soit approvisionnée en dioxygène et en électrons (voir partie I.2.B). La chaîne membranaire de transport d'électrons est composée de deux protéines, le cytochrome b5 et la cytochrome b5 réductase, toutes deux encastrées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le cytochrome b5, qui transfère un par un les électrons à l'enzyme, est alimenté en électrons par la cytochrome b5 réductase qui oxyde le NADH. Il est envisageable que le problème provienne d'un mauvais transfert d'électrons entre la désaturase de plante et le cytochrome b5 de la levure. Malheureusement, le site de fixation du cytochrome b5 n'est pas identifié chez les désaturases, du fait de l'absence de structure tridimensionnelle jusqu'en 2015 (Bai et al. 2015; Wang et al. 2015; Zhu et al. 2015). Sur la structure de la stéaroyl-CoA désaturase de souris (Bai et al. 2015), les auteurs ont remarqué qu'un sillon formé par les parties cytosoliques pourrait être un lieu de fixation adéquat pour le cytochrome b5 (accessibilité au centre fer avec distance acceptable de 14 Å et complémentation électrostatique avec la surface du cytochrome b5). Dans notre article (Robin et al. 2019), à partir du modèle tridimensionnel réalisé, nous n'avons pas observé de complémentation électrostatique similaire. On peut noter que celle-ci n'est pas non plus présente chez la sphingolipide α -hydroxylase dont la structure a été obtenue (Zhu et al. 2015). Mais comme montré dans les alignements des désaturases (figure III.4.3), les parties cytosoliques de Y1.FAD2, CpFAH12, CpFAD2 (Fungi) ont une différence de taille avec celles des désaturases de plantes. Peut-être que cette différence pourrait expliquer une mauvaise interaction cytochrome b5-désaturase ?

Après avoir formulé ces hypothèses, des expériences sont réalisées pour essayer de les vérifier et d'améliorer l'activité de RcFAH12 chez *Y. lipolytica*.

B. Des chimères « plantes-champignons » pour comprendre et restaurer l'activité des enzymes de modification de plantes

a. Design des chimères *R. communis* / *C. purpurea*

La première stratégie employée pour restaurer l'activité et vérifier nos hypothèses a été de construire des chimères entre les hydroxylases et désaturases des deux origines. Les séquences châssis utilisées seront celles de la plante *R. communis* dans lesquelles les zones équivalentes de celles de *C. purpurea* seront transférées. L'hypothèse est que si la bonne zone de CpFAH12 est transférée, l'hydroxylase monofonctionnelle pourra récupérer son activité chez *Y. lipolytica*. Les deux enzymes du ricin, RcFAH12 et RcFAD2, partagent 73% d'identité de séquence, ce qui est dans le même ordre de grandeur qu'entre CpFAH12 et CpFAD2 (86% d'identité). Par contre, les deux désaturases et les deux hydroxylases ne partagent respectivement « que » 38% à 41% d'identité.

Pour définir les domaines à échanger, nous nous sommes basés sur des alignements entre les séquences des enzymes de plantes et de champignons et sur les prédictions de structures secondaires (avec les mêmes outils de prédition que ceux présentés dans l'article, partie III.2). Pour tester l'hypothèse du problème d'intégration dans les membranes, les zones transmembranaires (TM) de l'hydroxylase de champignon ont été échangées avec celles de l'hydroxylase de plante. Comme les zones TM sont de tailles presque identiques entre *C. purpurea* et *R. communis* (tableau III.4.4 et figure III.4.4), le problème ne vient pas forcement de la taille de cette zone mais peut-être de sa composition ou de son agencement. L'identité entre les zones TM est du même ordre de grandeur que celle pour la protéine totale (respectivement 44% contre 41%). La chimère RcFAH12 TM_CpHyd ainsi construite permettra de vérifier si la limitation vient de l'enchâssement dans la membrane du réticulum endoplasmique (figure III.4.5).

	CpFAH12 / CpFAD2	RcFAH12 / RcFAD2
TM1&2	55aa	52aa (id. 44%)
TM3&4	55aa	55aa (id. 35%)
Cytdiff	74aa	49aa (id. 16%)
C-term	92aa / 91aa	74aa (id. 40%)

Tableau III.4.4 : Taille des différentes zones échangées entre les désaturases et hydroxylases de *C. purpurea* et *R. communis*. L'identité de séquence entre les zones est indiquée entre parenthèses.

CpFAD2	1	MAAATSAMPKNSVLRRTAASTNANDYESSAAVSPADSPRPSASSTSLSLSSLDANDKDEYAGLLDTYGN AF	73
CpFAH12	1	MASATPAMSENAVLRKAASTTGIDYESSAAVSPAESPRTSASSTSLSLSSLDANEKKDEYAGLLDTYGN AF	73
RcFAH12	1	M-----GGGGRMSTVITSNNSEKKGGSSHLKRAPH-----	30
RcFAD2	1	M-----GAGGRMSVPPPSKKVE---SDDLKRAPS-----	26

CpFAD2	74	TPPDFTIKDIRDAIPKHCYERSALK	98
CpFAH12	74	TPPDFTSIKDIRAAIPKHCYERSTIK	98
RcFAH12	31	TKPPFTLGDILKRAIPPHCFERSFVR	55
RcFAD2	27	SKPPFTLQIJKAIIPPHCFKRSIPR	51

Domaine transmembranaire n°1

CpFAD2	99	GYGYILRDIACLSTTFYLFHNFTVPENVPSTPLRFALWGIYTVLQGLFGTGLWVI	153
CpFAH12	99	SYAYVLRDLCCLSTTFYLFHNFTVPENIPSNPLRFVLWSIYTVLQGLFATGLWVI	153
RcFAH12	56	SFSYVAYDVCLSFLFYSIATNFF-P--YISSPLSYVAWLWLFQGCILTGLWVI	107
RcFAD2	52	SFSYVYYDLTIAFLFYYVATNYF-H--LLPEPLSYVAWPIYWALQGCVLTGVWVI	103

CpFAD2	154	A[HECGH]GAFSPSTLINDVTGWVLHSALLVPYFSWKFS[HSAAH]KATGHMERDMVFLP	209
CpFAH12	154	G[HECGH]CAFSPSPFISDLTGFWVIHSALLVPYFSWKFS[HSAAH]KGIGNMERDMVFLP	209
RcFAH12	108	G[HECGH]HAFSEYQLADDIVGLIVHSALLVPYFSWKYS[HRRHH]SNIGSLERDEVFVP	163
RcFAD2	104	A[HECGH]HAFSDYQLLDDVVGLILHSCLLVPYFSWKHS[HRRHH]SNTGSLERDEVFVP	159

Partie Cytdiff

CpFAD2	210	RTRAQQATRLGRAVEELGDLCEETPIYTALHLVGQQLIGWPSYLMANVTGHNFHERQREGRGKGKNGFGGSVN	283
CpFAH12	210	RTREQQATRLGRAVEELGDLCEETPIYTALHLVGKQQLIGWPSYLMNTATGHNFHERQREGRGKGKNGFGGGVN	283
RcFAH12	164	KSK---SKISWYSKYLNN---PPGRVLTLAATLLLGPPLYLAFNVSGRPYDR-----FAC	212
RcFAD2	160	KKK---SSIRWYSKYLNN---PPGRIMTIATLTLGPPLYLAFNVSGRPYDR-----FAC	208

CpFAD2	284	HFDPRSPIFE A	294
CpFAH12	284	HFDPRSPIFE A	294
RcFAH12	213	HYDPYGPIFSE	223
RcFAD2	209	HYDPYGPINYD	219

Domaine transmembranaire n°2

CpFAD2	295	RHAKYIVLSDIGLGLAIAALV-YLGNRFGWANMAWVYFLPYLWVNHWLVAI[TFLQH]	349
CpFAH12	295	RQAKYIVLSDIGLGLAIAALV-YLGNRFGWANMAWVYFLPYLWVNHWLVAI[TFLQH]	349
RcFAH12	224	RERLQIYIADLGI-FATTFVLYQATMAKGLAWVMRIYGVPLIVNCFLVMI[TYLQH]	278
RcFAD2	220	RERIEIFISDAGV-LAVTFGLYQLATAKGLAWVVCVYGVPLVVNSFLVLI[TFLQH]	274

CpFAD2	350	TDPTLPHYTAEENYVRGAAATIDREMGFIGRHLH	385
CpFAH12	350	TDPTLPHYNREENWNFVRGGACTIDRDLGFIGRHLFH	385
RcFAH12	279	THPAIPRYGSSEWDWLRGAMVTVDRDYGVLNK-VFH	313
RcFAD2	275	THPALPHYDSSEWDWLRGALATVDRDYGILNK-VFH	309

C-term

CpFAD2	386	GIIET[HVLHH]YVSSIIPFYNADEASEAIKPVMGKHYRSET	424
CpFAH12	386	GIADT[HVVHH]YVSRIIPFYNADEASEAIKPIMGKHYRSDT	424
RcFAH12	314	NIADT[HVAHH]LFATVPHYHAMEATKAIKPIMGEYYRYDG	352
RcFAD2	310	NITDT[HVAHH]LFSTMPHYHAMEATKAIKPILGEYYQFDG	348

C-term

CpFAD2	425	KDGPVGIFIRALWKTARWCQWVEPSAEAEAGAGKGVLFRRNRNGLGTPISMKN-	476
CpFAH12	425	AHGPVGLHALWKTARWCQWVEPSADAQGAGKGILFYRNRNKLGTPISMKTQ	477
RcFAH12	353	----TPFYKALWREAKECLFVEPDEGAPT--QGVFWYRNKY-----	387
RcFAD2	349	----TSFYKAMWREAKECIYVEKDDAEQN--GGVFWYNNKF-----	383

Figure III.4.4 : Alignement entre les désaturases (FAD2) et hydroxylases (FAH12) de *Claviceps purpurea* (Cp) et *Ricinus communis* (Rc). Les histidines-box sont encadrées et écrites en rouge (Robin et al. 2019). Les parties échangées entre les chimères ont été indiquées en couleur au-dessus des parties concernées.

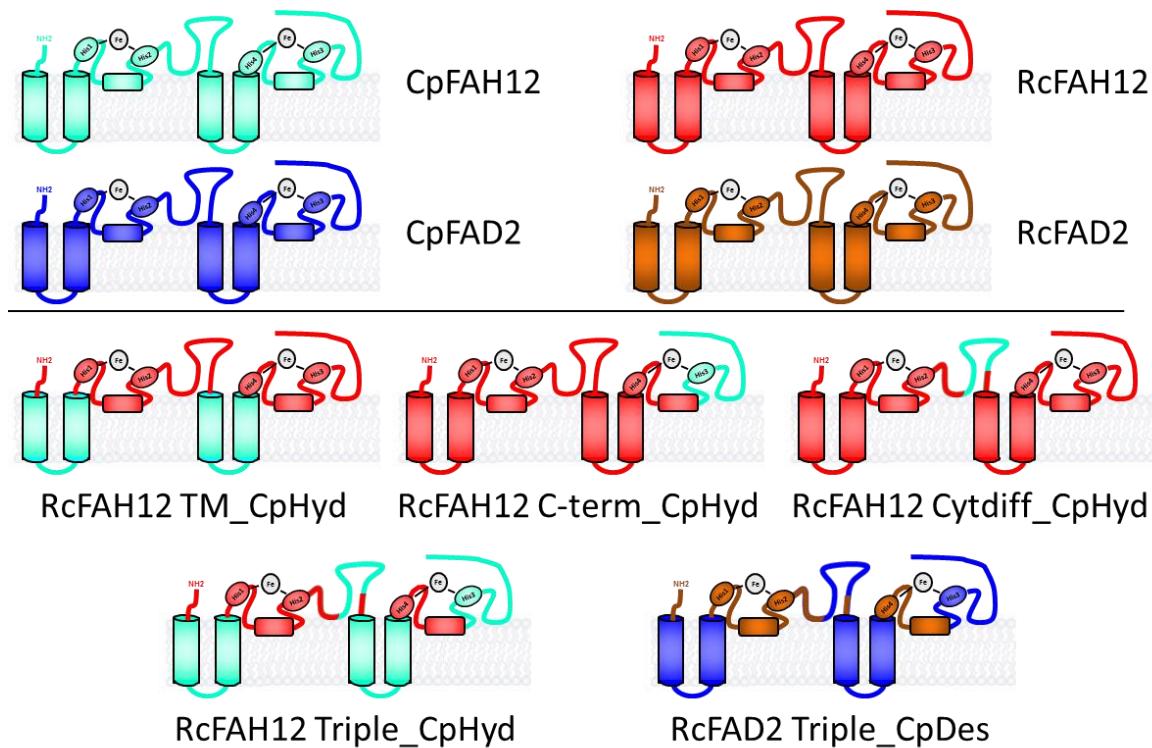


Figure III.4.5 : Représentations topologiques des hydroxylases et désaturases (haut) utilisées pour construire les cinq chimères plantes-champignons (bas). Pour faciliter la visualisation, chaque enzyme a un code couleur : CpFAH12 (cyan), RcFAH12 (rouge), CpFAD2 (bleu foncé) et RcFAD2 (orange).

Pour tester l'hypothèse du problème dans la chaîne de transport des électrons, la zone C-terminale (C-term) et une zone centrale comprise dans Cyt2 (Cytdiff) ont été ciblées car ces deux zones diffèrent beaucoup dans les alignements (tableau III.4.4 et figures III.4.4 et III.4.5). En effet, ces deux zones sont plus longues dans les enzymes de *C. purpurea* par rapport à celle de *R. communis*. Ces deux zones sont prédictes comme étant cytosoliques, elles pourraient donc être localisées à la surface de la protéine et pourraient permettre des interactions avec le cytochrome b5. La zone Cytdiff est très différente entre les enzymes de *C. purpurea* et celles de *R. communis* avec seulement 16% d'identité sur cette portion de séquence. Si une activité significative est obtenue dans les chimères, cela permettra de supposer d'identifier la zone responsable de la non-activité des enzymes de ricin chez *Y. lipolytica*, et une stratégie similaire pourrait être appliquée aux autres désaturases membranaires de plante identifiées.

Pour tester cette hypothèse, deux chimères supplémentaires ont été construites (figure III.4.5). Elles ont pour base l'hydroxylase RcFAH12 dans laquelle une seule des zones Cytdiff et C-term a été échangée avec la zone correspondante de *C. purpurea*. Ces chimères s'appelleront respectivement RcFAH12 Cytdiff_CpHyd et RcFAH12 C-term_CpHyd.

Les deux dernières chimères réalisées comprennent les trois zones des enzymes de *C. purpurea* (zones Cytdiff, C-term et TM) échangées dans le châssis des enzymes de plantes. Ces chimères ont été réalisées aussi bien pour les désaturases que pour les hydroxylases et ont donc donné RcFAH12 Triple_CpHyd et RcFAD2 Triple_CpDes. Des schémas des constructions sont représentés dans la figure III.4.5.

b. Analyse de la production de lipide des chimères plantes-champignon

Les gènes synthétiques des chimères ont été commandés avec la séquence optimisée pour le biais de codon de *Y. lipolytica*. Les souches OléoX zêta sont transformées et les cultures sont réalisées avec une phase décane. Quatre souches témoins exprimant les gènes sauvages, CpFAH12, CpFAD2, RcFAH12 ou RcFAD12, ont été réalisées en parallèle des chimères.

Concernant la production en acide gras des cultures des souches témoins, elles donnent des résultats similaires à ceux présentés dans la figure III.4.2. Pour rappel, l'hydroxylase de ricin est monofonctionnelle et elle ne produit que de l'acide ricinoléique et pas d'acide linoléique. L'expression de l'hydroxylase de ricin RcFAH12 conduit à une production d'acide ricinoléique extrêmement faible puisque l'acide ricinoléique représente seulement 1% des acides gras totaux (soit une diminution d'environ 98% par rapport à ce qui est produit par la souche exprimant CpFAH12). L'expression de la désaturase du ricin RcFAD2 quant à elle, a permis de produire de l'acide linoléique mais en proportion inférieure à ce qui est obtenu par le témoin CpFAD2 (une perte de 76% est observée).

Toutes les chimères impliquant des modifications dans les zones cytosoliques ont perdu leur activité, ainsi on ne retrouve plus aucune trace d'acide ricinoléique pour les souches exprimant les chimères RcFAH12_Cytdiff_CpHyd, RcFAH12_C-term_CpHyd et RcFAH12_Triple_CpHyd, ni de trace d'acide linoléique pour celles exprimant la chimère RcFAD2_Triple_CpDes.

Seule la souche exprimant la chimère RcFAH12_TM_CpHyd produit de faibles quantités d'acide ricinoléique (1,7% des acides gras totaux, tableau III.4.5) à un niveau comparable (mais un peu supérieur) à ce qui est produit par la souche témoin (1% des acides gras totaux).

	Ratio AR total	Ratio AL total	Pourcentage de conversion	Taux d'AR comparé à celui de CpFAH12
	<u>AR</u> AG Totaux	<u>AL</u> AG Totaux	<u>AL + AR</u> AO + AL + AR	AR(échantillon) AR (CpFAH12)
CpFAH12	29%	11%	58%	100%
RcFAH12	0,98%		1,3%	2,3%
RcFAH12 TM_CpHyd	1,7%		2,2%	3,6%

Tableau III.4.5 : Paramètres des cultures des souches OléoX zêta exprimant une hydroxylase sauvage ou une chimère fonctionnelle RcFAH12_TM_CpHyd. Les chimères inactives n'ont pas été intégrées dans ce tableau. AR : acide ricinoléique. AL ; acide linoléique. AO ; acide oléique. AG : acides gras.

L'absence d'activité des chimères indique que le changement de domaine C-term ou Cytdiff est délétère pour l'activité. Mais comme une activité est obtenue avec la chimère RcFAH12_TM_CpHyd, il semble que les deux paires d'hélices transmembranaires issues de plantes et de champignons sont librement interchangeables.

C. Conclusion générale, Discussion et perspectives

À part la désaturase et l'hydroxylase de ricin (qui montrent une faible ou très faible activité chez la levure *Y. lipolytica*), aucune des désaturases avec des activités inhabituelles issues de plantes n'a montré d'activité chez la levure *Y. lipolytica*. Comme vu précédemment, ces enzymes sont également peu actives chez la levure *S. cerevisiae*. Nous avons dans ce chapitre exploré deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : un problème d'intégration dans les membranes ou un problème dans la chaîne de transport des électrons. Pour tester ces hypothèses des chimères ont été construites entre les enzymes non fonctionnelles de plantes (ricin) et les enzymes de champignon (*C. purpurea*).

a. Les Δ^{12} -désaturases de levures et de plantes semblent avoir des parties transmembranaires compatibles

Lorsque les zones Cytdiff ou C-term sont échangées, les chimères perdent toute activité d'hydroxylation. Par contre, la chimère RcFAH12 TM_CpHyd, dans laquelle les zones transmembranaires de CpFAH12 sont échangées avec celle de RcFAH12, est la seule chimère qui a permis de conserver une activité. Cependant, elle n'a pas montré d'amélioration significative de l'activité : elle semble produire un peu plus d'acide ricinoléique que l'hydroxylase sauvage, mais comme il s'agit toujours de quantités faibles, il n'est pas possible de déterminer si l'amélioration observée est significative (test de Student = 0,62).

