

L'École Doctorale Sciences agronomiques et Ingénierie biologique

**Faculté des Sciences
Université Libre de Bruxelles**

**Étude de la régulation de promoteurs inductibles par
l'acide oléique chez la levure *Yarrowia lipolytica* dans un
contexte de production de protéines recombinantes**

Thèse de doctorat

En vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences agronomiques et Ingénierie Biologique

Présenté par

Hosni SASSI

Le 14 Septembre 2017

Membres du jury

Prof. Sigrid Flahaut (Université Libre de Bruxelles)

Prof. Charles De Cannière (Université Libre de Bruxelles)

Dr. Héra Kallel (Institut Pasteur de Tunis)

Prof. Patrick Fickers (Université de Liège)

Prof. Frank Delvigne (Université de Liège)

Prof. Micheline Vandebol (Université de Liège)

Prof. Isabelle George (Université Libre de Bruxelles)

Présidente

Promoteur

Co-promotrice

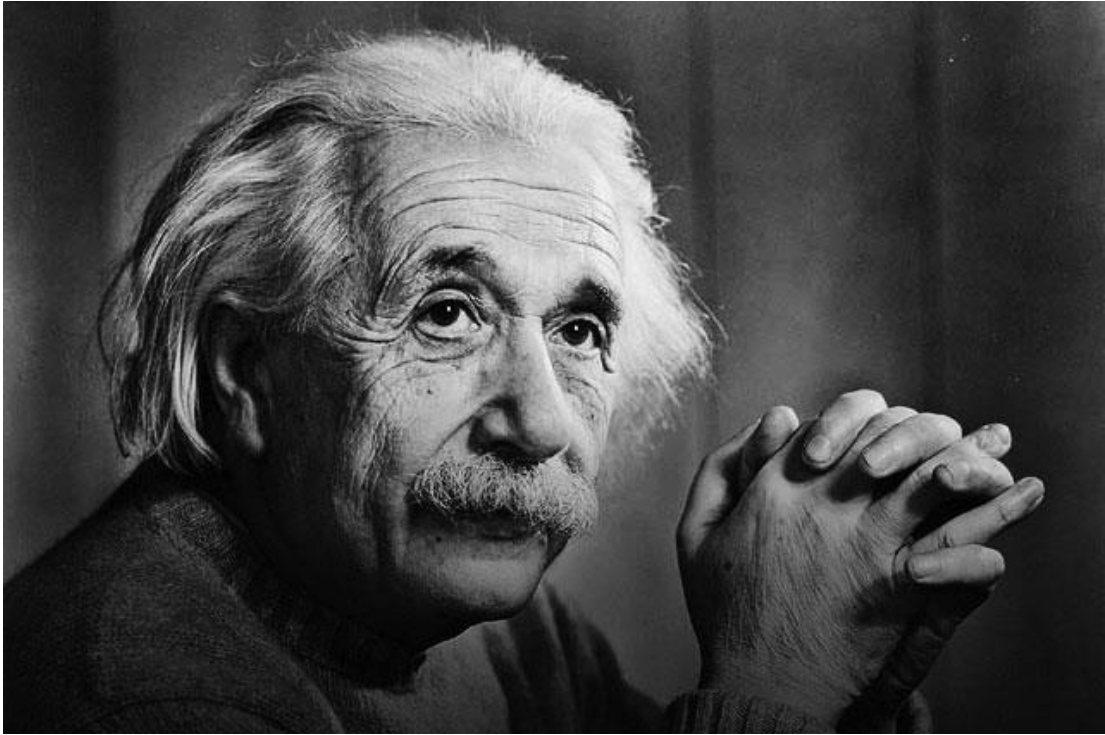
Co-promoteur

Examineur

Examinatrice

Examinatrice

Année universitaire 2017-2018



" Si vous n'arrivez pas à expliquer les choses avec simplicité, c'est certainement que vous ne les comprenez pas encore suffisamment "

Albert Einstein

Remerciements

Au terme de cette thèse, nombreuses sont les personnes qu'il me faudrait remercier. Sans les conseils, les encouragements, le soutien et l'amitié de beaucoup de ceux et celles que j'ai croisés durant mes recherches, je ne serais pas arrivé à les mener à bien. Qu'ils trouvent tous ici l'expression de ma profonde gratitude. Je ne pourrais pas tous les remercier nommément, mais que chacun sache combien je lui suis redevable.

Par ailleurs, mes remerciements vont à ceux qui m'ont permis de réaliser ces travaux : l'Unité de Biotechnologies et Bioprocédés, dirigée par **le Prof. Patrick Fickers** de l'Université Libre de Bruxelles (ULB), en collaboration avec l'unité de Biofermentation de l'Institut Pasteur de Tunis, dirigée par **le Prof. Héla Kallel**. Ces travaux de thèse bénéficient aussi de la collaboration de l'équipe de **Jean-Marc Nicaud** du Laboratoire de Microbiologie et de Génétique moléculaire (Paris – Grignon) pour les transformations génétiques de la levure *Y. lipolytica*. Les aspects d'analyse par cytométrie en flux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de recherche dirigée par **le professeur Frank Delvigne** à l'unité MiPi Microbial Processes and Interactions » à la Faculté de Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.

Je tiens aussi à remercier les membres du département de coopération internationale de l'Université Libre de Bruxelles (ULB) qui ont soutenu mes travaux et m'ont accordé la bourse CCD durant quatre ans.

Je suis également très sensible à l'honneur que m'a fait **le Prof. Patrick Fickers** de m'avoir encadré depuis mon TFE jusqu'à ma thèse de doctorat. Merci pour ses encouragements, sa passion communicative pour la science, ses critiques constructives toujours exigeantes. Son enthousiasme et ses qualités humaines ont non seulement rendu notre relation très agréable, mais ils sont aussi devenus des modèles.

Mes remerciements vont également à mon promoteur et à ma co-promotrice de thèse, Prof. Héla Kallel, pour leur soutien sans faille. La confiance et la liberté qu'ils m'ont offertes m'ont permis de me sentir davantage chercheur qu'étudiant en thèse.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude au **Prof. Frank Delvigne**, pour m'avoir permis de réaliser une partie de ma thèse dans son laboratoire. Merci à lui

pour ses connaissances scientifiques – particulièrement sa passion de la cytométrie- qu'il m'a si bien transmises, pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour le soutien et les encouragements que j'ai toujours reçus de sa part. Merci également de m'avoir engagé comme chercheur sur le projet « Single Cell », une thématique qui, dès le début de ma thèse, a révélé toute sa richesse.

Mes remerciements s'adressent aussi au **Prof. Isabelle George** et au **Prof. Micheline Vandebol** qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et membres du Jury. De même, je tiens à remercier sincèrement la présidente du jury, Madame **Prof. Sigrid Flahaut** et les autres membres du jury qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours de recherches.

De plus, mes remerciements les plus vifs vont au **Prof. Charles De Canniere** qui a accepté de continuer l'encadrement de cette thèse. Je lui suis très reconnaissant pour ses conseils et ses propos judicieux qui m'ont aidé à franchir ce pas.

Enfin, ma gratitude va à l'ensemble du personnel, des doctorants, chercheurs et techniciens de l'unité de Biotechnologie et de Bioprocédés (ULB), de l'unité de Biofermentation (IPT) et de l'unité MiPi (Gembloux) pour leurs encouragements et leur aide durant toute la période de ma thèse. Leur soutien, la qualité de leur savoir scientifique et leurs échanges amicaux pendant ces trois années de recherche ont été un cadeau précieux.

A ma copine Abir, mes remerciements ne pourront jamais égaler ton grand cœur qui m'a apporté du soutien au moment où j'avais besoin d'aide malgré la distance qui nous sépare. Merci mon cœur pour tout ce que tu fais pour moi: quand je te raconte mes soucis, tu m'écoutes et me remontes le moral. Merci pour ce que tu fais, pour ce que tu es. Ta tendresse et ton affection qui me comblent au quotidien, tu es vraiment la perle rare de ma vie !

A vous aussi, mes chers amis tunisiens-gembloutois, les futurs docteurs, Sofiene, Amine et Haithem, merci pour tout le soutien moral que vous m'avez apporté pendant ces années d'études mais également pour les excellents moments de détente que nous avons partagés.

Par ailleurs, je dédie ce travail à mes parents et à ma famille.

A mon père Mahfoud qui m'a inculqué le goût du savoir-vivre et qui m'a toujours encouragé dans mes études, même si ce fut au prix de nombreux sacrifices.

A ma mère, Mabrouka, pour tout son amour et la belle éducation qu'elle nous a offerte et dont nous sommes si fiers.

À ma sœur Sonia, docteur en Génie des Matériaux en France, pour son soutien moral tout au long de ma thèse. Même si nous résidons dans deux pays différents, elle a maintenu une présence et un soutien constants dont je la remercie.

À mes frères et mes sœurs, pour leurs nombreux contacts et leur amour.

Enfin, merci à tous ceux et celles qui m'ont aidé à franchir un horizon de ma vie

Sommaire

Remerciements	iii
Sommaire	vi
Résumé (en français)	x
Résumé (en anglais)	xii
Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. Les protéines recombinantes dans la biotechnologie : système eucaryote et procaryote.....	2
2. Paramètres liés à la production des protéines recombinantes	3
3. <i>Yarrowia lipolytica</i>	5
3.1. Historique, taxonomie et habitat	5
3.2. <i>Yarrowia lipolytica</i> est une levure dimorphique	5
3.2.1. Effet des sources de carbone	7
3.2.2. Effet des sources d'azote	7
3.2.3. Effet du pH	7
3.2.4. Stress anoxique	7
3.2.5. Choc thermique.....	7
3.2.6. Effet du mode de culture.....	8
3.3. Métabolisme.....	8
3.3.1. Métabolisme du glycérol	8
3.3.2. Métabolisme du glucose	9
3.3.4. Catabolisme des substrats hydrophobes : β -oxydation	12
3.3.5. Métabolisme d'azote	13
3.4. Caractéristiques génomiques et outils génétiques	13
3.5. Applications industrielles de <i>Y. lipolytica</i>	14

4. <i>Yarrowia lipolytica</i> , un système levure performant pour la production des protéines recombinantes	15
4.1. Promoteurs.....	16
4.1.1. Les promoteurs constitutifs	17
4.1.2. Les promoteurs hybrides	17
4.1.3. Les promoteurs inductibles par de l'acide oléique	18
4.2. Régulation de l'induction de gène <i>LIP2</i>	20
4.2.1. Effet des sources d'azote	20
4.2.2. Effet des sources de carbone	21
4.2.3. Effet d'oxygène	21
4.2.4. Induction de promoteur <i>POX2</i> et <i>LIP2</i> via des éléments de réponse oléate (ORE)....	22
5. <i>Yarrowia</i> et la cytométrie en flux	23
6. Conclusion.....	27
Références	29
Chapitre II: <i>Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast Yarrowia lipolytica</i>	42
Chapitre III: <i>pH and not cell morphology modulates pLIP2 induction in the dimorphic yeast Y. lipolytica</i>.....	56
Chapitre IV: <i>Multiplexed on-line flow cytometry for high content monitoring of Y. lipolytica bioprocesses based on hydrophobic substrat</i>.....	64
Chapitre V : Conclusions générales et perspectives.....	94

Communications

Communications orales

- **Hosni Sassi**, Jean-Marc Nicaud, Anne-Marie Crutz-Le Coq, Frank Delvigne and Patrick Fickers. Comparative study of *pPOX2* and *pLIP2* regulation in response to carbon source to enhance recombinant protein production in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. European Symposium on Biochemical Engineering Sciences (ESBES). 11th-14th September 2016, Dublin, Ireland
- **Hosni Sassi**; Frank Delvigne; Tambi Kar; Jean-Marc Nicaud; Anne-Marie Crutz- LeCoq; Patrick Fickers. Deciphering how *LIP2* and *POX2* promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. 14th International Congress on Yeasts (ICY14). Japon: 5th-10th September 2016
- **Hosni Sassi**, Jean-Marc Nicaud, Anne-Marie Crutz-Le Coq, Frank Delvigne and Patrick Fickers Comparative study of *pPOX2* and *pLIP2* regulation in response to carbon source to enhance recombinant protein production in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. European Symposium on Biochemical Engineering Sciences (ESBES). Dublin, Ireland 2016 11th-14th September 2016
- **Hosni SASSI**, H la KALLEK and Patrick FICKERS. Development of a cultivation process for the production of heterologous protein under *pLIP2* in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica* . Djerba-Tunisia. From 20th to 24th December 2015

Communications sous forme d'affiche

- **Hosni SASSI** and Patrick FICKERS. Regulation of *POX2* promoter for the development of heterologous protein production processes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Scientific research day 23th October 2014, MONS-Belgium.
- **Hosni Sassi**, Frank Delvigne, Jean-Marc Nicaud and Patrick Fickers. Real time monitoring of *Yarrowia lipolytica* culture growth using flow cytometry technique. International conference "Green chemistry and white biotechnology". May 12th-13th 2016 Gemboux- Belgium.
- **Hosni Sassi**, Frank Delvigne, Jean-Marc Nicaud, Patrick Fickers. Real time

monitoring of *Yarrowia lipolytica* culture growth using flow cytometry technique. International conference Advances in Cell Biology and Biotechnology. 11th-13th October 2015 Ukraine.

- **Hosni Sassi**, Jean-Marc Nicaud, Anne-Marie Crutz-Le Coq and Patrick Fickers. *POX2* promoter regulation: new strategies to enhance recombinant protein production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. 3rd European Congress of Applied Biotechnology. 27th September -1st October 2015 Nice-France.
- **Hosni SASSI**, H la KALLEK and Patrick FICKERS. Optimization of oleic acid feeding process to enhance heterologous protein production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* *pLIP2-LacZ* strain. Bio forum 13th May 2015 Liège. Belgium.
- **Hosni SASSI** and Patrick FICKERS. Novel strategies for the development of heterologous protein production processes under *POX2* promoter in the yeast *Yarrowia lipolytica*. 2nd international congress on bacteriology and infectious diseases- Chicago— USA- 17th-19th November 2014.

Résumé (en français)

Mots clés: *Yarrowia lipolytica*, production des protéines recombinantes, promoteurs, dimorphisme, cytométrie en flux

Les levures non conventionnelles, dont *Yarrowia lipolytica*, sont devenues des usines cellulaires attractives pour la production de protéines recombinantes. La sélection de promoteurs régulés impliqués dans le métabolisme de substrats hydrophobes est d'un grand intérêt pour une telle application. Dans ce cadre, l'objectif de ce projet est de mieux comprendre la régulation des promoteurs des gènes *POX2* et *LIP2* dans le but d'améliorer la production de protéines recombinantes chez *Y. lipolytica*.

D'un point de vue biotechnologique, l'analyse à l'échelle cellulaire est devenue une approche répandue pour l'analyse et l'optimisation des bioprocédés. Ainsi, l'objectif de la première partie de ce projet vise le développement d'une méthode d'analyse en ligne des paramètres de culture *Y. lipolytica* dans un milieu contenant de l'acide oléique. Cette technique consiste au couplage d'un bioréacteur à un cytomètre en flux via une interface d'échantillonnage automatique. Cette méthodologie a conduit principalement à une analyse rapide de la croissance cellulaire, de l'accumulation des lipides, du dimorphisme ainsi qu'à l'analyse du niveau d'induction des promoteurs chez *Y. lipolytica*.

Les systèmes d'expression basés sur les promoteurs *LIP2* et *POX2* sont difficiles à manipuler, principalement en raison de l'utilisation de substrats insolubles dans l'eau (acide oléique) comme inducteur. Dans ce travail, il a été clairement démontré que *pLIP2* est le promoteur de choix à utiliser pour développer un procédé de production de protéines recombinantes par culture de *Y. lipolytica* dans un milieu complexe. De plus, l'utilisation d'un mélange acide oléique-glucose 60/40 (w/w) a conduit à une amélioration du niveau d'induction du promoteur *LIP2* par un facteur de 10 par rapport à utilisation l'acide oléique. De plus, l'analyse à l'échelle cellulaire montre que ces deux substrats sont co-consommés par les cellules.

Enfin, la dernière partie de cette thèse a eu pour but d'étudier la régulation du promoteur *LIP2* par rapport à la transition dimorphique. Nos résultats ont clairement

montré que le changement morphologique chez *Y. lipolytica* n'a pas d'impact sur la régulation de *pLIP2*.

L'ensemble de ces études a conduit à une meilleure compréhension de la physiologie de *Y. lipolytica*, soulignant son potentiel avéré de production des protéines recombinantes.

Résumé (en anglais)

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, recombinant protein production, promoter, dimorphism, flow cytometry

The non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* has become an attractive cell factory for recombinant proteins production. The selection of strongly regulated promoters involved in hydrophobic substrate metabolism has become of a great interest for a given application. Therefore, the present work aim is to better understand the *POX2* and *LIP2* promoter regulations in order to enhance recombinant proteins production in *Y. lipolytica*.

From a biotechnological point of view, single cell analysis using a flow cytometry technic is a promising approach for the analysis and the optimization of bioprocesses. In this regard, the first part of this PhD focused on the development of a methodology based on online analysis of *Y. lipolytica* culture process in bioreactor. This methodology consists in the connection of the culture device with a flow cytometer by an automatic sampling interface. Mainly, this methodology led to a fast analysis of *Y. lipolytica* cell growth, lipids accumulation, dimorphism as well as the promoter induction level.

On the other hand, production processes using *pLIP2* and *pPOX2* are difficult to manage. The main difficulty resides in the use of hydrophobic substrates such as oleic acid witch are insoluble in water. In the present work, we claim that *pLIP2* is the promoter of choice to develop a recombinant proteins production process in a complex medium. Furthermore, we clearly showed that the co-feeding strategy based on oleic acid and glucose 60/40 (w/w) led the increase of *pLIP2* induction level by a factor of 10 with respect to use of oleic acid. *Y. lipolytica*

Finally, the last part of this thesis is aimed to study the regulation of the *pLIP2* with regard to the dimorphic transition in *Y. lipolytica*. Our results showed clearly that medium pH has an impact on the regulation of *pLIP2* but not the dimorphic change.

Altogether, this study allowed a better understanding *Y. lipolytica* cell physiology underscoring its potential as a host for recombinant proteins production.

Liste des figures

	Page
Figure 1: Chronologie de production des protéines recombinantes de <i>Y. lipolytica</i>	XV
Figure 2: Relation entre la morphologie cellulaire et la productivité	4
Figure 3: Morphologie de la cellule de <i>Yarrowia lipolytica</i> , forme ovoïde à gauche – forme filamenteuse à droite	6
Figure 4: Métabolisme du glycérol chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
Figure 5: Voies métaboliques des acides gras et des triglycérides par <i>Y. lipolytica</i> (modifiée)	11
Figure 6: Mécanisme de β -oxydation chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
Figure 7: Pourcentage d'utilisation des promoteurs pour la production des protéines recombinantes chez <i>Y. lipolytica</i> (Madzak & Beckerich, 2013)	20
Figure 8: Voie de régulation de <i>pLIP2</i> et de <i>pPOX2</i> par des substrats hydrophobes (modifié)	23
Figure 9: Principe de la cytométrie en flux	24
Figure 10: Vue microscopique des cellules de <i>Y. lipolytica</i> produisant la protéine Dsred	25
Figure 13: Illustration des différents paramètres physiologiques qui peuvent être mesurés par cytométrie en flux en ligne sans un protocole de coloration externe. Ces paramètres sont : la détection des microgouttelettes d'huile, la biomasse, les lipides intracellulaires, le dimorphisme ainsi que le niveau d'induction des promoteurs qui contrôlent la synthèse de la protéine fluorescence YFP	66
Figure 14: Boucle de régulation de l'ajout du mélange acide oléique glucose sur base d'analyse à l'échelle de la cellule de <i>Yarrowia lipolytica</i>	98

Avant-propos

La biotechnologie blanche est un secteur où l'innovation est importante et qui a de tout temps été le sujet d'une importante synergie entre recherche académique et applications industrielles. Ainsi, la biotechnologie industrielle ne cesse d'envahir les différents secteurs de la société moderne. Au sens large, la biotechnologie industrielle contribue considérablement au développement de la chimie verte qui vise à convertir des matières premières renouvelables (sucres, huiles...) en une large gamme de produits des biomolécules, notamment les protéines, enzymes, additifs alimentaires, solvants, produits pharmaceutiques... Celle-ci fait appel à des réactions biologiques qui font intervenir des catalyseurs biologiques (enzymes) et des procédés de fermentation mettant en œuvre des cultures microbiennes ou des cellules animales ou végétales.

À côté des bioproduits à faible valeur ajoutée (alcools, acides aminés, enzymes, etc.), la demande mondiale pour des produits biotechnologiques à fortes valeurs ajoutées a connu un essor considérable. Par ailleurs, la production de protéines recombinantes d'intérêt médical (vaccins, protéines thérapeutiques, enzymes...) par cultures des micro-organismes, dont les levures, est un procédé abondamment utilisé dans l'industrie biopharmaceutique. L'intérêt scientifique porté à cette filière est considérable. En effet, une recherche à l'aide des mots clés « recombinant protein expression » dans la base de données NCBI révèle 147 429 publications scientifiques dont plus de 7000 traitent de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 3092 de la levure *Pichia pastoris* et uniquement 118 de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* (données octobre 2016). **Dans ce cadre, en se basant sur les connaissances issues de travaux antérieurs, l'enjeu scientifique de cette thèse réside, en la mise en place d'un procédé optimisé de production de protéines recombinantes chez la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.** Une synthèse des connaissances actuelles relatives à ce sujet sera présentée dans le **premier chapitre** de cette thèse.

Les levures non conventionnelles ont été largement utilisées pour produire des protéines recombinantes comme une alternative à *S. cerevisiae*. Parmi ces levures, *Yarrowia lipolytica*, micro-organisme non pathogène dont la physiologie et la génétique ont été étudiées en détail, est un hôte eucaryote de choix pour l'expression de protéines hétérologues (Figure 1).

Heterologous protein production in *Yarrowia*:

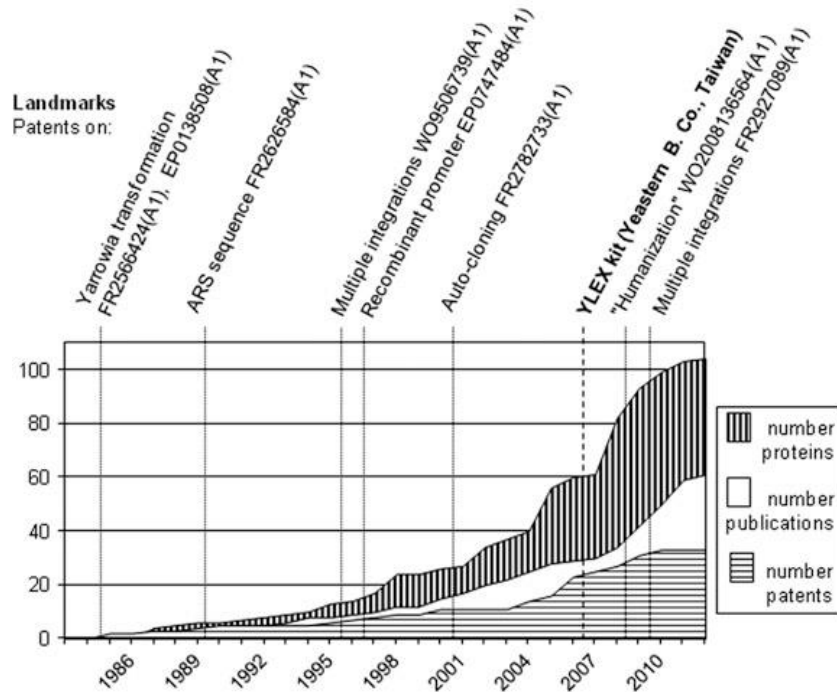


Figure 1 : Chronologie de production des protéines recombinantes de *Y. lipolytica*

La plupart des promoteurs utilisés pour l'expression hétérologue par cette levure sont impliqués dans la voie de dégradation des substrats hydrophobes tels que l'acide oléique. Il est intéressant de noter que le niveau d'expression du gène dépend significativement de son promoteur. Dans ce cadre, l'objectif principal de cette thèse est l'étude de la régulation des promoteurs pour augmenter la production des protéines recombinantes par *Y. lipolytica*.

Dans un premier lieu, une étude comparative de la régulation des deux promoteurs cités précédemment (*pPOX2* et *pLIP2*) par l'utilisation de différentes sources de carbone (glucose, glycérol et acide oléique ou un mixte entre eux) fera l'objet **du deuxième chapitre**. La mesure du niveau d'induction a été assurée par l'utilisation des protéines modèles comme la β -galactosidase codée par le gène *LacZ* ou la protéine fluorescente rouge (Redstar2) qui ont été exprimées sous le contrôle des promoteurs en question. Ce chapitre de la thèse a pour but de sélectionner le promoteur le plus fort, le milieu le plus performant ainsi que les sources de carbone les plus appropriées pour obtenir un niveau maximal d'induction. Ainsi, le promoteur choisi sera utilisé pour le reste du travail de thèse.

Par ailleurs, *Y. lipolytica* est une levure dimorphique. Plusieurs facteurs impliqués dans le phénomène de transition dimorphique ont déjà été identifiés, dont des

sources nutritionnelles notamment la source de carbone. Toutefois, la capacité de *Y. lipolytica* à se développer sous une forme ovoïde ou filamenteuse pourrait avoir un impact sur le niveau d'induction des promoteurs. Ainsi, les connexions et interactions entre ces différents mécanismes n'ont jamais été caractérisées, empêchant dès lors l'obtention d'une vue globale de l'impact de ce phénomène sur le rendement du procédé. C'est l'objectif principal du **troisième chapitre** qui sera de répondre à la question suivante : le dimorphisme peut-il affecter le rendement de production des protéines recombinantes chez *Y. lipolytica* ?

Dans un deuxième lieu, de nouvelles méthodes d'analyse et de contrôle des bioprocédés basées sur la culture de *Y. lipolytica*, en présence des substrats hydrophobes, ont été développées en utilisant la technique de cytométrie en flux. Ainsi, cette étude fera l'objet du **quatrième chapitre**.

Finalement, l'ensemble des données collectées ont pour but de créer un lien direct entre les sources de carbone, le dimorphisme et les interactions de promoteurs (activation/inhibition), en particulier le promoteur LIP2.

Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les protéines recombinantes dans la biotechnologie : système eucaryote et procaryote

La diversité surabondante des micro-organismes constitue une ressource inépuisable pour diverses applications en recherche et en industrie. A l'image de l'intérêt croissant pour les protéines recombinantes, le développement et l'optimisation des nouveaux procédés de production ont connu un véritable essor dans le domaine de la biotechnologie industrielle. À l'heure actuelle, il existe un éventail de plus en plus large pour le choix du système d'expression le plus efficace. En effet, le défi majeur est de sélectionner un système qui permet une grande productivité à un faible coût de production.

Le premier système de production exploité pour l'expression de protéines recombinantes dans l'industries pharmaceutiques est le système procaryote tel qu'*Escherichia coli* (Itakura, et al., 1977). Par la suite, il s'est avéré que ce système de production souffrait de plusieurs problèmes, dont l'incapacité d'effectuer des modifications post-traductionnelles (PTM). Dès lors, d'autres systèmes d'expression hétérologue ont été développés, notamment les systèmes d'expression eucaryotes. En effet, les différents systèmes utilisés à l'heure actuelle sont les cellules d'insectes, les levures, les cellules mammifères (Sorensen, 2010). En effet, presque 50% des protéines hétérologues sont produites par la bactérie *E.coli* (~30%) ou par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (~20%). Toutefois, l'exploitation des cellules d'insectes ou des cellules de mammifères en tant que systèmes d'expression des protéines recombinantes est respectivement de 1% et 10%. Et les 39 % restant alors ?

En particulier, les levures représentent une bonne alternative aux systèmes procaryotes tels que *S. cerevisiae* et *Pichia pastoris* (Porro, et al., 2011). En effet, les levures offrent un certain nombre d'avantages en tant qu'hôtes pour l'expression des protéines hétérologues. D'abord, elles sont capables de se développer avec une forte concentration cellulaire dans des milieux de culture peu coûteux. Ensuite, elles présentent une forte capacité de sécrétion des protéines tout en assurant des modifications post traductionnelles eucaryotiques. Toutes ces caractéristiques font des levures le système le plus adapté pour la production des protéines recombinantes (Porro, et al., 2005).

2. Paramètres liés à la production des protéines recombinantes

Initialement, la culture de micro-organismes pour la production de protéines recombinantes est un processus multi-opérationnel qui fait appel à une approche multidisciplinaire mêlant biologie avec les sciences de l'ingénieur. Ces approches peuvent aller de la performance de la souche jusqu'aux conditions et stratégies de production. C'est une stratégie qui a été largement utilisée par l'industrie pharmaceutique, puis, depuis le milieu des années 80, dans le secteur agro-alimentaire, par confection d'ingrédients à haute fonctionnalité.

Après avoir choisi le bon système d'expression, la première étape dans ce genre de procédé est de choisir le promoteur adéquat permettant une forte production de la protéine d'intérêt. Le choix de celui-ci dépend essentiellement de la nature de la protéine à exprimer.

Toutefois, il est intéressant de noter que le choix d'un milieu de culture adéquat est aussi primordial. En général, il existe deux types de milieux de culture, les milieux définis appelés aussi milieux synthétiques dont la composition est chimiquement connue et les milieux complexes qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée et variable (hydrolysats de protéines, extrait de levure). Ainsi, le choix d'un milieu dépend non seulement du rendement de production, mais aussi des applications ultérieures de la protéine en question. En effet, le milieu défini est plus favorisé lors de la production des protéines à haute valeur ajoutée telles que les protéines thérapeutiques. Toutefois, un milieu complexe est souvent utilisé pour la production des protéines à faible valeur ajoutée destinées à l'agroalimentaire, l'environnement, etc. Qu'il soit synthétique ou complexe, l'optimisation des sources nutritives dans chaque milieu est indispensable pour maximiser le rendement de production du produit désiré.

La compréhension de la régulation des promoteurs (induction/ répression) vis-à-vis de la nature des sources nutritives, en particulier la source de carbone, est l'un des paramètres incontournables pour l'optimisation du procédé de production de protéines recombinantes (Weinhandl, *et al.*, 2014). Par ailleurs, la quantification du niveau d'induction des promoteurs fait appel à l'utilisation de gènes rapporteurs en raison de la facilité de dosage de leur niveau d'expression (comparativement à d'autres techniques telles que la quantification de mRNA correspondants).

Les techniques d'analyse fondées sur l'utilisation des protéines fluorescentes font partie des méthodes les plus couramment utilisées dans le domaine de la biologie cellulaire, entre autres l'étude de la régulation des promoteurs. De plus, l'utilisation de protéines fluorescentes s'avère utile pour la compréhension de la réponse dynamique du promoteur à étudier qui pourrait être compatible pour une analyse spécifique du niveau d'induction à l'échelle cellulaire, notamment par la technique de la cytométrie en flux.

L'exploitation des micro-organismes filamenteux dans des bioprocédés industriels pour la production des biomolécules connut un grand essor (Walisko, *et al.*, 2015). Un des obstacles majeurs pour la mise en place de ce type de bioprocédés est cependant la complexité de leur morphologie lors de leur culture en milieu liquide. En effet, l'hétérogénéité morphologique peut présenter un spectre qui peut aller de la croissance sous la forme ovoïde jusqu'à la forme mycélienne. Ce phénomène qui apparaît en cours de procédé influence de manière significative le rendement final et la productivité (Grimm, *et al.*, 2005). L'adaptation d'une forme par rapport à l'autre dépend éventuellement de plusieurs facteurs comme la composition du milieu de culture, la concentration de l'inoculum, les conditions de culture, etc. Le choix de la forme appropriée pour un bioprocédé varie donc en fonction de plusieurs paramètres (figure 2). Ainsi, l'établissement d'un lien entre forme/ productivité a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche dans le but d'améliorer et d'intensifier les bioprocédés basés sur la culture de micro-organismes filamenteux (Papagianni, 2004, Grimm, *et al.*, 2005).

