



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

**Institut National Supérieur Des Sciences Agronomiques de l'Alimentation et de
l'Environnement
AGROSUP DIJON**

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Science de l'Alimentation

Options : Biotechnologie, Biochimie Microbienne, Microbiologie

Par

TA Thi Minh Ngoc

Date de soutenance : 28 avril 2010

**Mécanismes physiologiques et biochimiques induits chez *Yarrowia lipolytica*
en réponse à des modifications de l'environnement physico-chimique des
cellules**

Thèse partiellement confidentielle

Devant la commission d'examen :

Pr. Le Thanh Mai	Institut Polytechnique de Hanoï, Hanoï, Vietnam	Rapporteur Présidente du jury
Dr. Jacqueline Destain	Université de Liège, Liège, Belgique	Rapporteur
Pr. Jean-Louis Goergen	ENSIA, Nancy	
Pr. Jean-François Cavin	AgroSup Dijon, co-directeur de thèse	
Dr. Yves Waché	AgroSup Dijon, Directeur de thèse	

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie UMR UB/INRA 1232 devenu pendant cette période le Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires. Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes dans l'équipe qui m'ont accompagnée pendant cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-Marc BELIN, et puis Monsieur Patrick GERVAIS, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pendant ces années.

Yves, je te remercie beaucoup, pour avoir accepté d'être directeur de thèse, pour ton soutien, ta confiance, ta disponibilité et ta compréhension illimitée pendant toutes ces années de tourment mais aussi de bonheur.

Mes remerciements vont ensuite à Jeff pour m'avoir accueillie et encadrée tout d'abord en DEA et en tant que co-directeur de thèse. Merci pour tes conseils scientifiques, tes encouragements et ta confiance sans lesquels je n'aurais jamais pu continuer mes études en thèse.

Madame Jacqueline DESTAIN (Université de Liège, Liège, Belgique) et Madame LE Thanh Mai (Institut Polytechnique de Hanoï, Hanoï, Vietnam) me font l'honneur d'assumer les fonctions de rapporteurs. Monsieur Jean-Louis GOERGEN (ENSIA, Nancy) me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Je les en remercie vivement.

J'aimerais remercier Messieurs J-M Belin et Jean-Marie Perrier-Cornet pour leur participation à mon comité de thèse, Christine et Sylvie pour leur disponibilité et leur aide pour les commandes, les démarches administratives, les techniques d'autoclave et de lyophilisation.

Je remercie tous mes stagiaires qui ont contribué beaucoup pour ce travail et qui m'ont appris beaucoup : Hanh, Mathieu, Tam, Abi, Nad.

Un grand merci à toutes les personnes au laboratoire, Hoa, Thien, Hue, Phuong, Chi, Ly, Lan, Erandi, Cynthia, Julie, Phu, Binh, Nhi, Minh, Hélène, Dominique, grâce à qui mon séjour d'études ici s'est passé dans une ambiance chaleureuse.

Un merci spécial à tous mes amis vietnamiens pour leur soutien, leur amitié et pour avoir partagé de bons moments avec moi durant mon séjour sur Dijon.

Je n'oublie pas d'adresser un merci sincère à toute la famille Pierron qui m'a accueillie dans sa maison pendant ces années : Jean-Philippe pour ton humour, Christel pour ton amitié, Lyse et Simon qui viennent de temps en temps et chauffent le jardin.

Merci à ma petite copine Sabina pour ses dessins et ses messages.

A mes amis, Phuong, Tanh, Linh, Giang, Thom, Thuan, je vous remercie vivement.

Un grand merci de tout mon cœur et mon amour à toi, Dang, pour tout.

Le plus grand merci revient à ma mère, mon père et mon petit frère, qui ont toujours été à mes côtés. Leur amour, leur encouragement m'ont donné la force de suivre ce chemin jusqu'à son but.

Titre :

Mécanismes physiologiques et biologiques induits chez *Yarrowia lipolytica* en réponse à des modifications de l'environnement physico-chimique des cellules

Résumé :

Les composés hydrophobes sont connus comme des sources de carbone qui peuvent être utilisées par les levures comme *Yarrowia lipolytica* pour de multiples applications. Ces composés causent parfois des perturbations aux levures mais sont aussi rapportés comme conférant aux cellules une certaine résistance contre les stress environnementaux. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié le rôle de l'oléate de méthyle comme source de carbone sur la résistance de la levure *Y. lipolytica* en réponse au choc d'un composé amphiphile, la γ -dodécalactone, et au stress thermique. Les résultats obtenus montrent que les cellules ayant poussé sur oléate sont beaucoup plus résistantes au choc lactone ainsi qu'au stress thermique que les cellules ayant poussé sur glucose. L'action de la lactone se trouve au niveau de la membrane où elle cause une fluidification membranaire et une déplétion de stérols qui sont considérés comme la cause de la mort cellulaire. Ce travail met en évidence le rôle des corps lipidiques dans la réponse cellulaire qui se manifeste de différentes manières en réponse à ces stress. Une accumulation des corps lipidiques est importante pour la résistance de la cellule aux stress. Les cellules ayant poussé sur glucose transforment leur stérol libre en esters de stéryle pour former les corps lipidiques en réponse au choc lactone, ce qui augmente leur sensibilité. Tandis que les cellules ayant poussé sur oléate qui ont accumulé des corps lipidiques pendant leur croissance ont tendance à convertir leurs esters de stéryle en stérol libre pour compenser la déplétion de stérol membranaire causée par la lactone ce qui diminue leur sensibilité. L'homéostasie de l'ergostérol, liée à la présence de corps lipidiques, semble donc jouer un rôle clé dans la résistance cellulaire à ces stress. Ce travail relève aussi que la présence de lipides modifie le processus de mort cellulaire programmée de *Y. lipolytica* en réponse à un stress thermique.

Mots clé : *Yarrowia lipolytica*, oléate, corps lipidiques, lactone, rampe, stress

Title:

Physiologic and biologic mechanisms induced in *Yarrowia lipolytica* in response to physico-chemical modifications of cells environment.