Néanmoins, comme l'activité est *a minima* conservée pour la chimère RcFAH12 TM_CpHyd par rapport à RcFAH12, les zones transmembranaires ne semblent pas porter de déterminants spécifiques à l'espèce chez les hydroxylases de *R. communis* et *C. purpurea*. Or comme nous l'avons montré dans l'article Robin et al, 2019 (Robin et al. 2019), les zones transmembranaires entre CpFAH12 et CpFAD2 sont interchangeables sans impact sur l'activité (et la spécificité). D'autres travaux sur la régiospécificité des désaturases membranaires (issus d'un même organisme mais avec des spécificités différentes), se basant sur la même stratégie d'échange de domaines, montrent également que chez les désaturases de *Caenorhabditis elegans* et d'*Aspergillus nidulans* les zones membranaires ne sont pas impliquées dans la spécificité (Sasata et al. 2004; Hoffmann et al. 2007). Nos travaux vont plus loin et montrent que ces domaines des Δ^{12} -désaturases sont interchangeables entre espèces sans modifier l'activité de l'enzyme.

b. La chaîne membranaire de transport d'électrons

Si c'est bien un problème de partenaire rédox qui explique l'inactivité de RcFAH12, alors plutôt que de l'adapter au cytochrome b5 de la levure, une stratégie plus évidente serait d'exprimer le cytochrome b5 du ricin dans *Y. lipolytica*. Ce type de co-expression a déjà été tenté avec succès chez *S. cerevisiae* pour favoriser l'activité de désaturases membranaires de plantes produisant des acides gras poly-insaturés. Ainsi, l'expression d'une Δ^6 -désaturase de *Tetrahymena thermophila* (un Cilié) ne permet la conversion que de seulement 4% de l'acide linoléique (substrat) en acide γ -linolénique (18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$) et la surexpression du cytochrome b5 endogène (*S. cerevisiae*) ne permet qu'une amélioration limitée (8,2% de conversion). Alors que la co-expression de cette désaturase avec des cytochromes b5 issu de *T. thermophila* conduit à des conversions de respectivement 25% et 40% (augmentation d'un facteur 8,25 et 10). La co-expression avec un cytochrome b5 de *Arabidopsis thaliana* permet lui aussi d'atteindre 40% de conversion (Dahmen et al. 2013), ce qui pourrait indiquer des caractéristiques communes entre les cytochromes b5 de plante. Dans un autre article sur *S. cerevisiae* (Kumar et al. 2012), la co-expression de la Δ^{12} -désaturase et de certains cytochromes b5 de *A. thaliana* permettent une amélioration de plus de trois fois de la production d'acide linoléique (de <2% à >6% avec le Cb5-B). Lors de l'expression de la Δ^{15} -désaturase du soja, une amélioration d'un facteur deux est obtenue quand il y a co-expression avec un cytochrome b5 du soja. L'effet est encore plus marqué avec la Δ^{15} -désaturase de *A. thaliana*, où le facteur est de plus de vingt fois avec le Cb5-B et le cytochrome natif. Donc pour pallier à cela, une stratégie de co-expression entre RcFAH12 et un cytochrome b5 issu de *R. communis* a été tentée.

Cette stratégie n'a pas été décrite dans cette thèse car elle faisait l'objet d'une partie de mon travail de master. Les trois cytochromes du ricin (sur les six qu'il contient) les plus exprimés dans l'endosperme de *R. communis* lors de la synthèse d'acide ricinoléique (Lu et al. 2007; Brown et al. 2012) avaient été testés : Rc.cyb5B1 (GenBank: EEF44276), Rc.cyb5B2 (NCBI Reference Sequence: XP_002521096.1) et Rc.cyb5E1 (NCBI Reference Sequence: XP_002518220.1). Un cytochrome b5 issu de *C. purpurea* avait également été testé en parallèle, Cp.cyb5-1 (GenBank: CCE29659.1) pour voir si l'on arrivait à obtenir une amélioration avec un cytochrome b5 d'un autre organisme synthétisant de l'acide ricinoléique. L'ensemble de ces protéines sont putatives et leurs tailles sont similaires (tableau III.4.6 et figure III.4.6). Rc.cyb5B1 et Rc.cyb5B2 sont les deux séquences les plus proches, alors que Cp.cyb5-1 et Yl.cyb5-1 sont les séquences les plus différentes. Les levures ne possèdent généralement qu'un seul cytochrome. Chez *Y. lipolytica*, la séquence putative trouvée est YALI0D12122g1 (Yl.cyb5-1), et elle n'a jamais été caractérisée mais juste annotée lors du séquençage.

Cp-cyb5-1	1	-----MSSTLELTYQDVAEHNTKKDIYVVIHDKIYDCAQFIDEHPGGE	43
Rc-cyb5B1	1	-----MSGEGKVFTLAQVSEHNNPKDCWLIIINGKVDVTKFLEDHPGGD	44
Rc-cyb5B2	1	-----MGGQGKVYTLADVSEHNSPKDCWLVIEGKVDVTKFLEDHPGGD	44
Rc-cyb5E1	1	-----MASDPKILNFEEVAKHNKLKDCWLVISGKVDVTPFMDDHPGGD	44
Yl-cyb5	1	MSDTAAIPTDTAEKKIFTLKQVAEHKDRNDLWMIINGKVDIISFFVDEHPGDE	53
cons	1	.. . :*: :* : * : :* . * :* : * : :****:	53
 Cp-cyb5-1	44	EVLLDCAGQDATEAFEDVGHSDARETLDKIQVGVLKRQPGDPAPKASVPVSS	96
Rc-cyb5B1	45	EVLLSATGKDATDDFEDVGHSTSAREMMDQYYVGEID--PSTIPKKATYKPPK	95
Rc-cyb5B2	45	EVLLSATGKDATDDFEDVGHSSSARAMMDEFYVGEID--TSTIPTKKAYTPPK	95
Rc-cyb5E1	45	DVLLSSTGKDATNDFEDVGHSDSARDMMEKYYIGEID--SATIPLRRTHIPKP	95
Yl-cyb5	54	EVLLDAGGTEATNAFFDVGHSEDAYGILNDLYVGEVD--PSEDVIRKTHTVKT	104
cons	54	:***.. * :*: * :***** .* :.. :* :. .. : :	106
 Cp-cyb5-1	97	GSSSSSSDTTGFIGVYFLLLGVGALGY-----FAFQYMAKQEQAAGAA	141
Rc-cyb5B1	96	QPHYNQDKTAEFIKLLQASSCYIGFGFWNPHLYKINL-----KEYRPPL	140
Rc-cyb5B2	96	QPHYNQDKTPFIFIKLLQFVVPPLLILGL-----AVGI-----RFYTK-S	133
Rc-cyb5E1	96	QANYNQDKSSEFLIKILQFLVPLLILGL-----AFAV-----RHYTKKE	134
Yl-cyb5	105	SYEDGESVGDDHGSSSMIFLIVAAVAA-----AAF-----FYLQGQK	142
cons	107	158

Figure III.4.6 : Alignement entre les cytochromes b5 de *Claviceps purpurea* (Cp), *Ricinus communis* (Rc) et *Y. lipolytica* (Yl).

	Cp.cyb5-1	Rc.cyb5B1	Rc.cyb5B2	Rc.cyb5E1
Cp.cyb5-1 (141 aa)				
Rc.cyb5B1 (140 aa)	52% (50%)			
Rc.cyb5B2 (136 aa)	49% (60%)	85% (80%)		
Rc.cyb5E1 (134 aa)	37% (90%)	57% (92%)	64% (97%)	
Yl.cyb5-1 (142 aa)	38% (88%)	43% (89%)	47% (69%)	45% (69%)

Tableau III.4.6 : Tableau récapitulatif des pourcentages d'identité entre les différents cytochromes b5 de *C. purpurea*, *R. communis* et *Y. lipolytica*. La taille en acide aminé (aa) et la couverture de la séquence (%) sont indiquées entre parenthèses.

Malheureusement, aucune différence de production n'avait été observée entre les souches exprimant RcFAH12 seule ou avec l'un des cytochromes b5 testés.

Pour le moment, seulement le cytochrome b5 a été exprimé. La co-expression avec son partenaire, la cytochrome b5 réductase, pourrait permettre un flux beaucoup plus important d'électrons. Un criblage haut-débit de mutants ayant une réduction de la production d'acide ricinoléique chez *A. thaliana* exprimant RcFAH12 a permis de montrer qu'une mutation présente sur la cytochrome b5 réductase réduit la production d'acide ricinoléique de 86% (Kumar et al. 2006). Cela prouve que cibler les cytochromes b5 réductases pourrait également améliorer la conversion. Cet article montre aussi que la cytochrome b5 réductase mutée à une stabilité et une activité réduite, mais que surtout la production d'acide ricinoléique n'est pas impactée de la même manière que les autres acides gras insaturés. Leur hypothèse est qu'il y a compétition des différentes désaturases pour les cytochromes, ce qui suppose que les interactions sont différentes entre les désaturases endogènes et celle du ricin. Avoir une chaîne

membranaire de transport d'électrons spécifique de la désaturase semble important pour obtenir un transfert optimal d'électrons, et donc une activité maximum.

Même si aucune amélioration de l'activité n'est visible, il reste d'autres cytochromes b5 à tester chez *R. communis* ou d'autres organismes. Et une co-expression avec une cytochrome b5 réductase serait également d'intérêt. Sachant qu'il existe trois cytochrome b5 réductases et six cytochrome b5 chez le ricin, il y aurait quinze constructions à tester. Cela nécessiterait donc d'utiliser le système d'assemblage de gènes en cours de développement au laboratoire pour assembler de façon simple et robuste les différentes combinaisons avec les trois gènes d'intérêt (hydroxylase, cytochrome b5 et cytochrome b5 réductase). Enfin, une dernière perspective serait de créer des enzymes de fusion entre une désaturase et un cytochrome b5. Ce type de fusion existe déjà chez certaines désaturases membranaires, comme par exemple les Δ^9 -désaturases de champignon (fusionné en C-terminal) ou certaines appartenant à la famille des front-end désaturases (fusionné en N-terminal) (Li et al. 2016). Malheureusement, il semblerait qu'aucune enzyme appartenant à la famille des méthyl-end désaturases, à laquelle appartiennent les Δ^{12} -désaturases, ne possèdent de fusion avec de cytochrome b5. Un important travail de modélisation moléculaire sera à réaliser pour mener à bien ce projet. Aussi, tant que la structure tridimensionnelle n'est pas résolue, il semble risqué de se lancer dans ce projet ambitieux.

Conclusion générale :

Conclusion

L'objectif de cette thèse portait sur l'augmentation de la production d'un acide gras inhabituel, l'acide ricinoléique, chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Avant la thèse, l'expression de l'hydroxylase CpFAH12 du champignon *Claviceps purpurea* dans la souche OléoX permettait d'obtenir la production d'acide ricinoléique la plus importante chez un micro-organisme. Malheureusement, cette **production n'est pas encore suffisamment élevée pour permettre de développer un procédé industriel**.

Au cours de cette thèse, **le premier obstacle que j'ai rencontré est une faible reproductibilité entre les résultats de plusieurs productions**. Malheureusement, l'origine du problème n'était pas claire au début de la thèse et donc les améliorations nécessaires se sont faites séquentiellement. Un des deux points déterminants pour l'amélioration de la reproductibilité a été de proposer une nouvelle méthode de culture et d'analyse avec l'utilisation d'une phase décane. Cela a permis globalement d'améliorer la reproductibilité de la production d'acides gras de différents clones lors de la même culture ou entre des cultures différentes. Elle a aussi permis **une augmentation de la sensibilité** par l'analyse séparée de la phase décane, qui contient majoritairement l'acide ricinoléique sécrété dans le milieu de culture, et du culot cellulaire qui contient les autres acides gras. Ainsi, l'acide ricinoléique est concentré dans la phase décane, ce qui permet un seuil de détection plus bas, et une plus grande quantité de culot cellulaire est analysé par transméthylation, ce qui permet de mieux caractériser les acides gras ayant une faible concentration. Cette double analyse est nécessaire pour analyser les ratios hydroxylation/désaturation et les taux de conversion des différents mutants et souches construits. Concernant les souches produisant de l'acide ricinoléique, qui étaient initialement conservées à 4°C, il m'aura fallu du temps avant de remarquer que la diminution de la production des cultures était corrélée à l'âge du stock. Le stockage des souches à -80°C n'a pas permis de résoudre le problème. Donc, toutes les premières cultures de la thèse étaient inexploitables. Une fois que la non-stabilité des souches a été révélée, seule l'utilisation de souches fraîchement transformées a permis de s'affranchir de cette limite, ce qui nécessite une transformation systématique des souches avant chaque culture. Puis l'utilisation d'une plateforme d'intégration génomique dans la souche OléoX zéta a permis d'obtenir **une augmentation du taux de transformation et de garantir un meilleure reproductibilité quant au niveau d'expression des différents mutants de l'hydroxylase**. La combinaison des différentes modifications apportées au protocole a permis d'associer les différentes améliorations et d'avoir un protocole fiable pour la production et la comparaison des résultats.

Ainsi la mise au point de cette nouvelle méthode a pu être valorisée dans le cadre d'un travail annexe à mon sujet de thèse et a donné lieu à une publication qui décrit la construction d'une souche OléoX cellulolytique et ouvre la voie à des productions microbiennes d'acide ricinoléique à partir de biomasse végétale renouvelable.

La majeure partie de la variabilité chez les souches a été attribuée à **la toxicité de l'acide ricinoléique**, probablement par un mécanisme de déstabilisation des membranes. L'utilisation

d'une phase décane dans les cultures a permis d'éviter une partie de sa toxicité de par la séquestration de la fraction sécrétée. Cependant, la totalité de l'effet toxique n'a pas été résorbée, car les souches produisant de l'acide ricinoléique ont toujours une densité optique inférieure à celles n'en produisant pas. D'autre part, si nous avons pu modérer la toxicité pendant la phase de production, **la limitation majeure de ce projet réside dans l'effet de cette toxicité sur la stabilité des souches**. Dans le cadre de la thèse nous avons opté pour une re-transformation systématique des souches avant évaluation mais cette approche n'est pas pérenne et ce problème doit être résolu pour envisager une poursuite du projet.

Chez les plantes ou les microalgues, la toxicité de l'acide ricinoléique est limitée lorsqu'il est estérifié, par exemple dans les triacylglycérols ou sous forme d'estolides. Cependant, dans l'optique d'un procédé industriel, la sécrétion de l'acide ricinoléique est un avantage que nous souhaitons conserver car elle permet d'obtenir un produit quasiment pur avec seulement une faible contamination par les lipides cellulaires. Un solvant plus volatil, comme le pentane, devra toutefois être envisagé. Un procédé d'extraction en continu (sans solvant d'extraction) pourrait aussi être considéré pour limiter l'effet toxique de l'acide ricinoléique s'il s'accumule trop dans le bioréacteur.

Une possibilité pour limiter la toxicité des phospholipides sur lesquels est estérifié l'acide ricinoléique serait de favoriser la synthèse de triacylglycérols contenant de l'acide ricinoléique (par la surexpression d'une phospholipide:diacylglycérol acyltransférase comme YILRO1 ou d'une phospholipase). Puis favoriser l'hydrolyse des glycérolipides permettra d'avoir la sécrétion recherchée. L'expression d'une phospholipase A2/B libérerait directement l'acide ricinoléique du pool des phospholipides. C'est la sélectivité des enzymes et leur spécificité vis-à-vis de l'acide ricinoléique qui permettra la réussite de ce type d'approche.

Enfin, une autre possibilité pour s'affranchir de la toxicité de l'acide ricinoléique serait **d'utiliser un promoteur inductible pour découpler la croissance de la souche et la production du produit d'intérêt**. L'utilisation du promoteur pPOX2 inductible aux acides gras et testé dans cette thèse n'a pas permis d'obtenir une production significative d'acide ricinoléique mais les conditions n'étaient pas optimales pour son expression (présence de glucose dans le milieu qui le réprime). Il conviendrait donc de le tester dans des conditions différentes (avec d'autres sources de carbone). D'autre part, récemment de nouveaux promoteurs inductibles ont été développés et il serait pertinent de les tester.

Le développement d'un procédé a été réalisé avec une souche OléoX cellulolytique, et cela a permis la première production d'acide ricinoléique à partir de biomasse végétale renouvelable. Une amélioration de la production reste nécessaire pour que le procédé soit rentable et donc utilisable industriellement. Nous avons vu que plusieurs articles étaient sortis entre 2010 et 2015 sur la production d'acide ricinoléique chez les levures. Mais depuis aucun nouvel article n'a été publié sur le sujet, ce qui semble montrer qu'il existe des verrous importants pour la production d'acide ricinoléique chez les levures (au niveau de l'hydroxylase ou des transférases de plantes par exemple). Il est probable que je ne sois pas le seul à avoir eu des problèmes sur cette thématique.

La première stratégie pour améliorer la production d'acide ricinoléique a été de s'intéresser aux enzymes responsables de l'hydroxylation. En effet l'hydroxylase CpFAH12 est bifonctionnelle et elle réalise aussi la désaturation de l'acide oléique. Elle appartient à la famille des désaturases membranaires, plus précisément des Δ^{12} -désaturases ayant une activité inhabituelle. Ces enzymes ont été étudiées à cause de leur large gamme d'activité, mais jusqu'à présent aucune structure tridimensionnelle n'a encore été résolue. La première approche a été de comparer CpFAH12 à une désaturase du même organisme (CpFAD2, 86% d'identité) qui ne réalise que la désaturation. Cela a permis de déterminer de découper la séquence en plusieurs domaines, puis des chimères entre CpFAH12 et CpFAD2 ont été testées. Les deux premières chimères avaient eu leurs zones transmembranaires échangées, et elles n'ont montré aucune modification de leur activité par rapport à la souche sauvage (taux de conversion et d'hydroxylation identiques). Cela a permis de montrer que **les zones transmembranaires n'ont aucun rôle ni dans la spécificité hydroxylation/désaturation ni dans l'activité totale.**

Puis les autres zones de CpFAD2 ont été testées dans CpFAH12 et cela a permis de révéler une zone cruciale, Cyt2, qui fait perdre toute activité d'hydroxylation et qui améliore la désaturation. Cette zone contient quatre acides aminés différents entre CpFAH12 et CpFAD2. Des mutants de CpFAH12 pour ces positions ont permis de révéler que l'isoleucine 198 était cruciale pour l'activité, car son remplacement par la thréonine de CpFAD2 a donné le même résultat que la chimère Cyt2. La position 198 a ensuite été investigué de façon systématique par mutagénèse de saturation. Les dix-huit autres acides aminés ont montré des profils variés, ce qui prouve le **rôle crucial de la position 198 dans le ratio hydroxylation/désaturation et pour l'activité en général.** Malheureusement, aucun mutant n'a permis d'avoir une amélioration de la production d'acide ricinoléique par rapport à CpFAH12 sauvage.

Durant la thèse, trois structures de stéaroyl-CoA désaturase et sphingolipide hydroxylase ont été obtenues. Grâce à elles, un modèle tridimensionnel de CpFAH12 a pu être généré et **ce modèle a permis d'identifier que cette isoleucine était très proche des histidines permettant la coordination des centres fers.**

Le modèle permet d'avoir des indications générales mais présente de nombreuses limites. Ainsi, plusieurs zones cytosoliques n'ont pas pu être modélisées (103 et 78 acides aminés sur un total de 477) car le modèle est basé sur les alignements entre les structures secondaires prédictes de CpFAH12 et celles des structures disponibles, mais ces dernières appartiennent à d'autres sous-familles de désaturases membranaires. Cela limite fortement la découverte de cibles potentielles pour réaliser de la mutagénèse dirigée sur CpFAH12.