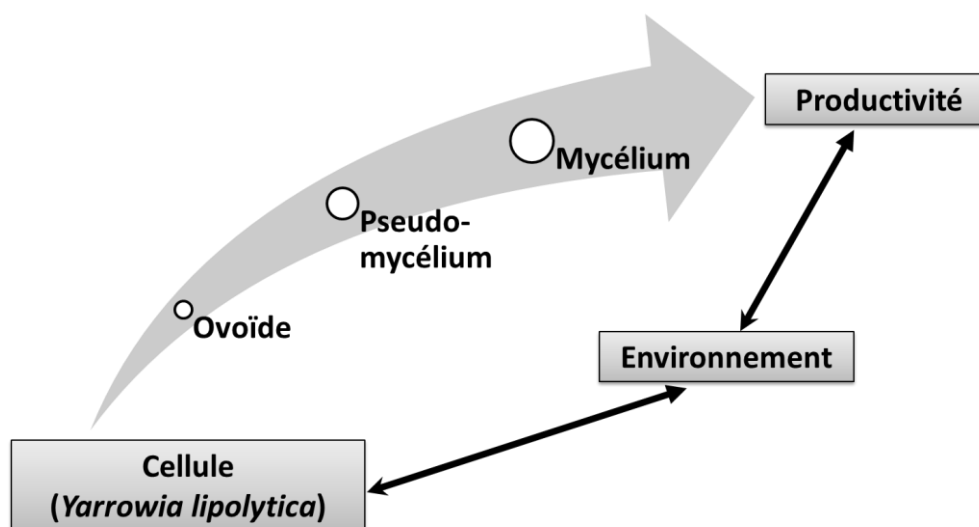


Figure 2: Relation entre la morphologie cellulaire et la productivité

3. *Yarrowia lipolytica*

3.1. Historique, taxonomie et habitat

C'est une levure non pathogène, qui appartient à la classe des *ascomycètes*, à la famille des *Saccharomycetaceae* et la sous-famille des *Saccharomycetoideae*. Elle est reconnue comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) (Barth & Gaillardin, 1996).

Cette espèce a pu trouver une niche écologique dans des environnements riches en protéines et lipides tels que les fromages (camembert), les saucissons séchés ainsi que les effluents industriels riches en lipides et/ou matières grasses (Barth & Gaillardin, 1996).

Sa classification taxonomique a subi plusieurs changements. Cette levure a été nommée *Candida lipolytica* à la fin des années 60 (Wickerham, *et al.*, 1970). Par la suite, la découverte de son mode de reproduction sexuée qui consiste en un bourgeonnement bipolaire a conduit à la renommer *Endomycopsis lipolytica*. Enfin, le nom générique *Yarrowia* a été proposé par van der Walt et von Arx (1980), en hommage au taxonomiste David Yarrow (van der Walt & von Arx, 1980).

3.2. *Yarrowia lipolytica* est une levure dimorphique

Y. lipolytica est une levure dimorphique. En effet, dans certaines conditions, elle croît sous une forme ovoïde et dans d'autres, sous une forme filamenteuse (Figure 3) (Dominguez, *et al.*, 2000). Les hyphes ont une paroi cellulaire tubulaire, formée souvent par des compartiments séparés par des parois internes, les septums qui circulent librement à travers le noyau et les différents organites cellulaires. Dans ce cas, la croissance se fait essentiellement à l'extrémité de l'hyphe et est dite « apicale ». La décision de s'adapter à une morphologie ou à une autre dépend majoritairement de l'état physiologique de la cellule et/ou de son micro-environnement.

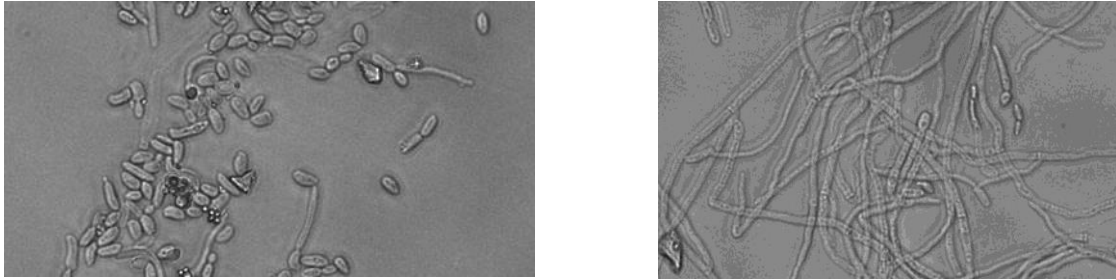


Figure 3: Morphologie de la cellule de *Yarrowia lipolytica*, forme ovoïde à gauche
– forme filamenteuse à droite

En effet, la transition dimorphique chez *Y. lipolytica* est liée essentiellement à un stress au cours de la croissance cellulaire, contrairement à d'autres micro-organismes tels que *Candida albicans* dont la transition dimorphique est reliée à sa pathogénicité (Szabo & Stofanikova, 2002).

Pour mieux comprendre le mécanisme de régulation du dimorphisme, plusieurs études sur le plan génomique ont été menées. D'une part, Cervantez-Chavez et Ruiz Herrera (2006) ont montré que l'induction du gène *STE11*, codant pour une protéine kinase, est responsable du développement de la forme filamenteuse (Cervantes-Chávez & Ruiz-Herrera, 2006). D'autre part, une souche mutante disruptée pour le gène *TPK1*, qui code pour une protéine de kinase, se développe uniquement sous la forme filamenteuse (Cervantes-Chávez, *et al.*, 2009). Récemment, Morales Vargas (2012) a identifié une série de gènes impliqués dans ce mécanisme (Morales-Vargas, *et al.*, 2012). Cette étude a révélé 226 gènes impliqués dans ce phénomène, dont 61 sont des régulateurs positifs et 165 des régulateurs négatifs pour le dimorphisme.

En conclusion, le nombre élevé de gènes impliqués dans ce phénomène indique bien la complexité de la régulation de la transition dimorphique.

D'après la littérature, le dimorphisme chez *Y. lipolytica* est principalement modulé en réponse à des changements des facteurs environnementaux (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002, Szabo & Stofanikova, 2002). Les différents facteurs intervenant dans la modulation de ce phénomène sont présents ci-après.

3.2.1. Effet des sources de carbone

D'un côté, *Y. lipolytica* se développe sous la forme de levure en présence de glucose dans le milieu, alors qu'en présence de n-acétylglucosamine (NAGlc), la forme filamenteuse est majoritairement observée, indépendamment du pH du milieu. (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002). D'un autre côté, il a été clairement montré que le citrate de sodium favorise le développement de la forme filamenteuse à des concentrations inférieures à 5 mM lorsqu'il est utilisé comme unique source de carbone (Palande, *et al.*, 2014).

3.2.2. Effet des sources d'azote

Chez *Yarrowia lipolytica*, de faibles concentrations en ammonium (supérieur à 0,005 %) favorisent la croissance sous la forme filamenteuse dans un milieu solide (Szabo & Stofanikova, 2002). Aussi, l'utilisation du sel d'ammonium favorise le développement de la forme filamenteuse, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation du glutamate ou de la glutamine (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002). Il a été montré que la forme filamenteuse chez *Yarrowia lipolytica* est aussi induite par la présence du sérum de bovin dans un milieu de culture (Dominguez, *et al.*, 2000).

3.2.3. Effet du pH

Un pH proche de la neutralité induit la croissance de la levure *Y. lipolytica* sous la formation mycélienne alors qu'un pH acide favorise sa croissance sous la forme de levure, avec un faible pourcentage de la forme filamenteuse qui s'annule à pH égal à 3 (González-López, *et al.*, 2006, Morales-Vargas, *et al.*, 2012).

3.2.4. Stress anoxique

En effet, la plupart des champignons, dont *Y. lipolytica*, sont des aérobies stricts. De ce fait, des conditions semi-anoxiques stimulent le développement de la forme filamenteuse chez cette souche (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002).

3.2.5. Choc thermique

Un choc thermique à 37- 38°C pendant 15 min avant l'inoculation de la souche *Y. lipolytica* dans un milieu de culture, favorise son développement sous la forme filamenteuse (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002). De même, lorsque les cellules en phase exponentielle sont incubées à faible température (~4°C) pendant 3 heures avant l'inoculation, les cellules se développent sous la forme filamenteuse.

3.2.6. Effet du mode de culture

Comme il a été mentionné précédemment, le pH du milieu joue un rôle important sur le changement morphologique chez *Y. lipolytica*. Récemment, Timoumi et ses collaborateurs (2016) ont montré que la culture en mode *batch* de la souche *Y. lipolytica* W29 à pH acide (4,5) ou à pH neutre favorise la prédominance de la forme filamenteuse (80%). Cependant, la culture en mode continu, dans les mêmes conditions, favorise la prédominance de la forme ovoïde. Ceci suggère que le changement morphologique de la souche *Y. lipolytica* est autant affecté par le mode de culture que par le changement du pH du milieu (Timoumi, *et al.*, 2017).

3.3. Métabolisme

Y. lipolytica est capable de métaboliser une grande variété de substrats carbonés tels que les acides organiques (citrate), les sucres (glucose, mannitol, galactose), le glycérol, mais aussi l'éthanol à une faible concentration (inférieure à 3 %) (Barth & Gaillardin, 1997). Comme son nom l'indique, *Y. lipolytica* est aussi capable de se développer dans un milieu riche en substrats hydrophobes tels que des alcanes (décane, hexadane), des lipides comme les acides gras (acide oléique, acide ricinoléique, acide palmitique ou acide laurique), des triglycérides (van der Walt & Yarrow, 1984, Barth & Gaillardin, 1997).

Toutes ces caractéristiques en ont fait un organisme modèle pour diverses applications biotechnologiques (chimiques environnement, agro-alimentaire) (Darvishi Harzevili, 2014).

3.3.1. Métabolisme du glycérol

Le glycérol est l'un des constituants principaux de la matière grasse. En raison de son faible coût, cette source de carbone est devenue une alternative à l'utilisation d'autres sources de carbone tel le glucose et le saccharose.

Dans un premier temps, le glycérol, est phosphorylé par l'enzyme glycérol kinase, codée par le gène *GUT1*, pour former le glycérol -3-phosphate (Figure 4). Ce dernier est ensuite transformé, via une glycérol 3 phosphate déshydrogénase (codée par le gène *GUT2*), en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ce dernier est considéré comme un précurseur des différentes voies métaboliques comme l'accumulation des lipides, la production des acides organiques (citrique, α -ketoglutarique, puryviqque,

etc.) ou la biosynthèse des métabolites tels que l'erythritol et le mannitol (Rywińska, *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la vitesse de croissance de *Y. lipolytica* en présence du glycérol est plus importante ($0,3 \text{ h}^{-1}$) que celle obtenue par des cultures en présence du glucose ($0,24 \text{ h}^{-1}$). Toutefois, la culture de *Y. lipolytica* en présence du glycérol requiert une forte demande en oxygène ($0,44 \text{ mol/g}_{\text{CDW}}/\text{h}$) contrairement à la culture en présence du glucose ($0,42 \text{ mol/g}_{\text{CDW}}/\text{h}$) (Workman, *et al.*, 2013).

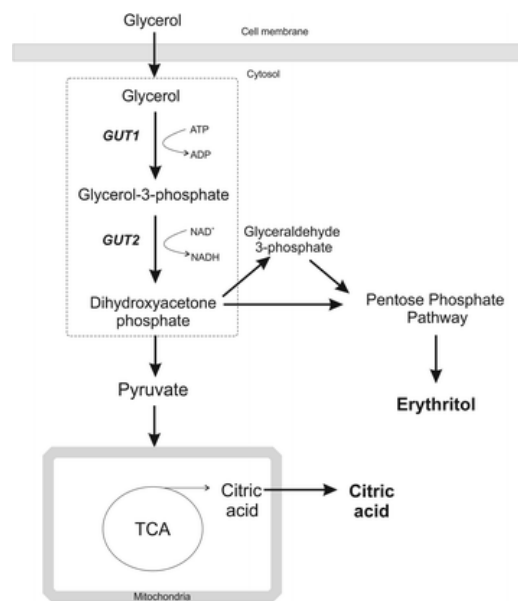


Figure 4: Métabolisme du glycérol chez *Yarrowia lipolytica* (Rywińska, *et al.*, 2013)

3.3.2. Métabolisme du glucose

Le glucose est le substrat le plus couramment utilisé pour la culture de micro-organismes comme les levures. Dans un premier lieu, la molécule du glucose est assimilée et exportée dans le cytoplasme à travers la membrane cytoplasmique par l'hexokinase 1, l'enzyme clé qui catalyse la première réaction de glycolyse chez *Y. lipolytica* (Petit & Gancedo, 1999). Par ailleurs, un seul gène (*HXT1*) a été identifié chez *Y. lipolytica* contre 18 gènes Hexokinase identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Fickers, *et al.*, 2005).

Une fois exportée dans le cytosol, la molécule du glucose subit une cascade de réactions enzymatiques, la glycolyse. La glycolyse est un ensemble de dix réactions biochimiques, catalysées par dix enzymes différentes, qui se déroulent dans le

cytosol de la cellule qui sert à convertir une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate.

La glycolyse est d'une importance cruciale pour la cellule. Elle sert à la production d'énergie pour la levure, sous forme de molécules d'ATP, des molécules précurseurs (pyruvate) et réductrices (NADH) pour les voies de biosynthèse.

3.3.3. Métabolisme des substrats hydrophobes

Le catabolisme de ces substrats peut prendre place dans différents compartiments cellulaires (Fickers, *et al.*, 2005). Chez *Y. lipolytica*, le catabolisme des triglycérides nécessite, dans un premier temps, un système lipasique, essentiellement *LIP2*, permettant de les hydrolyser en acides gras et en glycérol (Figure 5). Dans un deuxième temps, les acides gras sont ensuite adsorbés à la surface de la cellule pour y être incorporés.

En raison de son insolubilité dans l'eau, *Y. lipolytica* possède deux mécanismes pour augmenter son adhésion à la surface cellulaire. Le premier mécanisme est appelé « transfert assisté par des bio-surfactants » (Albuquerque, *et al.*, 2006). En effet, des bio-surfactants produits par la cellule, tels que le liposan, permettent d'augmenter la solubilité des composés hydrophobes par la formation des micelles.

Dans certains cas, la sécrétion des bio-surfactants peut ne pas être suffisante. Dans ce cas, la cellule adopte un second mécanisme appelé « accession interfacial direct » qui consiste en un réarrangement de la surface membranaire pour assurer une adhérence directe du substrat avec la cellule, notamment l'amincissement de la paroi cellulaire, l'augmentation du volume de l'espace périplasmique, l'apparition d'invaginations dans la membrane (protubérances) et l'apparition des pores associés aux structures du réticulum endoplasmique connectant les protubérances extramembranaires à l'intérieur de la cellule (Mlickova, *et al.*, 2004, Fickers, *et al.*, 2005).

Au niveau de leur incorporation, si la concentration des acides gras est supérieure à 10 μ M, leur mécanisme de passage dans le cytoplasme est assuré par une diffusion passive. Sinon, leur passage est assuré par des transporteurs spécifiques comme *Faa1* (long chain fatty acyl-CoA Synthetase) (Dirusso & Black, 2004). Une fois exportés dans le cytoplasme, les acides gras sont d'abord activés sous forme d'ester-CoA par la protéine *Faa1*.

Selon leur métabolisme, les acides gras sont soit directement métabolisés afin de fournir l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire via la chaîne de β -oxydation,

soit accumulés en réserve lipidique sous la forme de triglycérides (TAG) dans des compartiments spécifiques, les corps lipides (Beopoulos, *et al.*, 2008). La formation des lipides intracellulaires chez *Yarrowia lipolytica* peut être réalisée soit par accumulation des lipides extracellulaires, soit par synthèse *de novo* à partir de substrats non lipidiques (Beopoulos, *et al.*, 2009). La biosynthèse des lipides neutres chez les levures dont fait partie *Y. lipolytica* est menée dans deux compartiments différents: le réticulum endoplasmique (RE) et les corps lipidiques (CL) (Beopoulos, *et al.*, 2009). Les acétyl CoA sont exportés vers le cytoplasme après leur synthèse via l'acide gras synthase, enzyme clé des micro-organismes oléagineux. À ce stade, ils vont subir une cascade de réactions d'estérification pour synthétiser des triacylglycérols (TAG) ou des esters de stérol (ES).

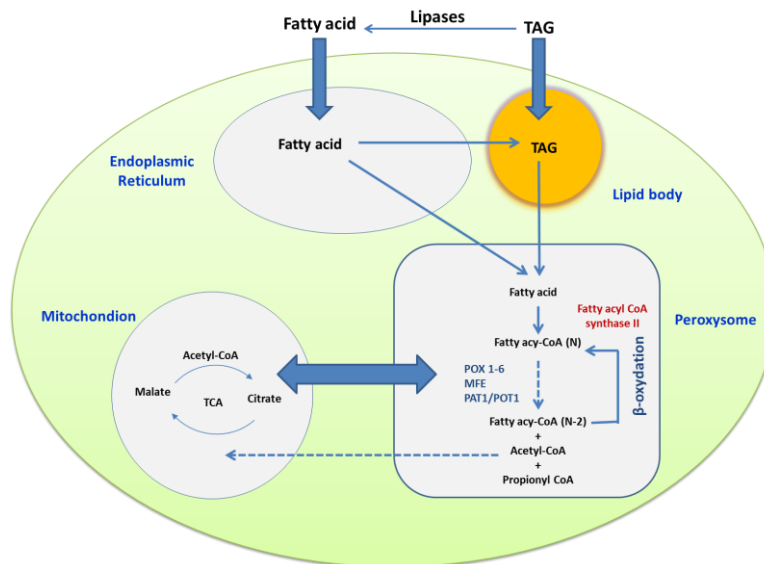


Figure 5: Les voies des acides gras et des triglycérides chez *Y. lipolytica* (modifiée) (Fickers, *et al.*, 2005).

La composition en lipides neutres est extrêmement variable. Elle dépend de la composition du milieu de culture et des conditions hydrodynamiques de la culture (pH, T, Po₂,...) (Athenstaedt, *et al.*, 2006, Beopoulos, *et al.*, 2009). De plus, une analyse de la composition de ces organelles a révélé la présence de certaines protéines associées à des lipides neutres qui semblent être impliquées dans des processus de synthèse, de dégradation et de transport des lipides intracellulaires.

3.3.4. Catabolisme des substrats hydrophobes : β -oxydation

La β -oxydation est une voie réservée au catabolisme des acides gras. Dans ce cas, deux provenances des acides gras sont possibles : soit du milieu extracellulaire (pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire), soit des réserves internes des lipides dans des corps lipidiques. Dans ce deuxième cas, en fonction de l'état physiologique de la levure, les lipides ainsi cumulés peuvent être re-métabolisés dans le peroxysome via la voie de la β -oxydation (Figure 6) (Fickers, *et al.*, 2005, Dulermo & Nicaud, 2011).

La β -oxydation comporte quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée de l'acyl-CoA est réduite de deux atomes de carbone via une cascade de réactions métaboliques qui se déroulent dans l'ordre suivant : l'acyl-CoA oxydase, le 2-énoyl-CoA hydratase, le 3- hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-cétoacyl-CoA thiolase.

La première étape de la β -oxydation est catalysée par différentes acyl CoA oxydases (Aox), codées par les gènes POX (*POX1* à *POX6*), conduisant à la transformation de thioester en 2-trans-énoyl-CoA. Les différents Aox possèdent une spécificité vis-à-vis du substrat (Acyl-CoA). Par exemple, Aox2 a une spécificité envers les Acyl-CoA à longue chaîne carbonée telle que l'acide oléique. En revanche, Aox3 a une spécificité envers les Acyl-CoA à courte chaîne (Wang, *et al.*, 1999). Les seconde et troisième étapes de ce processus sont catalysées par l'enzyme multifonctionnelle (MFEP) codée par le gène *MFE1*. Le trans-2énoyl-CoA ainsi formé subit deux réactions successives (hydratation/ déshydratation) pour former le 3-cétoacyl-CoA. Ce dernier est catalysé par le 3-cétoacyl-CoA thiolase, libérant ainsi un acétyl CoA et un acyl-CoA dépourvus de deux carbones qui rentrent de nouveau dans la spirale de la β -oxydation.

Tous les gènes impliqués dans ce mécanisme sont fortement induits en présence d'acide oléique et réprimés par du glucose (Smith, *et al.*, 2007). De plus, l'activation de cette voie de dégradation dépend essentiellement de la nature de l'acyl-CoA, de la disponibilité en substrat, de la présence de coenzyme A, d'acétyl-CoA ou selon le ratio NAD⁺ /NADH.

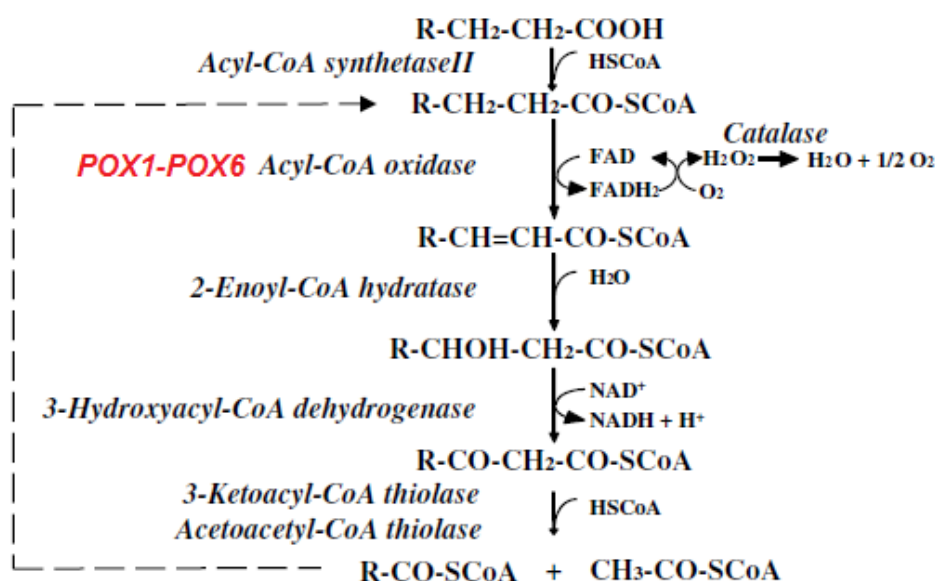


Figure 6: Mécanisme de β -oxydation chez *Yarrowia lipolytica* (Fickers, *et al.*, 2005).

3.3.5. Métabolisme d'azote

L'azote sous ses formes organique d'acide aminé, de peptides, de protéines ou d'urée est plus préférable pour la production de la lipase LIP2 chez *Y. lipolytica* contrairement à celui sous la forme de sels minéraux (nitrates et nitrites) (Fickers, *et al.*, 2004). Cette dernière sera présentée en détail dans la section 4.2.

L'utilisation des azotes organiques implique l'utilisation d'un système protéolytique. Le système protéolytique extracellulaire de *Yarrowia* est composé de deux protéases : la protéase alcaline extracellulaire (AEP) et la protéase acide extracellulaire (AXP). Le mécanisme de régulation de ce système dépend essentiellement du pH du milieu de culture et de la quantité de protéine extracellulaire (Barth & Gaillardin, 1997).

3.4. Caractéristiques génomiques et outils génétiques

Les génomes de la souche E150 de *Y. lipolytica* ont été séquencés et caractérisés (Dujon, *et al.*, 2004). Son génome est de 20,5 Mb, repartit sur six chromosomes. Son génome est caractérisé par son contenu élevé en (G+C) et par la forte densité de gènes dont un gène est repéré chaque 3,3 Kb (Bon, *et al.*, 2003). L'analyse de son

génomique révèle la présence de plusieurs familles multigéniques impliquées dans l'assimilation d'une grande variété de substrats (Darvishi Harzevili, 2014).

Plusieurs outils génétiques ont été développés tels que les marqueurs de sélection, un système de transformation, un système de délétion des gènes, des vecteurs réplicatifs et intégratifs, des promoteurs fortement régulés ou constitutifs. Tous ces outils ont été révisés et présentés avec plus de détails dans plusieurs revues (Barth & Gaillardin, 1996, Madzak, *et al.*, 2004, Madzak, 2015).

3.5. Applications industrielles de *Y. lipolytica*

En raison de la capacité de son métabolisme à assimiler une large gamme de substrats carbonés, plusieurs projets de recherche impliquant *Y. lipolytica* ont été menés, portant principalement sur des procédés de bioconversions pour les industries chimiques, alimentaires, environnementales et pharmaceutiques (Darvishi Harzevili, 2014). Depuis les années soixante, cette levure a été exploitée pour sa capacité à produire des protéines d'organismes unicellulaires (POU ou Single Cell Proteins « SCP ») et des acides organiques, principalement l'acide citrique.

Cette levure est actuellement devenue un organisme modèle pour l'étude du dimorphisme (Dominguez, *et al.*, 2000), du métabolisme lipidique (Beopoulos *et al.*, 2009) et en particulier en tant qu'un système de production des protéines recombinantes (Fickers, *et al.*, 2011) (Madzak, 2015). L'étude de ces caractéristiques a été facilitée par le développement des outils en biologie moléculaire et par la récente mise sur le marché d'une puce à ADN commercialisée par Eurogentec.

3.6. Production de la lipase extracellulaire *LIP2* par *Yarrowia lipolytica*

La capacité de sécrétion de lipases par *Yarrowia* a été mise en évidence pour la première fois par Peters et Nelson en 1948 (Peters & Nelson, 1948). L'analyse du génome de *Y. lipolytica* a révélé la présence de 16 gènes codants pour des lipases extra et intracellulaires. Cette particularité génomique en fait un producteur potentiel de lipases, en particulier la lipase extracellulaire *LIP2* (YLLIP2) codée par le gène *LIP2* (Ota, *et al.*, 1982, Pignede, *et al.*, 2000).

En 2007, une procédure mettant en œuvre la purification et la caractérisation enzymatique de YLLIP2 a été réalisée (Aloulou, *et al.*, 2007). En effet, cette protéine présente une forte stabilité à pH acide. De plus, elle est capable de catalyser préférentiellement la réaction d'hydrolyse des triglycérides à longues chaînes de

résidus oléiques triglycérides, libérant ainsi des acides gras et, successivement, des diglycérides, des monoglycérides et du glycérol. Une telle caractéristique enzymatique a fait de cette lipase une protéine modèle pour diverses applications biotechnologiques comme l'environnement, l'industrie pharmaceutique et l'agroalimentaire (Fickers, *et al.*, 2011).

De ce fait, l'optimisation et le développement des procédés de production de cette lipase ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche.

En effet, le rendement de production de la lipase *LIP2* a été amélioré par mutagenèse avec un rendement de l'ordre de 0,5 g/L, soit un facteur de 40 et une sensibilité moindre à la répression catabolique par rapport à la souche sauvage dans un milieu contenant uniquement de l'acide oléique (Destain, *et al.*, 1997, Fickers, *et al.*, 2003). La production de lipase dépend de plusieurs facteurs environnementaux, de la culture, dont la source nutritionnelle de carbone ou d'azote, de la température et de l'aération. Les facteurs environnementaux influençant la régulation du gène *LIP2* seront présentés plus en détail dans la section suivante.

4. *Yarrowia lipolytica*, un système levure performant pour la production des protéines recombinantes

La levure *S. cerevisiae* a été le premier système de levure à avoir été utilisé pour la production de protéines recombinantes. Cependant, ce système a révélé certaines limites qui ont été surmontées par la suite (Shusta, *et al.*, 1998).

Entre temps, le développement des systèmes d'expression des levures alternatives autres que *S. cerevisiae* a beaucoup progressé, entre autres le groupe des levures dites « non conventionnelles » : *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* et les levures dimorphiques *Arxula adenivorans* et *Yarrowia lipolytica* (Dominguez, *et al.*, 1998). Ces systèmes d'expression ont montré de meilleures performances par rapport à *S. cerevisiae* en termes de productivité et de sécrétion (Buckholz & Gleeson, 1991, Dominguez, *et al.*, 1998, Cereghino & Cregg, 2000, Gellissen, *et al.*, 2005).

En particulier, la levure *Y. lipolytica* est utilisée dans de nombreuses applications biotechnologiques en raison de sa capacité métabolique et de sa forte capacité de sécrétion de diverses protéines comme les protéases, les lipases, etc. (Barth & Gaillardin, 1996, Bankar, *et al.*, 2009). À côté des protéines naturellement produites,

Y. lipolytica est actuellement utilisée comme un système d'expression performant de production des protéines recombinantes (Nicaud, *et al.*, 2002, Madzak & Beckerich, 2013).. Dans cette optique, une étude comparative des performances des levures par rapport à *S. cerevisiae* pour produire six protéines hétérologues a été menée (Müller, *et al.*, 1998). L'analyse des cinétiques de productions obtenues montre que le groupe des levures non conventionnelles présentait un meilleur rendement de production que *S. cerevisiae* et que leurs performances variaient significativement avec la nature de la protéine à produire. Le système d'expression le plus attractif, surtout en termes de reproductibilité et de performance, était *Y. lipolytica*.

Dès lors, ce système d'expression a connu un progrès remarquable grâce au développement des outils moléculaires, notamment des souches, des vecteurs intégratifs, des promoteurs, des marqueurs de sélection et des vecteurs réplicatifs comme expliqué précédemment. Ces outils sont commercialement disponibles sous la forme d'un kit d'expression hétérologue commercialisé par la firme Yeastern Biotech Co. (Taiwan ; <http://www.yeastern.com/>).

À ce jour, plus de 104 gènes hétérologues de différentes espèces (virus, champignons, bactéries, qu'ils soient animaux ou humains) ont été exprimés chez cette levure.

4.1. Promoteurs

D'une manière générale, il existe deux catégories de promoteurs : les promoteurs inductibles et les promoteurs constitutifs. Le choix d'un promoteur dépend généralement du procédé de production et/ou de la propriété de la protéine à produire.

À l'heure actuelle, il y a peu de promoteurs qui ont été identifiés chez *Yarrowia lipolytica* pour la production des protéines recombinantes. Les principaux promoteurs utilisés pour la production des protéines recombinantes et leur mode de régulation sont présentés dans le tableau 1. Historiquement, l'exploitation de *Y lipolytica* comme un système de production de protéines hétérologues a commencé par l'utilisation du promoteur pXPR2 du gène codant pour une protéase extracellulaire EXP2 (Ogrydziak, *et al.*, 1977). Cependant, l'induction de ce promoteur requiert des conditions difficiles à appliquer, essentiellement un pH supérieur à 6 et une forte concentration de peptone dans le milieu de culture. Ce mécanisme complexe de

régulation a limité son exploitation à grande échelle (Madzak, *et al.*, 2004). Dès lors, d'autres promoteurs ont été identifiés.

4.1.1. Les promoteurs constitutifs

Muller et ses collaborateurs (1998) ont isolé deux promoteurs constitutifs, nommés pTEF1 et pRPS7 des gènes codant pour les protéines facteur1-alfa et la protéine ribosomal S7 respectivement (Müller, *et al.*, 1998). En outre, le niveau d'induction de ce promoteur ne dépend ni des conditions ni de la composition du milieu de culture. Toutefois, qu'ils soient extra ou intracellulaires, l'accumulation de certains types de protéines recombinantes peut être un facteur déterminant pour la croissance cellulaire. Dès lors, la recherche de nouveaux promoteurs dont les caractéristiques peuvent répondre aux contraintes industrielles est devenue un sujet d'actualité.