Abstract:

Hydrophobic compounds are known as carbon sources which can be used by yeast like *Yarrowia lipolytica* for multi purposes. These compounds may cause disturbance in yeast but has also been shown as conferring some resistance to cells towards environmental stress. Here, we study the role of methyl oleate as the carbon source on the resistance of *Y. lipolytica* in response to the stress caused by an amphiphilic compound, γ -dodecalactone, and to heat shock. Results show that cells grown in oleate are more resistant to these stresses than cells grown in glucose. This work reveals the role of lipid bodies in cell response to stress and that cells manifest in different ways in response to these stresses. An accumulation of lipid bodies is required for the resistance of cells towards stress as glucose grown cells transform their free sterol into sterol esters to form lipid bodies in response to the lactone shock which increases their sensitivity towards lactone. In the case of oleate grown cells which accumulated lipid bodies during their growth, cells tend to convert their sterol esters into free sterol in order to compensate sterol depletion caused by the lactone shock and decrease their sensitivity. Homeostasis of ergosterol, linked with the presence of lipid bodies, seems to be a key for mechanism of cellular resistance to stresses. This work reveals also that the presence of lipid bodies modifies the processes of programmed cells death in response to heat shock.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, oleate, lipid bodies, lactone, heat, stress

Table de matières

Titre :	3
Résumé :	3
Title:	4
Abstract:	4
Table de matières	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Introduction	9
1. Rappel bibliographique	11
1.1. Les substrats hydrophobes comme source de carbone	11
1.1.1. La biotechnologie des lipides : les lipides comme ressource renouvelable	11
1.1.1.1. Industrie des cosmétiques, esters et biosurfactants	13
1.1.1.2. Production de biocarburants utilisant des microbes et des algues.	13
1.1.1.3. Production d'aliments et aliments fonctionnels.	14
1.1.2. Utilisation des substrats hydrophobes chez la levure	16
1.1.2.1. Entrée des substances hydrophobes dans la cellule	16
1.1.2.2. Assimilation des substrats hydrophobe chez la levure	19
1.2. Rappel sur la levure	20
1.2.1. La membrane biologique	20
1.2.1.1. La membrane biologique : composition et fonctionnement	20
1.2.1.2. Les lipides membranaires	21
1.2.1.3. Les protéines membranaires	22
1.2.1.4. La fluidité membranaire	23
1.2.1.5. Les stérols membranaires	24
1.2.2. Les corps lipidiques	25
1.2.2.1. Formation des corps lipidiques	26
1.2.2.2. Composition des corps lipidiques	27
1.2.2.3. Mobilisation des lipides neutres dans les corps lipidiques	27
1.3.1. Les perturbations causées par la présence des composés hydrophobes dans le milieu	29
1.3.1.1. Effet des composés hydrophobes sur les propriétés structurales de la bicouche	29
1.3.1.2. Perturbation dans les fonctions membranaires	33
1.3.2. Adaptation au stress des microorganismes – rôle des lipides	35
1.3.2.1. Changement physiologique des levures cultivées en présence de substrats hydrophobes	36
1.3.2.2. Les lipides protègent la cellule contre les stress environnementaux	36
1.4. La levure <i>Y. lipolytica</i> et ses applications	38
1.4.1. Origine	39
1.4.2. Caractéristiques physiologiques	39
1.4.3. Applications industrielles et environnementales de <i>Y. lipolytica</i>	40
1.4.3.1. Sécrétion des protéines	40
1.4.3.2. Production d'acides organiques	41
1.4.3.4. Production d'huiles d'organisme unicellulaire	44
1.4.3.5. Les applications environnementales	45
1.4.3.6. Autres applications	45
1.5. Conclusion de la partie bibliographique et problématique	46

2. Matériels et Méthodes	48
2.1. Souches de levure, milieux et conditions de stress	48
2.1.1. Les souches de levure utilisées dans cette étude	48
2.1.2. Conditions de croissance	48
2.1.3. Conditions de stress.....	48
2.1.3.1. Rampe thermique	48
2.1.3.2. Choc chimique.....	49
2.2. Estimation de la viabilité cellulaire	49
2.2.1. Coloration au bleu de méthylène.....	49
2.2.2. UFC sur milieu gélosé.....	49
2.3. Dosage des composés d'arôme	50
2.3.1. Extraction liquide-liquide.....	50
2.3.2. Quantification par chromatographie en phase gazeuse	50
2.4. Analyses des stérols	50
2.5. Les techniques fluorescentes utilisées dans cette étude	51
2.5.1. Détermination de la fluidité membranaire	51
2.5.2. Microscopie fluorescente et marquage des cellules	51
2.5.2.1. Coloration des lipides au Rouge Nil	52
2.5.2.2. Marquage de paroi cellulaire au Calcofluor	52
2.5.2.3. Marquage de l'état énergétique de la membrane cellulaire au Bis-Oxonol	52
2.5.2.4. Marquage de l'intégrité membranaire avec Iodure de Propidium.....	52
2.5.2.5. Marquage d'ADN au Acridine Orange et au DAPI	53
2.5.2.6. Coloration et observation des levures en microscopie multispectrale et confocale	54
3. Résultats	55
3.1. Effet de la lactone sur la membrane cellulaire et rôle de la source de carbone dans la réponse des cellules à ce stress.....	56
Publication 1: New insights into the effect of medium chain length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium.....	56
3.2. Rôle des corps lipidiques dans la résistance des cellules au choc lactone.	70
Publication 2: Lipid bodies play a role in the resistance of the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> to amphiphilic compounds	70
3.3 Effet de la source de carbone sur la résistance de <i>Y. lipolytica</i> en réponse à un stress thermique.....	72
Préambule.....	72
Publication 3: A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and oleate- grown cells of <i>Yarrowia lipolytica</i>	76
4. Conclusions et perspectives	98
4.1. Conclusions	98
4.2. Perspectives et travaux en cours.....	99
4.2.1. L'influence de la source carbone sur la réponse cellulaire au stress s'appuie sur l'homéostasie des stérols ?	99
4.2.2. Mécanisme d'apoptose en réponse au choc thermique chez <i>Y. lipolytica</i> ?.....	99
Références bibliographiques	100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Commercialisation des produits de la biotechnologie des lipides (adapté de Schörken & Peter, 2009)	12
Tableau 2 : Les enzymes utiles dans la modification des lipides (adapté de Metzger & Bornscheuer, 2006)	12
Tableau 3 : Différents types de biosurfactants et leur origine microbienne (adapté de Schörken & Peter, 2009)	14
Tableau 4 : Comparaison de différentes sources des biodiesels (adapté de (Mata <i>et al.</i> , 2009)	16
Tableau 5 : Composition de LB chez <i>Y. lipolytica</i> W29 en fonction de la source de carbone (adapté de Athenstaedt <i>et al.</i> , 2006)	27
Tableau 6: Exemples de protéines hétérologues exprimées/ sécrétées par <i>Y. lipolytica</i>	42
Tableau 7: Exemple d'acides organiques produites par <i>Y. lipolytica</i> (adapté de (Finogenova <i>et al.</i> , 2005)	43
Tableau 8: Pourcentage des lipides et acides gras produits par des levures les plus efficaces (d'après (Ratledge & Zvi, 2008)	44
Tableau 9: Applications de <i>Y. lipolytica</i> dans les traitements et la valorisation de déchets (d'après Bankar <i>et al.</i> , 2009)	45
Tableau 10 : Les souches utilisées dans cette étude	48
Tableau 11 : Compositions des milieux utilisés dans cette étude (g/L)	49