Si l'on continue de considérer l'aspect « enzymatique » de notre stratégie, nous avons également évalué l'activité de l'hydroxylase de ricin (RcFAH12) qui a la particularité d'être monofonctionnelle. Nous avons également testé d'autres enzymes de la famille des Δ^{12} -désaturases qui avaient des activités inhabituelles. Ainsi, l'hydroxylase de ricin, trois époxydases et quatre conjugases de plantes ont été évaluées dans la souche châssis optimisée pour la production d'acide gras inhabituel. Malheureusement, **les désaturases membranaires de plantes qui ont été transformées n'ont pas permis d'obtenir une activité significative** chez la levure *Y. lipolytica*. Seule la désaturase de ricin a montré une activité (16% de conversion) mais bien inférieure à celle de *C. purpurea* (16% de l'activité de CpFAD2). Une

analyse de la littérature a montré que ces enzymes étaient effectivement très peu actives chez la levure et nous avons cherché à comprendre les raisons de cette faible activité.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées, l'une d'elle pourrait être l'incompatibilité entre la chaîne membranaire de transport d'électrons de *Y. lipolytica* et ces désaturases. La tentative pour co-exprimer des cytochromes b5 de *R. communis* avec RcFAH12 n'a pas permis de restaurer l'activité. **L'expression de la chaîne complète, cytochrome b5 + cytochrome b5 réductase, pourrait permettre d'obtenir une activité.** Si ce n'est pas le cas, il faudra vérifier si l'expression des enzymes est correcte, et dans ce cas le problème pourrait venir de leur localisation ou glycosylation par exemple.

Pour poursuivre l'étude de la spécificité ou du mécanisme de CpFAH12 ou d'autres Δ^{12} -désaturases apparentées, **il semble indispensable d'obtenir une structure cristallographique d'une de ces enzymes.** Cette structure pourrait également donner des indications sur les zones de fixation des cofacteurs (phosphatidylcholine, cytochrome b5...) et des cibles plus pertinentes pour de la mutagénèse dirigée. Mais avant de pouvoir se lancer dans la cristallisation, il est nécessaire d'avoir un protocole pour pouvoir la produire en grande quantité et pour la récupérer dans les membranes du réticulum endoplasmique.

En l'absence de structure, une stratégie alternative serait **d'utiliser la méthode de l'évolution dirigée** pour essayer d'obtenir des variants avec des caractéristiques modifiées pour révéler des déterminants de la spécificité. Ainsi, un grand nombre de chimères entre CpFAH12 et CpFAD2 pourraient être générées aléatoirement par des techniques de « DNA shuffling » et d'autres zones impliquées dans la spécificité d'hydroxylation pourraient alors être découvertes. Avec cette stratégie, il est cependant peu probable d'améliorer la spécificité d'hydroxylation du gène parent CpFAH12. Il s'agirait alors de faire des banques de variants sur ces zones d'intérêt ou sur la protéine entière pour améliorer les performances de l'enzyme.

Mais **l'un des prérequis à l'évolution dirigée est la possibilité de réaliser un crible haut-débit de l'activité.** Plusieurs cribles sont envisageables, de cribles moyen-débit basés sur des techniques d'extraction puis une analyse par GC ou RMN et des techniques plus haut-débit qui pourraient être basées sur une production d'acide gras en microplaqué et une détection de la quantité de lipides sécrétés (majoritairement de l'acide ricinoléique) avec un colorant adapté (Nile red). Selon la technique de criblage utilisée et le débit qui pourra être atteint, la taille des banques à cribler devra être adaptée.

La seconde stratégie pour améliorer la production d'acides gras inhabituels a été de travailler sur l'ingénierie du métabolisme de la souche. La première voie explorée était **l'augmentation du pool des phospholipides** par soit la réorientation de l'acide phosphatique produit vers la voie des CPD-DAG grâce à la délétion de l'acide phosphatidique hydrolase Yl.PAH1, soit la surexpression d'une phosphotransférase de la voie de Kennedy, Yl.CPT1 ou Yl.EPT1. L'objectif était d'augmenter la quantité de phosphatidylcholine disponible, le cofacteur sur lequel l'acide oléique est estérifié, pour favoriser la conversion. La seconde voie explorée était **d'améliorer la libération de l'acide ricinoléique de la phosphatidylcholine**, ce qui réduirait simultanément la toxicité sur les membranes et libérait le cofacteur pouvant être

reconverti en substrat. Pour cela six gènes ont été testés, deux triacylglycérol lipases multifonctionnelles (dont Yl.TGL5) et quatre phospholipases présomptives.

Sur le métabolisme des lipides, la **surexpression de Yl.TGL5 ou Yl.CPT1 semble avoir permis d'obtenir des améliorations de la production d'acide ricinoléique (+45% et +26% respectivement)**, mais la variabilité plus élevée de cette expérience n'a pas permis de conclure définitivement. Poursuivre cette stratégie semble pertinent, mais pour cela il est indispensable de pouvoir quantifier les différents pools de lipides (acyl-CoA, glycérolipides, phospholipides...), et pas seulement les acides gras totaux. Cela pourrait être permis par des **études de lipidomique**. La connaissance fine des différents pools de lipides permettrait d'aller plus loin dans l'ingénierie de la souche et dans la compréhension de l'effet toxique de l'acide ricinoléique. La combinaison de plusieurs mutations du métabolisme lipidique semble indispensable pour obtenir une amélioration notable de la production d'acide ricinoléique.

D'autre part, la co-expression simultanée de Yl.TGL5 et de Yl.CPT1 pourrait avoir un effet synergique qu'il serait intéressant de tester. De plus, certaines des modifications suggérées pour limiter la toxicité de l'acide ricinoléique nécessitent également la co-expression de plusieurs autres gènes. Un système permettant l'expression simultanée de multiples gènes devra donc être utilisé dans le futur pour une poursuite du projet. Par ailleurs, les nombreuses transformations/excisions de marqueurs de sélection réalisés sur la souche OléoX l'ont fortement affectée (réduction du taux de croissance, diminution du taux de transformation...) et les nouvelles excisions des marqueurs par le système Cre-Lox sont devenues difficiles, probablement par la présence de nombreux sites Lox qui recombinent dans le génome. Une perspective importante pour la suite du projet serait de **reconstruire la souche OléoX avec la technologie CRISPR-Cas 9 pour repartir avec une souche sans fardeau génétique**. À partir de cette souche, les nouvelles délétions à réaliser pourraient être faites elles aussi avec CRISPR-Cas9, et les gènes à surexprimer pourraient être intégrés avec des systèmes permettant la co-expression multiples de différents gènes.

Les améliorations apportées grâce à la modification du métabolisme (Δ Yl.PAH1...) et les perspectives d'améliorations (surexpression cytochrome b5...) peuvent aussi être appliquées pour la production d'autres acides gras. Par exemple, la construction d'une souche hyperproductrice d'acide linoléique pourrait être intéressante dans les domaines des compléments alimentaires ou pour de la conversion en d'autres composés d'intérêt (comme la production d'isomères conjugués d'acide linoléique).

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les déterminants de la spécificité des enzymes de la famille des désaturases membranaires ayant une activité inhabituelle et d'explorer d'avantage le potentiel de la levure *Y. lipolytica* comme organisme producteur d'acides gras inhabituels. Des résultats prometteurs ont été obtenus, mais aussi beaucoup de questionnements et de verrous scientifiques qui, je l'espère, seront levés dans les prochaines années.

Références bibliographiques

- Abghari, Ali, and Shulin Chen. 2014. "Yarrowia Lipolytica as an Oleaginous Cell Factory Platform for Production of Fatty Acid-Based Biofuel and Bioproducts." *Frontiers in Energy Research* 2 (June). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00021>.
- Aguieiras, Erika C. G., Cláudia O. Veloso, Juliana V. Bevílaqua, Danielle O. Rosas, Mônica A. P. da Silva, and Marta A. P. Langone. 2011. "Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases." *Enzyme Research* 2011: 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/432746>.
- Aiba, Shuichi, and Masayoshi Matsuoka. 1979. "Identification of Metabolic Model: Citrate Production from Glucose by *Candida Lipolytica*." *Biotechnology and Bioengineering* 21 (8): 1373–86. <https://doi.org/10.1002/bit.260210806>.
- Aitzetmüller, Kurt. 2012. "Santalbic Acid in the Plant Kingdom." *Plant Systematics and Evolution* 298 (9): 1609–17. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0678-5>.
- Alonso, Hernan, Oded Kleifeld, Adva Yeheskel, Poh C. Ong, Yu C. Liu, Jeanette E. Stok, James J. De Voss, and Anna Roujeinikova. 2014. "Structural and Mechanistic Insight into Alkane Hydroxylation by *Pseudomonas Putida* AlkB." *Biochemical Journal* 460 (2): 283–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20131648>.
- Andersson, Rebecka, Cecilia Safari, Petra Båth, Robert Bosman, Anastasya Shilova, Peter Dahl, Swagatha Ghosh, et al. 2019. "Well-Based Crystallization of Lipidic Cubic Phase Microcrystals for Serial X-Ray Crystallography Experiments." *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 75 (10): 937–46. <https://doi.org/10.1107/S2059798319012695>.
- Andrade, Dayana Pereira de, Beatriz Ferreira Carvalho, Rosane Freitas Schwan, and Disney Ribeiro Dias. 2017. "Gamma-Decalactone Production by Yeast Strains under Different Conditions." *Food Technology and Biotechnology* 55 (2). <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.5009>.
- Aryal, Niranjan, and Chaofu Lu. 2018. "A Phospholipase C-Like Protein From *Ricinus Communis* Increases Hydroxy Fatty Acids Accumulation in Transgenic Seeds of *Camelina Sativa*." *Frontiers in Plant Science* 9 (November). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01576>.
- Athenstaedt, Karin. 2011. "YALI0E32769g (DGA1) and YALI0E16797g (LRO1) Encode Major Triacylglycerol Synthases of the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (10): 587–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.07.004>.
- Athenstaedt, Karin, Pascale Jolivet, Céline Boulard, Michel Zivy, Luc Negroni, Jean-Marc Nicaud, and Thierry Chardot. 2006. "Lipid Particle Composition of the Yeast *Yarrowia Lipolytica* Depends on the Carbon Source." *PROTEOMICS* 6 (5): 1450–59. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500339>.
- Austin, Rachel N., Hung-Kuang Chang, Gerben J. Zylstra, and John T. Groves. 2000. "The Non-Heme Diiron Alkane Monooxygenase of *Pseudomonas o Leovorans* (AlkB) Hydroxylates via a Substrate Radical Intermediate." *Journal of the American Chemical Society* 122 (47): 11747–48. <https://doi.org/10.1021/ja001500v>.
- Autzen, Henriette E, David Julius, and Yifan Cheng. 2019. "Membrane Mimetic Systems in CryoEM: Keeping Membrane Proteins in Their Native Environment." *Current Opinion in Structural Biology* 58 (October): 259–68. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.022>.
- Aymé, Laure, Pascale Jolivet, Jean-Marc Nicaud, and Thierry Chardot. 2015. "Molecular Characterization of the *Elaeis Guineensis* Medium-Chain Fatty Acid Diacylglycerol Acyltransferase DGAT1-1 by Heterologous Expression in *Yarrowia Lipolytica*." Edited by Maoteng Li. *PLOS ONE* 10 (11): e0143113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143113>.

- Bafor, Maureen, Mark A. Smith, Lisbeth Jonsson, Keith Stobart, and Sten Stymne. 1991. "Ricinoleic Acid Biosynthesis and Triacylglycerol Assembly in Microsomal Preparations from Developing Castor-Bean (*Ricinus Communis*) Endosperm." *Biochemical Journal* 280 (2): 507–14. <https://doi.org/10.1042/bj2800507>.
- Bai, Yonghong, Jason G McCoy, Elena J Levin, Pablo Sobrado, Kanagalaghata R Rajashankar, Brian G Fox, and Ming Zhou. 2015. "X-Ray Structure of a Mammalian Stearoyl-CoA Desaturase." *Nature* 524 (7564): 252–56. <https://doi.org/10.1038/nature14549>.
- Bal, Jyotiranjan, Hye-Jeong Lee, Seon Ah Cheon, Kyung Jin Lee, Doo-Byoung Oh, and Jeong-Yoon Kim. 2013. "Ylpex5 Mutation Partially Suppresses the Defective Hyphal Growth of a *Yarrowia Lipolytica* Ceramide Synthase Mutant, Yllac1, by Recovering Lipid Raft Polarization and Vacuole Morphogenesis." *Fungal Genetics and Biology* 50 (January): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.003>.
- Barkan, Daniel, Dorsaf Hedhli, Han-Guang Yan, Kris Huygen, and Michael S. Glickman. 2012. "Mycobacterium Tuberculosis Lacking All Mycolic Acid Cyclopropanation Is Viable but Highly Attenuated and Hyperinflammatory in Mice." Edited by J. L. Flynn. *Infection and Immunity* 80 (6): 1958–68. <https://doi.org/10.1128/IAI.00021-12>.
- Barry, Clifton E, Richard E Lee, Khisimus Mdluli, Andrea E Sampson, Benjamin G Schroeder, Richard A Slayden, and Ying Yuan. 1998. "Mycolic Acids: Structure, Biosynthesis and Physiological Functions." *Progress in Lipid Research* 37 (2–3): 143–79. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00008-3).
- Barth, Gerold, and Claude Gaillardin. 1997. "Physiology and Genetics of the Dimorphic Fungus *Yarrowia Lipolytica*." *FEMS Microbiology Reviews* 19 (4): 219–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>.
- Baskar, G., I. Aberna Ebenezer Selvakumari, and R. Aiswarya. 2018. "Biodiesel Production from Castor Oil Using Heterogeneous Ni Doped ZnO Nanocatalyst." *Bioresource Technology* 250 (February): 793–98. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.010>.
- Bates, Philip D, Sean R Johnson, Xia Cao, Jia Li, Jeong-Won Nam, Jan G Jaworski, John B Ohlrogge, and John Browse. 2014. "Fatty Acid Synthesis Is Inhibited by Inefficient Utilization of Unusual Fatty Acids for Glycerolipid Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (3): 1204–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318511111>.
- Battino, Rubin, Timothy R. Rettich, and Toshihiro Tominaga. 1983. "The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids." *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 12 (2): 163–78. <https://doi.org/10.1063/1.555680>.
- Baye, Tesfaye, Heiko C. Becker, and Sabine v. Witzke-Ehbrecht. 2005. "Vernonia Galamensis, a Natural Source of Epoxy Oil: Variation in Fatty Acid Composition of Seed and Leaf Lipids." *Industrial Crops and Products* 21 (2): 257–61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.003>.
- Bayon, Shen, Guanqun Chen, Randall J. Weselake, and John Browse. 2015. "A Small Phospholipase A2- α from Castor Catalyzes the Removal of Hydroxy Fatty Acids from Phosphatidylcholine in Transgenic *Arabidopsis* Seeds." *Plant Physiology* 167 (4): 1259–70. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253641>.
- Beckmann, Christoph, Janine Rattke, Petra Sperling, Ernst Heinz, and Wilhelm Boland. 2003. "Stereochemistry of a Bifunctional Dihydroceramide 4-Desaturase/ Hydroxylase from *Candida Albicans*; a Key Enzyme of Sphingolipid Metabolism." *The Royal Society of Chemistry* 1 (June): 2448–54. <https://doi.org/10.1039/b303939k>.
- Beilen, J. B. van, T. H. M. Smits, F. F. Roos, T. Brunner, S. B. Balada, M. Rothlisberger, and B. Witholt. 2005. "Identification of an Amino Acid Position That Determines the Substrate Range of Integral Membrane Alkane Hydroxylases." *Journal of Bacteriology* 187 (1): 85–91. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.85-91.2005>.

- Bellou, S., A. Makri, I.-E. Triantaphyllidou, S. Papanikolaou, and G. Aggelis. 2014. "Morphological and Metabolic Shifts of *Yarrowia Lipolytica* Induced by Alteration of the Dissolved Oxygen Concentration in the Growth Environment." *Microbiology* 160 (Pt_4): 807–17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074302-0>.
- Belury, Martha A. 2002. "Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action." *The Journal of Nutrition* 132 (10): 2995–98. <https://doi.org/10.1093/jn/131.10.2995>.
- Beopoulos, A., Z. Mrozova, F. Thevenieau, M.-T. Le Dall, I. Hapala, S. Papanikolaou, T. Chardot, and J.-M. Nicaud. 2008. "Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (24): 7779–89. <https://doi.org/10.1128/AEM.01412-08>.
- Beopoulos, Athanasios, Julien Cescut, Ramdane Haddouche, Jean-Louis Uribelarrea, Carole Molina-Jouve, and Jean-Marc Nicaud. 2009. "*Yarrowia Lipolytica* as a Model for Bio-Oil Production." *Progress in Lipid Research* 48 (6): 375–87. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.
- Beopoulos, Athanasios, Ramdane Haddouche, Philomene Kabran, Thierry Dulermo, Thierry Chardot, and Jean-Marc Nicaud. 2012. "Identification and Characterization of DGA2, an Acyltransferase of the DGAT1 Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase Family in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*. New Insights into the Storage Lipid Metabolism of Oleaginous Yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (4): 1523–37. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3506-x>.
- Beopoulos, Athanasios, Jonathan Verbeke, Florence Bordes, Marie Guicherd, Mélusine Bressy, Alain Marty, and Jean-Marc Nicaud. 2014. "Metabolic Engineering for Ricinoleic Acid Production in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (1): 251–62. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5295-x>.
- Bernard, Amélie, and Jérôme Joubès. 2013. "Arabidopsis Cuticular Waxes: Advances in Synthesis, Export and Regulation." *Progress in Lipid Research* 52 (1): 110–29. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.10.002>.
- Bezard, J., M. Bugaute, and G. Clement. 1971. "Triglyceride Composition of Coconut Oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 48 (3): 134–39. <https://doi.org/10.1007/BF02545736>.
- Bhutada, Govindprasad, Martin Kavšek, Florian Hofer, Gabriela Gogg-Fassolter, Martina Schweiger, Barbara Darnhofer, Dušan Kordiš, Ruth Birner-Gruenberger, and Klaus Natter. 2018. "Characterization of a Lipid Droplet Protein from *Yarrowia Lipolytica* That Is Required for Its Oleaginous Phenotype." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863 (10): 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.010>.
- Bordes, Florence, Franck Fudalej, Valérie Dossat, Jean-Marc Nicaud, and Alain Marty. 2007. "A New Recombinant Protein Expression System for High-Throughput Screening in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Journal of Microbiological Methods* 70 (3): 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.008>.
- Borsenberger, Vinciane, Djamilia Onésime, Delphine Lestrade, Coraline Rigouin, Cécile Neuvéglise, Fayza Daboussi, and Florence Bordes. 2018. "Multiple Parameters Drive the Efficiency of CRISPR/Cas9-Induced Gene Modifications in *Yarrowia Lipolytica*." *Journal of Molecular Biology* 430 (21): 4293–4306. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.024>.
- Boyd, Alan S., Lee Wheless, Bobbi G. Brady, and Darrel Ellis. 2017. "Cutaneous *Yarrowia Lipolytica* Infection in an Immunocompetent Woman." *JAAD Case Reports* 3 (3): 219–21. <https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2017.02.010>.