4.1.2. Les promoteurs hybrides

Afin de comprendre la régulation du promoteur XPR2, Madzak et ses collaborateurs (1999) ont identifié des séquences activatrices (UAS) en amont de pXPR2 ne dépendant pas des conditions environnementales de la culture (pH, T, PO2...) (Madzak, *et al.*, 1999). C'est ainsi que cette séquence a été utilisée par la suite pour la conception d'un nouveau promoteur recombinant composé de 4 copies UAS1 en tandem, situées en amont du promoteur minimal *LEU2* contenant la boîte TATA. Le promoteur est, par conséquent, dénommé hp4d (hybrid promoter 4 direct repeats)

De nombreuses études montrent que ce promoteur ne dépend ni de la composition du milieu ni des conditions de la culture et que son induction commence à la fin de la phase exponentielle (Madzak, *et al.*, 2000, Nicaud, *et al.*, 2002, Nicaud, *et al.*, 2002).

Par ailleurs, en se basant sur le même concept, Blazek et al. (2011) ont construit une large gamme de promoteurs hybrides (hpnd) qui diffèrent par leur nombre de copies n (n : 1-32) des séquences activatrices (UAS). Les niveaux d'induction et de transcription de ces promoteurs ont été mesurés en utilisant un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente (GFP).

Les résultats ont montré une corrélation entre le niveau de fluorescence et le nombre de séquences n jusqu'à 19 copies. Au-delà de 20 copies ($n < 32$), la fluorescence demeure stable (Blazek, *et al.*, 2011).

L'analyse génomique de cette levure est en évolution afin d'identifier des promoteurs inductibles « idéaux » qui combinent à la fois un inducteur exploitable, avec une répression complète durant la phase de croissance cellulaire.

4.1.3. Les promoteurs inductibles par de l'acide oléique

Initialement, Dominguez et al. (1998) ont montré l'utilisation des promoteurs inductibles chez *Yarrowia* par des sels métalliques (Dominguez, et al., 1998). Toutefois, la nature de l'inducteur a fait exclure ce type de promoteurs pour des applications industrielles. Par ailleurs, des chercheurs se sont focalisés sur la capacité de cette souche à se développer dans des milieux riches en substrats hydrophobes pour sélectionner de nouveaux promoteurs de gènes impliqués dans cette voie (Fickers, et al., 2005, Thevenieau, et al., 2009). De ce fait, les promoteurs dérivants des gènes isocitrate lyase (ICL1), 3-oxo-acyl Co thiolase (POT1) et acyl CoA oxidase (POX1, POX2 et POX5) ont été identifiés.

Une étude comparative des niveaux d'induction de ces différents promoteurs a été réalisée en utilisant le gène *LacZ* comme un gène rapporteur durant la croissance cellulaire, en présence de différentes sources de carbone (Juretzek, et al., 2000). Cette étude a révélé que *pPOT1* et *pPOX2* sont induits par des alcanes et des acides gras et qu'ils sont réprimés en présence du glucose ou du glycérol.

Environ 13 protéines recombinantes ont été produites sous le contrôle des promoteurs *ICL1* et *POX2* (Madzak & Beckerich, 2013). Récemment, deux protéines thérapeutiques, hGMCSF et la cytokine interféron alpha 2 b, ont été exprimées chez *Y lipolytica* sous le contrôle de *pPOX2* (Gasmi, et al., 2011, Gasmi, et al., 2011).

En raison de son mode de vie lipophile, *Y. lipolytica* est connu pour son adaptation métabolique, comme le suggère la présence de 16 gènes codant pour des lipases, dont le gène *LIP2*, ce qui a été décrit précédemment (Pignede, et al., 2000, Fickers, et al., 2005). Concernant son mécanisme de régulation, une autre étude a montré que le niveau d'induction du gène *LIP2* est fortement affecté par divers facteurs environnementaux (Fickers, et al., 2004, Fickers, et al., 2005).

Tableau 1 : Liste des promoteurs utilisés pour l'expression des protéines hétérologues chez *Yarrowia lipolytica* (Madzak, 2015).

Protéine hétérologue/ origine	Promoteur/ gène correspondant	Régulation	Références
Endoglucanase I/ <i>Trichoderma reesei</i>	<i>pXPR2/</i> Alkaline extracellular protease	Inductible par du glucose	(Park, <i>et al.</i> , 1997)
Endo- β -1,4-mannose/ <i>A. aculeatus</i>	<i>hp4d/</i> promoteur hybride	Constitutive/ pendant la phase de croissance en présence du glucose	(Roth, <i>et al.</i> , 2009)
α -amylase/ <i>Oryza sativa</i> (plant)	<i>pXPR2/</i> Alkaline extracellular protease	Inductible par du peptone/ regulation complexe	(Chang, <i>et al.</i> , 1998)
A2b-interferon/ Humain	<i>pPOX2/</i> Acyl-CoA oxidase 2	Inductible par du l'acide oléique	(Gasmi, <i>et al.</i> , 2011)
β -galactosidase/ <i>E.coli</i> (bactérie)	<i>pPOT1/3-Oxo-acylCoA-thiolase</i>	Inductible par du l'acide oléique	(Juretzek, <i>et al.</i> , 2000)
β -galactosidase/ <i>E.coli</i> (bactérie)	<i>pPOX1/</i> Acyl-CoA oxidase 1	Inductible par du l'acide oléique	(Juretzek, <i>et al.</i> , 2000)
β -galactosidase/ <i>E.coli</i> (bactérie)	<i>pPOX5/</i> Acyl-CoA oxidase 5	Inductible par du l'acide oléique	(Juretzek, <i>et al.</i> , 2000)
β -galactosidase / <i>E.coli</i> (bactérie)	<i>pG3P/</i> Glycérol3-phosphate déhydrogénase	Inductible par du glycérol	(Juretzek, <i>et al.</i> , 2000)
Invertase/ <i>Saccaromyces cerevisiaes</i> (levure)	<i>pFBA1/</i> Fructose 1,6 biphosphate aldolase	Inductible par du glucose	(Hong, <i>et al.</i> , 2012)
cellulase II et xylanase I/ champignon	<i>pRPS7/</i> protéine ribosomale S7	Constitutive	(Müller, <i>et al.</i> , 1998)
cellulase II et xylanase I/ champignon	<i>pTEF1/</i> facteur d'élongation 1 α	Constitutive	(Müller, <i>et al.</i> , 1998)

Comme il a été mentionné précédemment, plus de 100 protéines recombinantes ont été produites chez *Y. lipolytica*. Cependant, très peu de promoteurs ont été exploités pour une telle application (Figure 7) (Madzak & Beckerich, 2013).

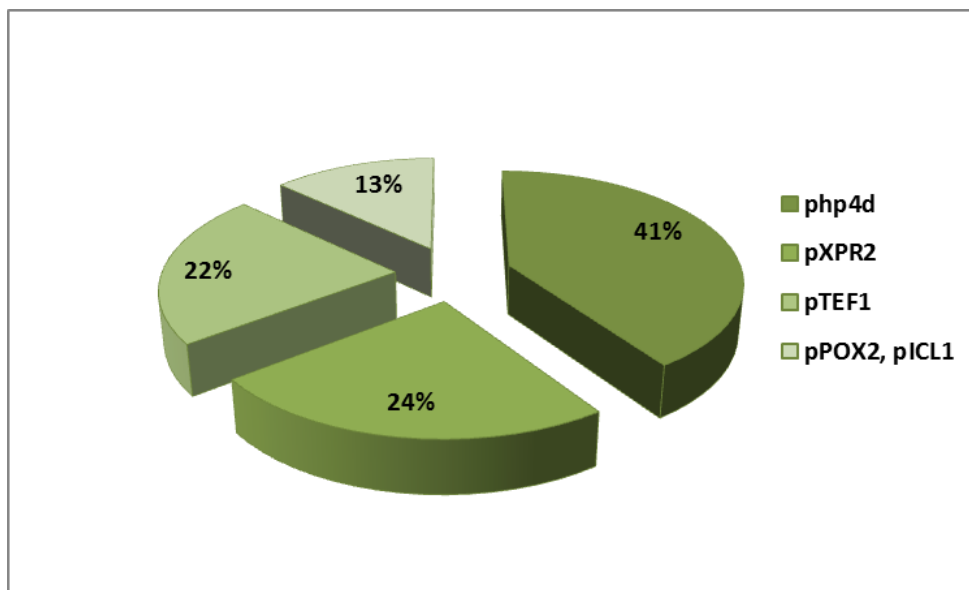


Figure 7: Pourcentage d'utilisation des promoteurs pour la production des protéines recombinantes chez *Y. lipolytica* (Madzak & Beckerich, 2013)

4.2. Régulation de l'induction de gène *LIP2*

Comme il a été discuté précédemment, l'induction du gène *LIP2* est affectée par les conditions environnementales et la composition du milieu de culture. Les différents facteurs, entre autres la source d'azote, de carbone et l'oxygène, seront présentés en détail dans cette section.

4.2.1. Effet des sources d'azote

L'influence des sources d'azote sur la croissance cellulaire et sur la productivité a été déterminée d'une manière extensive pour plusieurs micro-organismes. Chez *Yarrowia lipolytica*, l'expression du gène *LIP2* nécessite la présence d'une source d'azote organique et, plus particulièrement, la tryptone N1 par rapport aux sources d'azote minérales (Fickers, *et al.*, 2004). Ceci suggère que les peptides constitutifs de la tryptone N1 pourraient avoir un effet inducteur sur le promoteur du gène *LIP2*. Tukri et ses collaborateurs (2010) ont montré que le rendement de production était amélioré de 8 à 10 fois lorsque le milieu de culture était enrichi en peptides riches en acides aminés spécifiques comme la glycine, la thréonine et l'histidine par rapport à l'utilisation du tryptone comme seule source d'azote (Turki, *et al.*, 2010).

4.2.2. Effet des sources de carbone

Il a été clairement montré que certaines sources de carbone sont capables de stimuler ou d'inhiber la production de lipase au niveau transcriptionnel. Afin de garantir une viabilité économique au procédé, une source de carbone issue de la valorisation de sous-produits industriels est préférable, par exemple le méthyl oléate. (Darvishi, *et al.*, 2011). Cependant, la présence du glucose ou du glycérol dans le milieu de culture entraîne une diminution de la production de lipase (Fickers, *et al.*, 2005). À travers leurs recherches, des auteurs ont montré l'implication du gène *HXK1* dans le mécanisme de régulation du gène *LIP2* (Fickers, *et al.*, 2005). En effet, une surexpression du gène *HEX1* dans la souche *Y. lipolytica* JMY 755 induit une diminution du niveau d'induction du gène *LIP2* et, par conséquent, une diminution de la production de la lipase extracellulaire. Ceci confirme l'hypothèse que le gène *LIP2* est soumis à la répression catabolique par le glucose.

Par ailleurs, la présence d'acide oléique dans un milieu de culture pourrait servir comme une source de carbone, à la fois pour la croissance cellulaire et pour l'induction de gène *LIP2* chez *Yarrowia lipolytica* (Fickers, *et al.*, 2004, Fickers, *et al.*, 2005). Ainsi, une corrélation positive entre le niveau d'induction du gène *LIP2* et la concentration d'acide oléique dans le milieu de culture (jusqu'à 3 %) a été remarquée (Fickers, *et al.*, 2005).

4.2.3. Effet d'oxygène

Plusieurs études ont montré que la présence d'oxygène dissous dans un bioréacteur est essentielle pour la production de la lipase (Chen, *et al.*, 1999, Alonso, *et al.*, 2005). Lopez et ses collaborateurs ont montré que l'augmentation de la pression de 1 à 8 bars dans un bioréacteur permet l'amélioration du coefficient de transfert d'oxygène (OTR). Cette augmentation du coefficient OTR a été accompagnée par une augmentation de l'activité de lipase de 96.6 U/L à 533.5 U/L respectivement, soit avec un facteur de 5 (Lopes, *et al.*, 2008). Plus tard, Kar et ces collaborateurs ont confirmé cette hypothèse. En effet, leurs travaux de recherche ont montré clairement que la variation de concentration de l'oxygène dissoute affecte le niveau transcriptionnel du gène *LIP2* et, par conséquent, le rendement de production de la lipase dans le milieu de culture de *Y. lipolytica* (Kar, *et al.*, 2012).

4.2.4. Induction de promoteur *POX2* et *LIP2* via des éléments de réponse oléate (ORE)

L'analyse de la séquence des promoteurs de gènes induits par de l'acide oléique a révélé la présence d'une séquence activatrice en aval du promoteur, connu sous le nom d'**élément de réponse à l'oléate** « Oleate Response Element », **ORE** (Wang, *et al.*, 1999). Chez les levures, dont *Yarrowia*, deux protéines régulatrices interagissant avec cette région (ORF) ont été identifiées (Oaf1p et oaf2p). La fixation du complexe protéique formé par (oaf1p/Pip2p) sur la séquence ORE (ORE) aboutit à l'initiation de la transcription du gène en question. Ces motifs ont été identifiés dans la séquence de *pPOX2*, mais pas dans *pLIP2* (Figure 8). Dès lors, ceci suggère que le mécanisme moléculaire contrôlant l'induction du gène *LIP2* est différent de celui de la régulation des protéines peroxysomales.

Comme il a été dit précédemment, la transcription de ces gènes, dont *LIP2*, est soumise à plusieurs types de régulation, en particulier la répression par du glucose. Toutefois, elle est induite drastiquement par des substrats hydrophobes comme l'huile d'olive, l'acide oléique et le méthyl oléate. Récemment, une étude transcriptionnelle des ARNm synthétisés lors de la culture de *Y. lipolytica* dans un milieu contenant du glucose ou de l'acide oléique a été menée (Desfougères, *et al.*, 2010). D'après cette étude, deux nouvelles protéines régulatrices codées par les deux gènes *SOA1* et *SOA2* ont été identifiées et elles semblent être impliquées dans le mécanisme de régulation du gène *LIP2*. Pour confirmer cette hypothèse, une souche double mutante $\Delta SOA1 \Delta SOA2$ a été créée. Un taux de croissance faible de la souche double mutante cultivée dans un milieu contenant de la tributyrine ou trioléine a été observé par rapport à la souche sauvage. Cependant, un taux de croissance plus élevé a été observé par culture de ce mutant en présence d'acide oléique, accompagné d'une diminution de l'activité lipolytique avec un facteur de 50 par rapport à la souche sauvage. Dès lors, les travaux de ces auteurs suggèrent que ces protéines régulatrices sont impliquées dans la régulation du niveau d'induction du gène *LIP2* en présence des triglycérides ou des acides gras. L'analyse de la séquence protéique révèle l'absence d'un site d'interaction directe avec l'ADN, ce qui laisse dès lors supposer la présence d'intermédiaires des protéines qui interagissent directement ou indirectement avec des facteurs de transcription.

Pour autant, ces facteurs de régulation ne seraient probablement pas les seuls à entrer en jeu : le mécanisme de régulation de l'expression du gène *LIP2* reste donc loin d'être totalement élucidé.

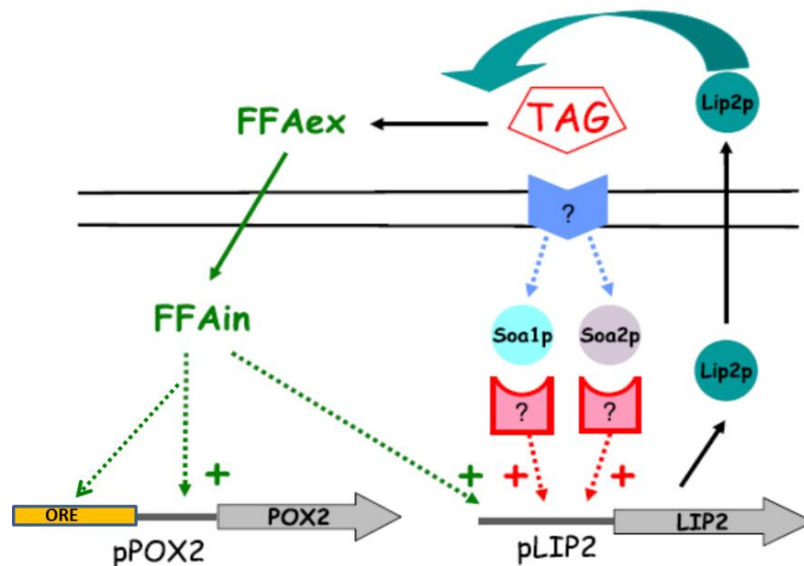


Figure 8: Voie de régulation de *pLIP2* et de *pPOX2* par des substrats hydrophobes (modifié) (Desfougeres, *et al.*, 2010)

Les vecteurs d'expression impliquant le promoteur *LIP2* (*pLIP2*) ont été développés et utilisés avec succès pour la production des protéines recombinantes à des rendements similaires ou plus élevés que ceux obtenus avec d'autres systèmes de levure tels que *Pichia pastoris* (Madzak, 2015).

5. *Yarrowia* et la cytométrie en flux

Comme il a été souligné précédemment, *Y. lipolytica* présente une forte sensibilité aux conditions environnementales rencontrées dans les bioréacteurs. En effet, de nombreuses études ont montré que la population microbienne de ce micro-organisme pouvait être ségréguée au niveau d'une ou plusieurs caractéristiques cellulaires comme la taille et la forme des cellules, leur viabilité, la synthèse d'une enzyme particulière, la capacité à accumuler les lipides, etc (Beopoulos, *et al.*, 2009).

Tenant compte de cette hétérogénéité sur différents plans, le développement d'une méthode d'analyse mettant en œuvre le comportement de cette levure dans un bioréacteur sera donc nécessaire afin de mieux optimiser et de contrôler les

bioprocédés. Parmi ces méthodes, la cytométrie est devenue une technique attirante pour l'optimisation et le contrôle des bioprocédés. Son système est constitué de deux grandes composantes : un système microfluidique qui permet le passage des cellules les unes après les autres et un système optique pour la détection (Figure 9). En effet, chaque cellule est excitée par un faisceau laser et la lumière séparée est en relation directe avec les différents paramètres physiologiques comme la taille (FSC), la forme (SSC) et le niveau de fluorescence (FL).

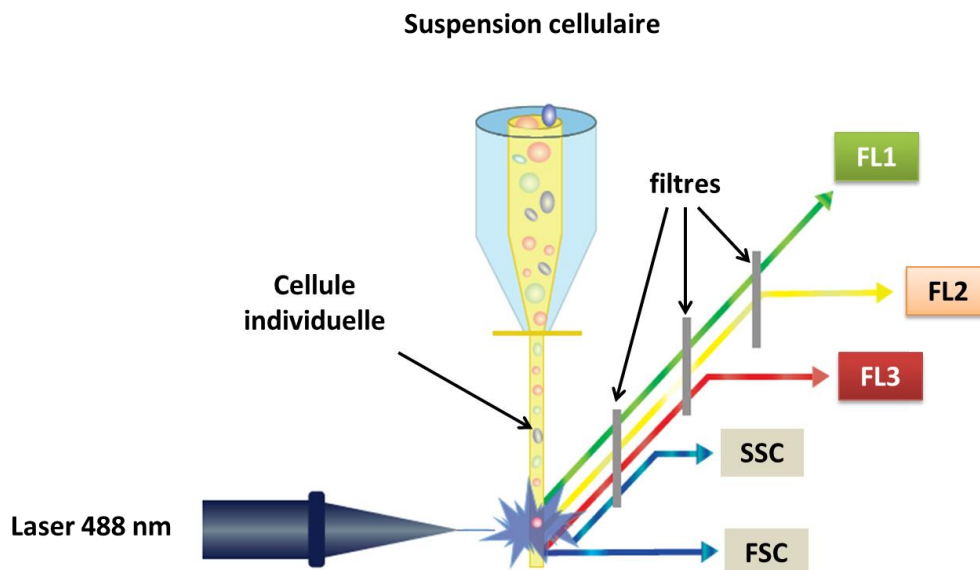


Figure 9: Principe de la cytométrie en flux

Dans ce contexte, le couplage de la technique d'utilisation des protéines fluorescentes et la cytométrie en flux permet d'obtenir un signal de fluorescence à l'échelle de la cellule microbienne proportionnel au changement de l'environnement de la culture. À l'heure actuelle, une large gamme de protéines fluorescentes a été développée pour l'étude de la régulation des promoteurs chez *Y. lipolytica* telles que la YFP, Redstar2 et mCherry (protéines fluorescentes rouges) et la GFP (Green Fluorescent Protein) (Kabran, et al., 2012, Shabbir Hussain, et al., 2016).

La DsRED est une protéine fluorescente rouge qui a été isolée du corail pacifique *Discosoma* genus (Matz, et al., 1999). Il s'agit d'une protéine de 238 acides aminés dotée d'une remarquable résistance en comparaison avec la protéine GFP (Verkhusha, et al., 2003) : sa fluorescence persiste à 80°C, à un pH de 11 ou encore un agent chaotropique (le chlorure de guanidinium) à une concentration de 6 M. De plus, la fluorescence est stable pour quelques jours. Elle doit sa fluorescence à un

chromophore formé à partir d'une séquence de trois acides aminés, Gln66-Tyr67-Gly68. Ainsi formé, le chromophore présente un pic d'absorption et d'émission respectivement à 558 nm et 583 nm (Gross, *et al.*, 2000).

La protéine DsRED ainsi isolée présente divers inconvénients, principalement le faible signal de fluorescence. Les travaux de M. Knop (2002) ont permis d'engendrer une Dsred présentant une fluorescence vingt fois plus intense. La protéine ainsi formée est appelée Redstar (Knop, *et al.*, 2002). D'autre part, Bevis et Glick (2002) ont généré un nouveau variant dérivé de la protéine sauvage appelé DsRed T4 ($t_{(1/2)}$ de maturation égale à 40 min) dont la durée de maturation est de 10 à 15 fois plus rapide que la protéine sauvage ($t_{(1/2)}$ de maturation égale à 12h) (Bevis & Glick, 2002). Plus tard, Janke et ses collaborateurs (2004) ont combiné les caractéristiques des deux formes précitées (Redstart et Dsred T4) pour générer une nouvelle protéine dénommée Redstar 2 qui a été utilisée dans le cadre de cette thèse (Figure 10).

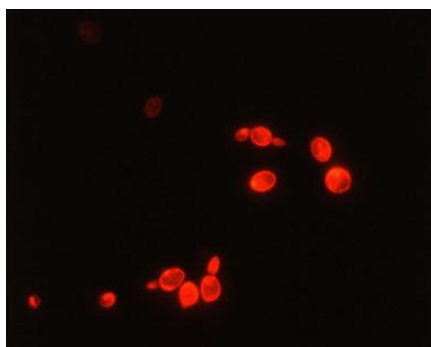


Figure 10: Vue microscopique des cellules *Y. lipolytica* produisant la protéine Dsred

La culture des micro-organismes oléagineux, dont *Y. lipolytica*, dans des milieux riches en substrats hydrophobes sont des procédés complexes à maîtriser. Néanmoins, rares sont les travaux de recherche qui s'intéressent à l'étude de ce genre de procédés en exploitant la technique de la cytométrie en flux. Une de ces études cherche à déterminer l'adhésion de microgouttelettes d'huile à la surface des membranes des cellules de *Y. lipolytica* (Aguedo *et al.*, 2003). D'autre part, quelques marqueurs externes ont été utilisés pour analyser la capacité d'accumuler les lipides

chez différents mutants de *Y. lipolytica* en utilisant des fluorochromes tels le Nile red ou le bodipy (Dulermo, et al., 2014).

6. Conclusion

En conclusion, cette étude bibliographique a permis de mettre en évidence la levure non conventionnelle *Y. lipolytica* en tant que système d'expression hétérologue. L'analyse des travaux relatifs à ce sujet a permis de faire ressortir les points forts suivants.

Y. lipolytica est un système d'intérêt pour l'expression des protéines hétérologues. Sa forte capacité à assimiler des substrats hydrophobes en a fait un organisme modèle pour l'étude du métabolisme lipidique. Les différents outils moléculaires relatifs à cette application ont été décrits dans plusieurs revues scientifiques. Toutefois, quelques promoteurs inductibles ont été sélectionnés pour une telle application. De plus, rares sont les travaux relatifs à l'étude de la régulation de ces promoteurs par des sources de carbone, en particulier le glucose, le glycérol et l'acide oléique, les substrats d'intérêt industriel pour cette souche.

Dans ce contexte, certains promoteurs, comme le promoteur du gène *LIP2* codant pour la lipase extracellulaire *LIP2p*, sont des candidats particulièrement intéressants. L'utilisation d'un co-substrat est aussi envisageable pour diminuer la fraction de l'acide oléique pendant la phase *batch*, sans aucune influence sur la productivité totale. Ce qui permet aussi, par conséquent, de faciliter les étapes de purification. L'étude de la régulation des promoteurs par la nature des sources de carbone chez *Y. lipolytica* reste un champ important d'investigation afin de comprendre leur mécanisme d'induction/répression, étape primordiale pour le développement et l'optimisation d'un procédé de production des protéines recombinantes.

D'autre part, l'étude du dimorphisme chez *Y. lipolytica* a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche concernant les différents facteurs environnementaux et les voies de signalisation impliquées dans l'induction de ce phénomène. Toutefois, ce facteur ne serait probablement pas le seul à entrer en jeu pour ce changement morphologique. La caractérisation de dimorphisme chez *Y. lipolytica* reste donc loin d'être totalement élucidée. Cependant, la détermination de l'impact de cette transition morphologique sur la régulation des promoteurs (*pPOX2* et *pLIP2*) demeure inconnue. Pour le développement et l'optimisation du procédé, il est donc primordial d'étudier la régulation des promoteurs par le dimorphisme chez *Y. lipolytica*.

Ainsi donc, le développement des méthodes d'analyse adaptées à l'étude et le contrôle de la culture de la levure *Y. lipolytica* dans un milieu de culture en présence du substrat hydrophobe présente un grand intérêt industriel. Dans ce cadre, la cytométrie en flux est la technique la plus utilisée pour l'étude et l'optimisation des procédés.

Références

Albuquerque CD, Filetti AM & Campos-Takaki GM (2006) Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol* 52: 575-583.

Alonso F, Oliveira E, Dellamora-Ortiz G & Pereira-Meirelles F (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22: 9-18.

Aloulou A, Rodriguez JA, Puccinelli D, Mouz N, Leclaire J, Leblond Y & Carriere F (2007) Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1771: 228-237.

Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, Zivy M, Negroni L, Nicaud JM & Chardot T (2006) Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* 6: 1450-1459.

Bankar A, Kumar A & Zinjarde S (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 847-865.

Barth G & Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica*. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook* 313 - 388.

Barth G & Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica—nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Barth G & Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 219-237.

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

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

Beopoulos A, Nicaud J-M & Gaillardin C (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1193-1206.

Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribe Larrea J-L, Molina-Jouve C & Nicaud J-M (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48: 375-387.

Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, *et al.* (2008) Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7779-7789.

Bevis BJ & Glick BS (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20: 83-87.

Blazek J, Liu L, Redden H & Alper H (2011) Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl Environ Microbiol* 77: 7905-7914.

Bon E, Casaregola S, Blandin G, *et al.* (2003) Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* 31: 1121-1135.

Bradner JR & Nevalainen KM (2003) Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 54: 193-201.

Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC & Belo I (2016) Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. *Journal of Biotechnology* 217: 22-30.

Brognaux A, Han S, Sørensen SJ, Lebeau F, Thonart P & Delvigne F (2013) A low-cost, multiplexable, automated flow cytometry procedure for the characterization of microbial stress dynamics in bioreactors. *Microbial Cell Factories* 12: 100-100.

Brognaux A, Thonart P, Delvigne F, Neubauer P, Twizere J-C, Francis F & Gorret N (2013) Direct and indirect use of GFP whole cell biosensors for the assessment of bioprocess performances: Design of milliliter scale-down bioreactors. *Biotechnology Progress* 29: 48-59.

Buckholz RG & Gleeson MA (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)* 9: 1067-1072.

Bulani SI, Moleleki L, Albertyn J & Moleleki N (2012) Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* 2: 27-27.

Cereghino J & Cregg J (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45 - 66.

Cervantes-Chávez JA & Ruiz-Herrera J (2006) STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research* 6: 801-815.

Cervantes-Chávez JA, Kronberg F, Passeron S & Ruiz-Herrera J (2009) Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 390-399.

Chang CC, Ryu DD, Park CS & Kim JY (1998) Improvement of heterologous protein productivity using recombinant *Yarrowia lipolytica* and cyclic fed-batch process strategy. *Biotechnol Bioeng* 59: 379-385.

Chen JY, Wen CM & Chen TL (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnology and bioengineering* 62: 311-316.

Darvishi F, Destain J, Nahvi I, Thonart P & Zarkesh-Esfahani H (2011) High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *N Biotechnol* 28: 756-760.

Darvishi Harzevili F (2014) *Yarrowia lipolytica* in Biotechnological Applications. *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*, ed. ^eds.), p. ^pp. 17-74. Springer International Publishing.

Davey HM & Hexley P (2011) Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ Microbiol* 13: 163-171.

Day RN & Davidson MW (2009) The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* 38: 2887-2921.

Delvigne F, Baert J, Gofflot S, Lejeune A, Telek S, Johanson T & Lantz AE (2015) Dynamic single-cell analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under process perturbation: comparison of different methods for monitoring the intensity of population heterogeneity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90: 314-323.

Demain AL & Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27: 297-306.

Desfougeres T, Haddouche R, Fudalej F, Neuveglise C & Nicaud JM (2010) SOA genes encode proteins controlling lipase expression in response to triacylglycerol utilization in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 10: 93-103.

Destain J, Roblain D & Thonart P (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters* 19: 105-108.

Díaz M, Herrero M, García LA & Quirós C (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48: 385-407.

Dirusso CC & Black PN (2004) Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J Biol Chem* 279: 49563-49566.

Dominguez A, Ferminan E & Gaillardin C (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib Microbiol* 5: 151-172.

Dominguez A, Ferminan E, Sanchez M, *et al.* (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int Microbiol* 1: 131-142.

Dujon B, Sherman D, Fischer G, *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.

Dulermo R, Gamboa-Melendez H, Dulermo T, Thevenieau F & Nicaud JM (2014) The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 19: 1567-1364.

Dulermo T & Nicaud J-M (2011) Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng* 13: 482 - 491.

Dulermo T, Tréton B, Beopoulos A, Kabran Gnankon AP, Haddouche R & Nicaud J-M (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: 1486-1495.

Fattaccioli J, Baudry J, Emerard J-D, Bertrand E, Goubault C, Henry N & Bibette J (2009) Size and fluorescence measurements of individual droplets by flow cytometry. *Soft Matter* 5: 2232-2238.

Fickers P, Destain J & Thonart P (2005) Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 27: 1751-1754.

Fickers P, Marty A & Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 29: 632-644.

Fickers P, Marty A & Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 29: 632-644.

Fickers P, Nicaud JM, Destain J & Thonart P (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 136-142.

Fickers P, Nicaud J, Destain J & Thonart P (2005) Involvement of hexokinase Hxk1 in glucose catabolite repression of LIP2 encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 50.

Fickers P, Nicaud J, Destain J & Thonart P (2005) Involvement of Hexokinase Hxk1 in Glucose Catabolite Repression of LIP2 Encoding Extracellular Lipase in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 50: 133-137.

Fickers P, Nicaud JM, Gaillardin C, Destain J & Thonart P (2004) Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 96: 742-749.

Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit M & Nicaud J (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5: 527 - 543.

Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS & Nicaud JM (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5: 527-543.

Gasmi N, Fudalej F, Kallel H & Nicaud J (2011) A molecular approach to optimize hIFN alpha 2b expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 109 - 119.

Gasmi N, Ayed A, Ammar B, Zrigui R, Nicaud J & Kallel H (2011) Development of a cultivation process for the enhancement of human interferon

alpha 2b production in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact* 10: 90 - 100.

Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M & van der Klei I (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*– A comparison. *FEMS Yeast Research* 5: 1079-1096.

González-López CI, Ortiz-Castellanos L & Ruiz-Herrera J (2006) The ambient pH response Rim pathway in *Yarrowia lipolytica*: identification of YIRIM9 and characterization of its role in dimorphism. *Current Microbiology* 53: 8-12.

Grimm LH, Kelly S, Krull R & Hempel DC (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 375-384.

Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PWM & Wyss M (2014) *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* 40: 187-206.

Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK & Tsien RY (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11990-11995.