Liste des figures

Figure 1 : Dispositions possibles des protéines membranaires : protéines extrinsèque (a) et protéines intrinsèques dont la chaîne polypeptidique est localisée principalement dans le bicouche (b), d'un côté de la membrane (c) ou des deux côtés de la membrane (d). (d'après Shechter, 1990a).....	23
Figure 2 : Les divers mouvements des constituants membranaires. Rotation des protéines (1), rotation des lipides (2), diffusion latérale des lipides (3), mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonées (4), diffusion latérale des protéines (5) (d'après Shechter, 1990).....	24
Figure 3 : Effet de l'ajout de stérol sur l'anisotropie du DPH dans des membranes modèle dans leur état fluide (POPC) ou gel (DPPC). (●) ergostérol, (o) cholestérol (Arora <i>et al.</i> , 2004)	25
Figure 4 : Mécanisme de la formation des corps lipidiques selon le modèle de bourgeonnement (Czabany <i>et al.</i> , 2007).	26
Figure 5 : Interconversion entre esters de stéryle (SE) et stérol : les enzymes impliquées.....	28
Figure 6 : Variation de la température de transition de phase lamellaire- gel à phase liquide-crystalline (T _m) induite par lactones sur DMPC-d27 : (O) δ-décalactone ; (□) γ-dodécalactone ; (■) γ-décalactone ; (◆) γ-butyrolactone. (Aguedo <i>et al.</i> , 2002a)	31
Figure 7 : Effet de la γ-décalactone : (A) sur la température de transition de bicouche DMPC en fonction de la concentration : (●) référence (0,5% éthanol), (◆) 50, (◇) 100, (□) 175, (Δ) 300 mg/l ; (B) sur fluidité membranaire de <i>Y. lipolytica</i> W29 (Aguedo <i>et al.</i> , 2003b)	32
Figure 8 : Ethanol induit la conversion en phase interdigitée de membrane Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (Weber & de Bont, 1996b)	35
Figure 9: Structure et spectre de quelques sondes fluorescentes	53
Figure 10 : Schématisation des utilisations de levure et des stress auxquelles les microorganismes sont exposés (adapté de Ferreira, 2009)	72
Figure 11 : Schéma d'un processus de production de levure boulangère.	73
Figure 12 : Schématisation de l'effet de la température et de la réponses de la cellule (Vigh <i>et al.</i> , 1998)	74

Introduction

L'utilisation des composés hydrophobes comme source de carbone dans les procédés de biotransformation est maintenant une tendance de la biotechnologie pour produire des composés d'intérêt comme les esters utilisés dans l'industrie des cosmétiques, les biosurfactants, les biodiesel, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne ou les arômes comme la lactone.

La levure *Yarrowia lipolytica* est connue pour sa capacité d'assimiler les substrats hydrophobes comme les alcanes, les hydroperoxydes, les esters d'oléate (oléate et ricinoléate de méthyle) en produisant des composés d'intérêt dans l'industrie alimentaire comme les acides gras insaturés, les arômes de note verte (hexanal), de note pêche (γ -dêcalactone, γ -dodêcalactone)....

Pourtant, ces composés amphiphiles provoquent certaines perturbations aux cellules à cause de leur toxicité, de leur effet fluidifiant de la membrane etc., qui donne souvent des contraintes au niveau des applications industrielles.

Une meilleure connaissance sur les mécanismes physiologiques et biochimiques induits chez *Y. lipolytica* en réponse aux stress environnementaux en présence de lipides comme source de carbone sera intéressante pour améliorer et valoriser leur application à grande échelle.

Le plan de travail est le suivant :

Un rappel bibliographique portant sur l'utilisation des substances hydrophobes dans la cellule, leur intérêt industriel et leurs interactions avec la cellule. La levure *Y. lipolytica* est brièvement présentée.

La méthodologie de l'ensemble de l'étude est ensuite abordée.

Les résultats de cette étude sont présentés en trois parties indépendantes. En premier, l'effet de la source de carbone sur la résistance et la réponse des cellules au choc lactone est étudié sur la viabilité cellulaire et au niveau de la membrane sur les aspects comme la fluidité, l'intégrité, les stérols. L'effet de l'induction par l'oléate de méthyle sur la résistance cellulaire est aussi étudié en comparaison avec d'autres espèces de levure. Ensuite, les mécanismes de réponse cellulaire au choc lactone induits chez *Y. lipolytica* sont étudiés au niveau des corps lipidiques et l'homéostasie des stérols. Comme le choc thermique est rapporté provoquer aux cellules des perturbations similaires à celles causées par les composés hydrophobes, la troisième partie est consacrée à étudier l'effet de choc thermique sur la cellule en présence d'oléate de méthyle.

Une brève conclusion retirée des résultats obtenus est abordée à la fin du rapport avec des perspectives proposées.

1. Rappel bibliographique

1.1. Les substrats hydrophobes comme source de carbone

Les sucres sont connus comme une excellente source de carbone pour des microorganismes dont les levures. Pour des raisons historiques et technologiques, l'étude de *Saccharomyces cerevisiae* a dominé la recherche sur les levures. A l'origine, cette levure est bien connue pour son assimilation du sucre et la sécrétion d'alcool qui en découle dans d'abondantes applications industrielles. Pourtant, le sucre n'est pas la seule source d'énergie pour la croissance cellulaire.