- Braga, A., and I. Belo. 2016. "Biotechnological Production of γ -Decalactone, a Peach like Aroma, by *Yarrowia Lipolytica*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (10). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2116-2>.
- Bredeweg, Erin L, Kyle R Pomraning, Ziyu Dai, Jens Nielsen, Eduard J Kerkhoven, and Scott E Baker. 2017. "A Molecular Genetic Toolbox for *Yarrowia Lipolytica*." *Biotechnology for Biofuels* 10 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0687-7>.
- Broadwater, John A., Edward Whittle, and John Shanklin. 2002. "Desaturation and Hydroxylation: Residues 148 and 324 of *Arabidopsis* FAD2, in Addition to Substrate Chain Length, Exert a Major Influence in Partitioning of Catalytic Specificity." *Journal of Biological Chemistry* 277 (18): 15613–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200231200>.
- Broun, P., Sekhar Boddupalli, and Chris Somerville. 1998. "A Bifunctional Oleate 12-Hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella Fendleri*." *The Plant Journal* 13 (2): 201–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00023.x>.
- Broun, Pierre, John Shanklin, Ed Whittle, and Chris Somerville. 1998. "Catalytic Plasticity of Fatty Acid Modification Enzymes Underlying Chemical Diversity of Plant Lipids." *Science* 282 (5392): 1315–17. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1315>.
- Broun, Pierre, and Chris Somerville. 1997. "Accumulation of Ricinoleic, Lesquerolic, and Densipolic Acids in Seeds of Transgenic *Arabidopsis* Plants That Express a Fatty Acyl Hydroxylase cDNA from Castor Bean." *Plant Physiology* 113 (3): 933–42. <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.933>.
- Brown, Adrian P., Johan T. M. Kroon, David Swarbreck, Melanie Febrer, Tony R. Larson, Ian A. Graham, Mario Caccamo, and Antoni R. Slabas. 2012. "Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways." Edited by Gustavo Bonaventure. *PLoS ONE* 7 (2): e30100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>.
- Browse, John, Peter J. McCourt, and Christopher R. Somerville. 1986. "Fatty Acid Composition of Leaf Lipids Determined after Combined Digestion and Fatty Acid Methyl Ester Formation from Fresh Tissue." *Analytical Biochemistry* 152 (1): 141–45. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90132-6).
- Buček, Aleš, Petra Matoušková, Hana Sychrová, Iva Pichová, and Olga Hrušková-Heidingsfeldová. 2014. " Δ 12-Fatty Acid Desaturase from *Candida Parapsilosis* Is a Multifunctional Desaturase Producing a Range of Polyunsaturated and Hydroxylated Fatty Acids." Edited by Vishnu Chaturvedi. *PLoS ONE* 9 (3): e93322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093322>.
- Buchan, Daniel W. A., Federico Minneci, Tim C. O. Nugent, Kevin Bryson, and David T. Jones. 2013. "Scalable Web Services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench." *Nucleic Acids Research* 41 (W1): W349–57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>.
- Bueno, Amauri, Ahmed Alfarhan, Katja Arand, Markus Burghardt, Ann-Christin Deininger, Rainer Hedrich, Jana Leide, Pascal Seufert, Simona Staiger, and Markus Riederer. 2019. "Effects of Temperature on the Cuticular Transpiration Barrier of Two Desert Plants with Water-Spender and Water-Saver Strategies." *Journal of Experimental Botany* 70 (5): 1613–25. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz018>.
- Burgal, Julie, Jay Shockey, Chaofu Lu, John Dyer, Tony Larson, Ian Graham, and John Browse. 2008. "Metabolic Engineering of Hydroxy Fatty Acid Production in Plants: RcDGAT2 Drives Dramatic Increases in Ricinoleate Levels in Seed Oil." *Plant Biotechnology Journal* 6 (8): 819–31. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00361.x>.
- Burke, John E., and Edward A. Dennis. 2009. "Phospholipase A2 Biochemistry." *Cardiovascular Drugs and Therapy* 23 (1): 49–59. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>.

- Cahoon, E. B., T. J. Carlson, K. G. Ripp, B. J. Schweiger, G. A. Cook, S. E. Hall, and A. J. Kinney. 1999. "Biosynthetic Origin of Conjugated Double Bonds: Production of Fatty Acid Components of High-Value Drying Oils in Transgenic Soybean Embryos." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (22): 12935–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12935>.
- Cahoon, Edgar B, Ann M Cranmer, John Shanklin, and John B Ohlrogge. 1994. "Δ6 Hexadecenoic Acid Is Synthesized by the Activity of a Soluble Δ6 Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase in *Thunbergia Alata* Endosperm." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (44): 27519–26.
- Cahoon, Edgar B., and Anthony J. Kinney. 2004. "Dimorphecolic Acid Is Synthesized by the Coordinate Activities of Two Divergent Δ¹² -Oleic Acid Desaturases." *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12495–502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314329200>.
- Cahoon, Edgar B, Y. Lindqvist, G. Schneider, and John Shanklin. 1997. "Redesign of Soluble Fatty Acid Desaturases from Plants for Altered Substrate Specificity and Double Bond Position." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (10): 4872–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4872>.
- Cahoon, Edgar B., Kevin G. Ripp, Sarah E. Hall, and Anthony J. Kinney. 2001. "Formation of Conjugated Δ⁸ ,Δ¹⁰ -Double Bonds by Δ¹² -Oleic-Acid Desaturase-Related Enzymes: BIOSYNTHETIC ORIGIN OF CALENDIC ACID." *Journal of Biological Chemistry* 276 (4): 2637–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009188200>.
- Cahoon, Edgar B., Judy A. Schnurr, Errol A. Huffman, and Robert E. Minto. 2003. "Fungal Responsive Fatty Acid Acetylenases Occur Widely in Evolutionarily Distant Plant Families." *The Plant Journal* 34 (5): 671–83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01757.x>.
- Cahoon, Edgar B, Salehuzzaman Shah, John Shanklin, and John Browse. 1998. "A Determinant of Substrate Specificity Predicted from the Acyl-Acyl Carrier Protein Desaturase of Developing Cat's Claw Seed." *Plant Physiology* 117 (2): 593–98. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.593>.
- Cai, Yuanheng, Xiao-Hong Yu, Qun Liu, Chang-Jun Liu, and John Shanklin. 2018. "Two Clusters of Residues Contribute to the Activity and Substrate Specificity of Fm1, a Bifunctional Oleate and Linoleate Desaturase of Fungal Origin." *Journal of Biological Chemistry* 293 (51): 19844–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005972>.
- Cao, Shijiang, Xue-Rong Zhou, Craig C Wood, Allan G Green, Surinder P Singh, Lixia Liu, and Qing Liu. 2013. "A Large and Functionally Diverse Family of Fad2 Genes in Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.)." *BMC Plant Biology* 13 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-5>.
- Carman, George M., and Gil-Soo Han. 2011. "Regulation of Phospholipid Synthesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Annual Review of Biochemistry* 80 (1): 859–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092229>.
- Celińska, Ewelina, Rodrigo Ledesma-Amaro, Macarena Larroude, Tristan Rossignol, Cyrille Pauthenier, and Jean-Marc Nicaud. 2017. "Golden Gate Assembly System Dedicated to Complex Pathway Manipulation in *Yarrowia Lipolytica*." *Microbial Biotechnology* 10 (2): 450–55. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12605>.
- Chan, Agnes P, Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, et al. 2010. "Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus Communis*." *Nature Biotechnology* 28 (9): 951–56. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chen, Grace, Harrie van Erp, Jose Martin-Moreno, Kumiko Johnson, Eva Morales, John Browse, Peter Eastmond, and Jiann-Tsyh Lin. 2016. "Expression of Castor LPAT2 Enhances Ricinoleic Acid Content at the Sn-2 Position of Triacylglycerols in

- Lesquerella Seed.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4): 507. <https://doi.org/10.3390/ijms17040507>.
- Chen, Haiqin, Zhennan Gu, Hao Zhang, Mingxuan Wang, Wei Chen, W. Todd Lowther, and Yong Q. Chen. 2013. “Expression and Purification of Integral Membrane Fatty Acid Desaturases.” Edited by Wolf-Hagen Schunck. *PLoS ONE* 8 (3): e58139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058139>.
- Chen, Lizhi, Lei Wang, Herong Wang, Ruhao Sun, Lili You, Yusheng Zheng, Yijun Yuan, and Dongdong Li. 2018. “Identification and Characterization of a Plastidial ω -3 Fatty Acid Desaturase EgFAD8 from Oil Palm (*Elaeis Guineensis Jacq.*) and Its Promoter Response to Light and Low Temperature.” Edited by Maoteng Li. *PLOS ONE* 13 (4): e0196693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196693>.
- Chen, Yao-Sheng, Wen-I Luo, Chung-Ling Yang, Yi-Jung Tu, Chun-Wei Chang, Chih-Hsiang Chiang, Chi-Yao Chang, Sunney I. Chan, and Steve S.-F. Yu. 2014. “Controlled Oxidation of Aliphatic CH Bonds in Metallo-Monooxygenases: Mechanistic Insights Derived from Studies on Deuterated and Fluorinated Hydrocarbons.” *Journal of Inorganic Biochemistry* 134 (May): 118–33. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.02.005>.
- Cheng, Robert, Chia-Ying Huang, Michael Hennig, Herbert Nar, and Gisela Schnapp. 2019. “*In Situ* Crystallography as an Emerging Method for Structure Solution of Membrane Proteins: The Case of CCR2A.” *The FEBS Journal*, October. <https://doi.org/10.1111/febs.15098>.
- Cipak, Ana, Meinhard Hasslacher, Oksana Tehlivets, Emma J. Collinson, Morana Zivkovic, Tanja Matijevic, Willibald Wonisch, et al. 2006. “Saccharomyces Cerevisiae Strain Expressing a Plant Fatty Acid Desaturase Produces Polyunsaturated Fatty Acids and Is Susceptible to Oxidative Stress Induced by Lipid Peroxidation.” *Free Radical Biology and Medicine* 40 (5): 897–906. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.039>.
- Cirigliano, Michael C, and George M Carman. 1984. “Isolation of a Bioemulsifier from *Candida Lipolyticat*.” *APPL. ENVIRON. MICROBIOYL.* 48 (4): 747–50.
- Clark, Kathleen M., Nadia Fedoriw, Katrina Robinson, Sara M. Connelly, Joan Randles, Michael G. Malkowski, George T. DeTitta, and Mark E. Dumont. 2010. “Purification of Transmembrane Proteins from *Saccharomyces Cerevisiae* for X-Ray Crystallography.” *Protein Expression and Purification* 71 (2): 207–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.012>.
- Cordero-Otero, R, and C Gaillardin. 1996. “Efficient Selection of Hygromycin-B-Resistant *Yarrowia Lipolytica* Transformants.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (2): 143–48. <https://doi.org/10.1007/s002530050796>.
- Cuellar, Maria C, and Luuk AM van der Wielen. 2015. “Recent Advances in the Microbial Production and Recovery of Apolar Molecules.” *Current Opinion in Biotechnology* 33 (June): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.003>.
- Czajka, Jeffrey J., Justin A. Nathenson, Veronica T. Benites, Edward E. K. Baidoo, Qianshun Cheng, Yechun Wang, and Yinjie J. Tang. 2018. “Engineering the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* to Produce the Aroma Compound β -Ionone.” *Microbial Cell Factories* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0984-x>.
- Dahmen, Jeremy L., Rebecca Olsen, Deirdre Fahy, James G. Wallis, and John Browse. 2013. “Cytochrome B₅ Coexpression Increases *Tetrahymena Thermophila* Δ 6 Fatty Acid Desaturase Activity in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Eukaryotic Cell* 12 (6): 923–31. <https://doi.org/10.1128/EC.00332-12>.
- Daskalaki, Alexandra, Ioanna A. Vasiliadou, Stamatia Bellou, Ludwika Tomaszewska-Hetman, Chrisanthi Chatzikotoula, Barbara Kompoti, Seraphim Papanikolaou, Dimitris Vayenas, Stavros Pavlou, and George Aggelis. 2018. “Data on Cellular Lipids of

- Yarrowia Lipolytica Grown on Fatty Substrates.” *Data in Brief* 21 (December): 1037–44. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.116>.
- Dauk, Melanie, Patricia Lam, Ljerka Kunst, and Mark A. Smith. 2007. “A FAD2 Homologue from *Lesquerella Lindheimeri* Has Predominantly Fatty Acid Hydroxylase Activity.” *Plant Science* 173 (1): 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.03.015>.
- Davidow, Lance S, Diane Apostolakos, Michele M O'Donnell, Alan R Proctor, David M. Ogrydziak, Rod A Wing, Irene Stasko, and John R DeZeeuw. 1985. “Integrative Transformation of the Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Current Genetics* 10: 39–48.
- De Pourcq, Karen, Wouter Vervecken, Isabelle Dewerte, Albena Valevska, Annelies Van Hecke, and Nico Callewaert. 2012. “Engineering the Yeast *Yarrowia Lipolytica* for the Production of Therapeutic Proteins Homogeneously Glycosylated with Man8GlcNAc2 and Man5GlcNAc2.” *Microbial Cell Factories* 11 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-53>.
- Desbois, Andrew P., and Valerie J. Smith. 2010. “Antibacterial Free Fatty Acids: Activities, Mechanisms of Action and Biotechnological Potential.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (6): 1629–42. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>.
- Dillard, Bret D., Jonathan M. Demick, Michael W. W. Adams, and William N. Lanzilotta. 2011. “A Cryo-Crystallographic Time Course for Peroxide Reduction by Rubrerythrin from Pyrococcus Furiosus.” *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16 (6): 949–59. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0795-6>.
- Dominguez, Angel, Encarnacion Ferminan, and Claude Gaillardin. 2000. “*Yarrowia Lipolytica*: An Organism Amenable to Genetic Manipulation as a Model for Analyzing Dimorphism in Fungi.” In *Contributions to Microbiology*, 5:151–72. Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000060349>.
- Du, Hao-Xing, Wen-Hai Xiao, Ying Wang, Xiao Zhou, Yu Zhang, Duo Liu, and Ying-Jin Yuan. 2016. “Engineering *Yarrowia Lipolytica* for Campesterol Overproduction.” Edited by Thierry Chardot. *PLOS ONE* 11 (1): e0146773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146773>.
- Dubnau, Eugenie, John Chan, Catherine Raynaud, Vellore P. Mohan, Marie-Antoinette Lanéelle, Keming Yu, Annaik Quémard, Issar Smith, and Mamadou Daffé. 2002. “Oxygenated Mycolic Acids Are Necessary for Virulence of Mycobacterium Tuberculosis in Mice: Oxygenated Mycolic Acids in M. Tuberculosis.” *Molecular Microbiology* 36 (3): 630–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01882.x>.
- Dufourc, Erick J. 2008. “Sterols and Membrane Dynamics.” *Journal of Chemical Biology* 1 (1–4): 63–77. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>.
- Dulermo, Rémi, Heber Gamboa-Meléndez, Rodrigo Ledesma-Amaro, France Thévenieau, and Jean-Marc Nicaud. 2015. “Unraveling Fatty Acid Transport and Activation Mechanisms in *Yarrowia Lipolytica*.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851 (9): 1202–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.04.004>.
- Dulermo, Thierry, and Jean-Marc Nicaud. 2011. “Involvement of the G3P Shuttle and β -Oxidation Pathway in the Control of TAG Synthesis and Lipid Accumulation in *Yarrowia Lipolytica*.” *Metabolic Engineering* 13 (5): 482–91. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.05.002>.
- Dulermo, Thierry, Brigitte Tréton, Athanasios Beopoulos, Affoué Philomène Kabran Gnankon, Ramdane Haddouche, and Jean-Marc Nicaud. 2013. “Characterization of the Two Intracellular Lipases of *Y. Lipolytica* Encoded by TGL3 and TGL4 Genes: New Insights into the Role of Intracellular Lipases and Lipid Body Organisation.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (9): 1486–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.07.001>.

- Durairaj, Pradeepraj, Sailesh Malla, Saravanan Prabhu Nadarajan, Pyung-Gang Lee, Eunok Jung, Hyun Ho Park, Byung-Gee Kim, and Hyungdon Yun. 2015. "Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases of *Fusarium Oxysporum* for the Synthesis of ω -Hydroxy Fatty Acids in Engineered *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbial Cell Factories* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0228-2>.
- Dyer, David H., Karen S. Lyle, Ivan Rayment, and Brian G. Fox. 2009. "X-Ray Structure of Putative Acyl-ACP Desaturase DesA2 from *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv." *Protein Science* 14 (6): 1508–17. <https://doi.org/10.1110/ps.041288005>.
- Dyer, John M., Dorselyn C. Chapital, Jui-Chang W. Kuan, Robert T. Mullen, Charlotta Turner, Thomas A. McKeon, and Armand B. Pepperman. 2002. "Molecular Analysis of a Bifunctional Fatty Acid Conjugase/Desaturase from Tung. Implications for the Evolution of Plant Fatty Acid Diversity." *Plant Physiology* 130 (4): 2027–38. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010835>.
- Dyer, John M., and Robert T. Mullen. 2001. "Immunocytological Localization of Two Plant Fatty Acid Desaturases in the Endoplasmic Reticulum." *FEBS Letters* 494 (1–2): 44–47. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02315-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02315-8).
- Earle, F. R., A. S. Barclay, and I. A. Wolff. 1966. "Compositional Variation in Seed Oils of the *Crepis Genus*." *Lipids* 1 (5): 325–27. <https://doi.org/10.1007/BF02532675>.
- Egermeier, Michael, Hannes Russmayer, Michael Sauer, and Hans Marx. 2017. "Metabolic Flexibility of *Yarrowia Lipolytica* Growing on Glycerol." *Frontiers in Microbiology* 8 (January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00049>.
- Engleter, Matthias, and Harald Pichler. 2018. "On the Current Role of Hydratases in Biocatalysis." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (14): 5841–58. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9065-7>.
- Ernst, Robert, Christer S. Ejsing, and Bruno Antonny. 2016. "Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids." *Journal of Molecular Biology* 428 (24): 4776–91. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.013>.
- Erp, Harrie van, Philip D. Bates, Julie Burgal, Jay Shockey, and John Browse. 2011. "Castor Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Facilitates Efficient Metabolism of Hydroxy Fatty Acids in Transgenic *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 155 (2): 683–93. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167239>.
- Evans, Marguerite V, Hal E Turton, Chris M Grant, and Ian W Dawes. 1998. "Toxicity of Linoleic Acid Hydroperoxide to *Saccharomyces Cerevisiae*: Involvement of a Respiration-Related Process for Maximal Sensitivity and Adaptive Response." *J. BACTERIOL.* 180: 8.
- Fahy, Eoin, Shankar Subramaniam, Robert C. Murphy, Masahiro Nishijima, Christian R. H. Raetz, Takao Shimizu, Friedrich Spener, Gerrit van Meer, Michael J. O. Wakelam, and Edward A. Dennis. 2009. "Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids." *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S9–14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>.
- Fernández-Murray, J. Pedro, Gerard J. Gaspard, Stephen A. Jesch, and Christopher R. McMaster. 2009. "NTE1-Encoded Phosphatidylcholine Phospholipase b Regulates Transcription of Phospholipid Biosynthetic Genes." *Journal of Biological Chemistry* 284 (52): 36034–36046.
- Ferreira, Raphael, Paulo Gonçalves Teixeira, Verena Siewers, and Jens Nielsen. 2018. "Redirection of Lipid Flux toward Phospholipids in Yeast Increases Fatty Acid Turnover and Secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (6): 1262–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715282115>.
- Fickers, P, P Benetti, Y Wache, A Marty, S Mauersberger, M Smit, and J Nicaud. 2005. "Hydrophobic Substrate Utilisation by the Yeast *Yarrowia Lipolytica*, and Its Potential