Heeres AS, Picone CSF, van der Wielen LAM, Cunha RL & Cuellar MC (2014) Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends in Biotechnology* 32: 221-229.

Hong SP, Seip J, Walters-Pollak D, Rupert R, Jackson R, Xue Z & Zhu Q (2012) Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA1IN promoter. *Yeast* 29: 59-72.

Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F & Boyer HW (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063.

Juretzek T, Wang H-J, Nicaud J-M, Mauersberger S & Barth G (2000) Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 5: 320-326.

Juretzek T, Wang H, Nicaud J, Mauersberger S & Barth G (2000) Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of beta-galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioproc E* 5: 320 - 326.

Kabran P, Rossignol T, Gaillardin C, Nicaud JM & Neuveglise C (2012) Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *DNA Res* 19: 231-244.

Kabran P, Rossignol T, Gaillardin C, Nicaud J-M & Neuvéglise C (2012) Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *DNA research* dss007.

Kar T, Destain J, Thonart P & Delvigne F (2012) Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35: 483-492.

Kawasse FM, Amaral PF, Rocha-Leao MH, Amaral AL, Ferreira EC & Coelho MA (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosyst Eng* 25: 371-375.

Knop M, Barr F, Riedel CG, Heckel T & Reichel C (2002) Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques* 33: 592, 594, 596-598 passim.

Krull R, Wucherpfennig T, Esfandabadi ME, *et al.* (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* 163: 112-123.

Lara AR, Galindo E, Ramírez OT & Palomares LA (2006) Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology* 34: 355-381.

Lopes M, Gomes N, Gonçalves C, Coelho M, Mota M & Belo I (2008) *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. *Letters in applied microbiology* 46: 255-260.

Madzak C (2015) *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 4559-4577.

Madzak C & Beckerich JM (2013) Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Yarrowia lipolytica*,(Barth G, ed.^eds.), p.^pp. Berlin Heidelberg, Springer.

Madzak C & Beckerich J-M (2013) Heterologous Protein Expression and Secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Yarrowia lipolytica*, Vol. 25 (Barth G, ed.^eds.), p.^pp. 1-76. Springer Berlin Heidelberg.

Madzak C & Beckerich J-M (2013) Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Yarrowia lipolytica*,(Barth G, ed.^eds.), p.^pp. Heidelberg, Springer.

Madzak C, Treton B & Blanchin-Roland S (2000) Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 207 - 216.

Madzak C, Gaillardin C & Beckerich J (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109: 63 - 81.

Madzak C, Gaillardin C & Beckerich J-M (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109: 63-81.

Madzak C, Gaillardin C & Beckerich J (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 109: 63 - 81.

Madzak C, Blanchin-Roland S, Cordero Otero RR & Gaillardin C (1999) Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiol* 145.

Maftahi M, Gaillardin C & Nicaud JM (1996) Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 859-868.

Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML & Lukyanov SA (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17: 969-973.

Mlickova K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T & Nicaud J (2004) Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3918 - 3924.

Morales-Vargas AT, Domínguez A & Ruiz-Herrera J (2012) Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Research in microbiology* 163: 378-387.

Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P & Dalbøge H (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14: 1267-1283.

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

Nicaud J-M, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P & Gaillardin C (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2: 371-379.

Nicaud J, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P & Gaillardin C (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2: 371 - 379.

Ogrydziak DM, Demain AL & Tannenbaum SR (1977) Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 497: 525-538.

Ota Y, Gomi K, Kato S, Sugiura T & Minoda Y (1982) Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 2885-2893.

Palande AS, Kulkarni SV, León-Ramírez C, Campos-Góngora E, Ruiz-Herrera J & Deshpande MV (2014) Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. *Archives of Microbiology* 1-12.

Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22: 189-259.

Park S, Ohkuma M, Masuda Y, Ohta A & Takagi M (1997) Galactose-inducible expression systems in *Candida maltosa* using promoters of newly-isolated GAL1 and GAL10 genes. *Yeast* 13: 21 - 29.

Peters, II & Nelson FE (1948) Preliminary Characterization of the Lipase of *Mycotorula lipolytica*. *J Bacteriol* 55: 593-600.

Petit T & Gancedo C (1999) Molecular cloning and characterization of the gene HXK1 encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 15: 1573-1584.

Pignede G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M & Nicaud JM (2000) Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182: 2802-2810.

Polizzi KM & Kontoravdi C (2015) Genetically-encoded biosensors for monitoring cellular stress in bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* 31: 50-56.

Porro D, Sauer M, Branduardi P & Mattanovich D (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol* 31: 245-259.

Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M & Mattanovich D (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 939-948.

Querol A, Barrio E, Huerta T & Ramón D (1992) Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2948-2953.

Roth R, Moodley V & van Zyl P (2009) Heterologous expression and optimized production of an *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-beta-mannanase in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biotechnol* 43: 112-120.

Ruiz-Herrera J & Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 178: 477-483.

Ruiz-Herrera J & Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 178: 477 - 483.

Rywińska A, Juszczak P, Wojtatowicz M, Robak M, Lazar Z, Tomaszewska L & Rymowicz W (2013) Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *biomass and bioenergy* 48: 148-166.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press New York.

Sassi H, Delvigne F, Kallel H & Fickers P (2017) pH and Not Cell Morphology Modulate *pLIP2* Induction in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 1-5.

Sassi H, Delvigne F, Kar T, Nicaud J-M, Coq A-MC-L, Steels S & Fickers P (2016) Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 15: 1-11.

Sevastyanovich Y, Alfasi S, Overton T, Hall R, Jones J, Hewitt C & Cole J (2009) Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. *FEMS Microbiol Lett* 299: 86-94.

Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S & Blenner MA (2015) Engineering Promoter Architecture in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS synthetic biology*.

Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S & Blenner MA (2016) Engineering Promoter Architecture in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol* 5: 213-223.

Shusta EV, Raines RT, Pluckthun A & Wittrup KD (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol* 16: 773-777.

Sibirny A, Madzak C & Fickers P (2014) Genetic engineering of non-conventional yeast for the production of valuable compounds. *Microbial biotechnology: progress and trends*. CRC Press, USA 63-111.

Smith JJ, Ramsey SA, Marelli M, *et al.* (2007) Transcriptional responses to fatty acid are coordinated by combinatorial control. *Mol Syst Biol* 3: 115.

Sorensen HP (2010) Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb Cell Fact* 9: 27.

Sundstrom H, Wallberg F, Ledung E, Norrman B, Hewitt CJ & Enfors SO (2004) Segregation to non-dividing cells in recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation processes. *Biotechnol Lett* 26: 1533-1539.

Szabo R & Stofanikova V (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett* 206: 45 - 50.

Szabo R & Štofániková V (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology letters* 206: 45-50.

Thevenieau F, Nicaud J-M & Gaillardin C (2009) Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*,(Satyanarayana T & Kunze G, ed.^eds.), p.^pp. 589-613. Springer Netherlands, Dordrecht.

Timoumi A, Cléret M, Bideaux C, et al. (2017) Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 351-366.

Tripathi SC & Kerr J (1989) Effect of mechanical stress on cellular morphology. *Tissue and Cell* 21: 747-752.

Turki S, Kraeim I, Weeckers F, Thonart P & Kallel H (2010) Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol* 2724 - 2731.

van der Walt JP & von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 46: 517-521.

van der Walt JP & Yarrow D (1984) Chapter II - Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts A2 - Rij, N.J.W. Kreger-van. *The Yeasts (Third Revised and Enlarged Edition)*,ed.^eds.), p.^pp. 45-104. Elsevier, Amsterdam.

Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Stepanenko OV, Zaraisky AG, Shavlovsky MM, Turoverov KK & Uversky VN (2003) High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry* 42: 7879-7884.

Walisko R, Moench-Tegeder J, Blotenberg J, Wucherpfennig T & Krull R (2015) The Taming of the Shrew--Controlling the Morphology of Filamentous Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 149: 1-27.

Wang H, Le Dall MT, Wache Y, Laroche C, Belin JM & Nicaud JM (1999) Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* 31: 165-174.

Weinhandl K, Winkler M, Glieder A & Camattari A (2014) Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microbial Cell Factories* 13: 5.

Wickerham LJ, Kurtzman CP & Herman AI (1970) Sexuality in *Candida lipolytica*. *Recent trends in yeast research* 1: 81-92.

Workman M, Holt P & Thykaer J (2013) Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express* 3.

Zaslaver A, Mayo AE, Rosenberg R, et al. (2004) Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat Genet* 36: 486-491.

Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM & Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15681-15686.

**Chapitre II: Deciphering how LIP2 and
POX2 promoters can optimally regulate
recombinant protein production in the
yeast *Y. lipolytica***

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Hosni Sassi, Frank Delvigne, Tambi Kar, Jean-Marc Nicaud, Anne-Marie Crutz-Le Coq, Sébastien Steels and Patrick Fickers. Deciphering how *LIP2* and *POX2* promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Y. lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 2016 **15**:159.

Title:

Deciphering *LIP2* and *POX2* promoters regulation for high yield recombinants protein production in the yeast *Y. lipolytica*

Authors

Hosni Sassi¹, Frank Delvigne², Tambi Kar², Jean-Marc Nicaud³, Anne-Marie Crutz-Le Coq³, Sébastien Steels² and Patrick Fickers^{1,2}

Affiliations and addresses

¹Biotechnology and Bioprocesses, Université libre de Bruxelles, avenue F.D. Roosevelt 50, 1050 Bruxelles, Brussels, Belgium : tel +32-2-650.30.49/ 30.44, fax +32-2-650.35.75 ;

²Microbial Processes and Interactions, University of Liège, Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgium : tel + 32 81 622 311 ;

³Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en Josas, France : Tel: (33) 01 30 81 54 50, Fax: (33) 01 30 81 54 57 ;

Author's correspondent

Patrick Fickers pfickers@ulg.ac.be

Microbial Processes and Interactions, University of Liège-Gembloux AgroBio Tech, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium

Introduction

La production des protéines recombinantes par *Y. lipolytica* est devenue une alternative intéressante aux autres systèmes de levure. Ainsi, le choix d'un

promoteur fort est l'un des paramètres clés pour améliorer la performance de la souche et, par conséquent, la productivité. A cette fin, il est indispensable de caractériser la régulation des promoteurs vis-à-vis de la nature des nutriments utilisés dans un milieu de culture, en particulier la source de carbone. Chez *Y. lipolytica*, les promoteurs des gènes *POX2* (code pour une oxydase impliquée dans la voie de β -oxydation) et *LIP2* (code pour la lipase extracellulaire *LIP2*) ont été utilisés avec succès pour la production des protéines recombinantes en présence d'acide oléique comme inducteur. Cependant, leur mécanisme de régulation est très peu étudié. En outre, les procédés de production basés sur l'utilisation de ce type de promoteurs sont difficiles à manipuler. La difficulté réside essentiellement dans la faible solubilité de l'inducteur utilisé (l'acide oléique) dans le milieu de culture. Ainsi, réduire la fraction du substrat hydrophobe en gardant la productivité suscite un grand intérêt sur le plan économique de procédé de culture. Une des alternatives envisageables consiste en la substitution d'une partie de l'acide oléique par un substrat non répresseur pour le promoteur d'intérêt. Cela nécessite une connaissance approfondie de la régulation des promoteurs en ce qui concerne la source de carbone qui, de façon surprenante, manque encore pour *pLIP2* et *pPOX2*.

Dans ce cadre, ce chapitre a pour objectif de caractériser, via une étude comparative, la régulation des promoteurs *POX2* et *LIP2* en présence des différentes combinaisons de sources de carbone (glucose, glycérol et acide oléique) et ce, en utilisant deux milieux de culture (un milieu complexe et un milieu défini GNY). Cette étude comparative a pour objectif de sélectionner le promoteur le plus fort et le milieu le plus favorable pour une meilleure induction des promoteurs. Les niveaux d'induction ont été quantifiés par la mesure de la fluorescence émise par la protéine Redstar2 et l'activité enzymatique de la protéine β -galactosidase codée par le gène *LacZ* comme gènes rapporteurs. Aussi, le métabolisme du glucose et d'acide oléique ont été caractérisés à l'échelle de la cellule. Enfin, la quantification des transcrits des gènes par la technique de PCR quantitative (qPCR) a été envisagée pour valider nos résultats.

RESEARCH

Open Access



Deciphering how *LIP2* and *POX2* promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*

Hosni Sassi¹, Frank Delvigne², Tambi Kar², Jean-Marc Nicaud³, Anne-Marie Crutz-Le Coq³, Sebastien Steels² and Patrick Fickers^{1,2*}

Abstract

Background: In recent years, the non-conventional model yeast species *Yarrowia lipolytica* has received much attention because it is a useful cell factory for producing recombinant proteins. In this species, expression vectors involving *LIP2* and *POX2* promoters have been developed and used successfully for protein production at yields similar to or even higher than those of other cell factories, such as *Pichia pastoris*. However, production processes involving these promoters can be difficult to manage, especially if carried out at large scales in fed-batch bioreactors, because they require hydrophobic inducers, such as oleic acid or methyl oleate. Thus, the challenge has become to reduce loads of hydrophobic substrates while simultaneously promoting recombinant protein production. One possible solution is to replace a portion of the inducer with a co-substrate that can serve as an alternative energy source. However, implementing such an approach would require detailed knowledge of how carbon sources impact promoter regulation, which is surprisingly still lacking for the *LIP2* and *POX2* promoters. This study's aim was thus to better characterize promoter regulation and cell metabolism in *Y. lipolytica* cultures grown in media supplemented with different carbon sources.

Results: p*POX2* induction could be detected when glucose or glycerol was used as sole carbon source, which meant these carbon source could not prevent promoter induction. In addition, when a mixture of glucose and oleic acid was used in complex medium, p*POX2* induction level was lower than that of p*LIP2*. In contrast, p*LIP2* induction was absent when glucose was present in the culture medium, which meant that cell growth could occur without any recombinant gene expression. When a 40/60 mixture of glucose and oleic acid (w/w) was used, a tenfold increase in promoter induction, as compared to when an oleic-acid-only medium was observed. It was also clear that individual cells were adapting metabolically to use both glucose and oleic acid. Indeed, no distinct subpopulations that specialized on glucose versus oleic acid were observed; such an outcome would have led to producer and non-producer phenotypes. In medium containing both glucose and oleic acid, cells tended to directly metabolize oleic acid instead of storing it in lipid bodies.

Conclusions: This study found that p*LIP2* is a promoter of choice as compared to p*POX2* to drive gene expression for recombinant protein production by *Y. lipolytica* used as cell factory.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, *POX2*, *LIP2*, Promoter regulation, Recombinant protein, Carbon source, Co-substrate

*Correspondence: pfickers@ulg.ac.be

² Microbial Processes and Interactions, University of Liège-Gembloux AgroBio Tech, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Non-conventional model yeast species such as *Pichia pastoris*, *Hansuluna polymorpha*, and *Yarrowia lipolytica* have received much attention in recent years because they can serve as cell factories for producing heterologous proteins at lab or industrial scales [1, 2]. High yields of more than one hundred heterologous proteins have already been successfully obtained using *Y. lipolytica*, underscoring this yeast's production potential [3]. When developing an efficient cell factory, the choice of the promoter driving recombinant gene expression is crucial. It therefore represents one of the key parameters to be optimized. At present, few promoters have been identified in *Y. lipolytica* and their regulation is not fully understood. Among them is the promoter derived from the *XPR2* gene, which encodes an alkaline extracellular protease. It was the first to be characterized and has been used to drive heterologous protein synthesis [4, 5]. However, full induction of this promoter requires high peptide concentrations and a pH above 6, conditions that are often unfeasible [6]. Constitutive promoters have also been considered, such as the one derived from the *TEF1* gene, which encodes translation elongation factor-1 α [7], or the hybrid promoter hp4d, which is derived from the *LEU2* and *XPR2* genes [8, 9]. Although these constitutive promoters are highly efficient, they have a drawback: the high protein yields obtained from the early stages of culture may be detrimental to cell growth (e.g., the proteins produced are toxic to the host). Therefore, identifying regulated promoters that can be used to express recombinant genes in *Y. lipolytica* is a challenge.

Yarrowia lipolytica is known for its ability to assimilate hydrophobic substrates, such as methyl oleate [10, 11] and oleic acid [10, 12]. Consequently, promoters of the key genes involved in this metabolic process have been cloned and characterized. More specifically, they have been used to drive heterologous gene expression, as in the case of the promoter derived from the *POX2* gene that encodes acyl-CoA oxidase 2, which is involved in the first step of peroxisomal β -oxidation, and the promoter derived from the *LIP2* gene, which encodes the extracellular Lip2p lipase [9]. Using expression vectors based on p*LIP2*, greater quantities of enzymes such as Lip2p lipase have been produced in *Y. lipolytica* than in other cell factories such as *Pichia pastoris*. Using the *GAP* constitutive promoter, Wang and Coll (2012) obtained lipase activity levels of 13,500 U/mL using a glucose fed-batch process in a 10-L bioreactor [13]. In contrast, activity levels of 150,000 U/mL were obtained using a *LIP2* promoter and a tryptone-olive oil fed-batch process [11]. However, little else is known about these promoters' regulation mechanisms. *POX2* promoter has been found to be induced in the presence of hydrophobic substrates such as fatty acids

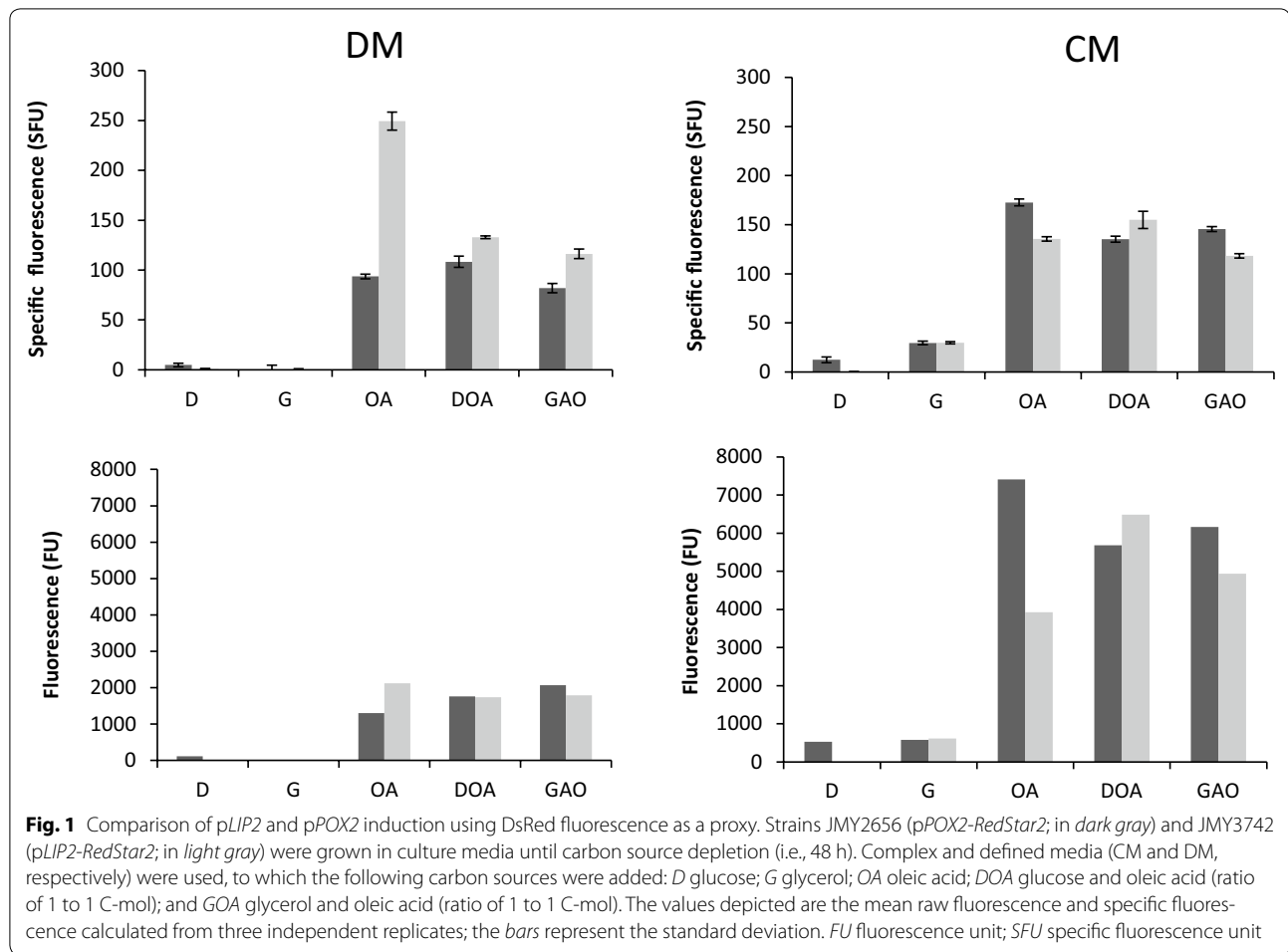
or triglycerides, and repressed or not induced in the presence of glucose or glycerol [14]. There is an additional layer of complexity: as highlighted elsewhere, the hexokinase Hxk1 is involved in the glucose-catabolite-mediated repression of the *LIP2* promoter [15]. Recently, Hussain and Coll (2015) reported on promoter engineering in *Y. lipolytica* [16]. Their findings highlight that promoter strength can be fine-tuned through the engineering of the different promoter constitutive components.

This study examined how p*POX2* and p*LIP2* regulation was affected by medium type and, more interestingly, by carbon source. To this end, the promoters were fused with a reporter gene that codes for a red fluorescent probe that was used to quantify promoter induction either at the global or at the single cell level.

Results

Impact of carbon source on promoter regulation

DsRed fluorescence was used to quantify p*POX2* and p*LIP2* induction levels in strains JMY2656 (p*POX2*-*RedStar2*) and JMY3742 (p*LIP2*-*RedStar2*) grown in defined medium (DM) and complex medium (CM) supplemented with various carbon sources. Specific fluorescence (i.e., biomass-corrected fluorescence) and raw fluorescence are depicted in Fig. 1. In defined medium supplemented with glucose (DMD) or glycerol (DMG), no fluorescence was detected for either strain, indicating that neither p*LIP2* nor p*POX2* had been induced. This result concurs with what has been seen in previous studies in which *LacZ* was used as a reporter [17]. In complex medium supplemented with glucose (CMD), p*LIP2* was not induced, while p*POX2* was slightly induced. Both were induced at low levels in complex medium supplemented with glycerol (CMG). In all media containing oleic acid (OA), specific fluorescence, and therefore induction levels, were significantly higher, especially for strain JMY3742 grown in DMOA. No significant differences in specific fluorescence were observed for strain JMY3742 grown in complex medium supplemented with glucose and oleic acid (CMDOA) or glycerol and oleic acid (CMGOA) versus in CMOA. This finding underscores that the repressive effects of glucose and glycerol are alleviated when oleic acid is also present. For JMY2656, there was a slight decrease in specific fluorescence in CMDOA (135 SFU) and CMGOA (154 SFU) versus in CMOA (172 SFU). JMY2656 showed similar specific fluorescence in DMDOA, DMGOA, and DMOA. In contrast, it was much reduced for JMY3742 grown in DMDOA (132 SFU) or DMGOA (116 SFU), as compared to when the strain was grown in DMOA (249 SFU). Raw fluorescence, a proxy for global induction levels, was much greater for strains grown in CM versus DM. This observation could be lined with the higher



biomass yield at the end of the culture in CM medium compared to DM medium (28.7 ± 2.7 and 15.3 ± 2.8 OD 600 nm, respectively). Moreover, pLIP2 induction was significantly greater in CMDOA and CMGOA than in CMOA. Cultures of strain JMY778 expressing the LacZ gene encoding β -galactosidase under the control of pLIP2 gave similar results (i.e., 117 ± 4 and 95 ± 5 Miller unit in CMOA and CMDOA, respectively). This finding means that with 50 % less oleic acid added to the culture medium, similar or higher induction levels could be obtained. Given these results, the impact of carbon sources on pLIP2 regulation in cultures grown in CM was investigated in greater detail.

LIP2 promoter regulation and carbon uptake

To better understand pLIP2 regulation, biomass production, carbon-source uptake, and DsRed fluorescence were characterized for JMY3742 cultures grown in CMD, CMG, CMOA, CMDOA, and CMGOA. Table 1 details JMY3742 growth and carbon uptake rates, and Fig. 2 depicts dynamics of cell growth, carbon source

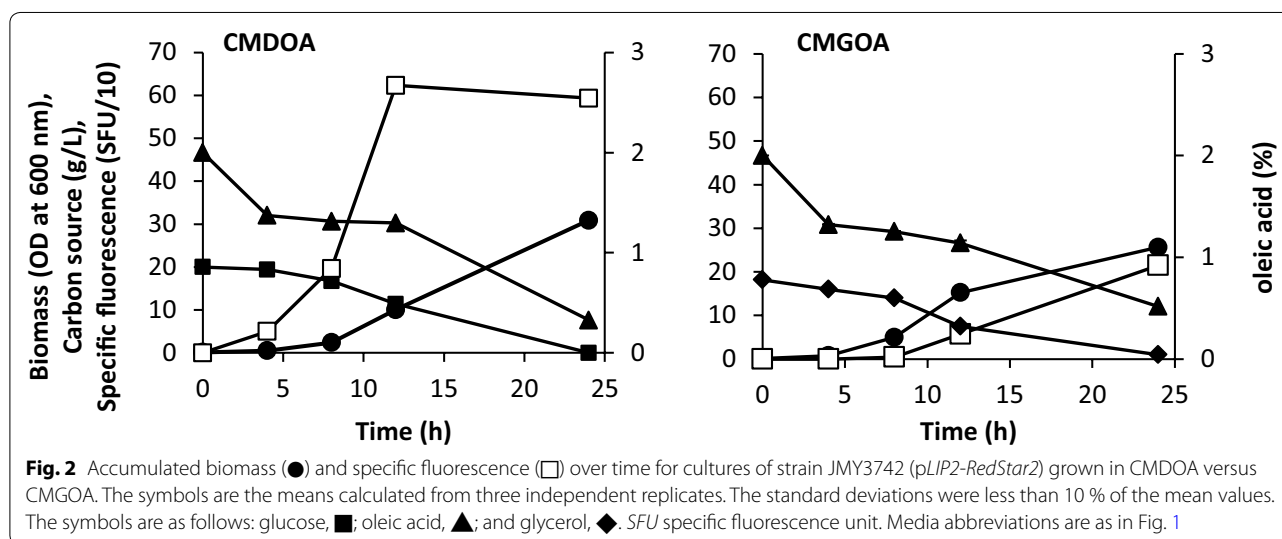
consumption and specific fluorescence for cultures performed in CMDOA and CMGOA. As can be seen, both carbon sources were consumed simultaneously from the beginning in CMDOA and CMGOA. This result suggests that *Y. lipolytica* is able to metabolize oleic acid and glucose or glycerol at the same time. However, the specific oleic acid uptake rate (r_{OA}) was reduced by 20–30 % in CMDOA [i.e., 0.07 g/(gDCW h)] and CMGOA [i.e., 0.08 g/(gDCW h)], as compared to in CMOA [i.e., 0.10 g/(gDCW h)]. Similarly, the specific glucose uptake rate (r_D) in CMDOA was 10 % less than in CMD [i.e., 0.09 and 0.10 g/(gDCW h), respectively]. In contrast, the specific glycerol uptake rate (r_G) was twofold lower in CMGOA. For all conditions, the growth rate (r_x) and the maximum biomass (X_{max}) obtained at the end of the growth phase (i.e., after 48 h; growth: mean of 0.25 gDCW/(L h) and maximum: 8.53 – 9.12 gDCW/L) were in the same range. The only exception was for cultures grown in CMG, where mean growth was 0.15 gDCW/(L h) and maximum biomass was 4.4 gDCW/L.

Table 1 Growth and uptake dynamics of strain JMY3742 cultured in CMDOA, CMGOA, CMD and CMG

Culture medium	r_x gDCW/(L h)	r_D g/(gDCW h)	r_G g/(gDCW h)	r_{OA} g/(gDCW h)	r_{luo} FU/h	X_{max} gCDW/L
CMDOA	0.26	0.08	–	0.07	108.12	9.12
CMGOA	0.25	–	0.11	0.08	82.23	8.91
CMOA	0.26	–	–	0.11	68.61	8.90
CMD	0.26	0.10	–	–	ND	8.53
CMG	0.15	–	0.21	–	8.51	4.44

The values provided are the means of three independent replicates; the standard deviations were less than 10 % of the means

r_x cell growth rate, r_{luo} specific induction rate, r_G specific glycerol uptake rate, r_D specific glucose uptake rate, r_{OA} specific oleic acid uptake rate, X_{max} final biomass. ND not detected



DsRed fluorescence and, therefore *pLIP2* induction, was 57 % (6482 SFU) and 24 % (4936 SFU) higher in CMDOA and CMGOA, respectively, than in CMOA (3926 SFU) (data not shown). Moreover, the specific induction rate (r_{luo}) was 37 % higher in CMDOA than in CMOA. This finding highlights that *pLIP2* induction was significantly greater when strain JMY3742 was grown in a medium containing a mixture of glucose and oleic acid (0.5/0.5 C-mol). To further explore the potential boost provided to *pLIP2* induction by growth in CMDOA, strain JMY3742 was grown for 60 h in different CMDOAs, which varied in their ratios of glucose to oleic acid (total carbon concentration of 1.8 Cmol/L); specific fluorescence was then determined. The results show that *pLIP2* induction varied depending on the glucose to oleic acid ratio (Fig. 3). It increased almost linearly when oleic acid levels ranged from 0 to 0.5 C-mol. It then plateaued between 0.6 and 0.9 C-mol. Finally, when oleic acid was the sole carbon source, *pLIP2* induction declined by 23 %. Under all the experimental conditions tested, similar final biomass values were obtained (data not shown). The results of this experiment highlight that mixtures of

glucose and oleic acid, in which the amount of glucose ranges from 0.1 to 0.4 C-mol, can increase *pLIP2* induction by almost 20 %.

Transcriptional analysis

To confirm that the *LIP2* promoter was being induced at higher levels in *Y. lipolytica* grown in CMDOA, RT-qPCR was used to quantify the transcription of the *RedStar2* and *LIP2* genes. These two genes were targeted since their expression was controlled by the same promoter in strain JMY3742. To facilitate comparisons, mRNA levels were normalized to those obtained for cultures grown in CMOA. The results show that *RedStar2* and *LIP2* were transcribed relatively less in CMD, although transcription levels increased 13.5- and 12.5-fold, respectively, in CMDOA (Fig. 4). This finding once again confirms that using a mixture of glucose and oleic acid significantly increases *pLIP2* induction.