Vue la croissance de l'industrie qui libère des milliers de tonnes de déchets gras, les substrats hydrophobes, surtout les alcanes, les acides gras et les triglycérides, deviennent maintenant des sources de carbone intéressantes à utiliser. Ces substrats sont soit purement hydrophobes, cas des alcanes, soit possèdent une tête polaire ou chargée, cas des alcanols et des acides gras, dits composés amphiphiles, mais ayant une pauvre affinité pour l'eau.

1.1.1. La biotechnologie des lipides : les lipides comme ressource renouvelable

(d'après (Hou, 2009; Metzger & Bornscheuer, 2006; Schörken & Peter, 2009))

La production mondiale des huiles et des graisses s'élevait de 1996 à 2000 à 105×10^6 tonnes et continue à augmenter. Environ 80% de ces produits sont consommés par l'alimentation humaine, 5 à 6 % par l'alimentation animale et 14% soient 15-17 millions de tonnes sont utilisés par les industries. La plupart des huiles et des graisses produites est d'origine végétale (soja, palme, colza, tournesol).

La biotechnologie des lipides comprend la production microbienne et la transformation biotechnologique des lipides et des composés liposoluble, comme par exemple le triacylglycérol (TAG), céramide, phospholipides (PL), carotène ...

Des exemples positifs du développement de la biotechnologie des lipides se trouvent principalement dans les domaines spécifiques comme la cosmétique, les aliments fonctionnels et l'industrie pharmaceutique (Tableau 1). Les enzymes concernées sont présentées dans la Tableau 2.

Tableau 1 : Commercialisation des produits de la biotechnologie des lipides (adapté de Schörken & Peter, 2009)

Produit	Procédé
Huiles microbiennes (polyinsaturées)	Fermentation utilisant des microorganismes marines
Lipides structurés	Modification enzymatique des lipases régiosélectifs
Acides gras enrichis	Enrichissement enzymatique utilisant des lipases spécifiques
Caroténoïdes (carotène, astaxathine)	Fermentation par <i>Dunaliella</i> , <i>Haematococcus</i> ou champignons
Esters cosmétiques	Synthèse par lipases
Sphingolipides	Production par <i>Pichia ciferrii</i>
Hormones stéroïdes	Transformation par microorganismes
Décalactone	Production par <i>Y. lipolytica</i>
Hexanal et autres composés d'arômes gras	Lipoxygénases et hydroperoxyde lyase
Acides dicarboxyliques (à partir d'alcane)	Production par <i>Candida tropicalis</i>
Biodiesel	Biodiesel d'algue

Tableau 2 : Les enzymes utiles dans la modification des lipides (adapté de Metzger & Bornscheuer, 2006)

Enzymes	Applications	Exemples
Lipases	Synthèse de triglycérides structurés	Equivalant de beurre de cacao, bétanol
	Enrichissement des acides gras	Les acides gras polyinsaturés à partir de graisse de poissons
	Incorporation de acides gras spécifiques	Les acides gras polyinsaturés incorporés dans l'huile des plantes
Phospholipases	Enlèvement du groupe phosphate	Diglycérides chirale
	Echange de groupes	Phosphatidylsérine
Monooxygénase	Hydroxylation des acides gras	Précurseurs de polyesters/ lactones
Epoxidase	Epoxidation de double liaison	-
Lipoxygénase	Synthèse de hydroperoxides d'acides gras	-

1.1.1.1. Industrie des cosmétiques, esters et biosurfactants

Les sphingolipides et leurs dérivés sont rapportés comme ayant des propriétés bénéfiques pour la peau. Ils aident à maintenir la fonction de barrière cutanée donc sont importants pour la rétention de l'hydratation. Ils possèdent également des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires et peuvent être utilisés dans le traitement de l'acné. Il est connu depuis longtemps que les levures peuvent synthétiser des sphingolipides comme un de leurs lipides intracellulaires (Boergel *et al.*, 2006; Braun & Snell, 1967; Kaufman *et al.*, 1971). La levure *Pichia ciferrii* est connue comme étant exceptionnelle car elle peut excréter totalement l'acétyle de tetraacétyl phytosphingosine dans le milieu de transformation. Le taux de transformation peut atteindre plusieurs gammes par litre. Les céramides produites par cette biotransformation sont commercialisées par Evonik and Doosan Corporation pour le marché cosmétique.

Les surfactants sont des composés amphiphiles. Plusieurs surfactants peuvent être excrétés par des microorganismes (Tableau 3). Ces biosurfactants sont proposés pour plusieurs applications comme la remédiation biologique et l'extraction du pétrole, les applications cosmétiques, détergentes ou émulsifiantes pour l'industrie alimentaire. Les monoacylglycérols sont utilisés comme émulsifiants dans les produits alimentaires (glace, chewing-gum, pâtes, margarine ...). Le procédé traditionnel produit des monoacylglycérols de degré technique avec un rendement maximum de 60% qui peut être augmenté à 90% par distillation. L'utilisation des lipases, grâce à leur spécificité, peut donner un rendement de plus de 90%. Le point faible des biosurfactants reste dans leur compétition de prix par rapport aux surfactants chimiques.

1.1.1.2. Production de biocarburants utilisant des microbes et des algues.

L'évolution de la production de pétrole semble avoir atteint le maximum dans l'année 2008 comme elle n'augmentait plus depuis quelques années. Comme la production pétrolière s'apprête à diminuer, des mesures doivent être prises pour diminuer la consommation du pétrole ou passer à des sources alternatives comme l'électricité d'origine éolienne, solaire ou des ressources biologiques. La biotechnologie des lipides donne une belle solution : la production de biocarburants comprenant les biodiesels, bioéthers, huiles végétales, biogaz. En plus, les biocarburants ont l'avantage alléchant du pétrole vert car ils sont biodégradables.