- Applications.” *FEMS Yeast Research* 5 (6–7): 527–43. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>.
- Fickers, P., F. Fudalej, M.T. Le Dall, S. Casaregola, C. Gaillardin, P. Thonart, and J.M. Nicaud. 2005. “Identification and Characterisation of LIP7 and LIP8 Genes Encoding Two Extracellular Triacylglycerol Lipases in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Fungal Genetics and Biology* 42 (3): 264–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.12.003>.
- Fickers, Patrick, Alain Marty, and Jean Marc Nicaud. 2011. “The Lipases from *Yarrowia Lipolytica*: Genetics, Production, Regulation, Biochemical Characterization and Biotechnological Applications.” *Biotechnology Advances* 29 (6): 632–44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>.
- Finn, Robert D., Teresa K. Attwood, Patricia C. Babbitt, Alex Bateman, Peer Bork, Alan J. Bridge, Hsin-Yu Chang, et al. 2017. “InterPro in 2017—beyond Protein Family and Domain Annotations.” *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D190–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1107>.
- Fontes, Gizele Cardoso, Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Marcio Nele, and Maria Alice Zarur Coelho. 2010. “Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia Lipolytica*.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/821306>.
- Frankel, Edwin N. 1988. “Hydroperoxidation of Unsaturated Fatty Esters.” In *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, Plenum Press. New York: M. G. Simic et al.
- Fritzsche, Kathrin, Ellen Hornung, Nicola Peitzsch, Andreas Renz, and Ivo Feussner. 1999. “Isolation and Characterization of a Calendic Acid Producing (8,11)-Linoleoyl Desaturase¹.” *FEBS Letters* 462 (3): 249–53. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01541-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01541-0).
- Gagné, Steve J., Darwin W. Reed, Gordon R. Gray, and Patrick S. Covello. 2009. “Structural Control of Chemoselectivity, Stereoselectivity, and Substrate Specificity in Membrane-Bound Fatty Acid Acetylenases and Desaturases.” *Biochemistry* 48 (51): 12298–304. <https://doi.org/10.1021/bi901605d>.
- Gamarra, David, Noelia Aldai, Aisaku Arakawa, Luis Javier R. Barron, Andrés López-Oceja, Marian M. de Pancorbo, and Masaaki Taniguchi. 2018. “Distinct Correlations between Lipogenic Gene Expression and Fatty Acid Composition of Subcutaneous Fat among Cattle Breeds.” *BMC Veterinary Research* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1481-5>.
- Gao, Difeng, Spencer Smith, Michael Spagnuolo, Gabriel Rodriguez, and Mark Blenner. 2018. “Dual CRISPR-Cas9 Cleavage Mediated Gene Excision and Targeted Integration in *Yarrowia Lipolytica*.” *Biotechnology Journal* 13 (9): 1700590. <https://doi.org/10.1002/biot.201700590>.
- Garcia, Cyrielle, Cécile Duby, Daniel Catheline, Pablo G. Toral, Laurence Bernard, Philippe Legrand, and Vincent Rioux. 2017. “Synthesis of the Suspected Trans-11,Cis-13 Conjugated Linoleic Acid Isomer in Ruminant Mammary Tissue by FADS3-Catalyzed Δ13-Desaturation of Vaccenic Acid.” *Journal of Dairy Science* 100 (1): 783–96. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11455>.
- Garcia, Cyrielle, Etienne Guillocheau, Léo Richard, Gaëtan Drouin, Daniel Catheline, Philippe Legrand, and Vincent Rioux. 2018. “Conversion of Dietary Trans-Vaccenic Acid to Trans11,Cis13-Conjugated Linoleic Acid in the Rat Lactating Mammary Gland by Fatty Acid Desaturase 3-Catalyzed Methyl-End Δ13-Desaturation.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 505 (2): 385–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.132>.
- Gavino, Victor C, Grace Gavino, Marie-Josée Leblanc, and Beatriz Tuchweber. 2000. “An Isomeric Mixture of Conjugated Linoleic Acids But Not Pure Cis-9,Trans-11-

- Octadecadienoic Acid Affects Body Weight Gain and Plasma Lipids in Hamsters.” *The Journal of Nutrition* 130 (1): 27–29. <https://doi.org/10.1093/jn/130.1.27>.
- Gibellini, Federica, and Terry K. Smith. 2010. “The Kennedy Pathway-De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine.” *IUBMB Life*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/iub.337>.
- Gipson, P., D. J. Mills, R. Wouts, M. Grininger, J. Vonck, and W. Kuhlbrandt. 2010. “Direct Structural Insight into the Substrate-Shuttling Mechanism of Yeast Fatty Acid Synthase by Electron Cryomicroscopy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (20): 9164–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913547107>.
- Goffeau, A, B. G Barell, H Bussey, R. W Davis, B Dujon, H Feldmann, F Galibert, et al. 1996. “Life with 6000 Genes.” *Science* 274 (October): 546–67.
- Gomes, Nelma, Yves Waché, José A. Teixeira, and Isabel Belo. 2011. “Oil-in-Water Emulsions Characterization by Laser Granulometry and Impact on γ -Decalactone Production in *Yarrowia Lipolytica*.” *Biotechnology Letters* 33 (8): 1601–6. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0593-9>.
- Groenewald, Marizeth, Teun Boekhout, Cécile Neuvéglise, Claude Gaillardin, Piet W. M. van Dijck, and Markus Wyss. 2014. “*Yarrowia Lipolytica*: Safety Assessment of an Oleaginous Yeast with a Great Industrial Potential.” *Critical Reviews in Microbiology* 40 (3): 187–206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>.
- Groenewald, Marizeth, and Maudy Th Smith. 2013. “The Teleomorph State of *Candida Deformans* Langeron & Guerra and Description of *Yarrowia Yakushimensis* Comb. Nov.” *Antonie van Leeuwenhoek* 103 (5): 1023–28. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8>.
- Groguenin, A. 2004. “Genetic Engineering of the β -Oxidation Pathway in the Yeast *Yarrowia Lipolytica* to Increase the Production of Aroma Compounds.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28 (2–3): 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.01.006>.
- Guerfal, Mouna, Katrien Claes, Oskar Knittelfelder, Riet De Rycke, Sepp D. Kohlwein, and Nico Callewaert. 2013. “Enhanced Membrane Protein Expression by Engineering Increased Intracellular Membrane Production.” *Microb. Cell Fact* 12: 122.
- Guerreiro, Carlos, Ana S. Pereira, Adelaide Braga, Marlene Lopes, and Isabel Belo. 2017. “Use of Mixed-Cultures of *Yarrowia Lipolytica* Mutant Strains for γ -Decalactone Production from Castor Oil.” *Journal of Biotechnology* 256 (August): S18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.611>.
- Guerrero-Castillo, Sergio, Alfredo Cabrera-Orefice, Miriam Vázquez-Acevedo, Diego González-Halphen, and Salvador Uribe-Carvajal. 2012. “During the Stationary Growth Phase, *Yarrowia Lipolytica* Prevents the Overproduction of Reactive Oxygen Species by Activating an Uncoupled Mitochondrial Respiratory Pathway.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (2): 353–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.11.007>.
- Guo, Yanqiong, Huanlu Song, Zhaoyue Wang, and Yongzhi Ding. 2012. “Expression of POX2 Gene and Disruption of POX3 Genes in the Industrial *Yarrowia Lipolytica* on the γ -Decalactone Production.” *Microbiological Research* 167 (4): 246–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.003>.
- Guo, Zhongpeng, Sophie Duquesne, Sophie Bozonnet, Gianluca Cioci, Jean-Marc Nicaud, Alain Marty, and Michael Joseph O’Donohue. 2015. “Development of Cellobiose-Degrading Ability in *Yarrowia Lipolytica* Strain by Overexpression of Endogenous Genes.” *Biotechnology for Biofuels* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0289-9>.
- Guo, Zhong-peng, Sophie Duquesne, Sophie Bozonnet, Gianluca Cioci, Jean-Marc Nicaud, Alain Marty, and Michael Joseph O’Donohue. 2017. “Conferring Cellulose-Degrading

- Ability to *Yarrowia Lipolytica* to Facilitate a Consolidated Bioprocessing Approach." *Biotechnology for Biofuels* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0819-8>.
- Guo, Zhong-peng, Sophie Duquesne, Sophie Bozonnet, Jean-Marc Nicaud, Alain Marty, and Michael Joseph O'Donohue. 2017. "Expressing Accessory Proteins in Cellulolytic *Yarrowia Lipolytica* to Improve the Conversion Yield of Recalcitrant Cellulose." *Biotechnology for Biofuels* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0990-y>.
- Guy, J. E., I. A. Abreu, M. Moche, Y. Lindqvist, E. Whittle, and J. Shanklin. 2006. "A Single Mutation in the Castor 9-18:0-Desaturase Changes Reaction Partitioning from Desaturation to Oxidase Chemistry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (46): 17220–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607165103>.
- Guy, J. E., E. Whittle, M. Moche, J. Lengqvist, Y. Lindqvist, and J. Shanklin. 2011. "Remote Control of Regioselectivity in Acyl-Acyl Carrier Protein-Desaturases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (40): 16594–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110221108>.
- Guy, Jodie E, Edward Whittle, Desigan Kumaran, Ylva Lindqvist, and John Shanklin. 2007. "The Crystal Structure of the Ivy $\Delta 4$ C16:0-ACP Desaturase Reveals Structural Details of the Oxidized Active Site and Potential Determinants of Regioselectivity." *Journal of Biological Chemistry* 282 (27): 19863–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702520200>.
- Hardman, Derell, Daniel McFalls, and Stylianos Fakas. 2017. "Characterization of Phosphatidic Acid Phosphatase Activity in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* and Its Role in Lipid Biosynthesis: Phosphatidic Acid Phosphatase in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Yeast* 34 (2): 83–91. <https://doi.org/10.1002/yea.3216>.
- Hardman, Derell, Rahul Ukey, and Stylianos Fakas. 2018. "Phosphatidate Phosphatase Activity Is Induced during Lipogenesis in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Yeast* 35 (11): 619–25. <https://doi.org/10.1002/yea.3353>.
- Hashimoto, Kosuke, Akiyasu C Yoshizawa, Shujiro Okuda, Keiichi Kuma, Susumu Goto, and Minoru Kanehisa. 2008. "The Repertoire of Desaturases and Elongases Reveals Fatty Acid Variations in 56 Eukaryotic Genomes." *Journal of Lipid Research* 49 (1): 183–91. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700377-JLR200>.
- Hawksworth, David L. 2011. "A New Dawn for the Naming of Fungi: Impacts of Decisions Made in Melbourne in July 2011 on the Future Publication and Regulation of Fungal Names." *IMA FUNGUS* 2 (2): 155–62. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.06>.
- Hayes, Douglas G., Robert Kleiman, and Bliss S. Phillips. 1995. "The Triglyceride Composition, Structure, and Presence of Estolides in the Oils of *Lesquerella* and Related Species." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (5): 559–69. <https://doi.org/10.1007/BF02638857>.
- Heilmann, Ingo, Mark S Pidkowich, Thomas Girke, and John Shanklin. 2004. "Switching Desaturase Enzyme Specificity by Alternate Subcellular Targeting." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (28): 10266–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402200101>.
- Henritzi, Sandra, Manuel Fischer, Martin Grininger, Mislav Oreb, and Eckhard Boles. 2018. "An Engineered Fatty Acid Synthase Combined with a Carboxylic Acid Reductase Enables de Novo Production of 1-Octanol in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biotechnology for Biofuels* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1149-1>.
- Henry, Susan A., Sepp D. Kohlwein, and George M. Carman. 2012. "Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 190 (2): 317–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130286>.
- Hernández, M. Luisa, Manuel Mancha, and José M. Martínez-Rivas. 2005. "Molecular Cloning and Characterization of Genes Encoding Two Microsomal Oleate Desaturases (FAD2)

- from Olive." *Phytochemistry* 66 (12): 1417–26. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.004>.
- Higashi, Shoichi, and Norio Murata. 1993. "An in Vivo Study of Substrate Specificities of Acyl-Lipid ' Desaturases and Acyltransferases in Lipid Synthesis in *Synechocystis PCC6803*" 102: 4.
- Hirata, Akiko, Shigenobu Kishino, Si-Bum Park, Michiki Takeuchi, Nahoko Kitamura, and Jun Ogawa. 2015. "A Novel Unsaturated Fatty Acid Hydratase toward C16 to C22 Fatty Acids from *Lactobacillus Acidophilus*." *Journal of Lipid Research* 56 (7): 1340–50. <https://doi.org/10.1194/jlr.M059444>.
- Hjelmstad, Russell H., and Robert M. Bell. 1988. "The Sn- 1,2-Diacylglycerol Ethanolaminephosphotransferase Activity of *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (36): 19748–57.
- Hoffmann, Mareike, Ellen Hornung, Silke Busch, Nina Kassner, Philipp Ternes, Gerhard H. Braus, and Ivo Feussner. 2007. "A Small Membrane-Peripheral Region Close to the Active Center Determines Regioselectivity of Membrane-Bound Fatty Acid Desaturases from *Aspergillus Nidulans*." *Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 26666–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705068200>.
- Holic, Roman, Hisashi Yazawa, Hiromichi Kumagai, and Hiroshi Uemura. 2012. "Engineered High Content of Ricinoleic Acid in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (1): 179–87. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3959-6>.
- Holz, Martina, Christina Otto, Anne Kretzschmar, Venelina Yovkova, Andreas Aurich, Markus Pötter, Achim Marx, and Gerold Barth. 2011. "Overexpression of Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase in *Yarrowia Lipolytica* and Its Effect on Production of Organic Acids." *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5): 1519–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2957-9>.
- Hormaiztegui, M.E. Victoria, Mirta I. Aranguren, and Verónica L. Mucci. 2018. "Synthesis and Characterization of a Waterborne Polyurethane Made from Castor Oil and Tartaric Acid." *European Polymer Journal* 102 (May): 151–60. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.03.020>.
- Hornung, Ellen, Christian Pernstich, and Ivo Feussner. 2002. "Formation of Conjugated $\Delta 11\Delta 13$ -Double Bonds by $\Delta 12$ -Linoleic Acid (1,4)-Acyl-Lipid-Desaturase in Pomegranate Seeds: Punicic Acid Producing (1,4)-Acyl-Lipid-Desaturase." *European Journal of Biochemistry* 269 (19): 4852–59. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03184.x>.
- Hu, Yating, Zhiwei Zhu, Jens Nielsen, and Verena Siewers. 2018. "Heterologous Transporter Expression for Improved Fatty Alcohol Secretion in Yeast." *Metabolic Engineering* 45 (January): 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.11.008>.
- Hu, Z., Z. Ren, and C. Lu. 2012. "The Phosphatidylcholine Diacylglycerol Cholinephosphotransferase Is Required for Efficient Hydroxy Fatty Acid Accumulation in Transgenic *Arabidopsis*." *PLANT PHYSIOLOGY* 158 (4): 1944–54. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192153>.
- Iida, Toshiya, Akinori Ohta, and Masamichi Takagi. 1998. "Cloning and Characterization of Ann-Alkane-Inducible Cytochrome P450 Gene Essential Forn-Decane Assimilation by *Yarrowia Lipolytica*." *Yeast* 14 (15): 1387–97. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199811\)14:15<1387::AID-YEA333>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1387::AID-YEA333>3.0.CO;2-M).
- Iida, Toshiya, Toru Sumita, Akinori Ohta, and Masamichi Takagi. 2000. "The Cytochrome P450ALK Multigene Family of Ann-Alkane-Assimilating Yeast, *Yarrowia Lipolytica*: Cloning and Characterization of Genes Coding for New CYP52 Family Members."

- Yeast* 16 (12): 1077–87. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000915\)16:12<1077::AID-YEA601>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000915)16:12<1077::AID-YEA601>3.0.CO;2-K).
- Imatoukene, Nabila, Jonathan Verbeke, Athanasios Beopoulos, Abdelghani Idrissi Taghki, Brigitte Thomasset, Claude-Olivier SARDE, Maurice NONUS, and Jean-Marc Nicaud. 2017. “A metabolic engineering strategy for producing conjugated linoleic acids using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*.” *2017, Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 101 (January): 4605–16. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8240-6>.
- Imig, John D. 2018. “Prospective for Cytochrome P450 Epoxygenase Cardiovascular and Renal Therapeutics.” *Pharmacology & Therapeutics* 192 (December): 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.015>.
- Iwabuchi, Mari, Junko Kohno-Murase, and Jun Imamura. 2003. “Δ12-Oleate Desaturase-Related Enzymes Associated with Formation of Conjugated *Trans* -Δ11, *Cis* -Δ13 Double Bonds.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4603–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210748200>.
- Jain, Samta, Antonella Caforio, and Arnold J. M. Driessens. 2014. “Biosynthesis of Archaeal Membrane Ether Lipids.” *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00641>.
- Jiao, Guangling, Joseph Hui, Ian Burton, Marie-Hélène Thibault, Claude Pelletier, Josée Boudreau, Nadia Tchoukanova, et al. 2015. “Characterization of Shrimp Oil from *Pandalus Borealis* by High Performance Liquid Chromatography and High Resolution Mass Spectrometry.” *Marine Drugs* 13 (6): 3849–76. <https://doi.org/10.3390/md13063849>.
- Jones, D T. 1999. “Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-Specific Scoring Matrices.” *J. Mol. Biol.* 292 (195–202): 8.
- Joubès, Jérôme, Sylvain Raffaele, Brice Bourdenx, Christel Garcia, Jeanny Laroche-Trainneau, Patrick Moreau, Frédéric Domergue, and René Lessire. 2008. “The VLCFA Elongase Gene Family in *Arabidopsis Thaliana*: Phylogenetic Analysis, 3D Modelling and Expression Profiling.” *Plant Molecular Biology* 67 (5): 547–66. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9339-z>.
- Jung, Jean-Luc, Gaelle Simon, Eric Alfonsi, Didier Thoraval, Nelly Kervarec, Douraied Ben Salem, Sami Hassani, and Frédéric Domergue. 2017. “Qualitative and Quantitative Study of the Highly Specialized Lipid Tissues of Cetaceans Using HR-MAS NMR and Classical GC.” Edited by Songhai Li. *PLOS ONE* 12 (7): e0180597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180597>.
- Juretzek, Thomas, Marie-Thérèse Le Dall, Stephan Mauersberger, Claude Gaillardin, Gerold Barth, and Jean-Marc Nicaud. 2001. “Vectors for Gene Expression and Amplification in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Yeast* 18 (2): 97–113.
- Juretzek, Thomas, Hui-Jie Wang, Jean-Marc Nicaud, Stephan Mauersberger, and Gerold Barth. 2000. “Comparison of Promoters Suitable for Regulated Overexpression of β-Galactosidase in the Alkane-Utilizing Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 5 (5): 320–26. <https://doi.org/10.1007/BF02942206>.
- Kajikawa, Masataka, Tatsuki Abe, Kentaro Ifuku, Ken-ichi Furutani, Dongyi Yan, Tomoyo Okuda, Akinori Ando, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, and Hideya Fukuzawa. 2016. “Production of Ricinoleic Acid-Containing Monoestolide Triacylglycerides in an Oleaginous Diatom, *Chaetoceros Gracilis*.” *Scientific Reports* 6 (36809). <https://doi.org/10.1038/srep36809>.
- Kaneko, Takao, Naomichi Baba, and Mitsuyoshi Matsuo. 1996. “Cytotoxicity of Phosphatidylcholine Hydroperoxides Is Exerted through Decomposition of Fatty Acid Hydroperoxide Moiety.” *Free Radical Biology and Medicine* 21 (2): 173–79. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00025-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00025-1).