The transcription levels of two key genes involved in glucose and oleic acid metabolism were also quantified. *POX2* encodes the acyl-CoA oxidase 2 involved in fatty-acid catabolism [15], and *PGK1* encodes the

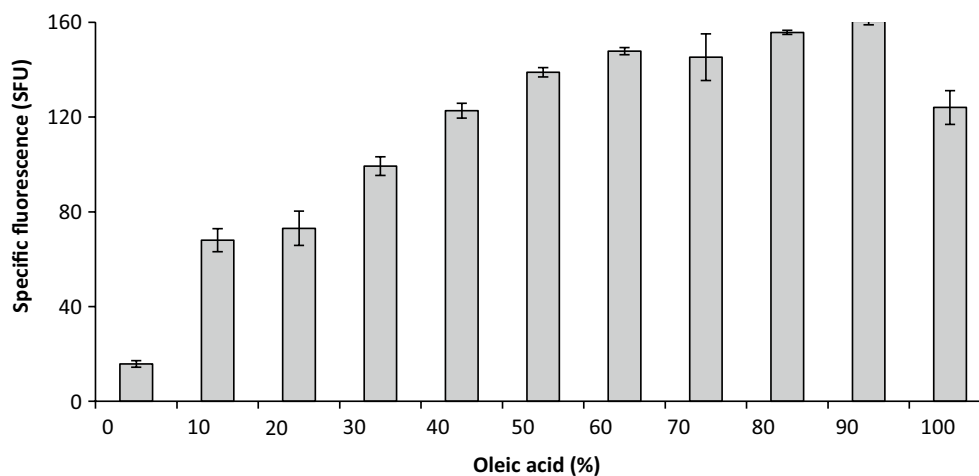


Fig. 3 Specific fluorescence after 60 h for cultures of strain JMY3742 grown in CMDOA (see Fig. 1 for definition) containing different ratios of glucose to oleic acid. The data depicted are the means calculated from three independent replicates. SFU specific fluorescence unit

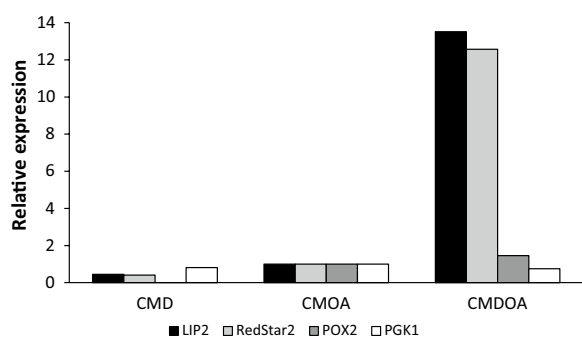


Fig. 4 Transcription of mRNA from *LIP2* (encodes an extracellular lipase), *RedStar2* (encodes the DsRed fluorescent protein), *POX2* (encodes acyl-CoA oxidase 2), and *PGK1* (encodes 3-phosphoglycerate kinase) in strain JMY3742 after 24 h of growth in CMD, CMOA, and CMDOA. The data were processed using the Livak method, and expression levels were normalized based on the results obtained in CMOA. The values are the means calculated from three independent replicates, and the standard deviations were less than 10 % of the means. Media abbreviations are as in Fig. 1

phosphoglycerate kinase that catalyzes the conversion of 1,3-bisphosphoglycerate into 3-phosphoglycerate during glycolysis [18]. Transcription levels were once again normalized to those obtained for cultures grown in CMOA. The expression of *PGK1* was relatively lower in CMD and CMDOA (20 and 25 %, respectively; Fig. 4). This finding concurs with that of a previous study, in which *PGK1* expression was found to be greater when a non-glycolytic substrate was used [18]. In contrast, *POX2* expression is modulated by the medium composition. For instance, transcription declined ten-fold in CMD but

increased 46 % in CMDOA. This result highlights that the β -oxidation pathway is more active in the presence of both glucose and oleic acid.

Analysis of carbon-source uptake by individual cells

As shown in Fig. 2, *Y. lipolytica* seems to be able to co-consume glucose and oleic acid. To further characterize this phenomenon at the single-cell level, glucose uptake capacity was quantified using the fluorescent glucose analog 2-NDBG [19], which cannot be metabolized. Flow cytometry was utilized to measure intracellular 2-NDBG fluorescence, which served as a proxy for the glucose transport capacity of individual cells. In Fig. 5, the area delimited by gate 1 corresponds to the fluorescence signal recorded in the absence of 2-NDBG—the phenotype expected for a cell exhibiting no glucose uptake (WGU). Cells grown in CMD showed the greatest 2-NDBG uptake capacity, and thus glucose transport (mean fluorescence: 60.5×10^3 FU; Table 2). The area delimited by gate 3 corresponds to the high-glucose-uptake phenotype (HGU). Cells grown in CMOA had a low glucose-uptake capacity (mean fluorescence: 8.5×10^3 FU); 58.7 % of cells displayed the WGU phenotype. In CMDOA, an intermediate situation was observed (mean fluorescence: 22.8×10^3 FU): 5.9 % of cells displayed the HGU phenotype, 20.9 % displayed the WGU phenotype, and 72 % displayed an intermediate phenotype. The results of this experiment suggest that heterogeneity within the cell population is the product of phenotype diversity as opposed to the presence of two distinct subpopulations, one that metabolizes only glucose and the other that metabolizes only oleic acid.

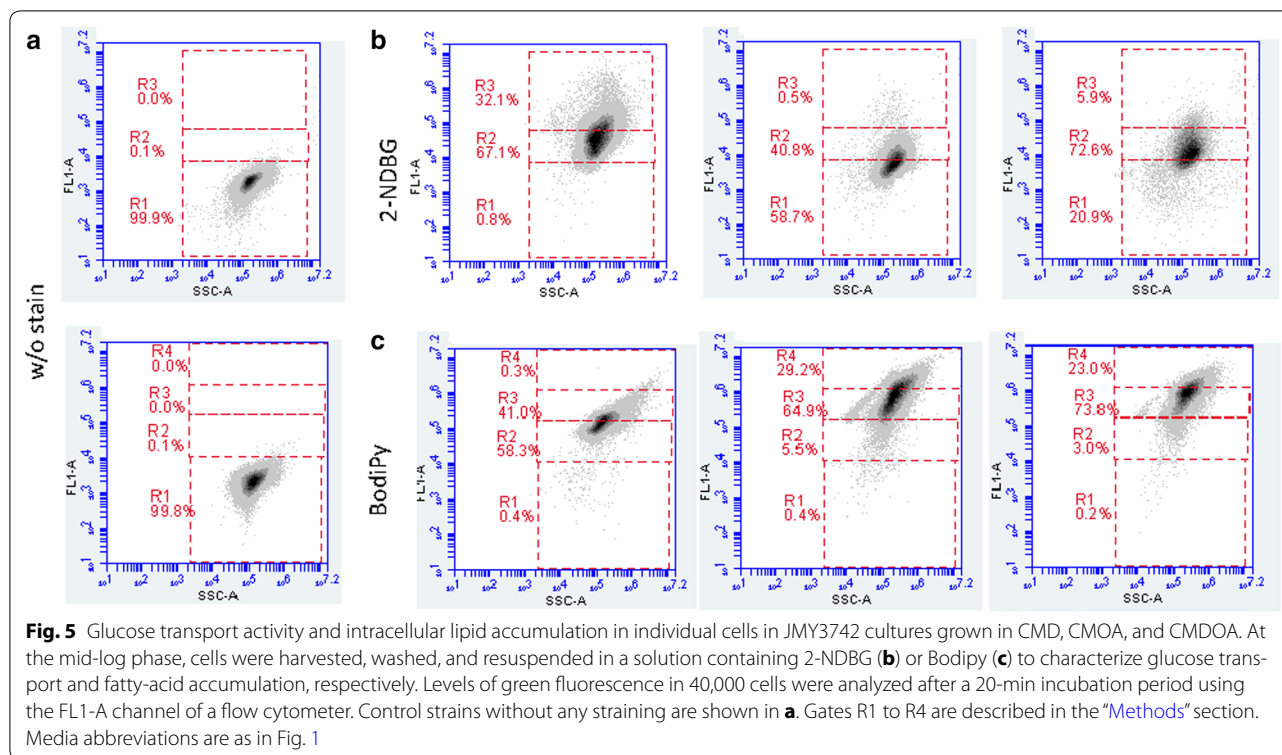


Table 2 Mean fluorescence of cells (in 1×10^3 FU) after 2-NDBG uptake or Bodipy staining

Probe	Culture medium			
	Control	CMD	CMOA	CMDOA
2-NDBG	1.8	60.5	8.5	22.9
Bodipy	3.4	160	900	840

In a related experiment, the intracellular accumulation of lipids in lipid bodies was monitored using Bodipy. In Fig. 5, the area delimited by gate R2 corresponds to the low-lipid-accumulation phenotype (LLA), while gate R4 corresponds to the high-lipid-accumulation phenotype (HLA). Gate R3, which lies between R2 and R4, corresponds to an intermediate phenotype (ILA). In the different media tested, cells accumulated lipids with at least LLA or ILA phenotype. Not surprisingly, mean fluorescence was lowest in CMD (160×10^3 FU) and highest in CMOA (900×10^3 FU) (Table 2). In CMDOA, lipid accumulation was intermediate (mean fluorescence: 840×10^3 FU, 73.8 % of the cell population with R2 phenotype); the lower levels of lipid accumulation imply that more oleic acid was available for direct catabolism. This assessment is supported by the slightly greater biomass produced in CMDOA (Table 1).

Discussion

Promoters of the *LIP2* and *POX2* genes have been successfully used in the development of regulated expression vectors [20]. However, cell factories exploiting these promoters are difficult to manage, especially when large fed-batch bioreactors are used because low-water soluble inducers such as oleic acid or methyl oleate are required [11]. Thus, it would be extremely helpful to reduce the loads of hydrophobic substrates without affecting heterologous protein productivity. One strategy may be to replace a certain portion of the substrate (e.g., oleic acid) with a non-repressive hydrophilic co-substrate that can serve as an alternative carbon source. We used such a strategy in *Pichia pastoris* to reduce methanol loads [21, 22].

To date, however, no study has examined *POX2* and *LIP2* regulation in media containing a second carbon source in addition to oleic acid. Here, the objective was therefore to better characterize the regulation of *pPOX2* and *pLIP2* when glucose or glycerol was employed as a co-substrate. Promoter regulation was investigated using DsRed, the fluorescent protein encoded by the *RedStar2* gene. This system was preferred over others, such as the LacZ/ β -galactosidase system, because DsRed has high intracellular stability. Hence, its accumulation in cells over time reflects total induction during the culturing

period. Moreover, based on the comparison of DsRed fluorescence and *RedStar2* mRNA expression, it appears that fluorescence is a good proxy for promoter induction, at least under the experimental conditions tested here.

In this study, two types of media were utilized: a defined medium derived from that of Gasmi et al. [23] and a complex medium developed by the authors [23]. Although both medium types yielded similar specific fluorescence levels, which meant that levels of promoter induction were similar, the results suggest that complex medium is to be preferred over defined medium because the latter yielded significantly less biomass. In complex medium supplemented with glucose, *pLIP2* production was completely repressed. This matches what was previously seen when a different reporting system was used [11, 17]. In media supplemented with glycerol, both promoters were slightly induced, suggesting that this carbon source is less suitable for producing biomass. Moreover, less biomass was obtained in complex medium supplemented with glycerol. Given these results, the study's focus shifted to using glucose as a co-substrate.

In a previous study, it was found that oleic acid is a good inducer for both *pLIP2* and *pPOX2* and that induction is medium dependent [24]. Here, similarly, *pLIP2* induction was greater than *pPOX2* induction in defined medium supplemented with oleic acid; in the equivalent complex medium, the opposite was true. Based on the fluorescence results, *pLIP2* induction appeared to be greater in complex medium containing both oleic acid and glucose than in oleic-acid-only medium. To confirm these results, mRNA transcription levels for the native *LIP2* gene and the recombinant *RedStar2* gene, both of which are regulated by *pLIP2*, were quantified for strain JMY3742 grown in the presence of different carbon sources. In medium supplemented with both glucose and oleic acid, *LIP2* and *RedStar2* expression were ten-fold higher than in oleic-acid-only medium. Our findings suggest that, when glucose is also present in the culture medium, more oleic acid is available for induction because part of the energy used in cell metabolism is furnished by the co-substrate. Using a simplified metabolic flux analysis, support for a similar hypothesis was found in *P. pastoris*; in that case, the promoter was methanol induced and sorbitol was used as a co-substrate [22]. These results also imply that *Y. lipolytica* is able to simultaneously metabolize oleic acid and a co-substrate such as glucose or glycerol. Glucose and glycerol co-consumption has recently been observed in *Y. lipolytica* strain IBT 446 [25]. In that study, the co-consumption of carbon sources was attributed to the absence of carbon catabolite repression. Indeed, the authors failed to

identify homologs for relevant genes during their BLAST search. This finding stands in contrast to results obtained with other eukaryotic cell factories, such as *Saccharomyces cerevisiae*, that exhibit carbon catabolite repression in the presence of glucose [26]. Here, it has been clearly demonstrated that *Y. lipolytica* is able to simultaneously consume oleic acid and a co-substrate such as glucose or glycerol.

Surprisingly, *POX2* was expressed at significantly higher levels (46 %) in medium supplemented with glucose and oleic acid than in medium containing just oleic acid, which suggests that β -oxidation is more active in the former. However, while the specific oleic acid uptake rate, r_{OA} , was similar in both media, lipid accumulation in lipid bodies was somewhat lower in the glucose-and-oleic-acid medium. Indeed, the percentage of cells displaying the high-lipid-accumulation phenotype was smaller in the latter medium than in the oleic-acid-only medium. Therefore, when a co-substrate is available, cells seem prone to directly metabolize oleic acid instead of storing it in lipid bodies.

Furthermore, *PGK1* expression was slightly lower in the glucose-and-oleic-acid medium than in the oleic-acid-only medium. Since *PGK1* encodes a glycolytic enzyme, its lower levels of expression suggest a lower level of glucose catabolism in that medium. This observation fits with the lower glucose uptake rate, r_D , observed in the glucose-and-oleic-acid medium and with the results of the 2-NDBG uptake experiments.

This study clearly shows that *Y. lipolytica* can simultaneously metabolize oleic acid and glucose. Nonetheless, the question arose: can all cells co-consume both carbon sources or are cultures composed of two subpopulations, each exploiting only one of the two carbon sources? The experiments carried out at the single-cell level suggest that individual cells can indeed co-consume both carbon sources.

Conclusions

This study found that *pLIP2* should be a promoter of choice for the synthesis of recombinant proteins, especially on complex medium. Its failure to be induced in medium in which glucose was the sole carbon source allows *Y. lipolytica* cells to grow without any leaks of *pLIP2*-driven gene expression. Compared to the *POX2* promoter, the *LIP2* promoter also permits to use less oleic acid when glucose is available as co-substrate; the ideal glucose/oleic acid ratio appears to be 40/60. Moreover, the results of the flow cytometry experiments clearly demonstrate that individual cells can adapt to metabolize both glucose and oleic acid.

Methods

Plasmids, strains, media, and culture conditions

The plasmids, oligonucleotides, *Escherichia coli* strains, and *Y. lipolytica* strains used in this study are listed in Table 3. The *E. coli* strain Mach1T1 (Thermo Fisher Scientific, Belgium) was used in the transformation and amplification of the recombinant plasmid DNA. Bacteria were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium supplemented with kanamycin sulphate as necessary (50 mg/L, Sigma-Aldrich, Belgium). The *Y. lipolytica* strains were grown at 28 °C in YPD or YNB supplemented to meet the requirements of auxotrophs [27]. To select the Ura⁺ clones, transformants were plated on YNBura (YNB containing 0.01 % uracil; Sigma-Aldrich). The defined medium (DM), which was derived from GNY medium [28], was composed of 0.93 g/L CaSO₄·2H₂O, 18.2 g/L K₂SO₄, 7.28 g/L MgSO₄·7H₂O, 4.4 g/L KOH, 26.7 mL/L H₃PO₄ 85 %, 10 mg/L FeCl₃, 1 g/L glutamate, 5 mL/L of PTM1 solution (6 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.08 g/L KI, 3 g/L MnSO₄·2H₂O, 0.2 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g/L H₃BO₃, 0.5 g/L CoCl₂·6H₂O, 20 g/L ZnCl₂, 6.5 g/L FeSO₄·7H₂O and 5 mL/L H₂SO₄) as well as 2 mL/L of a vitamin solution (8 µg/L biotin, 200 µg/L thiamin, 4 µg/L

myo-inositol). The complex medium (CM) was composed of 10 g/L yeast extract and 20 g/L tryptone. Both media contained a sodium phosphate buffer (50 mM; pH 6.8) and were supplemented with 1.8 C-mol/L of various carbon sources as follows: glucose (D), glycerol (G), oleic acid (OA), glucose and oleic acid (DOA; 0.9 C-mol each), or glycerol and oleic acid (GOA; 0.9 C-mol each) (see Additional file 1). A fatty acid stock solution (20 % oleic acid, 0.5 % Tween 20) was subject to sonication for 1 min to carry out emulsification; a Sonics Vibra-Cell™ Processor (USA) was used. Precultures were grown in 50-mL flasks containing 15 mL of YPD medium; they were incubated at 28 °C and kept at 250 rpm for 20 h. Culturing was performed under the same conditions but using 24-square deepwell microtiter plates (System Duetz, EnzyScreen, [29]). Culture volume was 2 mL, and inoculation was such that the initial optical density (OD) at 600 nm was 0.1. Cultures were performed in triplicate.

General genetic techniques

The media and techniques used for *Y. lipolytica* have been described elsewhere [30], and standard media and techniques were used for *E. coli* [31]. Restriction enzymes,

Table 3 Strains, plasmids, and primers used in this study

Yeast strains	Genotype	Source
W29	Wild-type strain	[30]
JMY2033	W29 <i>ura3::LEU2ex-zeta, leu2-270, xpr2-322</i>	[39]
JMY2656	JMY2033 pPOX2-RedStar2	This study
JMY3742	JMY2033 pLIP2-RedStar2	This study
<i>E. coli</i> strain	Plasmid description	
JME509	JMP114	[35]
JME803	JMP62	[40]
JME1394	JMP62-type <i>LEU2ex-pTEF-RedStar2</i>	[41]
JME1491	JMP62-type <i>URA3ex-pTEF-RedStar2</i>	This study
JME1500	JMP62-type <i>URA3ex-pPOX2b-RedStar2</i>	This study
JME1945	JMP62-type <i>URA3ex-pLip2-RedStar2</i>	This study
Primers	Sequence (5'–3')	Restriction site
LAM51	ACTTTCGAAATGATAACGTTGGAGAAGAG	<i>Bst</i> BI
LAM52	TCCGATCCTGAGGAGAGCTGGTACTTGG	<i>Bam</i> HI
Lip2Qfo	CGAGGAACCCACTCTCTGG	
Lip2Qrev	GCTCAATCACAGAGTCGAGC	
RedStarQfo	CGAAGGTGAAGGTGAGGGTAG	
RedStarQrev	CCACTTGAAACCTTCTGGGAAG	
ACT-R	GGCCAGCCATATCGAGTCGCA	
ACT-F	TCCAGGCCGCTCTCTCCC	
POX2fo	GCCTGCATTGACGACAGTTCTC	
POX2rev	CGTCGAAACAACCTCATTGAGGC	
PGKfo	CAGGTGAGTACCCACGAAACGC	
PGKrev	GCATCCCAATTGCTTAGCATTTG	

DNA polymerases, and ligases were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Competent *E. coli* cells were obtained by the rubidium chloride method adapted from [32]. Genomic DNA was extracted from yeast cells as described elsewhere [33]. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed with the primers mentioned in the text. Pyrobest DNA polymerase (Ozyme) was used for cloning, and ExTaq (Takara, France) was used for verifying genomic structures. DNA fragments were purified from PCR products using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) or recovered from agarose gels using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). DNA sequencing was performed by GATC Biotech. Primers were designed with Primer 3 software (<http://simgene.com/Primer3>) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium).

Construction of strains JMY2656 and JMY3742

pLIP2 and pPOX2 were fused with the *RedStar2* gene, which codes for a fast-maturing variant of the red fluorescent protein DsRed [34]. They were then inserted into the zeta-docking platform of *Y. lipolytica* strain JMY2033. First, the *LEU2ex* selectable marker of plasmid JME1394 was exchanged with the *URAex* marker of JMP114 using *I-SceI* digestion-ligation; this process yielded JME1491. Second, a 1.6-kb fragment of the *LIP2* promoter [35] was amplified via PCR from W29 genomic DNA and flanked by *BstBI* and *BamHI* sites using the primer pair LAM51/LAM52. The *POX2* promoter was rescued from JMP62 as a 1-kb *Clal-BamHI* fragment. The two promoters were cloned into JMP1491 at the *Clal-BamHI* restriction sites. The resulting plasmids were *NotI* digested, and the promoter-*RedStar2* expression cassettes were purified on gels before being introduced into the zeta-docking platform of the *Y. lipolytica* strain JMY2033, which yielded strains JMY2656 and JMY3742.

Analytical methods

Cell growth was estimated using either OD at 600 nm or dry cell weight (DCW), as previously described [21]. The concentration of glucose in the culture broth was determined using a BioMerieux RTU7500 Kit (BioMerieux, France). Oleic acid and glycerol concentrations were determined by HPLC on a HP Agilent 1100 series apparatus (Agilent Technologies, Belgium) using an Aminex HPX-87H ion-exclusion column (300 × 7.8 mm Bio-Rad). Glycerol was eluted with 5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.5 mL/min at 30 °C, and its quantified using a refractive index detector. Oleic acid was eluted with a mixture of acetonitrile, H₂O, and acetic acid (98:2:0.5; v/v) at a flow rate of 0.5 mL and was detected at 205 nm. Total nitrogen content was estimated via Kjeldahl's method. A Kjeltac™ System I with a Kjeltac 1026 Distilling Unit and

a 6120 Kjeldahl digestion system (Tecator AB, Sweden) was used. DsRed fluorescence was measured using black microplates (Microfluor™) and a FLUOstar/POLARstar Galaxy Microplate Reader (BMG Labtech, Germany); the excitation and emission settings were 510 and 590 nm, respectively. β-galactosidase was measured as described previously (Fickers et al. [17]).

Transcriptional analysis

Samples of yeast cells (1 mL) were centrifuged at 5000×g for 5 min; they were then stored at −80 °C until further analyses could be performed to prevent RNA degradation. RNA extraction and DNase treatment were carried out using a NucleoSpin RNA Kit (Macherey–Nagel, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using spectrophotometry; a Thermo Scientific NanoDrop 2000 UV–Vis Spectrophotometer was employed. RNA quality was evaluated via agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed in a total volume of 10 μL, which included 50 ng of total RNA using the Core Kit (Eurogentec, Belgium) in accordance with the manufacturer's instructions. The target genes *LIP2*, *RedStar2*, *POX2*, and *PGK* were amplified using the primer pairs Lip2Qfo/Lip2Qrev, RedStarQfo/RedStarQrev, Pox2fo/Pox2rev, and PGKfo/PGKrev, respectively. The reference gene (ACT-encoding actin) was amplified using the ACT-F/ACT-R primer pair [36]. Average amplicon size was 200 bp. Quantitative amplification was carried out using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The following reaction protocol was employed: 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, and 95 °C for 15 s. Reaction mixtures were prepared using the Mesa GRreen qPCR MasterMix Plus Kit (Eurogentec) as follows: 12.5 μL of the Mesa Green qPCR Master Mix Plus solution was combined with 1 μL of each primer (0.2 μM), 5 μL of cDNA (5 ng), and 5.5 μL of DNase/RNase free water. Primer specificity was validated using a melting-curve analysis. The amplification efficiency of each oligonucleotide was similar (84–107 %). The Livak method was used to analyze the raw data, and the results were standardized using the data from the complex medium supplemented with oleic acid (CMOA) as a reference.

Quantification of 2-NBDG uptake

The uptake of (2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose), or 2-NBDG, by *Y. lipolytica* cells was estimated as described elsewhere [37]. At the mid-log phase, 1 mL of culture broth was centrifuged at 3200g for 4 min at 4 °C. The cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) containing 5 % ethanol to remove any remaining extracellular oleic acid;

they were then resuspended in fresh medium without a carbon source such that OD at 600 nm was 0.5. A 100- μ L sample of this cell suspension was centrifuged. The resulting cell pellet was immediately placed on ice for a few seconds until 2-NBDG uptake was initiated by adding 20 μ L of 2-NBDG (10 mM). After a 20-min incubation phase at 30 °C, the reaction was stopped by adding 100 μ L of 10 % formalin. Then, 1 mL of PBS was added and the sample was analyzed using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD Bioscience, Belgium).

Lipid body staining

Lipid bodies were stained using Bodipy Lipid probe (Thermo Fisher Scientific, USA) as described elsewhere [38]. Cells were harvested and washed twice with PBS containing 5 % ethanol. They were then resuspended in PBS (OD600 = 1), to which 1 % (v/v) Bodipy stock solution (1 mg/mL in ethanol) was added. After 20 min of incubation at room temperature, cells were washed twice with PBS to remove the excess Bodipy. Neutral lipid content was quantified at the single cell level using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer.

Flow cytometry and data analysis

Lipid bodies stained with Bodipy and cells containing 2-NBDG were detected using a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer. For each sample, 40,000 cells were analyzed using the FL1 channel to identify fluorescence associated with Bodipy and 2-NBDG presence (excitation was performed with a 20-mW, 488-nm solid-state blue laser; the emission wavelength was 533/30 nm). Flow rate was set to medium and threshold of 80,000 AU was applied on the forward scatter (FSC) channel for reducing background noise. For both the FL1 and the SSC, the area of the global signal was recorded (FL1-A, SSC-A). The flow cytometry dotplots (FL1/SSC) were analyzed using CFlowPlus software (Accuri, BD Bioscience). For further processing, the raw data were exported as.fcs files and loaded in MatLab using the `fca_readfsc` function (downloaded from the MatLab File Exchange file server; <http://www.mathworks.com>). Mean fluorescence was calculated for each sample, and the gates were defined as follows. Gate R1 encompassed 99.9 % of the basal fluorescence signal of the cells (i.e., absence of Bodipy or 2-NBDG). In the hexose transport experiment, gate R3 encompassed intensity values greater than the mean intensity of 2-NBDG fluorescence for cells grown in CMD, while gate R2 encompassed intermediate values (i.e., those between R3 and R1). In the lipid accumulation experiment, gate R2 included intensity values lower than the mean intensity of Bodipy fluorescence for cells grown in CMD, while gate R4 included intensity values higher

than the mean intensity of Bodipy fluorescence for cells grown in CMOA. Gate R3 included intermediate values (i.e., those between gates 2 and 4). The percentages represent the percentage of cells found in each gate. Each flow cytometry analysis was performed twice.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Composition of the medium used in this study.

Abbreviations

C-mol: carbon molar; Cmol/L: carbon molar per liter; w/w: ratio weight to weight; DM: defined medium; DMD: defined medium glucose; DMG: defined medium glycerol; DMOA: defined medium oleic acid; DMDOA: defined medium glucose oleic acid; DMGOA: defined medium glycerol oleic acid; CM: complex medium; CMD: complex medium glucose; CMG: complex medium glycerol; CMOA: complex medium oleic acid; CMDOA: complex medium glucose oleic acid; CMGOA: complex medium glycerol oleic acid; r_x : cell growth rate; r_{flu} : specific induction rate; r_G : specific glycerol uptake rate; r_F : specific glucose uptake rate; r_{OA} : specific oleic acid uptake rate; X_{max} : final biomass; gDCW/(L h): gram of dry cell weight per liter and per hour; g/(gDCW h): gram per gram of dry cell weight and per hour; FU: fluorescence unit; FU/h: fluorescence unit per hour; SFU: specific fluorescence unit; PCR: polymerase chain reaction; RT-qPCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; 2-NBDG: 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose; WGU: without glucose uptake; HGU: high-glucose-uptake; LLA: low-lipid-accumulation; HLA: high-lipid-accumulation; YPD: yeast extract peptone dextrose; OD: optical density; YNB: yeast nitrogen base; HPLC: high performance liquid chromatography; PBS: phosphate buffer saline; SSC: side scatter; FSC: forward scatter; nd: not detected.

Authors' contributions

HS, TK, AMC, SS carried out the experimental work. HS drafted the manuscript. FD, JMN, AMC, PF planned the experiments, analyzed the data and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Biotechnology and Bioprocesses, Université libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, 1050 Brussels, Belgium. ² Microbial Processes and Interactions, University of Liège-Gembloux AgroBio Tech, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium. ³ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en Josas, France.

Acknowledgements

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Data, plasmid maps and sequences are available at University of Liège-Gembloux AgroBio Tech, Gembloux, Belgium on the charge of Prof. Patrick Fickers.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable. The manuscript does not report data collected from humans or animals.

Funding

TK was funded by an Erasmus Mundus EPIC postdoctoral grant, and HS received a Ph.D. grant from the Xenophylia Fund at the Université libre de Bruxelles.

Received: 2 June 2016 Accepted: 9 September 2016

Published online: 20 September 2016

References

- Fickers P. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Curr Res Microb Biotechnol*. 2014;2:354–63.
- Sibirny A, Madzak C, Fickers P. Genetic engineering of non-conventional yeast for the production of valuable compounds. *Microb Biotechnol Prog Trends*. 2014. doi:10.1201/b17587-5.
- Madzak C, Beckerich J-M. Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G, editor. *Yarrowia lipolytica*, vol. 25. Springer: Heidelberg; 2013. p. 1–76.
- Madzak C, Blanchin-Roland S, Cordero Otero RR, Gaillardin C. Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter. *Microbiol*. 1999;145(Pt 1):75–87.
- Nicaud JM, Fabre E, Beckerich JM, Fournier P, Gaillardin C. Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease (XPR2) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*. 1989;12:285–97.
- Ogrydziak D, Scharf S. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B. *J Gen Microbiol*. 1982;128:1225–34.
- Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, Dalbøge H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 1998;14:1267–83.
- Madzak C, Treton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2000;2(207–216):7.
- Madzak C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G, editor. *Yarrowia lipolytica*. Springer: Berlin Heidelberg; 2013. p. 1–76.
- Fickers P, Destain J, Thonart P. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*. 2005;27:1751–4.
- Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*. 2005;5:527–43.
- Beopoulos A, Chardot T, Nicaud J. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochim*. 2009;91:692–6.
- Wang X, Sun Y, Ke F, Zhao H, Liu T, Xu L, Liu Y, Yan Y. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;166:1355–67.
- Juretzek T, Wang H-J, Nicaud J-M, Mauersberger S, Barth G. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*. 2000;5:320–6.
- Fickers P, Nicaud J, Destain J, Thonart P. Involvement of hexokinase Hxk1 in glucose catabolite repression of LIP2 encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol*. 2005;50:133–7.
- Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S, Blenner MA. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synt Biol*. 2015;5(3):213–23.
- Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;63:136–42.
- Le Dall M-T, Nicaud J-M, Treton B, Gaillardin C. The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowia lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. *Curr Genet*. 1996;29:446–56.
- Roy A, Dement AD, Cho KH, Kim J-H. Assessing glucose uptake through the yeast hexose transporter 1 (Hxt1). *PLoS ONE*. 2015;10:e0121985.
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich J. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*. 2004;109:63–81.
- Carly F, Niu H, Delvigne F, Fickers P. Influence of methanol/sorbitol co-feeding rate on pAOX1 induction in a *Pichia pastoris* Mut+ strain in bioreactor with limited oxygen transfer rate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(4):1–7.
- Niu H, Jost L, Pirlot N, Sassi H, Daukandt M, Rodriguez C, Fickers P. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut+/pAOX1-lacZ strain. *Microb Cell Fact*. 2013;12:33.
- Gasmi N, Ayed A, Nicaud J-M, Kallel H. Design of an efficient medium for heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica*: case of human interferon alpha 2b. *Microb Cell Fact*. 2011;10:38.
- Desfougeres T, Haddouche R, Fudalej F, Neuveglise C, Nicaud JM. SOA genes encode proteins controlling lipase expression in response to triacylglycerol utilization in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*. 2010;10:93–103.
- Workman M, Holt P, Thykaer J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express*. 2013;3:58.
- Gancedo J. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:334–61.
- Wang D, Zheng F, Holmberg S, Kohlhaw GB. Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem*. 1999;274:19017–24.
- Gasmi N, Ayed A, Nicaud JM, Kallel H. Design of an efficient medium for heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica*: case of human interferon alpha 2b. *Microb Cell Fact*. 2011;10:1475–2859.
- Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:2641–6.
- Barth G, Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica*—nonconventional yeasts in biotechnology. Heidelberg: Springer, Berlin; 1996. p. 313–88.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166:557–80.
- Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:2948–53.
- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 2004;21:947–62.
- Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, Thonart P, Nicaud JM. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Met*. 2003;55:727–37.
- Kar T, Destain J, Thonart P, Delvigne F. Scale-down assessment of the sensitivity of *Yarrowia lipolytica* to oxygen transfer and foam management in bioreactors: investigation of the underlying physiological mechanisms. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(2):337–46. doi:10.1007/s10295-10011-11030-10298.
- Achilles J, Muller S, Bley T, Babel W. Affinity of single *S. cerevisiae* cells to 2-NBD glucose under changing substrate concentrations. *Cytometry A*. 2004;61:88–98.
- Dulermo R, Gamboa-Melendez H, Dulermo T, Thevenieau F, Nicaud JM. The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*. 2014;19:883–96.
- Lazar Z, Rossignol T, Verbeke J, Crutz-Le Coq A-M, Nicaud J-M, Robak M. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40:1273–83.
- Nicaud J, 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;2:371–9.
- Kabran P, Rossignol T, Gaillardin C, Nicaud J-M, Neuveglise C. Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *DNA Res*. 2012;19(3):231–44.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



**Chapitre III: pH and not cell
morphology modulates *pLIP2* induction
in the dimorphic yeast *Y. lipolytica***

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Hosni Sassi, Frank Delvigne, H la Kallel and Patrick Fickers. pH and not cell morphology modulates pLIP2 induction in the dimorphic yeast *Y. lipolytica*. *Biotechnology Journal*. 2016

Title:

pH and not cell morphology modulates pLIP2 induction in the dimorphic yeast *Y. lipolytica*

Authors

Hosni Sassi¹, Frank Delvigne², H la Kallel³ and Patrick Fickers^{1,2}

Affiliations and addresses

¹Biotechnology and Bioprocesses, Université libre de Bruxelles, avenue F.D. Roosevelt 50, 1050 Bruxelles, Brussels, Belgium : tel +32-2-650.30.49/ 30.44, fax +32-2-650.35.75 ;

²Microbial Processes and Interactions, University of Liège, Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgium : tel + 32 81 622 311 ;

³Laboratory of Molecular Microbiology, Vaccinology and Biotechnology Development, Biofermentation Unit, Institut Pasteur de Tunis, Tunis, Tunisia.