Tableau 3 : Différents types de biosurfactants et leur origine microbienne (adapté de Schörken & Peter, 2009)

Type de biosurfactant	Structure/ nom	Microorganisme
Glycolipides	Sophorose lipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>
	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Tréhalose lipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp.,
Lipopeptides	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.,
	Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Lichensin	<i>Bacillus licheniformis</i>
Phospholipides		<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Acide	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
	corynomicolique	
Surfactants polymériques	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Alasan	<i>Ancinatobacter radioresistens</i>
	Liposan	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Lipomannan	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Particule de biosurfactant	Vésicules	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.,
	Cellules entières	<i>Cyanobacter</i>

Les biodiesels sont des biocarburants produits à partir d'huiles végétales, de graisses animales ou recyclées. Ils sont d'esters d'alkyles à longue chaîne comme le linoléate de méthyle, produit à partir de l'huile de soja et du méthanol. La production de biodiesel peut atteindre 1,3 g/L par *Escherichia coli*. Un champignon *Gliocladium roseum* est aussi capable de le synthétiser. Parmi les microorganismes, les algues ou microalgues sont les microorganismes qui attirent le plus attention dans la production des biodiesels. Elles sont plus efficaces pour la production des biodiesels que les sources végétales (Tableau 4). Toutefois, jusqu'à présent, la production commerciale des biodiesels par les microalgues n'a pas encore été réalisée à l'échelle industrielle d'une manière rentable.

1.1.1.3. Production d'aliments et aliments fonctionnels.

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (PUFA), comme l'acide arachidonique (AA), l'acide éicosapentaénoïque (EPA) ou décosapentaénoïque (DHA) sont considérés comme ayant une variété d'effets positifs sur la santé : prévention des maladies

coronariennes, abaissement de la pression artérielle et du taux de cholestérol, protection contre le développement de tumeurs ... Les PUFA se trouvent naturellement dans quelques huiles des graines (graine de lin, bourrache, soja, colza ...) et surtout dans les organisme aquatiques (thon, anchois ...).

Les microorganismes sont capables d'utiliser et synthétiser les PUFA à travers le processus d'huile monocellulaire ou « single cell oils ». Cet aspect est abordé plus tard dans la partie application de *Y. lipolytica* (voir 1.4). L'avantage d'utiliser des microorganismes se trouve dans les possibilités de génie génétique qui nous permettent de concentrer et enrichir la composition des PUFA désirés qui ne sont pas trouvés de manière naturelle.

A côté des sucres connus comme substrats classiques pour les microorganismes, les substrats hydrophobes (acides gras, alcanes, triacylglycérides...) sont des sources de carbone qui attirent beaucoup l'attention des chercheurs et de l'industrie. La technologie de lipides devient un champs intéressant dans la biotechnologie et se trouve dans plusieurs applications : production des lipases, de biocarburants, d'esters, d'aliments fonctionnels... L'utilisation des levures capables d'utiliser des substrats hydrophobes connaît un fort potentiel dans ce domaine de « biotechnologie blanche » qui respecterait mieux environnement.

Tableau 4 : Comparaison de différentes sources des biodiesels (adapté de Mata *et al.*, 2009)

Maïs	44	172	66	152
Chanvre	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Colza	41	974	12	862
Tournesol	40	1070	11	946
Castor	48	1307	9	1156
Huile de palme	36	5966	2	4747
Microalgue	30	58700	0.2	51927
(bas contenu en huile)				
Microalgue	50	97800	0.1	86515
(médium contenu en huile)				
Microalgue	70	136900	0.1	121104
(haut contenu en huile)				

1.1.2. Utilisation des substrats hydrophobes chez la levure

1.1.2.1. Entrée des substances hydrophobes dans la cellule

Etant donné que les substrats hydrophobes ne sont pas miscible dans l'eau, leur entrée dans la cellule demande des modifications morphologiques et physiologiques, surtout des propriétés de la surface cellulaire qui sont impliquées dans l'adhésion des gouttelettes lipidiques sur la paroi (hydrophobicité de la surface) ou dans la production des émulsifiants (surfactants). Quelle que soit la nature des interactions entre la molécule hydrophobe et la cellule, le passage comprend trois étapes : mise au contact et adsorption sur la surface cellulaire ; traversé de la structure (paroi et membrane plasmique) ; désorption pour entrer dans le cytoplasme.

Contact entre substrat et cellule

Pour entrer dans la cellule, le substrat hydrophobe doit interagir avec la surface cellulaire. Deux hypothèses ont été développées pour expliquer cette étape de transport d'une molécule peu miscible dans l'eau dans la cellule :

- * solubilisation ou pseudo-solubilisation du composé envisagé en présence de surfactants

- * adhésion directe à la paroi cellulaire

Dans le cas de *Y. lipolytica*, ces deux mécanismes sont mis en évidence. Cette levure peut produire des surfactants quand cultivée sur des substrats hydrophobes. L'induction d'adhésion entre des substrats hydrophobes et la cellule peut augmenter l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Cette modification d'hydrophobicité surfaciale serait corrélée avec la formation des protrusions à la surface des cellules cultivées en n-alcane. Cette structure, aussi observée chez *Candida tropicalis*, dépend de la phase de croissance et serait inductible par alcane ou acide oléique (Fickers *et al.*, 2005).

Passage des parois

Les mécanismes du franchissement de la paroi par des composés hydrophobes demeurent peu connus.

Osumi *et al.*, (1975) ont observé en microscopie électronique à balayage que la surface de *C. tropicalis* est rugueuse lors de la croissance sur alcanes alors qu'elle est lisse si la source de carbone est le glucose. Sur des coupes de levures observées en microscopie électronique à transmission, les protrusions paraissent composées de sous-unités qui semblent former un canal, résistant au lavage avec des solvants organique, dépassant légèrement la surface des levures. Les protrusions ont été aussi observées chez *Y. lipolytica* cultivée dans oléate de méthyle comme la seule source de carbone (Mlickova *et al.*, 2004).

Il semblerait que les levures peuvent adapter la composition de leur paroi en présence de composés hydrophobes afin d'améliorer l'assimilation. Cette hypothèse peut être renforcée par l'observation de *Y. lipolytica* qui présente une paroi d'une épaisseur plus importante en présence d'alcanes qu'en présence de glucose (Kim, 2000) .

Passage de la membrane plasmique

Les mécanismes du passage des acides gras à longue chaîne carbonée au travers de la membrane plasmique restent un point en débat (Trotter, 2001). Les études démontrent que les acides gras libres peuvent traverser très rapidement une membrane lipidique modèle à un pH physiologique. Chez la levure, la pénétration des acides gras comme l'acide laurique et l'acide oléique dans la cellule de *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica* a été démontrée comme s'appuyant sur une diffusion simple pour des concentrations supérieures à 10 μ M alors qu'en dessous de ces concentrations, un transporteur n'utilisant pas d'énergie était requis (Kohlwein & Paltauf, 1983). Ce type de transport conditionné par les concentrations d'acides gras du milieu est aussi observé par Berk & Stump, (1999) chez *Saccharomyces uvarum* et *Y. lipolytica* en utilisant un marquage radioactif. Chez *C. tropicalis* le transport de l'oléate est saturable et

plus rapide chez des cellules dont la croissance s'est faite sur un milieu contenant de l'oléate que chez des cellules ayant poussé en présence de glucose, ce qui indique que le transporteur impliqué est inductible (Trigatti *et al.*, 1992).