- Kang, Woo-Ri, Min-Ju Seo, Jung-Ung An, Kyung-Chul Shin, and Deok-Kun Oh. 2016. “Production of δ -Decalactone from Linoleic Acid via 13-Hydroxy-9(Z)-Octadecenoic Acid Intermediate by One-Pot Reaction Using Linoleate 13-Hydratase and Whole *Yarrowia Lipolytica* Cells.” *Biotechnology Letters*, January. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2041-3>.
- Kaprakkaden, Anees, Preeti Srivastava, and Virendra Swarup Bisaria. 2017. “In Vitro Synthesis of 9,10-Dihydroxyhexadecanoic Acid Using Recombinant *Escherichia coli*.” *Microbial Cell Factories* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0696-7>.
- Kelley, Lawrence A, Stefans Mezulis, Christopher M Yates, Mark N Wass, and Michael J E Sternberg. 2015. “The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis.” *Nature Protocols* 10 (6): 845–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- Kennedy, Eugene P, and Samuel B Weiss. 1956. “The Function of Cytidine Coenzyme in the Biosynthesis of Phospholipides.” *Journal of Biological Chemistry* 222: 193–214.
- Kerkhoven, Eduard J., Young-Mo Kim, Siwei Wei, Carrie D. Nicora, Thomas L. Fillmore, Samuel O. Purvine, Bobbie-Jo Webb-Robertson, et al. 2017. “Leucine Biosynthesis Is Involved in Regulating High Lipid Accumulation in *Yarrowia Lipolytica*.” Edited by Sang Yup Lee. *MBio* 8 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00857-17>.
- Khadake, Rupali M., Prabhakar K. Ranjekar, and Abhay M. Harsulkar. 2009. “Cloning of a Novel Omega-6 Desaturase from Flax (*Linum Usitatissimum L.*) and Its Functional Analysis in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Molecular Biotechnology* 42 (2): 168–74. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9150-3>.
- Kildegaard, Kanchana Rueksomtawin, Belén Adiego-Pérez, David Doménech Belda, Jaspreet Kaur Khangura, Carina Holkenbrink, and Irina Borodina. 2017. “Engineering of *Yarrowia Lipolytica* for Production of Astaxanthin.” *Synthetic and Systems Biotechnology* 2 (4): 287–94. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.002>.
- Kim, Hyun Uk, Kyeong-Ryeol Lee, Young Sam Go, Jin Hee Jung, Mi-Chung Suh, and Jong Bum Kim. 2011. “Endoplasmic Reticulum-Located PDAT1-2 from Castor Bean Enhances Hydroxy Fatty Acid Accumulation in Transgenic Plants.” *Plant and Cell Physiology* 52 (6): 983–93. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp051>.
- Kim, Kyoung-Rok, Hye-Jin Oh, Chul-Soon Park, Seung-Hye Hong, Ji-Young Park, and Deok-Kun Oh. 2015. “Unveiling of Novel Regio-Selective Fatty Acid Double Bond Hydratases from *Lactobacillus Acidophilus* Involved in the Selective Oxyfunctionalization of Mono- and Di-Hydroxy Fatty Acids: Two Linoleate Hydratases in a Single Genome.” *Biotechnology and Bioengineering* 112 (11): 2206–13. <https://doi.org/10.1002/bit.25643>.
- Klug, Lisa, and Günther Daum. 2014. “Yeast Lipid Metabolism at a Glance.” *FEMS Yeast Research* 14 (3): 369–88. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>.
- Kopp, Daniel A., and Stephen J. Lippard. 2002. “Soluble Methane Monooxygenase: Activation of Dioxygen and Methane.” *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (5): 568–576.
- Korinek, Michal, Yi-Hong Tsai, Mohamed El-Shazly, Kuei-Hung Lai, Anders Backlund, Shou-Fang Wu, Wan-Chun Lai, et al. 2017. “Anti-Allergic Hydroxy Fatty Acids from Typhonium Blumei Explored through ChemGPS-NP.” *Frontiers in Pharmacology* 8 (June). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00356>.
- Kubiak, Monika, Monika Borkowska, Wojciech Białas, Paulina Korpys, and Ewelina Celińska. 2019. “Feeding Strategy Impacts Heterologous Protein Production in *Yarrowia Lipolytica* Fed-batch Cultures—Insight into the Role of Osmolarity.” *Yeast* 36 (5): 305–18. <https://doi.org/10.1002/yea.3384>.
- Kumar, Rajesh, Lam-Son Phan Tran, Anjanasree K. Neelakandan, and Henry T. Nguyen. 2012. “Higher Plant Cytochrome B5 Polypeptides Modulate Fatty Acid Desaturation.” Edited

- by Gustavo Bonaventure. *PLoS ONE* 7 (2): e31370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031370>.
- Kumar, Rajesh, James G. Wallis, Chris Skidmore, and John Browse. 2006. "A Mutation in *Arabidopsis* Cytochrome B5 Reductase Identified by High-Throughput Screening Differentially Affects Hydroxylation and Desaturation." *The Plant Journal* 48 (6): 920–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02925.x>.
- Larroude, Macarena, Young-Kyoung Park, Paul Soudier, Monika Kubiak, Jean-Marc Nicaud, and Tristan Rossignol. 2019. "A Modular Golden Gate Toolkit for *Yarrowia Lipolytica* Synthetic Biology." *Microbial Biotechnology* 12 (6): 1249–59. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13427>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Remi Dulermo, Xochitl Niehus, and Jean-Marc Nicaud. 2016. "Combining Metabolic Engineering and Process Optimization to Improve Production and Secretion of Fatty Acids." *Metabolic Engineering* 38 (November): 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.004>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, and Jean-Marc Nicaud. 2016. "Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia Lipolytica*." *Trends in Biotechnology* 34 (10): 798–809. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>.
- Lee, Kyung S., Jana L. Patton, Markus Fido, Lori K. Hines, Sepp D. Kohlwein, Fritz Paltauf, Susan A. Henry, and David E. Levin. 1994. "The *Saccharomyces Cerevisiae* PLB1 Gene Encodes a Protein Required for Lysophospholipase and Phospholipase B Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (31): 19725–30.
- Lee, Michael, Marit Lenman, Antoni Banas, Maureen Bafor, Surinder Singh, Michael Schweizer, Ralf Nilsson, et al. 1998. "Identification of Non-Heme Diiron Proteins That Catalyze Triple Bond and Epoxy Group Formation." *Science* 280 (5365): 915–18. <https://doi.org/10.1126/science.280.5365.915>.
- Legrand, Philippe, and Vincent Rioux. 2015. "Specific Roles of Saturated Fatty Acids: Beyond Epidemiological Data: Cellular and Physiological Roles of Saturated Fatty Acids." *European Journal of Lipid Science and Technology* 117 (10): 1489–99. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400514>.
- Leidy, Chad, Jackson Ocampo, Lars Duelund, Ole G. Mouritsen, Kent Jørgensen, and Günther H. Peters. 2011. "Membrane Restructuring by Phospholipase A2 Is Regulated by the Presence of Lipid Domains." *Biophysical Journal* 101 (1): 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.062>.
- Li, Dongdi, Ruth Moorman, Thomas Vanhercke, James Petrie, Surinder Singh, and Colin J Jackson. 2016. "Classification and Substrate Head-Group Specificity of Membrane Fatty Acid Desaturases." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14: 341–49. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.08.003>.
- Liavonchanka, A., E. Hornung, I. Feussner, and M. G. Rudolph. 2006. "Structure and Mechanism of the *Propionibacterium Acnes* Polyunsaturated Fatty Acid Isomerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (8): 2576–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510144103>.
- Lindqvist, Ylva, Weijun Huang, Gunter Schneider, and John Shanklin. 1996. "Crystal Structure of A9 Stearyl-Acyl Carrier Protein Desaturase from Castor Seed and Its Relationship to Other Di-Iron Proteins" 15 (16): 4081–92.
- Liu, Aiqiu, Xiaoming Tan, Lun Yao, and Xuefeng Lu. 2013. "Fatty Alcohol Production in Engineered *E. Coli* Expressing *Marinobacter* Fatty Acyl-CoA Reductases." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (15): 7061–71. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5027-2>.
- Liu, Huan, Monireh Marsafari, Fang Wang, Li Deng, and Peng Xu. 2019. "Engineering Acetyl-CoA Metabolic Shortcut for Eco-Friendly Production of Polyketides Triacetic Acid

- Lactone in *Yarrowia Lipolytica*.” *Metabolic Engineering* 56 (December): 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.017>.
- Liu, Nian, Kangjian Qiao, and Gregory Stephanopoulos. 2016. “¹³C Metabolic Flux Analysis of Acetate Conversion to Lipids by *Yarrowia Lipolytica*.” *Metabolic Engineering* 38 (November): 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.006>.
- Liu, Qin, Jin Chai, Martin Moche, Jodie Guy, Ylva Lindqvist, and John Shanklin. 2015. “Half-of-the-Sites Reactivity of the Castor $\Delta 9$ -18:0-Acyl Carrier Protein Desaturase.” *Plant Physiology* 169 (1): 432–41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00622>.
- Liu, Ran, Fayin Zhu, Lei Lu, Aisi Fu, Jiankai Lu, Zixin Deng, and Tiangang Liu. 2014. “Metabolic Engineering of Fatty Acyl-ACP Reductase-Dependent Pathway to Improve Fatty Alcohol Production in *Escherichia Coli*.” *Metabolic Engineering* 22 (March): 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.12.004>.
- Liu, Wei, Wei Li, Qiuling He, Muhammad Khan Daud, Jinhong Chen, and Shuijin Zhu. 2015. “Characterization of 19 Genes Encoding Membrane-Bound Fatty Acid Desaturases and Their Expression Profiles in *Gossypium Raimondii* Under Low Temperature.” Edited by Xianlong Zhang. *PLOS ONE* 10 (4): e0123281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123281>.
- Loira, Nicolas, Thierry Dulermo, Jean-Marc Nicaud, and David Sherman. 2012. “A Genome-Scale Metabolic Model of the Lipid-Accumulating Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *BMC Systems Biology* 6 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-35>.
- Lomakin, Ivan B., Yong Xiong, and Thomas A. Steitz. 2007. “The Crystal Structure of Yeast Fatty Acid Synthase, a Cellular Machine with Eight Active Sites Working Together.” *Cell* 129 (2): 319–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.013>.
- López-Alonso, D., F. García-Maroto, J. Rodríguez-Ruiz, J.A. Garrido, and M.A. Vilches. 2003. “Evolution of the Membrane-Bound Fatty Acid Desaturases.” *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (10): 1111–24. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00041-3).
- Lu, Chaofu, Martin Fulda, James G. Wallis, and John Browse. 2006. “A High-Throughput Screen for Genes from Castor That Boost Hydroxy Fatty Acid Accumulation in Seed Oils of Transgenic *Arabidopsis*.” *The Plant Journal* 45 (5): 847–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02636.x>.
- Lu, Chaofu, and Jinling Kang. 2008. “Generation of Transgenic Plants of a Potential Oilseed Crop *Camelina Sativa* by Agrobacterium-Mediated Transformation.” *Plant Cell Reports* 27 (2): 273–78. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0454-0>.
- Lu, Chaofu, James G Wallis, and John Browse. 2007. “An Analysis of Expressed Sequence Tags of Developing Castor Endosperm Using a Full-Length cDNA Library.” *BMC Plant Biology* 7 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-42>.
- Lunn, Daniel, James G Wallis, and John Browse. 2019. “Tri-Hydroxy-Triacylglycerol Is Efficiently Produced by Position-Specific Castor Acyltransferases.” *Plant Physiology*, January, pp.01409.2018. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01409>.
- Magnan, Christophe, James Yu, Ivan Chang, Ethan Jahn, Yuzo Kanomata, Jenny Wu, Michael Zeller, Melanie Oakes, Pierre Baldi, and Suzanne Sandmeyer. 2016. “Sequence Assembly of *Yarrowia Lipolytica* Strain W29/CLIB89 Shows Transposable Element Diversity.” Edited by Joseph Schacherer. *PLOS ONE* 11 (9): e0162363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162363>.
- Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, D. Albanesi, and D. de Mendoza. 2004. “Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors.” *Journal of Bacteriology* 186 (20): 6681–88. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6681-6688.2004>.
- Mapaisansup, Tippawan, Rayakorn Yutthanasirikul, Apiradee Hongsthong, Morakot Tanticharoen, and Marasri Ruengjitchatchawalya. 2013. “Subcellular Localization-Dependent Regulation of the Three *Spirulina* Desaturase Genes, DesC, DesA, and

- DesD, under Different Growth Phases." *Journal of Applied Phycology* 25 (2): 467–75. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9880-7>.
- Marin, M. M., L. Yuste, and F. Rojo. 2003. "Differential Expression of the Components of the Two Alkane Hydroxylases from *Pseudomonas Aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* 185 (10): 3232–37. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3232-3237.2003>.
- Marquardt, Drew, Barbara Geier, and Georg Pabst. 2015. "Asymmetric Lipid Membranes: Towards More Realistic Model Systems." *Membranes* 5 (2): 180–96. <https://doi.org/10.3390/membranes5020180>.
- Martin-Arjol, Ignacio, M. Busquets, and Angels Manresa. 2013. "Production of 10(S)-Hydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid Mono-Estolides by Lipases in Non-Aqueous Media." *Process Biochemistry* 48 (2): 224–30. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.006>.
- Matzke, K., and M. Riederer. 1990. "The Composition of the Cutin of the Caryopses and Leaves of *Triticum Aestivum L.*" *Planta* 182 (3): 461–66. <https://doi.org/10.1007/BF02411400>.
- Mauersberger, S., H.-J. Wang, C. Gaillardin, G. Barth, and J.-M. Nicaud. 2001. "Insertional Mutagenesis in the N-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia Lipolytica*: Generation of Tagged Mutations in Genes Involved in Hydrophobic Substrate Utilization." *Journal of Bacteriology* 183 (17): 5102–9. <https://doi.org/10.1128/JB.183.17.5102-5109.2001>.
- Mavraganis, I., D. Meesapyodsuk, P. Vrinten, M. Smith, and X. Qiu. 2010. "Type II Diacylglycerol Acyltransferase from *Claviceps Purpurea* with Ricinoleic Acid, a Hydroxyl Fatty Acid of Industrial Importance, as Preferred Substrate." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (4): 1135–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.02297-09>.
- McKeon, T A, and G Q Chen. 2000. "Biochemical Aspects of Castor Oil Biosynthesis." *Biochemical Society Transactions* 28: 3.
- McKeon, Thomas A., David L. Brandon, and Xiaohua He. 2016. "Improved Method for Extraction of Castor Seed for Toxin Determination." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5 (January): 56–57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.007>.
- McKeon, Thomas A., Grace Q. Chen, Xiaohua He, Yeh-Jin Ahn, and Jiann-Tsyh Lin. 2007. "The Enzymology of Castor Oil Biosynthesis." *Issues in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria*, 101–104.
- Meesapyodsuk, D., Yan Chen, Siew Hon Ng, Jianan Chen, and Xiao Qiu. 2015. "Metabolic Engineering of *Pichia Pastoris* to Produce Ricinoleic Acid, a Hydroxy Fatty Acid of Industrial Importance." *Journal of Lipid Research* 56 (11): 2102–9. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060954>.
- Meesapyodsuk, Dauenpen, and Xiao Qiu. 2008. "An Oleate Hydroxylase from the Fungus *Claviceps Purpurea*: Cloning, Functional Analysis, and Expression in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 147 (3): 1325–33. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117168>.
- Meesapyodsuk, Dauenpen, Xiao Qiu, Darwin W Reed, Patrick S Covello, and Xiao Qiu. 2007. "Primary Structure, Regioselectivity, and Evolution of the Membrane-bound Fatty Acid Desaturases of *Claviceps purpurea*," *The journal of Biological Chemistry*, 282 (28): 20191–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702196200>.
- Merkel, Olaf, Markus Fido, Johannes A. Mayr, Hermann Prüger, Florian Raab, Gerhild Zandonella, Sepp D. Kohlwein, and Fritz Paltauf. 1999. "Characterization and Function in Vivo of Two Novel Phospholipases B/Lysophospholipases From *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28121–28127.
- Michely, Stéphanie, Claude Gaillardin, Jean-Marc Nicaud, and Cécile Neuvéglise. 2013. "Comparative Physiology of Oleaginous Species from the *Yarrowia* Clade." Edited by Steven Harris. *PLoS ONE* 8 (5): e63356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063356>.
- Mietkiewska, Elzbieta, Jennifer M. Brost, E. Michael Giblin, Tammy Francis, Song Wang, Darwin Reed, Martin Truksa, and David C. Taylor. 2006. "A *Tropaeolum Majus* FAD2

- CDNA Complements the Fad2 Mutation in Transgenic Arabidopsis Plants.” *Plant Science* 171 (2): 187–93. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.006>.
- Miklaszewska, Magdalena, Franziska Dittrich-Domergue, Antoni Banaś, and Frédéric Domergue. 2018. “Wax Synthase MhWS2 from Marinobacter Hydrocarbonoclasticus: Substrate Specificity and Biotechnological Potential for Wax Ester Production.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (9): 4063–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8878-8>.
- Minto, Robert E, and Brenda J Blacklock. 2008. “Biosynthesis and Function of Polyacetylenes and Allied Natural Products.” *Progress in Lipid Research* 47 (4): 233–306. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.02.002>.
- Mirończuk, Aleksandra M., Dorota A. Rzechonek, Anna Biegalska, Magdalena Rakicka, and Adam Dobrowolski. 2016. “A Novel Strain of *Yarrowia Lipolytica* as a Platform for Value-Added Product Synthesis from Glycerol.” *Biotechnology for Biofuels* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0593-z>.
- Mlickova, K., E. Roux, K. Athenstaedt, S. d’Andrea, G. Daum, T. Chardot, and J.-M. Nicaud. 2004. “Lipid Accumulation, Lipid Body Formation, and Acyl Coenzyme A Oxidases of the Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 3918–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3918-3924.2004>.
- Moche, Martin, John Shanklin, Alokes Ghoshal, and Ylva Lindqvist. 2003. “Azide and Acetate Complexes Plus Two Iron-Depleted Crystal Structures of the Di-Iron Enzyme Δ9 Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase: IMPLICATIONS FOR OXYGEN ACTIVATION AND CATALYTIC INTERMEDIATES.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (27): 25072–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301662200>.
- Montefusco, David J., Nabil Matmati, and Yusuf A. Hannun. 2014. “The Yeast Sphingolipid Signaling Landscape.” *Chemistry and Physics of Lipids* 177 (January): 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.006>.
- Moradi, Hamideh, Mohammad Ali Asadollahi, and Iraj Nahvi. 2016. “OPTIMAZTION OF GAMMA-DECALACTONE PRODUCTION BY YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA* USING THE TAGUCHI METHOD.” *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 6 (1): 685–88. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.1.685-688>.
- Mubofu, Egid B. 2016. “Castor Oil as a Potential Renewable Resource for the Production of Functional Materials.” *Sustainable Chemical Processes* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0055-8>.
- Müller, Sven, Thomas Sandal, Peter Kamp-Hansen, and Henrik Dalbøge. 1998. “Comparison of Expression Systems in the Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae*, *Hansenula Polymorpha*, *Klyveromyces Lactis*, *Schizosaccharomyces Pombe* and *Yarrowia Lipolytica*. Cloning of Two Novel Promoters from *Yarrowia Lipolytica*.” *Yeast* 14 (14): 1267–83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(1998100\)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(1998100)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2).
- Murata, N, and H Wada. 1995. “Acyl-Lipid Desaturases and Their Importance in the Tolerance and Acclimatization to Cold of Cyanobacteria.” *Biochemical Journal* 308 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1042/bj3080001>.
- Murphy, Denis J, and Jean Vance. 1999. “Mechanisms of Lipid-Body Formation.” *Trends in Biochemical Sciences* 24 (3): 109–15. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01349-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01349-8).
- Mutka, Sarah C., Shana M. Bondi, John R. Carney, Nancy A. Da Silva, and James T. Kealey. 2006. “Metabolic Pathway Engineering for Complex Polyketide Biosynthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *FEMS Yeast Research* 6 (1): 40–47. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1356.2005.00001.x>.