Author's correspondent

Patrick Fickers pfickers@ulg.ac.be

Microbial Processes and Interactions, University of Liège-Gembloux AgroBio Tech,
Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium

Introduction

Certes, *Y. lipolytica* est une levure dimorphique. Plusieurs facteurs d'influence ont été identifiés pour leur implication dans ce phénomène, dont le pH du milieu. D'après la littérature, la plupart des gènes impliqués dans cette transition phénotypique sont impliqués aussi dans le métabolisme nutritionnel, entre autres les sources de carbone et d'azote. Or, d'après nos travaux antérieurs, nous avons montré que le promoteur *LIP2* est fortement régulé par les sources de carbone (chapitre II). Par conséquent, il a été suggéré que la morphologie cellulaire peut avoir une influence sur la régulation du promoteur *LIP2*. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée pour tenter d'établir un lien direct entre la filamentation et la régulation des promoteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes par *Y. lipolytica*.

Dans ce cadre, la première partie de ce travail a pour objectif de discriminer les deux morphologies cellulaires en se basant sur le changement de pH du milieu. La seconde partie a pour but de caractériser la relation entre la morphologie cellulaire et l'induction du promoteur *LIP2*, et ce, en utilisant deux gènes rapporteurs *Redsart2* et *pLIP2* préalablement utilisée dans le chapitre II. Le niveau d'induction a été mesuré relativement par la mesure de l'activité β -galactosidase et par analyse à l'échelle cellulaire en utilisant la technique de cytométrie en flux.

pH and Not Cell Morphology Modulate pLIP2 Induction in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*

Hosni Sassi¹ · Frank Delvigne² · H la Kallel³ · Patrick Fickers²

Received: 16 November 2016 / Accepted: 25 January 2017
  Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* has become an emerging cell factory for recombinant proteins production. Expression vectors involving *LIP2* promoter (pLIP2) have been developed and used successfully. However, the relationship between dimorphic transition (i.e., cell morphology) and pLIP2 regulation is still unclear and must be assessed to improve process robustness. This requests to discriminate the effect of cell morphology from that of effectors, such as pH, that trigger the dimorphic transition. This was performed using gene reporter system based on β -galactosidase activity and DsRed fluorescence, single-cell analysis by flow cytometry, and quantification of gene expression. Our results clearly pointed out that cell morphology has not effect on the regulation of pLIP2. By contrast, pH modification yielded to phenotypic heterogeneity, potentially leading to a lack of robustness of the cell population. Taken altogether, our results demonstrated that, under appropriate environmental conditions (e.g., pH being an important factor), *Y. lipolytica* could be considered as a robust and reliable host for recombinant protein production.

Abbreviations

rProt Recombinant protein

pLIP2	Promoter of LIP2 gene
YTH	Yeast-to-hypha
DMDOA	Defined medium supplemented with glucose and oleic acid
CMDOA	Complex medium supplemented with glucose and oleic acid
RPM	Rotation per minute
C-mol	Carbon concentration in mole per liter
HPLC	High-performance liquid chromatography
MU	Miller unit
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction
SSC	Side scatter
FSC	Forward scatter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
FU	Fluorescence unit

Introduction

The non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* has recently been recognized as an emerging cell factory for recombinant protein (rProt) production [7, 10]. This could be related to its capacity to grow at high cell density on inexpensive nutrients and to secrete proteins at high yield. Expression vectors involving *LIP2* promoter (pLIP2) have been developed and used successfully for rProt production at yields similar to or even higher than those of other cell factories, such as *Pichia pastoris* [7]. *Y. lipolytica* is also known as a dimorphic fungi. It is able to grow either as yeast-like cell (i.e., with an ovoid morphology) or branching hyphae (i.e., with a filamentous morphology) [1, 10]. In its natural environment, *Y. lipolytica* grows as a mixture of budding and mycelia cells. However, under controlled conditions, it may grow almost homogeneously as yeast-like

  Patrick Fickers
pfickers@ulg.ac.be

¹ Biotechnology and Bioprocesses, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

² Microbial Processes and Interactions, TERRA Research Centre, University of Liège - Gembloux AgroBio Tech, Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgium

³ Laboratory of Molecular Microbiology, Vaccinology and Biotechnology Development, Biofermentation Unit, Institut Pasteur de Tunis, Université Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

cell or branching hyphae. Several effectors, such as pH or nitrogen source, have been reported to be responsible for the yeast-to-hypha (YTH) transition [12]. Indeed, *Y. lipolytica* grows in a yeast form at pH 3, whereas hypha is mainly observed at pH 6. The YTH transition has been shown responsible for the modification of the expression of more than 225 genes [8], hence affecting cell physiology [9] and more interestingly carbon metabolism [11]. The regulation of *pLIP2* is closely interconnected with the central carbon metabolism [14]. It has been also reported that the production of protein driven by *pLIP2* is positively correlated to the proportion of hyphae in the cell population [3]. Accordingly, cell morphology is suspected to modulate, directly or indirectly, *pLIP2* regulation, hence rProt synthesis. Here, we report on the characterization of this relationship using *pLIP2* reporter systems (i.e., β -galactosidase activity and DsRed fluorescence) and single-cell analysis based on flow cytometry. Indeed, this technology could be used for determining simultaneously the rProt production potential and cell morphology (i.e., based on the forward scatter FSC or the side-scatter SSC).

Materials and Methods

Strain, Media, and Culture Conditions

The strains used in this study were *Y. lipolytica* JMY766 (*pLIP2-LacZ*, [5]) and JMY3742 (*pLIP2-Redstar2*, [14]). The defined medium (DMDOA) and the complex medium (CMDOA) compositions were as described elsewhere [14]. Both media contained oleic acid and glucose at 0.9 C-mol each as carbon source. They were buffered at pH 3 or pH 6 according to [13] in order to induce YTH transition. Cultures were performed for 24 h in 250 ml shake flask containing 50 ml of medium or in 24-square deepwell microtiter plates (System Duetz, EnzyScreen, [2]) as previously described [14].

Analytical Methods

Cell growth was estimated using OD at 600 nm. The concentration of glucose in the culture broth was determined using a BioMerieux RTU7500 Kit (BioMerieux, France), whereas oleic acid concentrations were determined by HPLC as previously described [14]. β -galactosidase activity was determined according to [5] and expressed in Miller unit (MU, i.e., specific activity). For transcriptional analysis by RT-qPCR, the target gene *LacZ* was amplified using primer pair *LacZ-F* (GCATGGTGCCAATGAATCGT) and *LacZ-R* (CCAGCGACCAGATGATCACA) as described elsewhere [14]. The fluorescence of the DsRed protein was quantified by using an Attune™ flow cytometer (Applied

Biosystem). *Y. lipolytica* JMY3742 cells were harvested after 30 h of culture in CMDOA and DMDOA at pH 3 and 6, and washed with a 20% ethanol solution before being centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The cell pellet was then diluted in Attune Focusing Fluids 1× solution (Thermo Fisher Scientific). For each sample, 40,000 cells were analyzed using the SSC-A/FSC-A channel for cell morphology parameters and with the FL1 channel (dsRED2 channel) to quantify the fluorescence associated with DsRed. Excitation was performed with a 561 nm yellow laser (50 mW) and emission was recorded at 560/16 nm. For all the analyses, the sheath fluid flow rate was set at 200 μ l/min. For SSC, FSC, and dsRED2 channels, the area and the height of the global signal were recorded. Flow cytometry data acquisition and analysis were performed by Attune™ Flow Cytometry Software (Thermo Fisher Scientific). Cell morphology and shape were analyzed based on SSC-A/FSC-A dotplots, while DsRed fluorescence level was analyzed based on FSC-H/dsRED2 dotplots. Filamentous and non-filamentous subpopulations were determined based on SSC-A/FSC-A dotplots. For this purpose, gates were set based on the use of reference cell suspensions exhibiting either yeast-like cells or hyphae. These suspensions were generated according to [13]. For FSC-H/DsRED dotplots, the red dots correspond to yeast-like cells, while green dots correspond to hyphae. Gates in solid line encompass for cell exhibiting DsRed fluorescence, while gates in dotted line correspond to cells with a lower level of DsRed fluorescence. These gates were performed based on a standard cell suspension without the DsRed expression module. Cell morphology was observed after staining with crystal violet (2% in a 20/80% ethanol/water solution) for 1 min using a Zeiss Axioplan 2 microscope (100× objective lens).

Result and Discussion

Overall Quantification of *pLIP2* Induction

Y. lipolytica strain JMY766 was grown in DMDOA and CMDOA at pH 3 and pH 6 for 48 h. As shown in Fig. 1, cells were in yeast-like form in all the experimental conditions tested, except in DMDOA at pH6 where cells adopt a filamentous form (i.e., branched hyphae). For both media, cell growth, glucose, and oleic acid consumption rates were similar at the two pH tested (data not shown). The *pLIP2-LacZ* reporter system integrated at the *LEU2* locus in strain JMY766 [5] was used to quantify *pLIP2* induction level. Measurement of the β -galactosidase activity was performed after 24 h of growth, at the onset of stationary phase when *pLIP2* induction is high [4]. As shown in Fig. 1, the β -galactosidase activities were not significantly different in complex medium (CMDOA) at pH 3 and 6

Fig. 1 Specific β -galactosidase activity (light gray) and transcription of mRNA from *LacZ* (encodes β -galactosidase, dark gray) in *Y. lipolytica* JMY766 after 24 h of growth in CMDOA and DMDOA medium at pH 3 and pH 6 (a). The data from RT-qPCR were processed using the Livak method, and expression levels were normalized based on the results obtained at pH 3. The values are the means calculated from three independent replicates, and the standard deviations were less than 10% of the means. **b** Microscopic observations of cells grown in the different experimental conditions. Cells were stained with cristal violet. (Color figure online)

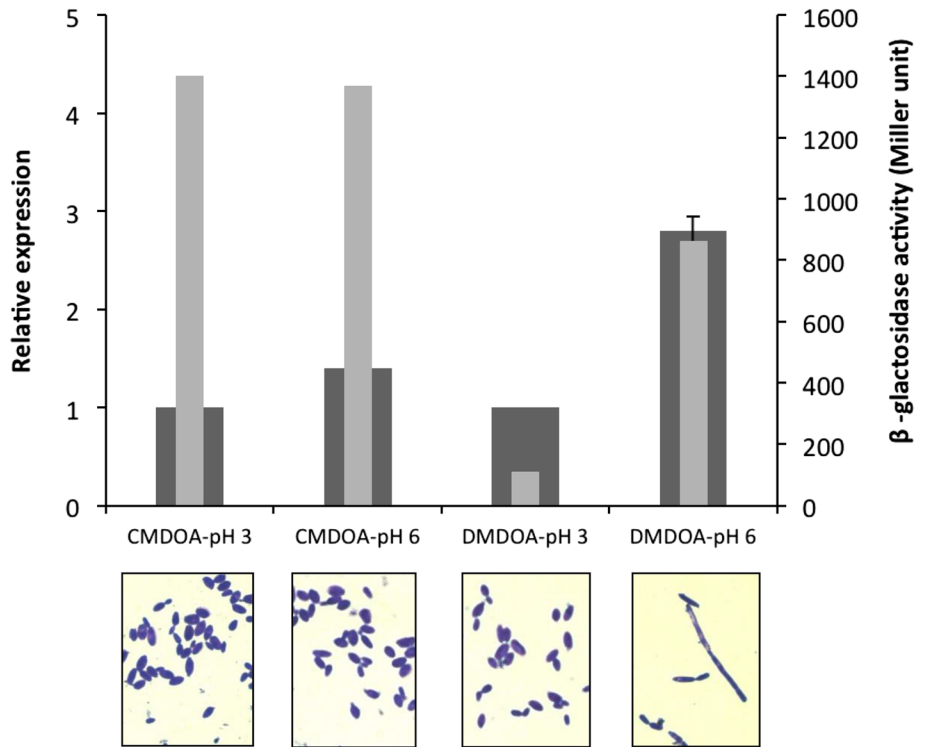


Fig. 2 Flow cytometry dotplots (FSC-A/SS-C) showing the distribution of the cell population between yeast-like and hyphae morphology. 40,000 yeast cells were analyzed in SSC-A and FSC-A channel of the flow cytometer. The red gates encompass SSC-A/FSC-A signal for yeast-like cells, whereas the green gates correspond to hyphae. Analysis was made on cells grown for 30 h in complex medium (CMDOA) and defined medium (DMDOA) at pH3 and pH6. Dotplots are representative results from two independent experiments. (Color figure online)

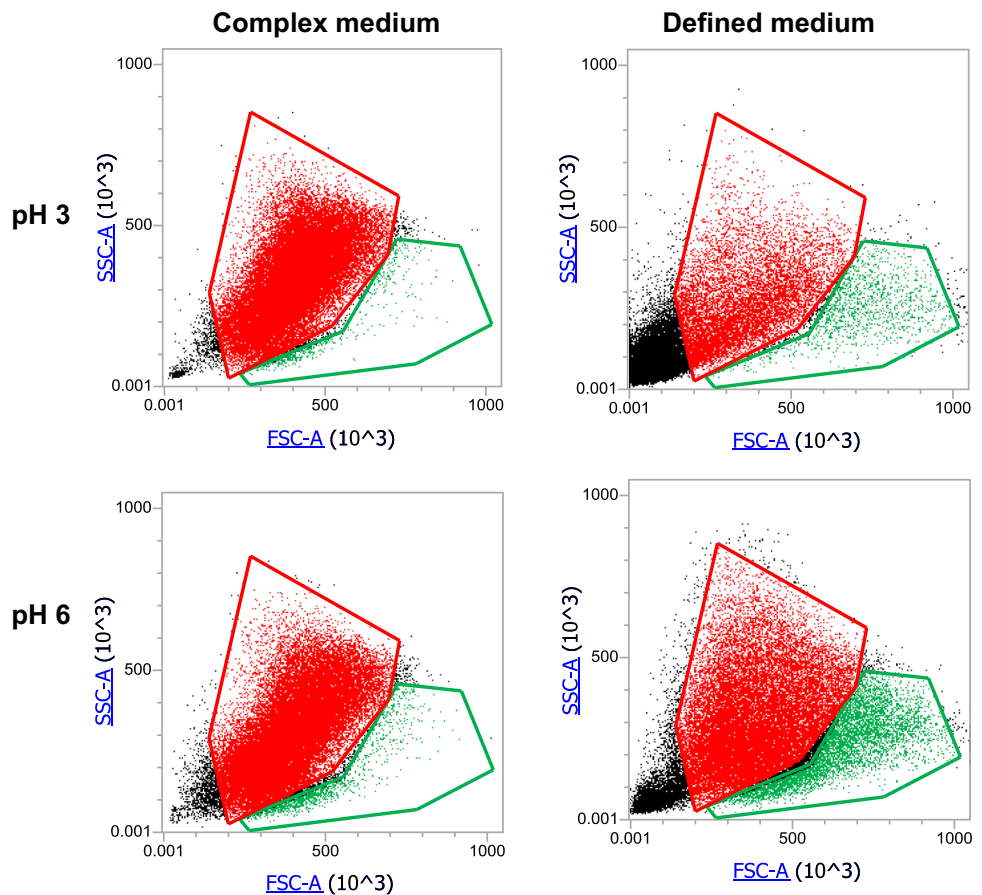
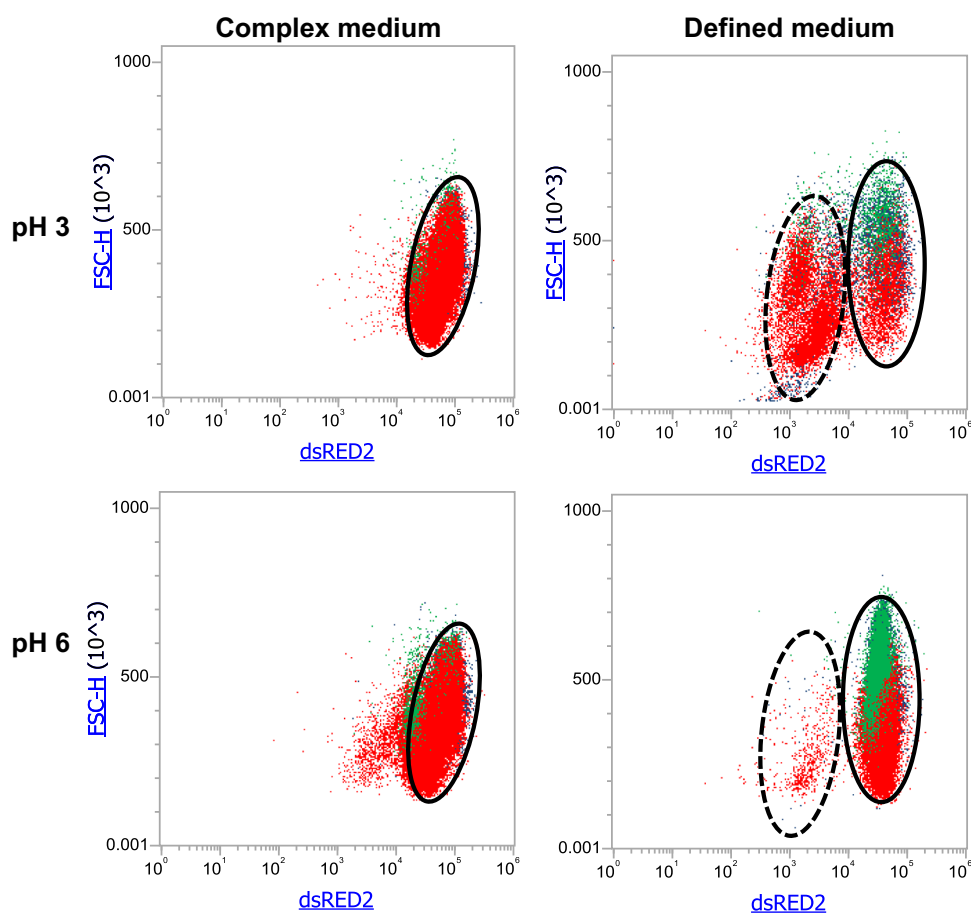


Fig. 3 Flow cytometry dotplots (FSC-H/dsRED2) showing the DsRed fluorescence level in strain JMY3742 grown for 30 h in complex medium (CMDOA) and defined medium (DMDOA) at pH3 and pH6. 40,000 yeast cells were analyzed in FSC-A and YL1 (dsRED2) channels of the flow cytometer. The *red* dots correspond to yeast-like cells while *green* dots correspond to hyphae. Gates in plain lines encompass for cell with high level of DsRed fluorescence, while gates in dotted lines correspond to cells with a low level of DsRed fluorescence. The distinction between yeast-like cells and hyphae is based on FSC-A/SSC-A dotplots of Fig. 2, with yeast-like cells in *red* and hyphae in *green*. Dotplots are representative results from two independent experiments. (Color figure online)



(1400 and 1368 MU, respectively). By contrast, in defined medium (DMDOA), an eightfold increased β -galactosidase activity was measured at pH 6 (863 MU) as compared to pH 3 (111 MU). As a further characterization, RT-qPCR was used to quantify the transcription of the *LacZ* gene. To facilitate comparisons, mRNA levels were normalized to those obtained for cultures performed at pH 3. The results show that *LacZ* was transcribed significantly more at pH 6 in defined medium, while there was no significant difference in expression level in complex medium for the two pH values considered. From these experiments, one question arises: is the level of *pLIP2* induction related to cell morphology? This hypothesis has already been suggested previously for *Y. lipolytica* [3] and other dimorphic yeasts [6].

Quantification of *pLIP2* Induction at the Single-Cell Level

To answer the above-mentioned question, *pLIP2* induction must be quantified for yeast-like and hyphae morphologies independently (i.e., at the single-cell level using flow cytometry). For this purpose, strain JMY3742 that express the *RedStar2* gene encoding the fluorescent protein DsRed under the control of *pLIP2* [14] was grown in complex

medium (CMDOA) and defined medium (DMDOA) at pH 3 and pH 6 for 30 h. Cells were then analyzed by flow cytometry. The FSC-A/SSC-A flow cytometry dotplots shown in Fig. 2 can be used to discriminate between cells in yeast-like morphology (i.e., delimited by the red gate) and hyphae (i.e., delimited by the green gate). In complex medium, cells grew almost exclusively in yeast-like form, either at pH 3 or pH 6. By contrast, in defined medium, cells were displaying the two morphologies. In the later case, dimorphism led to two cell subpopulations with different phenotypic properties, potentially impairing rProt production.

The FSC-H/dsRED2 dotplots were used to estimate the level of DsRed fluorescence and thus *pLIP2* induction, in function of the cell morphology. In complex medium, the DsRed fluorescence was not significantly different at pH 3 and pH 6 (mean fluorescence: 6×10^4 FU and 4×10^4 FU, respectively, Fig. 3). By contrast, for cells grown in defined medium at pH 3, two subpopulations with low (mean fluorescence: 1.5×10^4 FU) and high DsRed fluorescence (mean fluorescence: 3×10^4 FU) could be observed. Moreover, a mixture of yeast-like cells and hyphae composes the subpopulation with a high level of DsRed fluorescence. Cells grown in defined medium at pH 6 showed a high level

of DsRed fluorescence (mean fluorescence: 6×10^4 FU) comparable to that measured in complex medium. Yeast-like cells and hyphae compose this population.

Conclusions

So far dimorphism has been well characterized at the genetic level; however, environmental conditions that trigger YTH transition and thus phenotypic switch have not been clearly identified yet. From an applied perspective, this phenotypic switch could impair rProt productivity. In this context, the relationship between pLIP2 induction and cell morphology is an old debate that must be assessed to further optimize rProt production processes. The main point was to be able to dissociate cell morphology from the effect of the YTH effectors (i.e., pH) on pLIP2 regulation. Here, we succeeded to discriminate between these two parameters. We found out that pH is able to modulate in specific experimental conditions (i.e., defined medium at acidic pH) the level of pLIP2 induction and that these conditions lead to a phenotypic heterogeneity of the cell population. We also clearly demonstrate that cell morphology has no impact on the expression of gene under the control by pLIP2 and thus on potential rProt production.

Acknowledgements HS was supported by a PhD Grant from the Xhenophylia Fund at the Université libre de Bruxelles.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

1. Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev 19:219–237

2. Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B (2000) Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. Appl Environ Microbiol 66:2641–2646
3. Fickers P, Destain J, Thonart P (2009) Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. J Basic Microbiol 49:212–215
4. Fickers P, Marty A, Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnol Adv 29:632–644
5. Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. Appl Microbiol Biotechnol 63:136–142
6. Juntachai W, Kajiwara S (2015) Differential expression of extracellular lipase and protease activities of mycelial and yeast forms in *Malassezia furfur*. Mycopathologia 180:143–151
7. Madzak C (2015) *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. Appl Microbiol Biotechnol 99:4559–4577
8. Morales-Vargas AT, Domínguez A, Ruiz-Herrera J (2012) Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. Res Microbiol 163:378–387
9. Morin M, Monteoliva L, Insenser M, Gil C, Domínguez A (2007) Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. J Mass Spectrom 42:1453–1462
10. Nicaud JM (2012) *Yarrowia lipolytica*. Yeast 29:409–418
11. Palande AS, Kulkarni SV, León-Ramírez C, Campos-Góngora E, Ruiz-Herrera J, Deshpande MV (2014) Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. Arch Microbiol 196:1–12
12. Pérez-Campo FM, Domínguez A (2001) Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. Curr Microbiol 43:429–433
13. Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. Arch Microbiol 178:477–483
14. Sassi H, Delvigne F, Kar T, Nicaud JM, Crutz-Le Coq AM, Steels S, Fickers P (2016) Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Microb Cell Fact 15:1–11

**Chapitre IV: Multiplexed on-line flow
cytometry for high content monitoring
of *Y. lipolytica* bioprocesses based on
hydrophobic substrate**

Titre: Multiplexed on-line flow cytometry for high content monitoring of *Y. lipolytica* bioprocesses based on hydrophobic substrate (en préparation).

Introduction

À l'heure actuelle, l'analyse à l'échelle d'une cellule unique est devenue un véritable concept pour l'étude et l'optimisation de bioprocédés basés sur des cultures microbiennes, dont *Y. lipolytica*. D'une part, les bioprocédés mettant en œuvre l'utilisation de substrats hydrophobes dont l'acide oléique lors de la culture de *Y. lipolytica* sont difficiles à analyser. Comme mentionné précédemment, des procédures d'analyse des micro-gouttelettes d'huile, l'accumulation des lipides intracellulaires, l'étude de la régulation des promoteurs par cytométrie en flux ont été préalablement établies. Cependant, ces procédures se limitent à des mesures hors ligne, ce qui peut ne pas refléter la dynamique réelle de la culture au sein d'un bioréacteur. D'autre part, le dimorphisme cellulaire chez *Y. lipolytica* est l'une des caractéristiques à prendre en compte lors du développement de procédés. Dans ces circonstances, des méthodes et des stratégies d'analyse des paramètres de culture de *Y. lipolytica* dans un milieu contenant des substrats hydrophobes deviennent nécessaires.

Dans ce contexte, l'enjeu principal de ce chapitre s'intéresse au développement d'une méthode du suivi en ligne de la production de biomasse, la consommation du substrat hydrophobe (l'acide oléique), le dimorphisme, l'accumulation des lipides intracellulaires par *Y. lipolytica*, en utilisant la technique de cytométrie en flux en ligne (Figure 12). De plus, nous avons démontré clairement que cette méthode permet aussi d'analyser le niveau d'induction de promoteurs qu'ils soient inductibles ou constitutifs. Dans ce cas, la protéine YFP a été choisie pour quantifier l'induction du promoteur à l'échelle de la cellule unique.

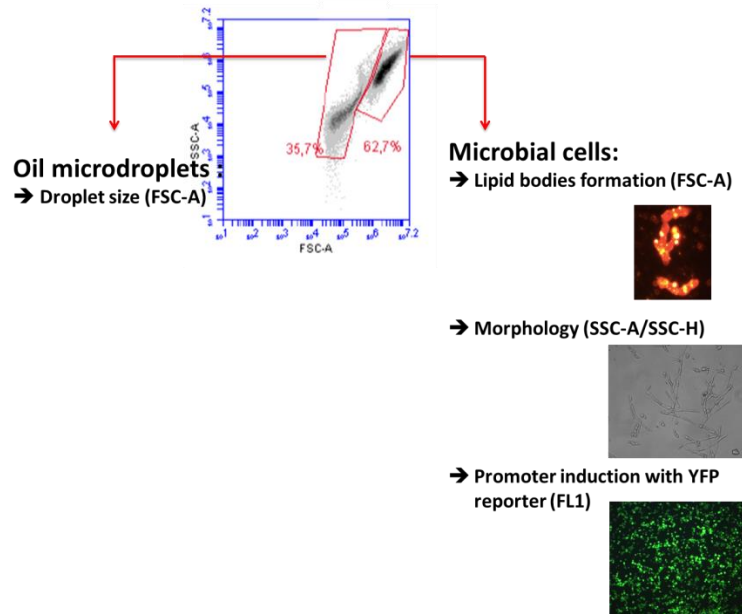


Figure 12: illustration des différents paramètres physiologiques qui peuvent être mesurés par cytométrie en flux en ligne sans un protocole de coloration externe. Ces paramètres sont : la détection des microgouttelettes d'huile, la biomasse, les lipides intracellulaires, le dimorphisme ainsi que le niveau d'induction des promoteurs qui contrôlent la synthèse de la protéine fluorescence YFP

Multiplexed on-line flow cytometry for high content monitoring of *Yarrowia lipolytica* bioprocesses based on hydrophobic substrate

Hosni Sassi¹, Tambi Kar², Sabine Danthine³, Naila Bouchedja^{2,3}, Patrick Fickers², Frank Delvigne^{2*}

*Corresponding author: F.Delvigne@ulg.ac.be

Abstract

Improving bioprocess performance and productivity request a better understanding of dynamic living system. To this end, development of process analysis tools and methodology is a fundamental prerequisite. Therefore, studies intended to develop a new method and procedures for bioprocess monitoring are considering a high attention. In this frame, development and optimization of analytical procedures for bioprocesses involving hydrophobic substrate is a hard task, hence, the development of a rapid and simple analysis tools in this case is a very active area of research. In the current study, we successfully developed flow cytometry method for on-line monitoring of *Yarrowia lipolytica* bioprocess based on hydrophobic substrate. Interestingly, we developed a fast and methods for on-line investigation of several bioprocess parameters such as oil assimilation and microbial growth, microbial lipid accumulation, cell shape modification and promoter regulation. All these phenomena can be easily tracked on-line on the basis of the measurement of FSC and SSC (side scatter) signal. The resulting data has been validated using the classical approach such as the optic and fluorescence microscopy undercrossing the suitability and the potential application of our method. Therefore, the present tool opens a new opportunities and perspectives for bioprocess intensifications based on *Y. lipolytica* bioprocesses.