Le passage transmembranaire passif des acides gras peut être influencé par plusieurs facteurs (Hettema & Tabak, 2000):

- * le gradient transmembranaire de pH
- * la distribution relative des sites de fixation des acides gras de chaque côté de la membrane
- * la conversion des acides gras libres en dérivés imperméables à la membrane (esters de CoA)
- * la dégradation des acides gras dans la cellule

Le passage des acides gras à travers la membrane peut être facilité par une acylation vectorielle par des enzymes Acyl-CoA synthetases (ACS). Chez *S. cerevisiae*, six enzymes ACS ont été caractérisées et baptisées Faa1p, Faa2p, Faa3p, Faa4p, Fat1p et Fat2p. Les Faa catalysent l'activation des acides gras de 8 à 20 carbones ; Le Fat1p est spécifique pour des chaînes de plus de 20 carbones quant aux substrats de Fat2p, ils n'ont pas encore été identifiés (Black & DiRusso, 2007).

En résumé, le passage transmembranaire des acides gras peut être facilité par une protéine membranaire agissant comme une translocase, ou il peut s'agir d'une diffusion simple au travers des phospholipides membranaires, d'un pore ou d'un canal, tous deux de nature protéique.

Désorption des acides gras de la membrane pour entrer dans le cytosol

Possédant une grande affinité pour la bicouche phospholipidique, il est évident que la désorption des acides gras de cette bicouche est plus lente que leur association, même plus lente que le passage transmembranaire par flip-flop. Une famille de protéines intracellulaires appelées Fatty acid binding proteins (FABP) semble nécessaire pour faciliter le transfert des acides gras de la surface intérieure de la membrane plasmique dans le cytosol aqueux. La cinétique de désorption est dépendante de la longueur chaîne des acides gras (Hamilton, 1998).

1.1.2.2. Assimilation des substrats hydrophobe chez la levure

Le catabolisme des substrats hydrophobes chez la levure est un métabolisme complexe dans lequel sont impliqués plusieurs cycles métaboliques qui ont lieu dans différents organites cellulaires.

Les substrats hydrophobes, une fois passée la membrane cellulaire, sont activés sous forme de coenzyme A (CoA), puis transportés par des protéines de la famille des Fatty Acids Binding Proteins (FABPs) à leur site d'oxydation primaire. *S. cerevisiae* exprime au moins une protéine de type acyl-CoA binding protein codée par le gène *ACB1*. C'est une protéine de 86-103 acides aminés qui va se lier avec les acyl-CoA de 14-20 carbones mais pas avec les acides gras libres. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras libres. Les alcanes sont oxydés jusqu'aux acides gras libres correspondants par des enzymes du système alcanes monooxygénase (AMOS) dont le cytochrome P450 et la NADPH-cytochrome P450 réductase, les alcool gras oxydases et les aldéhydes gras déshydrogénases.

Les acides gras libérés sous forme d'ester de CoA sont ensuite dégradés en acétyl-CoA et propionyl-CoA dans le cas des chaînes impaires d'alcanes à travers la β -oxydation peroxysomale. La chaîne acyle des acides gras peut également être incorporée dans la formation des lipides cellulaires après élongation et désaturation. Ces acides gras libres peuvent aussi, dépendant des conditions, s'accumuler dans les corps lipidiques. Ce point sera abordé plus tard (voir 1.2.2).

L'oxydation des acyl-CoA dans les peroxysomes est réalisée par les enzymes acyl CoA oxydase (Aox) codées par les gènes *POX*. Chez *Y. lipolytica*, il y a 6 gènes, de *POX1* à *POX6* qui ont été isolés et caractérisés (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999b). Le mutant de W29, délété de 4 gènes *pox2*, *pox3*, *pox4*, *pox5* (*Y. lipolytica* MTLY37) n'est pas capable de pousser sur oléate de méthyle comme seule source de carbone.

Le produit final de l'oxydation des acides gras chez la levure est l'acétyl-CoA. Ce dernier finit par entrer dans le cycle du glyoxylate dont l'enzyme clé est l'isocitrate lyase *ICL1*, ou exporté vers les mitochondries pour intégrer le cycle du citrate ou cycle du méthylcitrate dans le cas des chaînes dont le nombre de carbone est impair.

1.2. Rappel sur la levure

La structure de la levure a été décrite depuis longtemps comme comprenant plusieurs compartiments spécifiques :

- * la membrane plasmique qui sépare les composants cellulaires et d'autres organites avec le milieu externe
- * la mitochondrie qui est impliquée dans la génération métabolique d'énergie
- * le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi impliqués dans la synthèse et le tri des lipides et des protéines
- * le noyau qui renferme l'ADN et le protège
- * les vacuoles et peroxysomes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans le fonctionnement digestif.
- * autres organites : inclusions, réserves lipidiques....

Dans le cadre de cette bibliographie, nous allons nous focaliser sur les domaines riches en lipides de la cellule dont la membrane plasmique et les corps lipidiques.

1.2.1. La membrane biologique

1.2.1.1. La membrane biologique : composition et fonctionnement

Les membranes biologiques sont des structures délimitant les cellules et les organites intracellulaires (mitochondries, noyau, lysosomes ...). Leur rôle principal est de permettre des compartimentations. La membrane plasmique, formée d'une bicouche lipidique d'environ 7,5 nm de large, constitue l'interface entre la cellule et son milieu. Elle assure donc à la fois un rôle de barrière en empêchant les molécules cellulaires de partir et les molécules extérieures d'entrer librement, et un rôle de barrière en sélectionnant les éléments qui peuvent entrer ou sortir. Elle est aussi le support des enzymes impliquées dans la transduction de signaux, la synthèse d'énergie... C'est le premier élément rencontré par les molécules porteuses d'information, comme les hormones, les neurotransmetteurs ou diverses espèces chimiques importantes pour la cellule.