- Nakamura, M.T., and T.Y. Nara. 2003. "Essential Fatty Acid Synthesis and Its Regulation in Mammals." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68 (2): 145–50. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00264-8).
- Nakayama, Norikazu, Asako Takemae, and Hirofumi Shoun. 1996. "Cytochrome P450foxy, a Catalytically Self-Sufficient Fatty Acid Hydroxylase of the Fungus *Fusarium Oxysporum*." *J. Biochem* 119: 435–40.
- Nicaud, Jean-Marc. 2012. "Yarrowia Lipolytica: Yarrowia Lipolytica." *Yeast* 29 (10): 409–18. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>.
- Nicaud, Jean-Marc, Catherine Madzak, Peter Broek, Christof Gysler, Philippe Duboc, Peter Niederberger, and Claude Gaillardin. 2002. "Protein Expression and Secretion in the Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *FEMS Yeast Research* 2 (3): 371–79. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00106.x>.
- Niu, Bei, Huaxun Ye, Ying Xu, Shenghua Wang, Peng Chen, Shuming Peng, Yangchao Ou, Lin Tang, and Fang Chen. 2007. "Cloning and Characterization of a Novel Δ12-Fatty Acid Desaturase Gene from the Tree Sapium Sebiferum." *Biotechnology Letters* 29 (6): 959–64. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9325-6>.
- Nolan, J. V., R. A. Leng, R. C. Dobos, and R. C. Boston. 2014. "The Production of Acetate, Propionate and Butyrate in the Rumen of Sheep: Fitting Models to 14C- or 13C-Labelled Tracer Data to Determine Synthesis Rates and Interconversions." *Animal Production Science* 54 (12): 2082. <https://doi.org/10.1071/AN14539>.
- Nomura, Takahito, Yukiko Kitasaka, Suguru Takatsuto, James B. Reid, Motohiro Fukami, and Takao Yokota. 1999. "Brassinosteroid/Sterol Synthesis and Plant Growth as Affected by *Lka* and *Lkb* Mutations of Pea." *Plant Physiology* 119 (4): 1517–26. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1517>.
- Notredame, Cédric, Desmond G Higgins, and Jaap Heringa. 2000. "T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment." *Journal of Molecular Biology* 302 (1): 205–17. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
- Ochoa-Estopier, Abril, and Stéphane E. Guillouet. 2014. "D-Stat Culture for Studying the Metabolic Shifts from Oxidative Metabolism to Lipid Accumulation and Citric Acid Production in Yarrowia Lipolytica." *Journal of Biotechnology* 170 (January): 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.008>.
- Oelkers, Peter, Arthur Tinkelenberg, Naz Erdeniz, Debra Cromley, Jeffrey T. Billheimer, and Stephen L. Sturley. 2000. "A Lecithin Cholesterol Acyltransferase-like Gene Mediates Diacylglycerol Esterification in Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 275 (21): 15609–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000144200>.
- Okada, Shoko, Xue-Rong Zhou, Katherine Damcevski, Nerida Gibb, Craig Wood, Mats Hamberg, and Victoria S. Haritos. 2013. "Diversity of Δ12 Fatty Acid Desaturases in Santalaceae and Their Role in Production of Seed Oil Acetylenic Fatty Acids." *Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32405–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511931>.
- Pagot, Y, A. Le Clainche, Jean-Marc Nicaud, Y Wache, and J.-M. Belin. 1998. "Peroxisomal B-Oxidation Activities and c-Decalactone Production by the Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 295–300.
- Papanikolaou, Seraphim, Afroditi Chatzifragkou, Stylianos Fakas, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, Jean-Marc Nicaud, and George Aggelis. 2009. "Biosynthesis of Lipids and Organic Acids by Yarrowia Lipolytica Strains Cultivated on Glucose." *European Journal of Lipid Science and Technology* 111 (12): 1221–32. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900055>.
- Papanikolaou, Seraphim, Isabelle Chevalot, Michael Komaitis, George Aggelis, and Ivan Marc. 2001. "Kinetic Profile of the Cellular Lipid Composition in an Oleaginous *Yarrowia*

- Lipolytica* Capable of Producing a Cocoa-Butter Substitute from Industrial Fats." *Antonie van Leeuwenhoek* 80: 215–24.
- Pareilleux, A. 1979. "Hydrocarbon Assimilation by *Candida Lipolytica*: Formation of a Biosurfactant; Effects on Respiratory Activity and Growth." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 8 (1–2): 91–101. <https://doi.org/10.1007/BF00510270>.
- Park, Bomina, and Timothy W. Corson. 2019. "Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition for Ocular Diseases: Vision for the Future." *Frontiers in Pharmacology* 10 (February). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00095>.
- Park, Jeong-Nam, Yunkyoung Song, Seon Ah Cheon, Ohsuk Kwon, Doo-Byoung Oh, Yoshifumi Jigami, Jeong-Yoon Kim, and Hyun Ah Kang. 2011. "Essential Role of Y1 *MPO1*, a Novel *Yarrowia Lipolytica* Homologue of *Saccharomyces Cerevisiae MNN4*, in Mannosylphosphorylation of N- and O-Linked Glycans." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1187–95. <https://doi.org/10.1128/AEM.02323-10>.
- Park, Young-Kyoung, Paulina Koryps, Monika Kubiak, Ewelina Celinska, Paul Soudier, Pauline Trébulle, Macarena Larroude, Tristan Rossignol, and Jean-Marc Nicaud. 2019. "Engineering the Architecture of Erythritol-Inducible Promoters for Regulated and Enhanced Gene Expression in *Yarrowia Lipolytica*." *FEMS Yeast Research* 19 (1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy105>.
- Pei, Jimin, Bong-Hyun Kim, and Nick V. Grishin. 2008. "PROMALS3D: A Tool for Multiple Protein Sequence and Structure Alignments." *Nucleic Acids Research* 36 (7): 2295–2300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>.
- Pereira, Renato B., Agostinho A. Almeida, David M. Pereira, Olga Silva, Paula B. Andrade, Edgar Pinto, and Patrícia Valentão. 2018. "Trace Elements in Wild Edible Aplysia Species: Relationship with the Desaturation–Elongation Indexes of Fatty Acids." *Chemosphere* 208 (October): 682–90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.034>.
- Pignede, G., H. Wang, F. Fudalej, C. Gaillardin, M. Seman, and J.-M. Nicaud. 2000. "Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia Lipolytica*." *Journal of Bacteriology* 182 (10): 2802–10. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2802-2810.2000>.
- Pineau, Emmanuelle, Lin Xu, Hugues Renault, Adrien Trolet, Nicolas Navrot, Pascaline Ullmann, Bertrand Légeret, Gaëtan Verdier, Fred Beisson, and Franck Pinot. 2017. "*Arabidopsis Thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1 (AtEH1) Is a Cytosolic Epoxide Hydrolase Involved in the Synthesis of Poly-Hydroxylated Cutin Monomers." *New Phytologist* 215 (1): 173–86. <https://doi.org/10.1111/nph.14590>.
- Pomraning, Kyle R., and Scott E. Baker. 2015. "Draft Genome Sequence of the Dimorphic Yeast *Yarrowia Lipolytica* Strain W29." *Genome Announcements* 3 (6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01211-15>.
- Puig, Sergi, Rosa de Llanos, and Nerea Sanvisens. 2013. "Function and Regulation of Yeast Ribonucleotide Reductase: Cell Cycle, Genotoxic Stress, and Iron Bioavailability." *Biomedical Journal* 36 (2): 51. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.110398>.
- Qiao, Kangjian, Thomas M Wasylewko, Kang Zhou, Peng Xu, and Gregory Stephanopoulos. 2017. "Lipid Production in *Yarrowia Lipolytica* Is Maximized by Engineering Cytosolic Redox Metabolism." *Nature Biotechnology* 35 (2): 173–77. <https://doi.org/10.1038/nbt.3763>.
- Qiu, Xiao, Darwin W Reed, Haiping Hong, Samuel L MacKenzie, and Patrick S Covello. 2001. "Identification and Analysis of a Gene from *Calendula Officinalis* Encoding a Fatty Acid Conjugase." *PLANT PHYSIOLOGY* 125 (2): 847–55. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.847>.

- Rajakumari, Sona, and Günther Daum. 2010. "Multiple Functions as Lipase, Steryl Ester Hydrolase, Phospholipase, and Acyltransferase of Tgl4p from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 15769–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076331>.
- Rakicka, Magdalena, Anna Biegalska, Waldemar Rymowicz, Adam Dobrowolski, and Aleksandra M. Mirończuk. 2017. "Polyol Production from Waste Materials by Genetically Modified *Yarrowia Lipolytica*." *Bioresource Technology* 243 (November): 393–99. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.137>.
- Rakicka, Magdalena, Anita Rywińska, Krzysztof Cybulski, and Waldemar Rymowicz. 2016. "Enhanced Production of Erythritol and Mannitol by *Yarrowia Lipolytica* in Media Containing Surfactants." *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (2): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.011>.
- Rawat, Richa, Xiao-Hong Yu, Marie Sweet, and John Shanklin. 2012. "Conjugated Fatty Acid Synthesis: RESIDUES 111 AND 115 INFLUENCE PRODUCT PARTITIONING OF *MOMORDICA CHARANTIA* CONJUGASE." *Journal of Biological Chemistry* 287 (20): 16230–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325316>.
- Renne, Mike F., Xue Bao, Cedric H. De Smet, and Anton I. P. M. De Kroon. 2015. "Lipid Acyl Chain Remodeling in Yeast." *Lipid Insights* 8s1 (January): LPI.S31780. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31780>.
- Rigouin, Coraline, Christian Croux, Vinciane Borsenberger, Maher Ben Khaled, Thierry Chardot, Alain Marty, and Florence Bordes. 2018. "Increasing Medium Chain Fatty Acids Production in *Yarrowia Lipolytica* by Metabolic Engineering." *Microbial Cell Factories* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0989-5>.
- Rigouin, Coraline, Marc Gueroult, Christian Croux, Gwendoline Dubois, Vinciane Borsenberger, Sophie Barbe, Alain Marty, Fayza Daboussi, Isabelle André, and Florence Bordes. 2017. "Production of Medium Chain Fatty Acids by *Yarrowia Lipolytica* Combining Molecular Design and TALEN to Engineer the Fatty Acid Synthase." *ACS Synthetic Biology* 6 (10): 1870–79. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00034>.
- Robin, Julien, Marc Gueroult, Randa Cheikhrouhou, Marie Guicherd, Vinciane Borsenberger, Alain Marty, and Florence Bordes. 2019. "Identification of a Crucial Amino Acid Implicated in the Hydroxylation/Desaturation Ratio of CpFAH12 Bifunctional Hydroxylase." *Biotechnology and Bioengineering* 116 (July): 2451–62. <https://doi.org/10.1002/bit.27102>.
- Rock, Charles O., and Suzanne Jackowski. 2002. "Forty Years of Bacterial Fatty Acid Synthesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (5): 1155–66. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.2022>.
- Rols, J. L., J. S. Condoret, C. Fonade, and G. Goma. 1990. "Mechanism of Enhanced Oxygen Transfer in Fermentation Using Emulsified Oxygen-Vectors." *Biotechnology and Bioengineering* 35 (4): 427–35. <https://doi.org/10.1002/bit.260350410>.
- Rols, J. L., and G. Goma. 1991. "Enhanced Oxygen Transfer Rates in Fermentation Using Soybean Oil-in-Water Dispersions." *Biotechnology Letters* 13 (1): 7–12. <https://doi.org/10.1007/BF01033508>.
- Saam, Jan, Igor Ivanov, Matthias Walther, Hermann-Georg Holzhütter, and Hartmut Kuhn. 2007. "Molecular Dioxygen Enters the Active Site of 12/15-Lipoxygenase via Dynamic Oxygen Access Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (33): 13319–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702401104>.
- Salsinha, Ana S., Lígia L. Pimentel, Ana L. Fontes, Ana M. Gomes, and Luis M. Rodríguez-Alcalá. 2018. "Microbial Production of Conjugated Linoleic Acid and Conjugated

- Linolenic Acid Relies on a Multienzymatic System.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82 (4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-18>.
- Samuelsson, Johan, and Mats Johansson. 2001. “A Study of Fatty Acid Methyl Esters with Epoxy or Alkyne Functionalities.” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 78 (12): 1191–96. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0412-y>.
- Sandager, Line, Maria H. Gustavsson, Ulf Ståhl, Anders Dahlqvist, Eva Wiberg, Antoni Banas, Marit Lenman, Hans Ronne, and Sten Stymne. 2002. “Storage Lipid Synthesis Is Non-Essential in Yeast.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 6478–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109109200>.
- Santomartino, Rosa, Lina Riego-Ruiz, and Michele M Bianchi. 2017. “Three, Two, One Yeast Fatty Acid Desaturases: Regulation and Function.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (5). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2257-y>.
- Sasata, Robert J., Darwin W. Reed, Michèle C. Loewen, and Patrick S. Covello. 2004. “Domain Swapping Localizes the Structural Determinants of Regioselectivity in Membrane-Bound Fatty Acid Desaturases of *Caenorhabditis Elegans*.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (38): 39296–302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405712200>.
- Sato, Takashi, Yuzo Hamada, Masaru Sumikawa, Sadao Araki, and Hideki Yamamoto. 2014. “Solubility of Oxygen in Organic Solvents and Calculation of the Hansen Solubility Parameters of Oxygen.” *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53 (49): 19331–37. <https://doi.org/10.1021/ie502386t>.
- Schmid-Berger, Natascha, Beatrice Schmid, and Gerold Barth. 1994. “Ylt1, a Highly Repetitive Retrotransposon in the Genome of the Dimorphic Fungus *Yarrowia Lipolytica*.” *Journal of Bacteriology* 176 (9): 2477–2482.
- Schultz, David J, Edgar B Cahoon, John Shanklin, Richard Craig, Diana L Cox-Foster, Ralph O Mumma, and June I Medford. 1996. “Expression of a A9 14:0-Acyl Carrier Protein Fatty Acid Desaturase Gene Is Necessary for the Production of 5 Anacardic Acids Found in Pest-Resistant Geranium (*Pelargonium Xhortorum*).” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8771–75.
- Schwartz, Cory M., Murtaza Shabbir Hussain, Mark Blenner, and Ian Wheeldon. 2016. “Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR–Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia Lipolytica*.” *ACS Synthetic Biology* 5 (4): 356–59. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00162>.
- Schweizer, E., and J. Hofmann. 2004. “Microbial Type I Fatty Acid Synthases (FAS): Major Players in a Network of Cellular FAS Systems.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (3): 501–17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.501-517.2004>.
- Sec, Peter, Martina Garaiova, Peter Gajdos, Milan Certik, Peter Griac, Ivan Hapala, and Roman Holic. 2015. “Baker’s Yeast Deficient in Storage Lipid Synthesis Uses Cis-Vaccenic Acid to Reduce Unsaturated Fatty Acid Toxicity.” *Lipids* 50 (7): 621–30. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4022-z>.
- Serrano-Carreón, L., K. Balderas-Ruiz, E. Galindo, and M. Rito-Palomares. 2002. “Production and Biotransformation of 6-Pentyl- α -Pyrone by *Trichoderma Harzianum* in Two-Phase Culture Systems.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (2): 170–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0874-7>.
- Sestric, Ryan, Garret Munch, Nazim Cicek, Richard Sparling, and David B. Levin. 2014. “Growth and Neutral Lipid Synthesis by *Yarrowia Lipolytica* on Various Carbon Substrates under Nutrient-Sufficient and Nutrient-Limited Conditions.” *Bioresource Technology* 164 (July): 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.016>.
- Shanklin, John, and Edgar B Cahoon. 1998. “Desaturation and related modifications of Fatty Acids.” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Plant Molecular Biology, 49: 611–41.