1. Introduction

Y. lipolytica is a nonconventional yeast exhibiting high potential for recombinant protein synthesis and secretion, bio-oil production and synthesis of valuable compounds such as citric acid, erythritol or ricinoleic acid (Nicaud, *et al.*, 2002, Fickers, *et al.*, 2005, Beopoulos, *et al.*, 2009). It is also generally regarded as safe (GRAS, (Groenewald, *et al.*, 2014)) microorganism, that is able to grow easily on HS such as n-alkanes, fatty acids, fats and oils for which it has specific metabolic pathways (Fickers, *et al.*, 2005). These remarkable metabolic capacities, and the availability of genetic engineering tools (Madzak, *et al.*, 2004, Sibirny, *et al.*, 2014), render *Y. lipolytica* a promising microbial cell factory. Moreover, expression vectors involving *LIP2* and *POX2* promoters have been developed and used successfully for recombinant proteins production in this yeast (Sassi, *et al.*, 2016). However, research efforts have still to be given to better understand the dynamic of lipid storage. Oleaginous yeast such as *Y. lipolytica* are able to accumulate lipids, mainly triacylglycerol and sterol ester (forming the so-called neutral lipids), in specialized sub-cellular compartment known as lipid body (LB). These are formed by a lipid core surrounded by a phospholipid monolayer in which proteins involved in LB metabolism (i.e. anabolism, catabolism, trafficking) are embedded (Beopoulos, *et al.*, 2011). In the presence of assimilated carbon source mainly HS, oleaginous yeasts store these sources of energy in LB that are subsequently mobilized by LB bound lipase (Tgl3p and Tgl4p in *Y. lipolytica*, (Dulermo, *et al.*, 2013)) when carbon sources become scarce in the environment. This lipid accumulation and thus LB synthesis lead to phenotype modifications (cell size) that can be distinguished optically from non-accumulating cells. Metabolically engineering strains, exhibiting deletion for key genes involved in the beta-oxidation pathways, have shown remarkable capabilities for cell volume extension in order to store intracellular lipids (Beopoulos, *et al.*, 2009). Beside this HS metabolism, *Y. lipolytica* is able to undergo a true yeast-to-hypha transition. This morphological modification is a complex and highly regulated phenomenon involving more than 20 genes that is still not completely understood (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002, Nicaud, 2012). The regulation mechanisms of

filamentous cells are still unknown and worth to be evaluated. However, this morphological state is generally unwanted since it potentially induces strong variation from the global bioprocess objectives (Krull, *et al.*, 2013). It is thus interesting to address this phenomenon of phenotypic plasticity displayed *Y. lipolytica* according to the bioreactor operating conditions. At this level, single cell analysis becomes widespread for bioprocess monitoring since the impact of microbial phenotypic heterogeneity has been recognized as a major source of process deviation [4]. For this purpose, flow cytometry (FC) is considered as the most used single cell method in the field of bioprocess optimization [5]. The application of flow cytometry technique has gained renewed interest since the availability of low-cost, benchtop devices has allowed on on-line implementation of this technique for bioprocess monitoring (Brognaux, *et al.*, 2013). This kind of analysis can be potentially disturbed by the presence of oil droplets, but we will demonstrate in this work that on –line FC can be advantageously set-up in order to monitor the uptake of hydrophobic substrate, the resulting microbial growth/cellular differentiation and promoter induction.

Bioprocesses involving the use of hydrophobic substrate (HS) are generally difficult to monitor owing to the nature of the biphasic system. On-line determinations of cell growth and substrate consumption profiles are indeed quite difficult to assess in this kind of system and advanced analytical tools are thus required. This specific requirement is reinforced by the fact that bioprocess applications involving biofuels production and biocatalytic processes in biphasic system are emerging (Heeres, *et al.*, 2014). In this work, the usefulness of on-line flow cytometry will be demonstrated for the time profiling of biomass and HS utilization using *Yarrowia lipolytica* grown on oleic acid based medium as a case study.

2. Materials and Methods

2.1. Plasmids, strains, media, and culture conditions

The plasmids, oligonucleotides, *Escherichia coli* strains, and *Y. lipolytica* strains used in this study are listed in Table 1. The *E. coli* strain Mach1T1 (Thermo Fisher Scientific, Belgium) was used in the transformation and amplification of the recombinant plasmid DNA. Bacteria were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium

supplemented with kanamycin sulphate as necessary (50 mg/L, Sigma-Aldrich, Belgium). The *Y. lipolytica* strains were grown at 28 °C in YPD or YNB supplemented to meet the requirements of auxotrophs (Barth & Gaillardin, 1997). To select the Ura⁺ clones, transformants were plated on YNBura (YNB containing 0.01 % uracil; Sigma-Aldrich). All precultures were performed in YPD medium (10g/L yeast extract, 10 g/L casein peptone, 20 g/L of glucose) and incubated at 28°C overnight. The complex medium (CM) was composed of 10 g/L of yeast extract and 20 g/L of tryptone. Both media contained a sodium phosphate buffer (50 mM; pH 6.8) and were supplemented with 1.8 C-mol/L of various carbon sources as follows: glucose (D), oleic acid (OA), glucose and oleic acid (DOA; 0.9 C-mol each) (Sassi, *et al.*, 2016). A fatty acid stock solution (20 % oleic acid, 0.5 % Tween 20) was subject to sonication for 1 min to carry out emulsification; a Sonics Vibra-Cell™ Processor (USA) was used. The lipid accumulation medium (LAM) was composed of 5 g/L yeast extract, 5 g/L casein peptone, 10 g/L glucose, and 25 g/L oleic acid. All cultures carried out in bioreactors are inoculated at 0.2×10^8 cells. Batch cultures were performed in Dasgip platform equipped with four vessels of 200 ml of working volume. During cultures, the temperature was maintained at 28 °C, pH was adjusted at 6 by addition of ammonia (25%) or phosphoric acid (4N) and the dissolved oxygen was adjusted at 0.42 VVM.

Table 1. Strains, plasmids, and primers used in this study

Yeast strains	Genotype	Source
Po1d	MATA <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322</i>	
JMY775	MATA, <i>ura3-41, LEU2, URA3/LIP2-LacZ</i>	Fickers et al 2003
JMY2101	Po1d derivative LEU2	Nicaud et al
JMY2656	JMY2101 pLIP2-YFP	This study
<i>E. coli</i> strain	Plasmid description	
JME918	JMP62/pTEF-YFP-URA3ex (JMP918)	Gajdoš et al 2016
RIE122	JMP62/pLIP2-YFP-URA3ex (RIP112)	This study
Primers	Sequence (5'-3')	Restriction site
LIP2fo1	A GGATCGATGTGCCTTCAGGTGGGCATAG TTGATG	<i>Clal</i>
LIP2rev	CCGGATCCAGTGAGGGGAGCTGGTAC TTGGGTATC	<i>BamHI</i>
LIP2CLAfo	GTCATGGACAACGTTTTTGGGCTGAG	
LIP2CLAr	CTCAGCCCAAAAACGTTGTCCATGAC	

ev

2.2. General genetic techniques

The media and techniques used for *Y. lipolytica* have been described elsewhere (Barth and Gaillardin, 1996), and standard media and techniques were used for *E. coli* (Sambrook, *et al.*, 1989). Restriction enzymes, DNA polymerases, and ligases were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Competent *E. coli* cells were obtained by the rubidium chloride method adapted from Sambrook et al (1989). Genomic DNA was extracted from yeast cells as described elsewhere (Querol, *et al.*, 1992). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed with the primers mentioned in the text. Pyrobest DNA polymerase (Ozyme) was used for cloning, and ExTaq (Takara, France) was used for verifying genomic structures. DNA fragments were purified from PCR products using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) or recovered from agarose gels using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). DNA sequencing was performed by GATC Biotech. Primers were designed with Primer 3 software (<http://simgene.com/Primer3>) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium).

2.3. Construction of strain JMY2656

The promoter region of LIP2 (pLIP2) was obtained in two steps of PCR amplification from genomic DNA of strain Po1d using the SEP method (Maftahi, *et al.*, 1996). Firstly, a 670 bp fragment corresponding to the distal region of pLIP2 was amplified using primer Lip2fo and Lip2CLArev together with a 350 bp proximal fragment of the promoter amplified using primers Lip2CLAfo/Lip2rev. Secondly, the two resulting fragments were pooled after purification and used as a template for the amplification the entire pLIP2 sequence using primers LIP2fo and Lip2rev. This strategy was used to mutagenize the internal *ClaI* restriction site of the pLIP2 region. The resulting 1080 bp fragment of pLIP2, flanked by *ClaI* and *BamHI* was finally cloned in JMP918 vector at the corresponding site to yield vector RIP122.

2.4. Nile red staining

Lipid accumulation during cultures growth was determined using Nile red fluorescence dye (Sigma- Aldrich, N3013) as described elsewhere (Beopoulos, *et al.*, 2008).

2.5. Optical and fluorescence microscopy

Cell morphology was analyzed using optic and fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2, Germany microscope). All samples are deposited onto a slide covered with a cover slip. The microscope was coupled to a camera-type AxioCam HRC color Carl Zeiss technology, operating with Axiovision logiciel version 3.1.

2.6. On-line flow cytometry set-up

The on-line flow cytometry protocol was described in our previous work (Brognaux, *et al.*, 2013). Briefly, samples were automatically taken from the bioreactors every hour according to an automatized sequence programmed in a microcontroller. Samples were automatically diluted in PBS buffer in order to reduce the amount of event detected per second at the level of the FC. Indeed, high concentration induces overlap between event and signal distortion. After the sampling step, FC analysis was carried out on the basis of a maximum amount of events detected fixed at 40,000.

The relative Yellow fluorescence signal corresponding on the expression of the YFP protein was recorded at the level of the FL1 channel (excitation wavelength: 488 nm; emission wavelength: 530 nm). All the cytometric features investigated in this study are shown at figure 1.

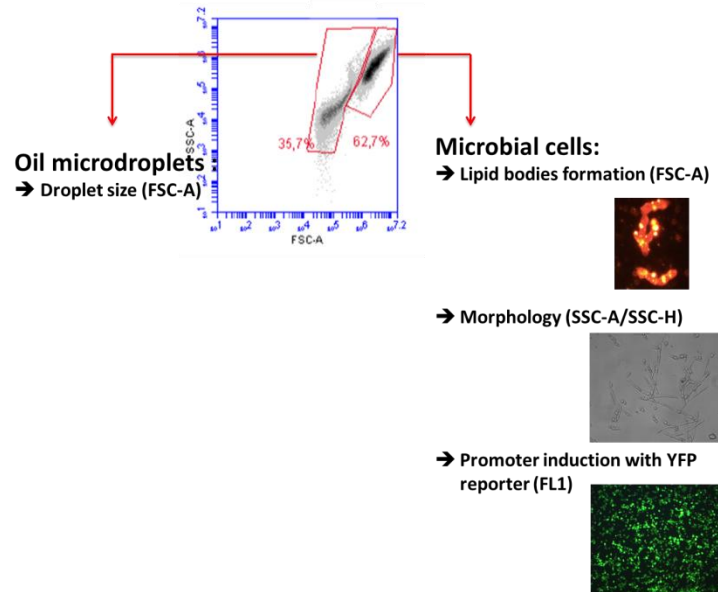


Figure 1 : Illustration of the data that can be gathered from the processing of on-line flow cytometry data without the use of exogenous dye. Microscopy pictures represent respectively (from top to bottom) yeast cells stained with Nile Red showing intracellular lipid accumulation, yeast cells exhibiting dimorphic switch to filamentous form and yeast cells expressing YFP

Data were exported from CFlow software (Accuri, BD biosciences) as .fcs files and were further analyzed by using either Matlab or R software. R was used for gating and visualizing the FC results through the bioconductor package (Flowcore and Flowviz libraries).

3. Results and discussion

3.1. Flow cytometry set-up : oil microdroplets and yeast cell standards

The first step in our experimental method was to show that FC can be effectively used in order to make the distinction between oil microdroplets and yeast cells according to an efficient gating procedure. The FC analyses are carried out on the basis of the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) without any cell staining. In order to assess the gating procedure, a series of standard samples were analyzed

(Figure 2). The first standard is a yeast culture carried out on glucose (YPD medium) without any hydrophobic compounds (ie oleic acid) (Figure 2A). The FSC/SSC dotplot shows a single population in this case corresponding to yeast cells. The second standard is a yeast culture carried out on YPD medium containing oleic acid (Figure 2C). In this case two subpopulations were observed, one corresponding to oil microdroplets and one corresponding to yeast cells. The location of the oil microdroplets on the FSC/SSC dotplot was further confirmed by analyzing an oleate emulsion stabilized with tween 80 (Figure 2E).

The specific S-shape of the oleic acid microdroplets population in the FSC/SSC dotplot has been previously observed for other emulsions (Fattaccioli, *et al.*, 2009) and is attributed to the Mie diffusion effect of scattered light. This property has notably been used for the evaluation of the encapsulation of microbial cells in droplet based microfluidics (Zengler, *et al.*, 2002).

It seems thus that on the basis of the different standards tested, an effective gating can be performed without any interference between the biotic (i.e. cells) and abiotic (i.e. oleic acid droplets) phases. However, the biotic phase exhibit different FSC and SSC signal to the two standard samples analyzed. Indeed, yeast cells cultivated with or without the presence of hydrophobic substrate display different FSC and SSC parameters. This phenomenon can be attributed to the fact that during the consumption of oleate, oil microdroplets are first adsorbed onto the membrane and then internalized and eventually stored as lipid bodies inside the cells (Fickers, *et al.*, 2005). Internalized structures, such as lipid bodies, are known to increase the SSC parameter (Díaz, *et al.*, 2010). Additionally, yeast cells cultivated on hydrophobic substrate display more complex cell shape (Figure 2D), contributing to the increase of the SSC parameter as well as the FSC parameter. Yeast growth on hydrophobic substrate is thus a very complex process according to the evolution of the biotic phase and dynamic analytical tools are thus needed for this purpose. The evolution of the cytometric parameters of the biotic phase will then be analyzed more in details in the next section.

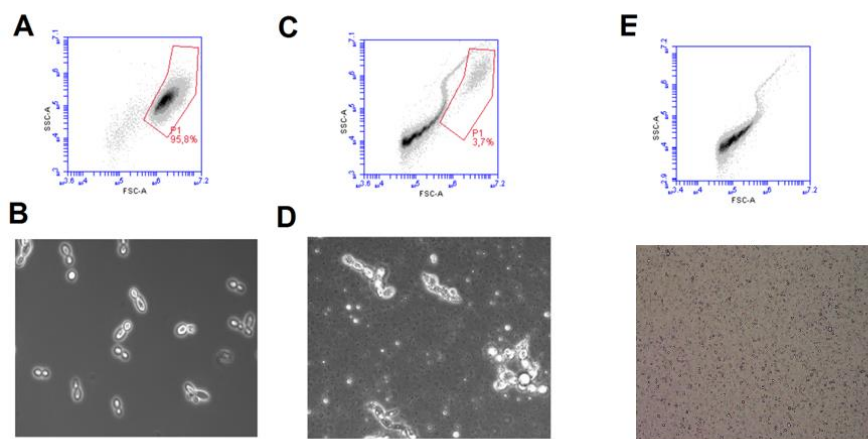


Figure 2: A: FC analysis of *Y. lipolytica* cultivated in shake flask on YPD medium B: microscopic observation (40x) of *Y. lipolytica* cultivated in shake flask on YPD medium showing the prevalence of yeast shaped cells. C: FC analysis of *Y. lipolytica* cultivated in shake flask on YPD/oleate medium D: microscopic observation (40x) of *Y. lipolytica* cultivated in shake flask on YPD/oleate medium. In this case more complex cell shapes as well as microdroplets attached to cells or internalized as lipid bodies can be observed E: FC analyses of oleate dispersion obtained by sonication in presence of tween 80 used as a stabilizing agent. FC analyses have been carried out on the basis of 40,000 events displayed in dotplot showing the forward scatter (FSC) in function of the side scatter (SSC). The gate P1 corresponds to the yeast cells

3.2. Monitoring cell growth and oleic acid consumption

In the context of this study, FC can be used in order to investigate several phenomena, i.e. oil assimilation and microbial growth, microbial lipid accumulation and cell shape modification. The first processes, i.e. oil consumption and the resulting microbial growth can be easily followed by on-line FC (Figure 3). Indeed, a culture carried out in mini-bioreactor with *Y. lipolytica* cultivated on oleate has been followed by on-line FC and the two regions corresponding respectively to biotic and abiotic phases, could be clearly visualized during the whole cultivation. Please discuss in more detail the results presented in Fig 3.

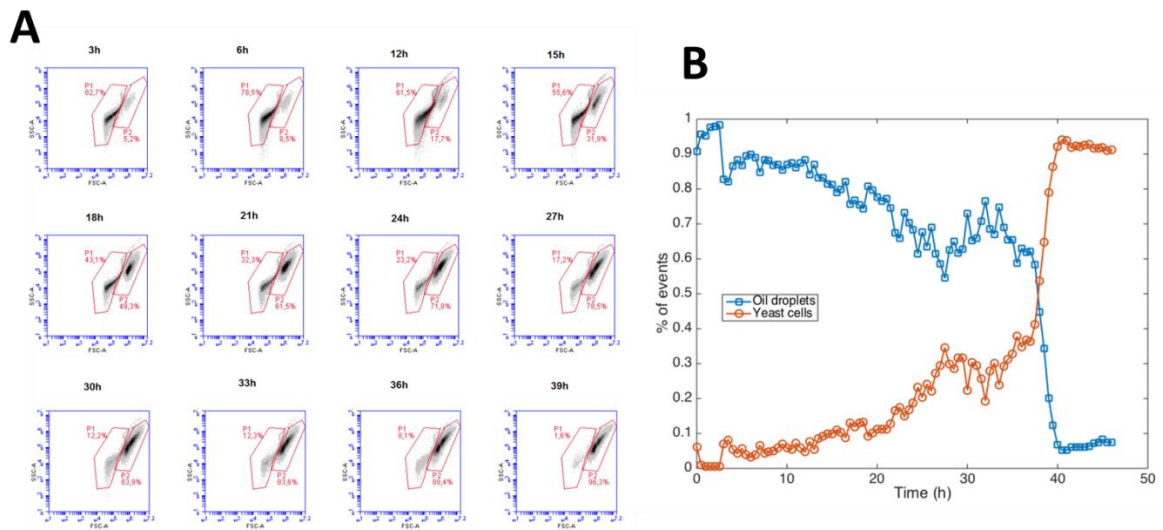


Figure 3: A: Evolution of the yeast cell population (gate P2) and oil microdroplets (gate P1) during a culture of *Yarrowia lipolytica* JMY7342 carried out in a stirred bioreactor. Analyses have been carried out with on-line FC and some of the results are displayed on forward scatter/side scatter (FSC/SSC) dotplot on the basis of 40,000 events. B: timeline of the evolution of the fraction of oil droplets in the extracellular medium and the fraction of yeast cells according to the gating shown in panel A

On the other hand, the oil microdroplets exhibit very limited changes during the cultivation process. However, the bioreactor is operated at constant pH, a parameter known to affect significantly the degree of dispersion of the oil phase. In order to validate this observation, the effect of pH on oil microdroplets dispersion will be further investigated.

3.3. Monitoring *Y. lipolytica* cell morphology

Once the understanding of the occurrence of cell morphology can affect bioprocess robustness and efficiency, the development of analytical tools for cell shape analysis, is of a great interest. However, a few reported studies investigated on the development of analytical tools for *Y. lipolytica* cell shape analysis. Most of established techniques are based on cell imaging analysis which require for most of the time several steps of cell washing which is considered as a mechanical stress that affect cell morphology (Kawasse, *et al.*, 2003, Braga, *et al.*, 2016). This

procedure requires, however, an off line preliminary step of sample preparation and image acquisition. In the present work we showed an on line characterization of cell morphology of *Y. lipolytica* using online flow cytometry on the basis of the comparative analysis of the height (SSC-H) and the area (SSC-A) of the side scatter signal which is shown to be highly correlated to particles form or granularity (Bradner & Nevalainen, 2003).

Firstly, the different *Y. lipolytica* cells forms have been obtained using a defined environmental process conditions based on pH shift as a standard sample. According to the literature, pH is the most significant factor that modulate dimorphic transition where mycelium form is dominated at pH near neutrality and decreased at pH of 3 (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002, Szabo & Štofaničková, 2002). In the present work, our result could be confirmed by some of the reported studies concerning the effect of medium pH on dimorphism transition by *Y. lipolytica*. Moreover, the Accuri C6 calibration beads have been used as a standard analysis of spherical particles (data not showed). The resulting morphological behavior has been analyzed on the basis of SSC-A/SSC-H parameters (Figure 4A). As expected, cytograms analysis of ovoid cell shape showed a linear presentation of cell particles whereas those corresponding to mycelium form showed a linear presentation with an extension which is attributed to the mycelium cells. To confirm this hypothesis, we showed in the figure B that the percentage of the extended form measured by the flow cytometry was significantly correlated to the mycelium cell fraction measured by optical microscopy.

As a conclusion, analysis of side scatter intensity can be easily used to investigate *Y. lipolytica* cell shape with a high precision without any preliminary steps of sample preparation that could be considered as a stress for the morphological behavior of microbial cells (Tripathi & Kerr, 1989).

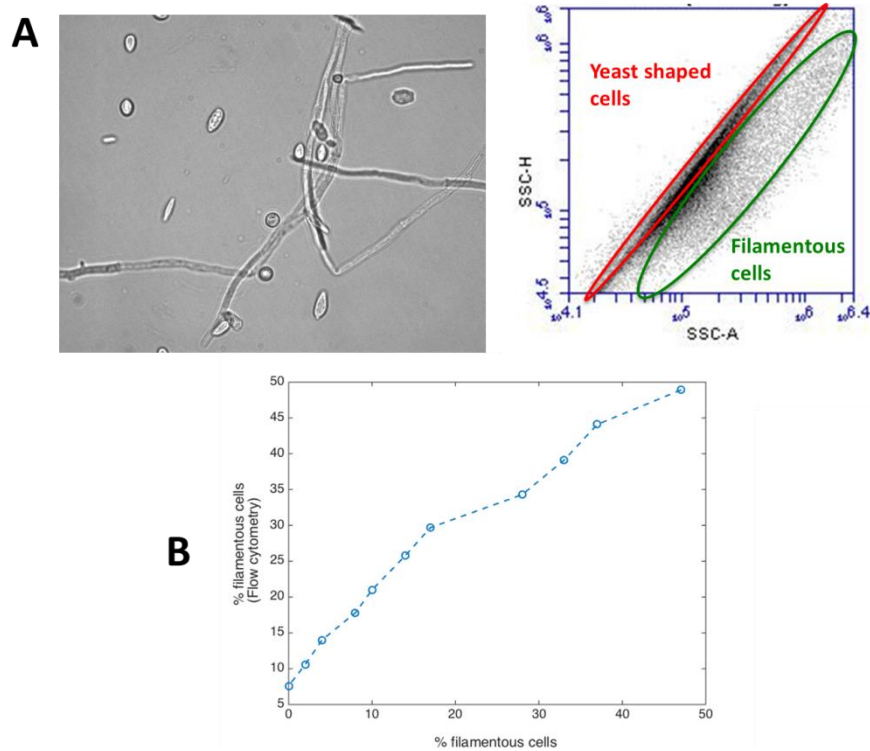


Figure 4: A : Dimorphism leading to the phenotypic switch from yeast shaped cells to filamentous cells can be detected by flow cytometry on the basis of the comparative analysis of side scatter signal SSC-H/SSC-A. B : correlation between filamentous cells counted on Bürker cell and filamentous cells counted by flow cytometry on the basis of the gating shown on panel A

3.4. Monitoring lipid accumulation

The main objective of this step is to develop a new method to monitoring the online lipid accumulation by *Y. lipolytica* using. To do, three cultures were carried out simultaneously in three mini-bioreactors operated in parallel with the multiplexed version of the on-line FC device, allowing an automatic sampling with one hour frequency. At the first bioreactor, pH and dissolved oxygen have been controlled according a set point and used as control. A second bioreactor has been used to investigate the effect of dissolved oxygen limitation and a third one to investigate the effect of pH drop on cell growth and oleic acid accumulation and assimilation. Oleic acid accumulation and assimilation can be followed by using Nile red as a staining agent of intracellular lipids (Figure 5A). A strong oleic acid accumulation could be

observed within the cells after 24 h of growth for all the operating conditions tested. However, cells sampled analyzed at 30h and 48h exhibit a reduced red fluorescence, suggesting that intracellular lipid resources are assimilated. However, lipid accumulation process was less active when the cells are cultivated in the medium without pH control. These results were further validated by flow cytometry analyzed (Figure 5B). It is interesting to note that a segregation of the population into an accumulating and non-accumulating fraction was occurred. This effect is particularly marked in the bioreactor used as control (i.e. with pH control and without dissolved oxygen limitation). The occurrence of these two sub-populations confirm the complexity of dynamic lipid process by *Y. lipolytica* (Beopoulos, *et al.*, 2009).

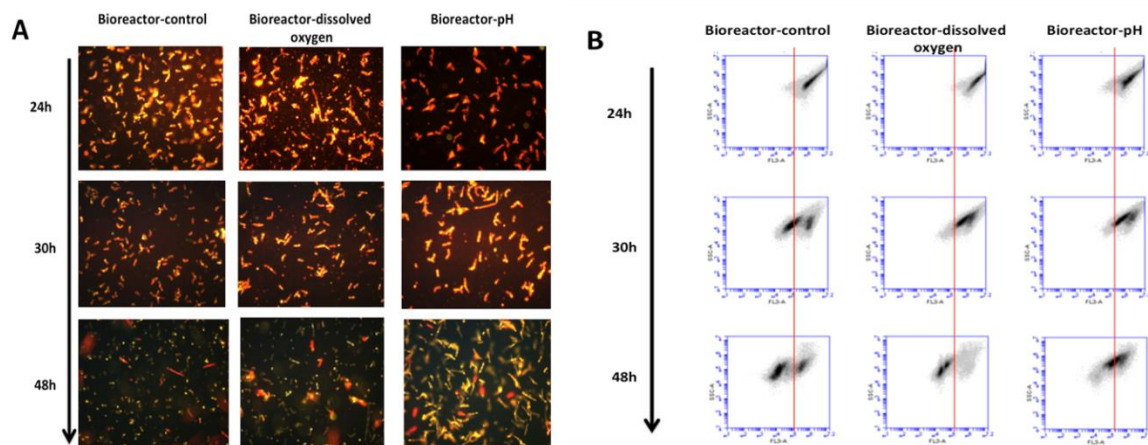


Figure 5 : A microscopy images showing the lipid accumulation in *Y. lipolytica* for different bioreactor operating conditions (bioreactor_control : culture operated with dissolved oxygen and pH controls; bioreactor_dissolved oxygen : culture operated with dissolved oxygen limitation; bioreactor_pH : bioreactor operated without pH control). For each condition, cells have been sampled at different time intervals and stained with Nile red. B: flow cytometry analyses corresponding to the samples displayed in panel A (FL3-A : red fluorescence intensity proportional to Nile red staining; SSC-A : side scatter intensity).

In a second time, the extracellular oil concentration and its intracellular accumulation have been followed by on-line flow cytometry. Extracellular oil droplet concentration could be followed by on-line FC since droplets and cells exhibit different forward and side scatter signals (FSC and SSC).

Formation of intracellular lipid bodies can be easily followed on the basis of forward and side-scatter. Indeed, modulation of forward and side scatter is known to be induced upon the formation of inclusion bodies [11][12] or endospores [13]. In our case, FSC is more affected than SSC by the formation of lipid bodies. When oleic acid is not depleted, FSC rises according to the accumulation process and the formation of lipid bodies. On the other hand, when oleic acid becomes limiting, FSC intensity decreased, corresponding to the remobilization of the lipids stored in the lipid bodies. Again, this effect is slowed down when either dissolved oxygen or pH is not controlled in the bioreactor. However, the re-assimilation process is significantly reduced when oxygen limitation was applied. The resulting phenomena confirm that the relative metabolic pathway requires some morphological and physiological modifications within the cells. Compared to other established techniques such fluorescence and chemical characterization, this is the first procedure for online lipid accumulation measurement without cell staining protocol allowing a fast analysis with capability for large number of samples.

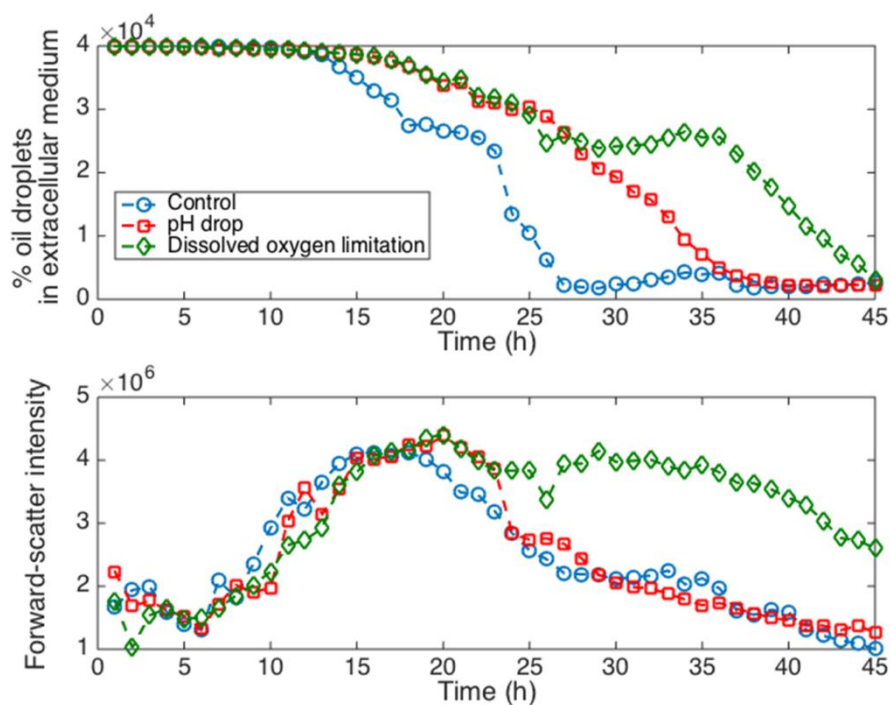


Figure 6: Evolution of the oil droplet fraction and the forward scatter intensities of the cell population in function of the different bioreactor operating conditions.

Bioreactors have been sampled by on-line flow cytometry. Percentage of oil droplets

has been determined by gating individually microbial cells and oil droplets according to the procedure displayed in figure. The forward scatter intensity corresponds to the mean FSC parameter obtained by gating the microbial cell fraction.

Analysis of FSC intensity is thus a reliable parameter for the on-line flow cytometry monitoring of the formation lipid bodies and their re-assimilation. Another advantage is that this determination doesn't rely on the use of a specific fluorescent marker, simplifying the on-line FC procedure. By the online FC, we set an online method for measurement of lipid accumulation on the basis of the comparative analysis of the mean FSC-A parameter obtained by gating the microbial cell fraction. To gain deeper information about the occurrence of lipid accumulation among the population, this analytical procedure alone is not sufficient-FC analysis of cell staining with a specific dye such as Nile red for neutral lipid must be taken into consideration

3.5. Monitoring promoter induction of *pLIP2* induction

One of most industrial applications of the yeast *Yarrowia lipolytica* is its high potential as an attractive host for recombinant proteins productions. Thus, several genetic and molecular tools have been developed. Among them, either constitutive or inducible promoter's regulation has been highly studied for a given application. In particular, promoters of genes involved in HS metabolism, such as *POX2* and *LIP2* promoters have been used for the development of regulated expression vector (Sassi, *et al.*, 2016). Furthermore, several fluorescent proteins have been successfully expressed under oleic acid inducible promoters in the yeast *Yarrowia lipolytica* such as GFP (Shabbir Hussain, *et al.*, 2015), Redstar2 (Kabran, *et al.*, 2012) and mCherry (Bulani, *et al.*, 2012). In these studies, analytical tools used for analysis of the promoter induction level are mainly based on the measurement of the relative fluorescent signal. However, it has been shown that recombinant proteins production processes are highly sensitive to microbial heterogeneity at the level of cell viability and productivity (Sundstrom, *et al.*, 2004, Sevastyanovich, *et al.*, 2009). In this context, the fluorescent reporter proteins have been widely used to characterize promoter induction and thus protein synthesis. In the present work, it has been clearly shown that the use of Yellow fluorescent protein (YFP) for bioprocess monitoring based on *Y. lipolytica* cell growth in a complex medium

supplemented with HS (Figure 7). The expression profile of the YFP regulated by either constitutive (*pTEF*) or inducible (*pLip2*) promoter reached is variable, depending on the carbon source considered. Indeed, *LIP2* promoter is not induced in CM medium complemented with glucose, whereas it is strongly induced during culture medium supplemented by oleic acid as sole carbon source or in combination with glucose. In fact, the potential use of the co-substrate composed of glucose and oleic acid for *pLIP2* induction has been evaluated in our previous work (Sassi, *et al.*, 2016). Besides, dot plot analysis showed the presence of phenotypic heterogeneity at the level of *pLip2* induction when oleic acid was used in the culture medium. This occurrence of this heterogeneity is correlated with our previous result in the same condition using a red fluorescent protein redstar2 (Sassi, *et al.*, 2017). This result suggests that the high sensibility of this promoter could probably be influenced by the environmental conditions, among others factors.