La membrane est constituée de trois des principaux éléments de base du vivant : lipides, protéines et glucides. Ces trois éléments coopèrent pour former un film fluide mais néanmoins étanche qui isole la cellule du milieu extérieur et lui permet d'interagir.

Les phospholipides ont une importance particulière puisqu'ils forment une double couche lipidique à l'origine de la compartimentation. Cette barrière bloque pratiquement toute diffusion d'ions inorganiques et freine considérablement la diffusion de solutés organiques

polaires (sucres, acides aminés...). Seuls quelques solutés très hydrophobes ou de petite taille comme le CO_2 ou l'éthanol diffusent librement à travers la bicouche. Pour les autres molécules, les échanges de part et d'autre de la membrane sont assurés par les protéines intégrées dans la bicouche phospholipidique.

1.2.1.2. Les lipides membranaires

La composition lipidique de la membrane plasmique est complexe et fortement réglée, ce qui suggère un rôle des lipides dans l'activité des protéines de la membrane plasmique.

Les lipides membranaires sont des molécules amphiphiles. Ceci détermine leur association dans les membranes sous forme de bicouche qui leur permet de limiter au maximum le contact entre les parties apolaires et l'eau. Les phospholipides forment la classe la plus abondante des lipides de la plupart des cellules. Les plus courants sont la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol, la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine qui se distinguent par la nature de leur tête polaire.

Les lipides membranaires amphiphiles, lorsqu'ils sont sortis de leur contexte membranaire et remis en suspension dans l'eau à forte concentration, adoptent des organisations structurales très variées. Cette organisation dépend à la fois de la nature du lipide considéré et des conditions expérimentales (températures, concentrations des différents constituants...). Deux grands types d'organisation peuvent apparaître, une organisation lamellaire (L_α et L_β) et une organisation hexagonale (H_I et H_{II}). Dans les phases hexagonales, les phospholipides forment un cylindre avec les queues hydrophobes regroupées à l'intérieur du cylindre pour les phases H_I , ou avec les têtes polaires orientées dans un cœur aqueux pour les phases H_{II} . En effet, en raison de leur nature chimique, les têtes polaires des lipides et leurs queues hydrophobes présentent des volumes et des interactions différentes avec les autres lipides membranaires. En particulier, la couche de solvation autour des têtes polaires détermine leur volume effectif et le degré de saturation alors que la conformation des doubles liaisons déterminent le volume occupé par les chaînes hydrophobes.

Certains lipides, tels que la phosphatidyléthanolamine, en raison de leur forme, ont une tendance à former spontanément une phase hexagonale de type H_{II} lorsqu'ils sont présents à forte concentration. En effet, une tête polaire de petite taille par rapport à la partie apolaire favorise la formation de phases H_{II} (Shechter, 1990). De plus, tout facteur qui pourrait contribuer à diminuer la taille effective de la partie polaire par rapport à la partie apolaire, par exemple la diminution de la couche de solvation de la tête polaire (Rietveld *et al.*, 1999), peut déclencher l'apparition de ce type d'organisation.

Dans les conditions physiologiques d'une cellule, la viscosité des membranes est de l'ordre de $0,1 \text{ N.s.m}^{-2}$, ce qui correspond environ à 100 fois celle de l'eau (Shechter, 1990). Ceci étant, la fluidité membranaire varie avec la température et la composition lipidique. En effet, les chaînes hydrocarbonées des lipides membranaires peuvent adopter plusieurs conformations en fonction de l'agitation thermique et de leur configuration (longueur des chaînes hydrocarbonées, présence ou non de doubles liaisons, configuration *trans* ou *cis* des doubles liaisons). Lorsque les chaînes hydrocarbonées sont en contact étroit et étirées au maximum, les lipides membranaires ont une conformation ordonnée et peu fluide appelée L_β . Lorsque les chaînes oscillent autour d'une orientation moyenne perpendiculaire au plan de la membrane et que les lipides ne sont plus séparés les uns des autres, les lipides membranaires ont une conformation liquide cristalline fluide ou L_α . Le passage des lipides d'une conformation ordonnée L_β à une conformation fluide L_α est appelé transition de phase gel/liquide cristalline.

1.2.1.3. Les protéines membranaires

Les protéines membranaires se classent en deux grandes catégories : les protéines extrinsèques (ou périphériques) et les protéines intrinsèques (transmembranaires ou intégrales) (Figure 1). Les protéines extrinsèques ne sont associées à la membrane que de manière relativement faible par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou les parties polaires des protéines intrinsèques qui émergent hors de la membrane. Elles sont donc en contact avec le milieu aqueux et possèdent des caractéristiques structurales semblables à celle des protéines globulaires solubles. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et les compartiments aqueux. Les protéines intrinsèques sont associées à la membrane de manière plus étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Elles permettent le transport de matière, les couplages énergétiques et le transfert d'informations.

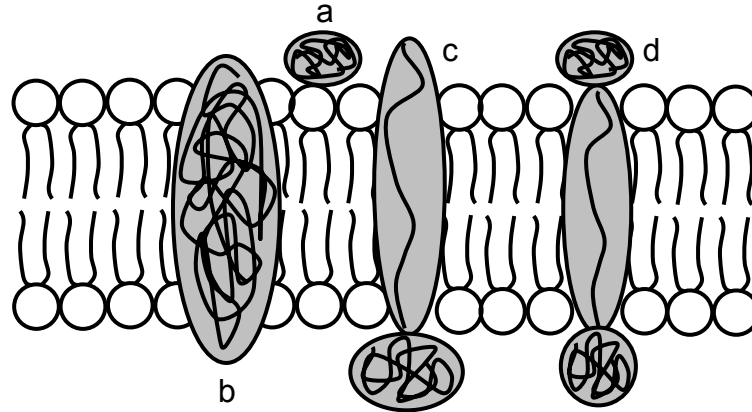


Figure 1 : Dispositions possibles des protéines membranaires : protéines extrinsèque (a) et protéines intrinsèques dont la chaîne polypeptidique est localisée principalement dans le bicouche (b), d'un côté de la membrane (c) ou des deux côtés de la membrane (d). (d'après Shechter, 1990a)

Les protéines extrinsèques et intrinsèques, par leurs interactions avec les parties apolaires ou polaires des lipides membranaires, ont une influence majeure sur la fluidité membranaire (D'Antuono *et al.*, 2000) et en fonction de leur nature peuvent faire augmenter ou diminuer la température de transition de phase ou encore faire disparaître ce phénomène (Tomczak *et al.*, 2003). A l'inverse, la fluidité membranaire a une influence directe sur la conformation du site actif de certaines enzymes membranaires, ce qui résulte en une augmentation de l'énergie d'activation de ces enzymes lorsque la membrane est plus fluide (McMurchie & Raison, 1979).