- Shanklin, John, Jodie E Guy, Girish Mishra, and Ylva Lindqvist. 2009. "Desaturases: Emerging Models for Understanding Functional Diversification of Diiron-Containing Enzymes." *Journal of Biological Chemistry* 284 (28): 18559–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900009200>.
- Shanklin, John, and Eckard Münck. 1997. "Mössbauer studies of alkane ω -hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme" 94 (April): 2981–86.
- Shanklin, John, and Edward Whittle. 2003. "Evidence Linking the *Pseudomonas Oleovorans* Alkane ω -Hydroxylase, an Integral Membrane Diiron Enzyme, and the Fatty Acid Desaturase Family." *FEBS Letters* 545 (2–3): 188–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00529-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00529-5).
- Shanklin, John, Edward Whittle, and Brian G. Fox. 1994. "Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase." *Biochemistry* 33 (43): 12787–12794.
- Sharmin, Eram, Syed Marghoob Ashraf, and Sharif Ahmad. 2007. "Epoxidation, Hydroxylation, Acrylation and Urethanation Of *Linum Usitatissimum* Seed Oil and Its Derivatives." *European Journal of Lipid Science and Technology* 109 (2): 134–46. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600227>.
- Shockey, Jay, Ida Lager, Sten Stymne, Hari Kiran Kotapati, Jennifer Sheffield, Catherine Mason, and Philip D. Bates. 2019. "Specialized Lysophosphatidic Acid Acyltransferases Contribute to Unusual Fatty Acid Accumulation in Exotic *Euphorbiaceae* Seed Oils." *Planta*, January. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-03086-y>.
- Silverman, Andrew M., Kangjian Qiao, Peng Xu, and Gregory Stephanopoulos. 2016. "Functional Overexpression and Characterization of Lipogenesis-Related Genes in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (8): 3781–98. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7376-0>.
- Singh, Surinder P, Xue-Rong Zhou, Qing Liu, Sten Stymne, and Allan G Green. 2005. "Metabolic Engineering of New Fatty Acids in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 8 (2): 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.012>.
- Singh, Surinder, Stefan Thomaeus, Michael Lee, Sten Stymne, and Allan Green. 2001. "Transgenic Expression of a Δ 12-Epoxygenase Gene in *Arabidopsis* Seeds Inhibits Accumulation of Linoleic Acid." *Planta* 212: 872–79.
- Sklodowska, Karolina, and Slawomir Jakiela. 2017. "Enhancement of Bacterial Growth with the Help of Immiscible Oxygenated Oils." *RSC Advances* 7 (65): 40990–95. <https://doi.org/10.1039/C7RA07095K>.
- Smith, Mark A., Hangsik Moon, Gangamma Chowrira, and Ljerka Kunst. 2003. "Heterologous Expression of a Fatty Acid Hydroxylase Gene in Developing Seeds of *Arabidopsis Thaliana*." *Planta* 217 (3): 507–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1015-6>.
- Smith, William L., and Michael G. Malkowski. 2019. "Interactions of Fatty Acids, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Coxibs with the Catalytic and Allosteric Subunits of Cyclooxygenases-1 and -2." *Journal of Biological Chemistry* 294 (5): 1697–1705. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.006295>.
- Snapp, Anna R., Jinling Kang, Xiaoli Qi, and Chaofu Lu. 2014. "A Fatty Acid Condensing Enzyme from *Physaria Fendleri* Increases Hydroxy Fatty Acid Accumulation in Transgenic Oilseeds of *Camelina Sativa*." *Planta* 240 (3): 599–610. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2122-2>.
- Spector, Arthur A., and Hee-Yong Kim. 2015. "Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway of Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Sperling, Petra, Michael Lee, Thomas Girke, Ulrich Zähringer, Sten Stymne, and Ernst Heinz. 2000. “A Bifunctional $\Delta 6$ -Fatty Acyl Acetylenase/Desaturase from the Moss *Ceratodon Purpureus*: A New Member of the Cytochrome B5 Superfamily.” *European Journal of Biochemistry* 267 (12): 3801–11. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01418.x>.
- Spincemaille, Pieter, Nabil Matmati, Yusuf A. Hannun, Bruno P.A. Cammue, and Karin Thevissen. 2014. “Sphingolipids and Mitochondrial Function in Budding Yeast.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (10): 3131–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.06.015>.
- Stenberg, C., M. Svensson, E. Wallström, and M. Johansson. 2005. “Drying of Linseed Oil Wood Coatings Using Reactive Diluents.” *Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions* 88 (2): 119–26. <https://doi.org/10.1007/BF02699543>.
- Stenzel, Irene, Bettina Hause, Otto Miersch, Tobias Kurz, Helmut Maucher, Jörg Ziegler, Ivo Feussner, and Claus Wasternack. 2003. “Jasmonate Biosynthesis and the Allene Oxide Cyclase Family of *Arabidopsis Thaliana*.” *Plant Molecular Biology* 51: 895–911.
- Strasser, Richard. 2016. “Plant Protein Glycosylation.” *Glycobiology* 26 (9): 926–39. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>.
- Stukey, Joseph E., Virginia M. McDonough, and Charles E. Martin. 1990. “The OLE1 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes the Delta 9 Fatty Acid Desaturase and Can Be Functionally Replaced by the Rat Stearyl-CoA Desaturase Gene.” *Journal of Biological Chemistry* 265 (33): 20144–20149.
- Sundler, Roger, and Björn Akesson. 1975. “Regulation of Phospholipid Biosynthesis in Isolated Rat Hepatocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 250 (9): 3359–67.
- Suzuki, Motofumi, Sung-Oui Suh, Takashi Sugita, and Takashi Nakase. 1999. “A Phylogenetic Study on Galactose-Containing *Candida* Species Based on 18S Ribosomal DNA Sequences.” *The Journal of General and Applied Microbiology* 45 (5): 229–38. <https://doi.org/10.2323/jgam.45.229>.
- Tai, Mitchell, and Gregory Stephanopoulos. 2013. “Engineering the Push and Pull of Lipid Biosynthesis in Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* for Biofuel Production.” *Metabolic Engineering* 15 (January): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>.
- Tanaka, Atsuo, Masako Osumi, and Saburo Fukui. 1982. “PEROXISOMES OF ALKANE-GROWN YEAST FUNDAMENTAL AND PRACTICAL ASPECTS.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 386 (1 Peroxisomes a): 183–99. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb21416.x>.
- Tang, Guo-Qing, William P. Novitzky, H. Carol Griffin, Steven C. Huber, and Ralph E. Dewey. 2005. “Oleate Desaturase Enzymes of Soybean: Evidence of Regulation through Differential Stability and Phosphorylation: Stability and Phosphorylation of FAD2 Enzymes.” *The Plant Journal* 44 (3): 433–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02535.x>.
- Tehlivets, Oksana, Kim Scheuringer, and Sepp D. Kohlwein. 2007. “Fatty Acid Synthesis and Elongation in Yeast.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771 (3): 255–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>.
- Thames, S.F., and H. Yu. 1999. “Cationic UV-Cured Coatings of Epoxide-Containing Vegetable Oils.” *Surface and Coatings Technology* 115 (2–3): 208–14. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(99\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(99)00244-3).
- Tharaud, Cécile, Anne-Marie Ribet, Claude Costes, and Claude Gaillardin. 1992. “Secretion of Human Blood Coagulation Factor XIIIa by the Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Gene* 121 (1): 111–19. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90168-O](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90168-O).

- Thévenieau, France. 2007. "Ingénierie métabolique de la levure *Yarrowia lipolytica* pour la production d'acides dicarboxyliques à partir d'huiles végétales." Institut national agronomique Paris-Grignon. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00126675>.
- Tian, Bo, Tianquan Lu, Yang Xu, Ruling Wang, and Guanqun Chen. 2019. "Identification of Genes Associated with Ricinoleic Acid Accumulation in *Hiptage Benghalensis* via Transcriptome Analysis." *Biotechnology for Biofuels* 12 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1358-2>.
- Tomaszewska, Ludwika, Anita Rywińska, and Witold Gładkowski. 2012. "Production of Erythritol and Mannitol by *Yarrowia Lipolytica* Yeast in Media Containing Glycerol." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39 (9): 1333–43. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1145-6>.
- Try, Sophal, Joëlle De-Coninck, Andrée Voilley, Thavarith Chunhieng, and Yves Waché. 2018. "Solid State Fermentation for the Production of γ -Decalactones by *Yarrowia Lipolytica*." *Process Biochemistry* 64 (January): 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.004>.
- Tsakraklides, Vasiliki, Annapurna Kamineni, Andrew L. Consiglio, Kyle MacEwen, Jonathan Friedlander, Hannah G. Blitzblau, Maureen A. Hamilton, et al. 2018. "High-Oleate Yeast Oil without Polyunsaturated Fatty Acids." *Biotechnology for Biofuels* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1131-y>.
- Türünç, Oğuz, Stijn Billiet, Kevin De Bruycker, Samira Ouardad, Johan Winne, and Filip E. Du Prez. 2015. "From Plant Oils to Plant Foils: Straightforward Functionalization and Crosslinking of Natural Plant Oils with Triazolinediones." *European Polymer Journal* 65 (April): 286–97. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.013>.
- Upadhyay, Rakesh K., and Autar K. Mattoo. 2018. "Genome-Wide Identification of Tomato (*Solanum Lycopersicum L.*) Lipoxygenases Coupled with Expression Profiles during Plant Development and in Response to Methyl-Jasmonate and Wounding." *Journal of Plant Physiology* 231 (December): 318–28. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.001>.
- Van de Loo, Frank J, Pierre Broun, Simon Turner, and Chris Somerville. 1995. "An Oleate 12-Hydroxylase from *Ricinus Communis L.* Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.
- Vance, Jean E. 2018. "Historical Perspective: Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine from the 1800s to the Present." *Journal of Lipid Research* 59 (6): 923–44. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084004>.
- Varga, Julia K., and Gábor E Tusnády. 2019. "The TMCrys Server for Supporting Crystallization of Transmembrane Proteins." Edited by Alfonso Valencia. *Bioinformatics* 35 (20): 4203–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz108>.
- Viswanath, Lakshmi, Vinay Patel, Gerard Dumancas, Lakshmi Viswanath, Randall Maples, and Bryan Subong. 2016. "Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production." *Lipid Insights*, September, 1. <https://doi.org/10.4137/LPI.S40233>.
- Waché, Y., M. Aguedo, J.-M. Nicaud, and J.-M. Belin. 2003. "Catabolism of Hydroxyacids and Biotechnological Production of Lactones by *Yarrowia Lipolytica*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (5–6): 393–404. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1207-1>.
- Waché, Yves, Yves Pagot, Jean-Marc Nicaud, and Jean-Marc Belin. 1998. "Acyl-CoA Oxidase, a Key Step for Lactone Production by *Yarrowia Lipolytica*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5 (1–4): 165–69. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00027-7).

- Wagner, Karen M., Cindy B. McReynolds, William K. Schmidt, and Bruce D. Hammock. 2017. "Soluble Epoxide Hydrolase as a Therapeutic Target for Pain, Inflammatory and Neurodegenerative Diseases." *Pharmacology & Therapeutics* 180 (December): 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.006>.
- Wallar, Bradley J., and John D. Lipscomb. 1996. "Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters." *Chemical Reviews* 96 (7): 2625–2658.
- Walt, J. P. van der, and J. A. von Arx. 1980. "The Yeast Genus *Yarrowia* Gen. Nov." *Antonie van Leeuwenhoek* 46 (6): 517–21. <https://doi.org/10.1007/BF00394008>.
- Wang, Guokun, Xiaochao Xiong, Rishikesh Ghogare, Pengdong Wang, Yonghong Meng, and Shulin Chen. 2016. "Exploring Fatty Alcohol-Producing Capability of *Yarrowia Lipolytica*." *Biotechnology for Biofuels* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0512-3>.
- Wang, Hui, Michael G Klein, Hua Zou, Weston Lane, Gyorgy Snell, Irena Levin, Ke Li, and Bi-Ching Sang. 2015. "Crystal Structure of Human Stearoyl-Coenzyme A Desaturase in Complex with Substrate." *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (7): 581–85. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3049>.
- Wang, Huijie J., Jean-Marc Belin, Claude Gaillardin, and Jean-Marc Nicaud. 1999. "Evaluation of Acyl Coenzyme A Oxidase (Aox) Isozyme Function in the n-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *J. BACTERIOL.* 181: 9.
- Wang, Mingxuan, Haiqin Chen, Zhennan Gu, Hao Zhang, Wei Chen, and Yong Q. Chen. 2013. "Ω3 Fatty Acid Desaturases from Microorganisms: Structure, Function, Evolution, and Biotechnological Use." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (24): 10255–62. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5336-5>.
- Werner, Nicole, and Susanne Zibek. 2017. "Biotechnological Production of Bio-Based Long-Chain Dicarboxylic Acids with Oleagenous Yeasts." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (11). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2360-0>.
- Whittle, Edward J., Amy E Tremblay, Peter H Buist, and John Shanklin. 2008. "Revealing the Catalytic Potential of an Acyl-ACP Desaturase: Tandem Selective Oxidation of Saturated Fatty Acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (38): 14738–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805645105>.
- Whittle, Edward, and John Shanklin. 2001. "Engineering Δ9 C16:0-Acyl Carrier Protein (ACP) Desaturase Specificity Based on Combinatorial Saturation Mutagenesis and Logical Redesign of the Castor Δ9-18:0-ACP Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21500–505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102129200>.
- Wilczek, Mateusz M., Robert Olszewski, and Andrzej Krupienicz. 2017. "Trans-Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Urgent Need for Legislation." *Cardiology* 138 (4): 254–58. <https://doi.org/10.1159/000479956>.
- Wilding, Matthew, Matthias Nachtschatt, Robert Speight, and Colin Scott. 2017. "An Improved and General Streamlined Phylogenetic Protocol Applied to the Fatty Acid Desaturase Family." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 115 (October): 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.012>.
- Wolf, Klaus. 1996. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3096655>.
- Xie, Dongming, Ethel N. Jackson, and Quinn Zhu. 2015. "Sustainable Source of Omega-3 Eicosapentaenoic Acid from Metabolically Engineered *Yarrowia Lipolytica*: From Fundamental Research to Commercial Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (4): 1599–1610. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6318-y>.
- Xie, Dongming, Edward Miller, Pamela Sharpe, Ethel Jackson, and Quinn Zhu. 2017. "Omega-3 Production by Fermentation of *Yarrowia Lipolytica* : From Fed-Batch to Continuous:

- Two-Stage Continuous Fermentation for Omega-3.” *Biotechnology and Bioengineering* 114 (4): 798–812. <https://doi.org/10.1002/bit.26216>.
- Xue, Wen-Bin, Fan Liu, Zheng Sun, and Zhi-Gang Zhou. 2016. “A Δ-9 Fatty Acid Desaturase Gene in the Microalga *Myrmecia Incisa* Reisigl: Cloning and Functional Analysis.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7): 1143. <https://doi.org/10.3390/ijms17071143>.
- Xue, Zhixiong, Pamela L Sharpe, Seung-Pyo Hong, Narendra S Yadav, Dongming Xie, David R Short, Howard G Damude, et al. 2013. “Production of Omega-3 Eicosapentaenoic Acid by Metabolic Engineering of *Yarrowia Lipolytica*.” *Nature Biotechnology* 31 (8): 734–40. <https://doi.org/10.1038/nbt.2622>.
- Yamagami, Setsu, Toshiya Iida, Yuji Nagata, Akinori Ohta, and Masamichi Takagi. 2001. “Isolation and Characterization of Acetoacetyl-CoA Thiolase Gene Essential for n-Decane Assimilation in Yeast *Yarrowia Lipolytica*.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282 (3): 832–38. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4653>.
- Yang, Jianyi, Renxiang Yan, Ambrish Roy, Dong Xu, Jonathan Poisson, and Yang Zhang. 2015. “The I-TASSER Suite: Protein Structure and Function Prediction.” *Nature Methods* 12 (1): 7–8.
- Yazawa, Hisashi, Roman Holic, Hiromichi Kumagai, and Hiroshi Uemura. 2013. “Toxicity of Ricinoleic Acid Production in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* Is Suppressed by the Overexpression of *Plg7*, a Phospholipase A2 of a Platelet-Activating Factor (PAF) Family Homolog.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (18): 8193–8203. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4987-6>.
- Yazawa, Hisashi, Hiromichi Kumagai, and Hiroshi Uemura. 2013. “Secretory Production of Ricinoleic Acid in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (19): 8663–71. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5060-1>.
- Yazawa, Hisashi, Masayo Ogiso, Hiromichi Kumagai, and Hiroshi Uemura. 2014. “Suppression of Ricinoleic Acid Toxicity by *Ptl2* Overexpression in Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (22): 9325–37. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6006-y>.
- Yeats, Trevor H., and Jocelyn K.C. Rose. 2013. “The Formation and Function of Plant Cuticles.” *Plant Physiology* 163 (1): 5–20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>.
- Yu, Tao, Yongjin J. Zhou, Leonie Wenning, Quanli Liu, Anastasia Krivoruchko, Verena Siewers, Jens Nielsen, and Florian David. 2017. “Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* for Production of Very Long Chain Fatty Acid-Derived Chemicals.” *Nature Communications* 8 (May): 15587. <https://doi.org/10.1038/ncomms15587>.
- Yuan, Yijun, Vincent Arondel, and Frédéric Domergue. 2019. “Characterization and Heterologous Expression of Three DGATs from Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) Mesocarp in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Biochimie*, September. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.010>.
- Yuzbasheva, Evgeniya Y., Gennaro Agrimi, Tigran V. Yuzbashev, Pasquale Scarcia, Elizaveta B. Vinogradova, Luigi Palmieri, Artem V. Shutov, Iuliia M. Kosikhina, Ferdinando Palmieri, and Sergey P. Sineoky. 2019. “The Mitochondrial Citrate Carrier in *Yarrowia Lipolytica*: Its Identification, Characterization and Functional Significance for the Production of Citric Acid.” *Metabolic Engineering* 54 (July): 264–74. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.002>.
- Zhang, Baixi, Haiqin Chen, Min Li, Zhennan Gu, Yuanda Song, Colin Ratledge, Yong Q Chen, Hao Zhang, and Wei Chen. 2013. “Genetic Engineering of *Yarrowia Lipolytica* for Enhanced Production of Trans-10, Cis-12 Conjugated Linoleic Acid.” *Microbial Cell Factories* 12 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-70>.

- Zhang, Ge, Timothy C Meredith, and Daniel Kahne. 2013. "On the Essentiality of Lipopolysaccharide to Gram-Negative Bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 16 (6): 779–85. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.09.007>.
- Zhang, Jiantao, Hua Liu, Jian Sun, Bei Li, Qiang Zhu, Shaoliang Chen, and Hongxia Zhang. 2012. "Arabidopsis Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth." *PLoS ONE* 7 (1): e30355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030355>.
- Zhang, Meng, Zhe Liu, Qilin Yu, Jiwei Mao, Biao Zhang, Laijun Xing, and Mingchun Li. 2015. "Deletion of Genes Encoding Fatty Acid Desaturases Leads to Alterations in Stress Sensitivity in *Pichia Pastoris*." *FEMS Yeast Research* 15 (4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov020>.
- Zhao, Chen, Deqing Gu, Komi Nambou, Liujing Wei, Jun Chen, Tadayuki Imanaka, and Qiang Hua. 2015. "Metabolome Analysis and Pathway Abundance Profiling of *Yarrowia Lipolytica* Cultivated on Different Carbon Sources." *Journal of Biotechnology* 206 (July): 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.005>.
- Zhao, Yue, Yue Ren, Ruchun Zhang, Lu Zhang, Dianyu Yu, Lianzhou Jiang, and Walid Elfalleh. 2018. "Preparation of Hydrogenated Soybean Oil of High Oleic Oil with Supported Catalysts." *Food Bioscience* 22 (April): 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.010>.
- Zhou, Xue-Rong, Surinder Singh, Qing Liu, and Allan Green. 2006. "Combined Transgenic Expression of Δ 12-Desaturase and Δ 12-Epoxygenase in High Linoleic Acid Seeds Leads to Increased Accumulation of Vernolic Acid." *Functional Plant Biology* 33 (June): 585–92. <https://doi.org/10.1071/FP05297>.
- Zhou, Xue-Rong, Surinder P Singh, and Allan G Green. 2013. "Characterisation of the FAD2 Gene Family from *Hiptage Benghalensis*: A Ricinoleic Acid Accumulating Plant." *Phytochemistry* 92 (August): 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.006>.
- Zhu, Guangyu, Mary Koszelak-Rosenblum, Sara M Connelly, Mark E Dumont, and Michael G Malkowski. 2015. "The Crystal Structure of an Integral Membrane Fatty Acid α -Hydroxylase." *Journal of Biological Chemistry* 290 (50): 29820–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680124>.
- Zhu, Quinn, and Ethel N Jackson. 2015. "Production of Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids by Metabolic Engineering of *Yarrowia Lipolytica*," 14.
- Zhuang, Xun, and Joe Chappell. 2015. "Building Terpene Production Platforms in Yeast: Building Terpene Production Platforms in Yeast." *Biotechnology and Bioengineering* 112 (9): 1854–64. <https://doi.org/10.1002/bit.25588>.
- Zinjarde, S., S. Chinnathambi, A. H. Lachke, and A. Pant. 1997. "Isolation of an Emulsifier from *Yarrowia Lipolytica* NCIM 3589 Using a Modified Mini Isoelectric Focusing Unit." *Letters in Applied Microbiology* 24 (2): 117–21. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00355.x>.
- Zinjarde, Smita S. 2014. "Food-Related Applications of *Yarrowia Lipolytica*." *Food Chemistry* 152 (June): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>.
- Zinjarde, Smita S, and Aditi Pant. 2002. "Emulsifier from a Tropical Marine Yeast, *Yarrowia Lipolytica* NCIM 3589." *Journal of Basic Microbiology* 42 (1): 67. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M).
- Zweytick, Dagmar, Erich Leitner, Sepp D. Kohlwein, Chunjiang Yu, Jonathan Rothblatt, and Günther Daum. 2000. "Contribution of Are1p and Are2p to Steryl Ester Synthesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Are1p and Are2p of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *European Journal of Biochemistry* 267 (4): 1075–82. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01103.x>.