In this regard, the present tool also successfully applied for the analysis of the promoter induction level during *Y. lipolytica* cell growth on oleic acid supplemented medium and thus, at the single cell level. According to our method, the sample was directly harvested, diluted and analyzed by FC. The resulting data are correlated with our previous work (Sassi, *et al.*, 2016) suggesting the suitability of our method for gene expression analysis.

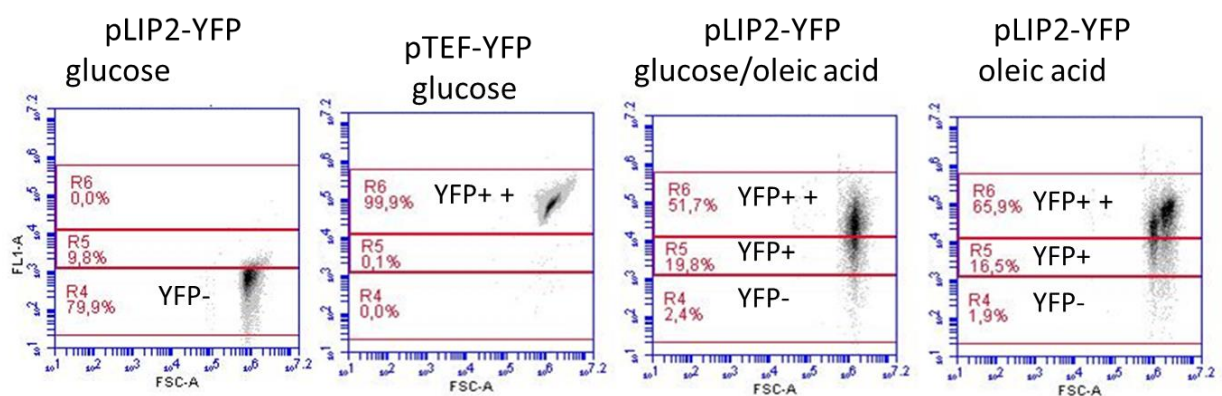


Figure 7: Flow cytometry profiles showing the cell size (FSC) in function of the YFP-related green fluorescence with three subpopulations (YFP-: cells are not

producing of YFP and YFP+: intermediate level and YFP ++: high production level of YFP).

4. Conclusion

Y. lipolytica presents specific physiological and metabolic characteristics among all the non-conventional species (Barth & Gaillardin, 1996). Besides the usual carbon source, it is widely known for its high capacity to assimilate unusual carbon sources such as hydrophobic substrate (Fickers, *et al.*, 2005). One of the most challenging step using the HS based process is their complex manipulation and analysis during bioprocess. Hence, the intended of new studies investigated on the development of new methodologies for an on-line analysis of process parameters is a bit of a challenge. In the context of this study, the present procedure is considered as a new tool for online bioprocess monitoring based on *Y. lipolytica* culture growth in a complex medium supplemented with oleic acid. This procedure is based on fully automated platform composed by on-line sampling from a bioreactor connecting to a flow cytometer previously established (Brognaux, *et al.*, 2013). Taken together, we set up an on-line flow cytometry adapted to multiphase bioreactor for the simultaneous monitoring of hydrophobic substrate consumption, cell growth, dimorphic transition as well as the induction profile of promoters at high single cell resolution for a large number of samples. The method doesn't require any staining step since it is entirely based on the basic optical properties of the particulates, either biotic (i.e. microbial cells) or abiotic (i.e. oil droplets).

References

- Barth G & Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica—nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Barth G & Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 219-237.
- Beopoulos A, Chardot T & Nicaud J-M (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91: 692-696.
- Beopoulos A, Chardot T & Nicaud J (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91: 692 - 696.
- Beopoulos A, Nicaud J-M & Gaillardin C (2011) An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1193-1206.
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribe Larrea J-L, Molina-Jouve C & Nicaud J-M (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48: 375-387.
- Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, et al. (2008) Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7779-7789.
- Bradner JR & Nevalainen KM (2003) Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 54: 193-201.
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC & Belo I (2016) Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. *Journal of Biotechnology* 217: 22-30.
- Brognaux A, Han S, Sørensen SJ, Lebeau F, Thonart P & Delvigne F (2013) A low-cost, multiplexable, automated flow cytometry procedure for the characterization of microbial stress dynamics in bioreactors. *Microbial Cell Factories* 12: 100-100.

Brognaux A, Thonart P, Delvigne F, Neubauer P, Twizere J-C, Francis F & Gorret N (2013) Direct and indirect use of GFP whole cell biosensors for the assessment of bioprocess performances: Design of milliliter scale-down bioreactors. *Biotechnology Progress* 29: 48-59.

Bulani SI, Moleleki L, Albertyn J & Moleleki N (2012) Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* 2: 27-27.

Díaz M, Herrero M, García LA & Quirós C (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48: 385-407.

Dulermo T, Tréton B, Beopoulos A, Kabran Gnankon AP, Haddouche R & Nicaud J-M (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: 1486-1495.

Fattaccioli J, Baudry J, Emerard J-D, Bertrand E, Goubault C, Henry N & Bibette J (2009) Size and fluorescence measurements of individual droplets by flow cytometry. *Soft Matter* 5: 2232-2238.

Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS & Nicaud JM (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5: 527-543.

Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit M & Nicaud J (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5: 527 - 543.

Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PWM & Wyss M (2014) *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* 40: 187-206.

Heeres AS, Picone CSF, van der Wielen LAM, Cunha RL & Cuellar MC (2014) Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends in Biotechnology* 32: 221-229.

Kabran P, Rossignol T, Gaillardin C, Nicaud J-M & Neuvéglise C (2012) Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *DNA research* dss007.

Kawasse FM, Amaral PF, Rocha-Leao MH, Amaral AL, Ferreira EC & Coelho MA (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosyst Eng* 25: 371-375.

Krull R, Wucherpennig T, Esfandabadi ME, et al. (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* 163: 112-123.

Madzak C, Gaillardin C & Beckerich J-M (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* 109: 63-81.

Maftahi M, Gaillardin C & Nicaud JM (1996) Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 859-868.

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

Nicaud J-M, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P & Gaillardin C (2002) Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2: 371-379.

Querol A, Barrio E, Huerta T & Ramón D (1992) Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2948-2953.

Ruiz-Herrera J & Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 178: 477-483.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press New York.

Sassi H, Delvigne F, Kallel H & Fickers P (2017) pH and Not Cell Morphology Modulate pLIP2 Induction in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 1-5.

Sassi H, Delvigne F, Kar T, Nicaud J-M, Coq A-MC-L, Steels S & Fickers P (2016) Deciphering how LIP2 and POX2 promoters can optimally regulate

recombinant protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 15: 1-11.

Sevastyanovich Y, Alfasi S, Overton T, Hall R, Jones J, Hewitt C & Cole J (2009) Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. *FEMS Microbiol Lett* 299: 86-94.

Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S & Blenner MA (2015) Engineering Promoter Architecture in Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica*. *ACS synthetic biology*.

Sibirny A, Madzak C & Fickers P (2014) Genetic engineering of non-conventional yeast for the production of valuable compounds. *Microbial biotechnology: progress and trends*. CRC Press, USA 63-111.

Sundstrom H, Wallberg F, Ledung E, Norrman B, Hewitt CJ & Enfors SO (2004) Segregation to non-dividing cells in recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation processes. *Biotechnol Lett* 26: 1533-1539.

Szabo R & Štofániková V (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology letters* 206: 45-50.

Tripathi SC & Kerr J (1989) Effect of mechanical stress on cellular morphology. *Tissue and Cell* 21: 747-752.

Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM & Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15681-15686.

Chapitre V : Conclusions générales et perspectives

Conclusion générale

Depuis son émergence dans le domaine de la biotechnologie, la production de protéines recombinantes a connu un véritable essor dans la recherche fondamentale et appliquée. Dans ce cadre, ces travaux de thèse sont articulés autour du sujet de l'optimisation de la production de protéines recombinantes par la levure oléagineuse *Y. lipolytica*. En particulier, les objectifs de ce travail de thèse résident dans l'étude de la régulation des promoteurs susceptibles d'être utilisés pour une telle application. Par ailleurs, les promoteurs impliqués dans le métabolisme des substrats hydrophobes sont devenus des candidats intéressants pour la production de protéines recombinantes par cette levure. L'inducteur principal souvent utilisé est l'acide oléique. Néanmoins, leur exploitation reste limitée par rapport à d'autres promoteurs sélectionnés chez la même souche comme le promoteur hybride *hpnd*. En particulier, les limitations résident dans la compréhension de leur mécanisme induction/répression en fonction des sources de carbone et en particulier les substrats hydrophobes. La compréhension de ce mécanisme est un sujet d'importance pour augmenter l'exploitation et l'intérêt de ce micro-organisme dans diverses applications biotechnologiques et en particulier pour la production des protéines recombinantes.

Dans ce travail de doctorat, notre première préoccupation est l'étude de la régulation des promoteurs impliqués dans la voie de dégradation de l'acide oléique. En effet, les promoteurs inductibles sont de plus en plus recherchés puisqu'ils permettent la séparation de la phase de croissance de la phase de production des protéines d'intérêt. Une telle stratégie permet d'une part d'éviter la limitation de la croissance cellulaire par la production d'une protéine toxique et d'éviter l'accumulation du substrat (inducteur) dans le milieu de culture d'autre part.

Des recherches ont montré l'efficacité du promoteur *POX2* pour la production des protéines recombinantes chez *Y. lipolytica* [10, 11]. En effet, les rendements de production obtenus en bioréacteur peuvent atteindre jusqu'à 400 mg/l. De plus, il a également été montré que le promoteur du gène *LIP2* pourrait devenir une alternative intéressante pour une telle application [13]. Par ailleurs, une étude comparative mettant en œuvre leur mécanisme de régulation n'a jamais été réalisée. Dans ce cadre, les principaux objectifs de cette partie de thèse sont de caractériser leur mécanisme d'activation/répression en fonction des sources de carbone dans le

but de sélectionner le promoteur le plus induit et d'optimiser ses conditions d'inductions.

Pour y parvenir, nous avons utilisé deux milieux de culture (un milieu complet et un autre synthétique GNY) supplémentés par du glucose, glycérol ou par un mélange acide oléique-glucose ou acide oléique-glycérol. Le niveau d'induction des promoteurs a été mesuré relativement par la mesure de l'intensité de la fluorescence rouge émise par la protéine Redstar2. L'avantage majeur d'utiliser cette protéine fluorescente s'explique par le fait que, contrairement à la protéine β -galactosidase, elle est stable dans le cytoplasme (pendant plus de 30 h à température ambiante), ce qui permet de mesurer le niveau d'induction même après la consommation totale des sources de carbone. En plus de la stabilité, la quantification de la fluorescence est beaucoup plus simple que celle de l'activité enzymatique β -galactosidase. Toutes ces caractéristiques font de la Dsred une protéine modèle pour l'optimisation et l'étude de la régulation des promoteurs chez *Y. lipolytica*.

D'après cette étude, l'induction maximale des deux promoteurs pLIP2 et pPOX2 est obtenue lorsque *Y. lipolytica* est cultivée dans un milieu complet par rapport à un milieu synthétique. De plus, pLIP2 est plus fortement induit que pPOX2 dans ces conditions. Cette forte induction de pLIP2 dans un milieu complet est expliquée par le fait qu'il nécessite la présence d'une source d'azote organique en plus de la source de carbone. Ce résultat corrobore les expériences réalisées par Fickers et ses collaborateurs (2004) qui ont mis en évidence cet effet bénéfique de la source d'azote, en particulier le tryptone N1 pour la production de la lipase 2 par *Y. lipolytica* [14]. Les auteurs supposent que la présence de peptides de faible taille (3 à 5 acides aminés) dans la composition de tryptone N1 pourrait être responsable de cette augmentation du niveau de production de la lipase LIP2.

Par ailleurs, il est apparu que le glucose est la source de carbone préférée d'*Y. lipolytica*. En présence de cette source de carbone, le promoteur LIP2 est non induit, alors qu'il présente une légère induction en présence du glycérol. Cette légère induction pourrait être expliquée par le fait que le glycérol est le composé principal d'un triacylglycérol dont la présence dans le milieu extracellulaire induit légèrement le promoteur LIP2. Ainsi, ce résultat nous a permis d'affirmer que le glucose pourrait être la source de carbone de choix pour la production de la biomasse par *Y. lipolytica*.

Un résultat intéressant : nous avons mis en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation d'un mélange acide oléique glucose sur d'induction du promoteur *LIP2* par rapport à l'utilisation de l'acide oléique tout seul. En effet, la diminution d'une partie de l'acide oléique sans perte du niveau d'induction est importante pour l'optimisation de la production de protéines recombinantes. En particulier, la diminution de la fraction hydrophobe permet essentiellement de faciliter les étapes ultérieures de purification de la protéine d'intérêt. Ces constatations nous ont amené à un autre volet du travail qui a été consacré à caractériser cet effet bénéfique sur l'induction du promoteur *LIP2*.

Dans un premier temps, nous avons testé différentes combinaisons du ce mélange dans l'optique de définir le ratio optimal pour une forte induction du *pLIP2*. Nos résultats ont montré que la fraction optimale d'acide oléique dans le mélange est comprise entre 60 et 90 %. Dans un deuxième temps, pour le prouver, des expériences de RT-qPCR ont été utilisées pour quantifier le niveau d'expression de gènes *LIP2* et *Redstar2*. Nos résultats révèlent que le niveau de transcription des deux gènes est 12 fois plus élevé dans le cas de l'utilisation d'un mélange acide oléique glucose (60-40) par rapport à l'utilisation de l'acide oléique tout seul. Dès lors, ce résultat nous permet d'affirmer que l'utilisation de ce mélange améliore le niveau d'induction du promoteur *LIP2*. La stratégie de l'utilisation d'un co-substrat a été également mise en évidence pour d'autres systèmes de levures tels que *Pichia pastoris* [17]. Dans ce cas, une fraction de méthanol a été substituée par de sorbitol afin de diminuer le taux de consommation d'oxygène pendant la phase de production par rapport à l'utilisation de méthanol tout seul méthanol sorbitol.

Sur le plan métabolique, l'analyse de la cinétique de croissance révèle une co-consommation du glucose et d'acide oléique par de *Y. lipolytica* JMY3742. Ainsi, afin de mieux caractériser leur métabolisme, nous avons étudié l'assimilation de ces deux sources de carbone à l'échelle cellulaire en utilisant la technique de cytométrie en flux. Pour y parvenir, l'assimilation du glucose a été mesurée par l'utilisation d'un analogue (2NBDG) et le métabolisme de l'acide oléique a été mesuré relativement à l'accumulation des lipides révélés par un fluorochrome (Bodipy). De même, l'analyse des résultats montre que les deux sources de carbone sont consommées simultanément par la même cellule. De plus, il en ressort que l'utilisation de ce

mélange diminue la capacité d'accumulation des lipides intracellulaires par *Y. lipolytica*.

En conclusion, nous avons montré que l'utilisation d'un mélange glucose-acide oléique pourrait conférer aux cellules de *Y. lipolytica* une certaine performance qui se traduit par l'augmentation du niveau d'induction du *pLIP2*. D'un point de vue métabolique, cette augmentation du niveau d'induction pourrait être expliquée par le fait que la quantité d'énergie fournie par le mélange est plus utilisée pour l'induction de *pLIP2* que pour l'accumulation des lipides intracellulaires. Enfin, outre la composition en carbone du milieu de culture, d'autres facteurs peuvent avoir un effet sur le niveau d'induction des promoteurs comme les réactions de type stochastique. Ainsi, l'identification des principaux acteurs impliqués dans cet effet bénéfique est loin d'être totalement élucidée.

Dans un autre contexte, la caractérisation du lien entre le changement morphologique et le niveau d'induction du promoteur est l'un des paramètres clés à prendre en compte pour l'optimisation des bioprocédés [18]. Dès lors, l'étude de l'impact de la morphologie cellulaire sur la régulation des promoteurs a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche [2, 19]. Cependant, sous l'effet de l'agitation, les longs filaments sont rassemblés en boucle formant ainsi un agrégat cellulaire. Ce dernier pourrait avoir un corps cellulaire dense et inactif dû au faible apport du nutriment ce qui, dès lors, pourrait être à l'origine d'une lyse cellulaire et, conséquemment, d'un faible niveau de production.

Comme discuté précédemment, les facteurs environnementaux qui ont un impact sur la transition dimorphique chez *Y. lipolytica* ont été identifiés, entre autres la nature de la source de carbone [21]. Il convient de rappeler qu'on a montré précédemment que l'induction du promoteur *LIP2* dépend énormément de la nature de la source de carbone. Ainsi, la question revient dès que ce phénomène apparaît : le dimorphisme a-t-il une influence sur le niveau d'induction du promoteur *LIP2* ? Pour répondre à cette question, il était nécessaire, dans un premier temps, de discriminer les deux morphologies cellulaires (filamenteuse et ovoïde). Les conditions environnementales induisant le dimorphisme cellulaire ne sont pas encore bien connues. L'hypothèse la plus répandue est que le pH du milieu avait un impact significatif sur ce phénomène. Toutefois, selon nos résultats, ce paramètre semble avoir un effet sur la régulation du promoteur *LIP2*.

Dans ces circonstances, nous avons procédé à l'analyse du niveau d'induction du promoteur *LIP2* à l'échelle cellulaire dans des conditions bien définies de manière à induire une hétérogénéité morphologique dans le même milieu de culture. Nos résultats font apparaître clairement que le niveau d'induction du promoteur *LIP2* dépend du changement de pH du milieu, mais pas du changement morphologique. En effet, ce résultat souligne la performance de cette levure et son potentiel avéré en tant que système d'expression hétérologue. Par ailleurs, la plupart des bioprocédés appliqués dans les industries pharmaceutiques ou alimentaires sont souvent basés sur des cultures réalisées dans un bioréacteur agité. Cependant, l'augmentation de volume de cultures, des micro-organismes filamenteux, est soumise à des contraintes physico-chimiques telles que la viscosité du milieu de culture qui pourrait affecter la physiologie de la cellule et, par conséquent, diminuer les performances du bioprocédé [8]. C'est pourquoi la conception des nouveaux bioréacteurs mieux adaptés à la physiologie des micro-organismes semble souvent être une bonne alternative aux cultures planctoniques. Une des alternatives intéressantes est le réacteur à biofilm dont il sera discuté dans la section suivante.

Dans la dernière partie de ce travail de doctorat, nous nous sommes focalisés sur le développement d'une méthode d'analyse en temps réel des paramètres de culture de *Y. lipolytica* en présence d'un substrat hydrophobe. En effet, les méthodes d'analyse des procédés basés sur l'utilisation des substrats hydrophobes sont difficiles à mettre en place à cause de leur faible degré de solubilité. Dans ces circonstances, on est amené à mettre en œuvre une nouvelle approche qui permet d'analyser en ligne les paramètres en relation directe avec la physiologie de *Y. lipolytica*.

En effet, cette méthode consiste dans l'utilisation de la cytométrie en flux en ligne connectée à un bioréacteur. D'une part, l'analyse des données nous a permis de distinguer entre la phase biotique (les cellules) et la phase abiotique (l'acide oléique). Cette distinction a été réalisée par la représentation biparamétrique des données sur base de paramètres de taille et forme des particules. Cette distinction nous a permis aussi de tracer la cinétique de la culture sur le plan de la production de biomasse et la consommation de l'acide oléique.

D'autre part, comme nous l'avons mentionné précédemment, l'hétérogénéité morphologique est l'un des paramètres clés à prendre en compte pour le

développement et l'optimisation des bioprocédés basés sur la culture des micro-organismes filamenteux dont *Y. lipolytica* [2]. Ainsi, l'analyse de la morphologie cellulaire de *Y. lipolytica* est basée généralement sur des méthodes classiques telles que l'imagerie cellulaire [3-4]. Cependant, ces techniques d'analyse sont relativement longues et requièrent une étape préliminaire de préparation de l'échantillon qui pourrait affecter la morphologie des cellules, tel le stress mécanique. A cet effet, nous avons développé une méthode d'analyse quantitative de la morphologie cellulaire de ce micro-organisme. Cette méthode consiste à analyser les signaux optiques relatifs à la taille des cellules (SSC-A /SSC-H).

Comme indiqué précédemment, la levure *Y. lipolytica* est de plus en plus considérée comme une machinerie cellulaire pour la synthèse et l'accumulation des lipides, ce qui a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche [5]. Généralement, les techniques de dosage des lipides intracellulaires utilisées sont très lourdes à mettre au point, notamment l'étape de leur extraction. En effet, le développement des nouvelles méthodes d'analyse simples qui s'adaptent pour l'analyse d'un nombre élevé d'échantillons est très recherché. En effet, plusieurs fluorochromes ont été développés pour l'analyse des lipides intracellulaires chez *Y. lipolytica* comme le Nile red et le bodipy [6, 7]. Dans le présent travail, nous avons développé une technique d'analyse des lipides intracellulaires à l'échelle de la cellule de *Y. lipolytica*. Par cette technique, le niveau des lipides accumulés est proportionnel au niveau de fluorescence mesuré. De plus, une corrélation entre la mesure en ligne de l'intensité de FSC-A et le profil de l'accumulation des lipides dans les trois conditions a également été observée. De ce fait, l'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica* pourrait être analysée en ligne sans l'utilisation d'une coloration externe sur base de la mesure de l'intensité de FCS-A au cours du temps.

Dans un même contexte, l'étude de la régulation des promoteurs par l'analyse de la population microbienne par cytométrie en flux est de plus en plus considérée lors de l'étude de la régulation des promoteurs [9]. En effet, le niveau d'induction d'un promoteur est mesuré d'une façon plus rapide et beaucoup plus précise. Dans le présent travail, nous avons montré l'utilisation cette technique pour l'étude de la régulation des promoteurs LIP2 et TEF chez *Y. lipolytica*. Cette étude est rendue possible par l'utilisation la protéine fluorescente YFP produite sous le contrôle de deux types de promoteurs. Par cette méthodologie, l'échantillon est analysé

directement par cytométrie en flux sans passer par des étapes d'élimination du milieu de culture. Nos résultats montrent que le promoteur *LIP2* est réprimé en présence de glucose et induisent que l'acide oléique est utilisé comme la seule source de carbone ou en mélange avec du glucose, au regard du profil d'induction du promoteur TEF. Ces constatations restent en accord avec nos résultats antérieurs de l'étude de la régulation des promoteurs *POX2* et *LIP2* qui ont fait l'objet du deuxième chapitre de cette thèse.

En résumé, il est désormais possible de suivre en ligne la consommation de l'acide oléique, la biomasse, l'accumulation des lipides intracellulaires, le dimorphisme ainsi que le niveau d'induction des promoteurs, sans l'intervention ni d'un opérateur ni d'une coloration externe lors de l'analyse.

Au terme de ces études, *pLIP2* apparaît comme un promoteur de choix pour l'expression des protéines recombinantes chez *Y. lipolytica*. De plus, son niveau maximal d'induction a été obtenu lors de la culture de ce micro-organisme dans un milieu complet en présence d'un mélange d'acide oléique glucose. Les avantages majeurs de ce milieu résident dans sa performance pour un niveau maximal d'induction, indépendamment du changement de pH et du changement morphologique de cette levure. En effet, la forme prédominante dans ce milieu est la forme ovoïde, qui est la plus adaptée pour les procédés de culture en bioréacteur.

Finalement, nous avons développé une nouvelle méthode de suivi des paramètres physiologiques de *Y. lipolytica* par la technique de la cytométrie en flux. Cette méthode est de plus en plus considérée pour étudier rapidement quelques caractéristiques d'un grand nombre de cellules, ce qui permet d'en tirer des statistiques fiables sur le phénomène en question. De plus, ce concept est devenu un outil très efficace et robuste pour l'analyse et l'intensification des bioprocédés basés sur la culture des micro-organismes dont *Y. lipolytica*, ce qui, à l'heure actuelle, est encore un sujet de débat.

Perspectives

Bien que ce travail représente un progrès dans le développement de bioprocédés basés sur la culture de *Y. lipolytica*, il convient de souligner qu'une nouvelle voie de recherche s'ouvre encore pour répondre à d'autres questions.

Dans un premier temps, les résultats de ces travaux ont mis en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation d'un mélange glucose acide oléique sur le niveau d'induction du *pLIP2*. Par ailleurs, dans un premier temps, il faudra reprendre ces expériences avec une caractérisation plus approfondie. En effet, il convient de valider cet effet bénéfique sur la productivité. De plus, le débit d'ajout de ce mélange pendant la phase de production, voire la stratégie de son ajout (pulse (s), en continu, ou exponentielle) est aussi à optimiser.

Dans un deuxième temps, l'utilisation d'une protéine modèle à produire serait un choix judicieux pour le développement d'un procédé optimisé. Dans ce cas, l'utilisation des protéines thérapeutiques telles que la protéine hGMCSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ou l'interféron $\alpha 2 b$ serait un parfait exemple puisqu'elles ont été déjà produites chez *Y. lipolytica* sous le contrôle du promoteur *POX2*. De ce fait, une étude comparative du rendement de la production est envisageable.

En troisième temps, les résultats de ces travaux de thèse montrent que la culture des deux formes cellulaires de *Y. lipolytica* (ovoïde et filamenteuse) conduisent au même niveau d'induction du promoteur *LIP2*. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour la production de protéines d'intérêt biotechnologique par la culture de *Y. lipolytica* en réacteur à biofilm. Ce procédé innovant est compatible avec les micro-organismes capables de former facilement des biofilms et qui sécrètent un large spectre de métabolites dont *Y. lipolytica* [12]. Les résultats de Khalesi et ces collaborateurs est un des exemples concrets faisant intervenir ce procédé pour améliorer le rendement de production d'une molécule à haute valeur ajoutée (l'hydrophobine II) par la culture de la souche *Trichoderma reesei* dans un réacteur à biofilm [15]. Dans ce type de bioréacteur, le biofilm formé est immobilisé sur un support inerte avec une circulation en continu du milieu de culture. Ce système de culture offre plusieurs avantages par rapport aux cultures planctoniques, entre autres, majoritairement, la limitation de la formation de la mousse et la limitation en oxygène.

Par ailleurs, il serait intéressant de répondre à la question de savoir si le dimorphisme n'a réellement pas d'impact sur le niveau d'induction d'autres promoteurs, notamment le promoteur *POX2* mais aussi, éventuellement, les promoteurs constitutifs comme le TEF qui est le plus utilisé dans l'ingénierie métabolique de la levure *Y. lipolytica* ? On peut aussi se poser la question suivante : le profil de production des deux formes de cette levure serait-il le même pour la culture en biofilm ? Enfin, ce prolongement de la taille est-il nécessaire pour le développement d'un biofilm chez *Y. lipolytica* ?

Par ailleurs, la méthode de suivi en ligne des paramètres de culture de *Y. lipolytica* en présence des substrats hydrophobes tels que l'acide oléique est désormais maîtrisée. Ce concept s'avère d'ailleurs utile pour le contrôle de ce bioprocédé. En effet, des boucles de régulation sont envisageables, notamment pour le contrôle de l'ajout du mélange acide oléique glucose durant la phase d'induction (figure 13). Une telle stratégie permettra d'éviter l'accumulation de l'acide oléique dans le milieu de culture dont une certaine concentration pourrait être déterminante pour la croissance cellulaire.

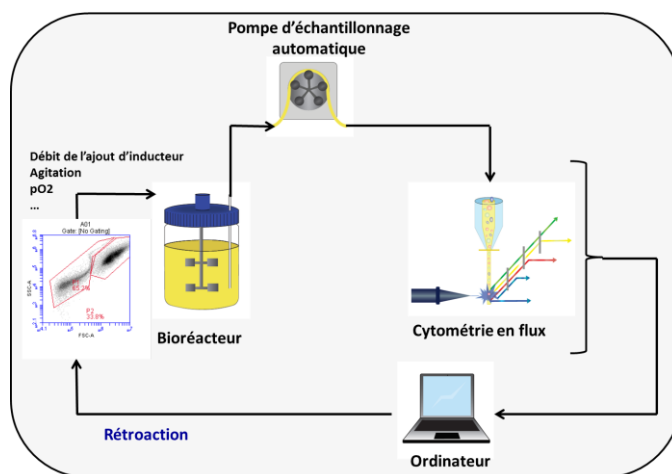


Figure 13: Boucle de régulation de l'ajout du mélange acide oléique glucose sur base d'analyse à l'échelle de la cellule de *Yarrowia lipolytica*

Références

1. Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C: **Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses**. *Biochemical Engineering Journal* 2010, **48**(3) : 385-407.
2. Wucherpennig T, Kiep KA, Driouch H, Wittmann C, Krull R: **Morphology and rheology in filamentous cultivations**. *Adv Appl Microbiol* 2010, **72**:89-136.
3. Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC, Belo I: **Quantitative image analysis as a tool for *Y. lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media**. *Journal of Biotechnology* 2016, **217**:22-30.
4. Coelho M, Belo I, Pinheiro R, Amaral A, Mota M, Coutinho J, Ferreira E: **Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **66**(3) : 318-324.
5. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C, Nicaud J-M: ***Y. lipolytica* as a model for bio-oil production**. *Progress in Lipid Research* 2009, **48**(6) : 375-387.
6. Dulermo T, Nicaud J-M: **Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Y. lipolytica***. *Metab Eng* 2011, **13**:482 - 491.
7. Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Le Dall M-T, Hapala I, Papanikolaou S, Chardot T, Nicaud J-M: **Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Y. lipolytica***. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, **74**(24) : 7779-7789.
8. Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG, Finogenova TV: **Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Y. lipolytica***. *FEMS Yeast Res* 2003, **3**(2) : 217-222.
9. Delvigne F, Goffin P: **Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: Dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations**. *Biotechnology Journal* 2014, **9**(1) : 61-72.
10. Gasmi N, Fudalej F, Kallel H, Nicaud J: **A molecular approach to optimize hIFN alpha2b expression and secretion in *Y. lipolytica***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **89**:109 - 119.
11. Gasmi N, Lassoued R, Ayed A, Treton B, Chevret D, Nicaud JM, Kallel H: **Production and characterization of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expressed in the oleaginous yeast *Y. lipolytica***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, **96**(1) : 89-101.
12. Halan B, Buehler K, Schmid A: **Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses**. *Trends in Biotechnology* 2012, **30**(9):453-465.
13. Fickers P, Destain J, Thonart P: **Methyl oleate modulates *LIP2* expression in the lipolytic yeast *Y. lipolytica***. *Biotechnol Lett* 2005, **27**(22) : 1751-1754.
14. Fickers P, Nicaud J, Gaillardin C, Destain J, Thonart P: **Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Y. lipolytica***. *J Appl Microbiol* 2004, **96**:742 - 749.
15. Khalesi M, Zune Q, Telek S, Riveros-Galan D, Verachtert H, Toye D, Gebruers K, Derdelinckx G, Delvigne F: **Fungal biofilm reactor improves the productivity of hydrophobin HFBII**. *Biochemical Engineering Journal* 2014, **88**:171-178.
16. Workman M, Holt P, Thykaer J: **Comparing cellular performance of *Y. lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations**. *AMB Express* 2013, **3**(1) : 58.

17. Niu H, Jost L, Pirlot N, Sassi H, Daukandt M, Rodriguez C, Fickers P: **A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut+/pAOX1-LacZ strain.** *Microb Cell Fact* 2013, **12**.
18. Walisko R, Moench-Tegeder J, Blotenberg J, Wucherpfennig T, Krull R: **The Taming of the Shrew--Controlling the Morphology of Filamentous Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2015, **149**:1-27.
19. Krull R, Wucherpfennig T, Esfandabadi ME, Walisko R, Melzer G, Hempel DC, Kampen I, Kwade A, Wittmann C: **Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology.** *J Biotechnol* 2013, **163**(2) : 112-123.
20. Barth G, Gaillardin C: **Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Y. lipolytica*.** *FEMS Microbiol Rev* 1997, **19**:219 - 237.
21. Ruiz-Herrera J, Sentandreu R: **Different effectors of dimorphism in *Y. lipolytica*.** *Archives of Microbiology* 2002, **178**(6) : 477-483.