1.2.1.4. La fluidité membranaire

Les différents constituants d'une membrane biologique, s'ils sont confinés dans un espace défini par la membrane, n'en sont pas moins animés de mouvements divers. Les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane ; les chaînes hydrocarbonées des lipides sont flexibles et sont animées d'un mouvement de balanciers plus ou moins prononcés. Ces mouvements à courte échelle confèrent à la membrane une certaine fluidité. Du fait de cette fluidité, les protéines peuvent être animées d'une rotation sur elles mêmes. Mais surtout, la fluidité permet des mouvements à plus longue échelle des lipides et des protéines dans le plan de la membrane : il s'agit de la diffusion latérale. Ces différents mouvements sont schématisés dans la Figure 2.

Un fonctionnement cellulaire correct nécessite une fluidité membranaire optimale, ni trop, ni trop peu. Ceci explique la nécessité d'une adaptation homéovisqueuse : des perturbation externes (température, solvants) qui affecteraient la fluidité membranaire sont compensées de sorte à maintenir une fluidité constante.

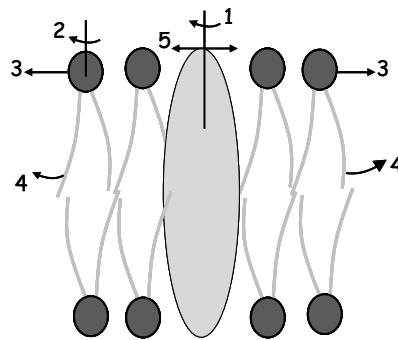


Figure 2 : Les divers mouvements des constituants membranaires. Rotation des protéines (1), rotation des lipides (2), diffusion latérale des lipides (3), mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonées (4), diffusion latérale des protéines (5) (d'après Shechter, 1990)

1.2.1.5. Les stérols membranaires

Les stérols sont essentiels pour la formation membranaire. Ils sont considérés comme une molécule clé pour maintenir l'état de la membrane avec une fluidité adéquate pour son fonctionnement. Tandis que le stérol majeur chez les vertébrés est le cholestérol, le stérol principal chez la levure est l'ergostérol, avec deux liaisons π et un groupement de méthyle en plus sur l'anneau B et la chaîne acyle. Les stérols sont bien enfouis dans la bicouche avec leur groupe OH en face du groupe carboxyle des chaînes de phospholipides. Malgré une diminution légère au niveau externe de la bicouche (partie entre les têtes polaire et profondeur de C7/ C9) qui facilite l'entrée des molécules d'eau, les interactions entre les stérols et les chaînes acyles insaturées renforcent l'hydrophobicité dans le centre de la bicouche qui diminue la perméabilité membranaire (Subczynski *et al.*, 1994). De plus, comme leur localisation n'est que très légèrement modifiée (1 Å) au cours de la transition gel-liquide de la membrane (Leonard *et al.*, 2001), les stérols jouent comme un rôle d'ancrage et renforcent la stabilité de la bicouche. Ils sont connus comme régulateur de la fluidité membranaire. L'ajout de stérol rigidifie la membrane en état fluide et au contraire, fluidifie la membrane en état rigide (Arora *et al.*, 2004; Dufourc, 2008) (Figure 3).

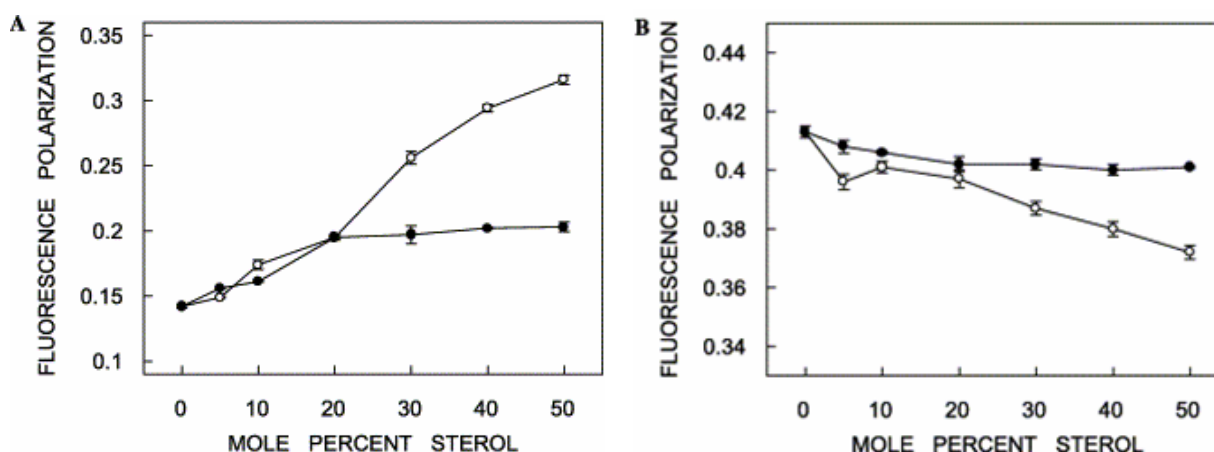


Figure 3 : Effet de l'ajout de stérol sur l'anisotropie du DPH dans des membranes modèle dans leur état fluide (POPC) ou gel (DPPC). (●) ergostérol, (○) cholestérol (Arora *et al.*, 2004)

Récemment, différentes formes d'existence de stérols dans la membrane ont été décrites : les caveolae et les rafts (Maxfield, 2002). Les cavéolae ont autour de 60 nm de diamètre sous forme de flacon-invagination et sont associés avec une protéine membranaire, la cavéoline. Ce microdomaine, existant dans presque tous les type de cellules des vertébrés mais aussi des levures (Kubler *et al.*, 1996) et riche en stérols, est proposé dans la régulation du transport des stérols comme stérol senseur ainsi que site d'échange de stérols (Fielding, 2001; Hoekstra & van Ijzendoorn, 2000). Les rafts sont un autre type de micro domaine riche en stérols se trouvant dans la membrane (Wachtler & Balasubramanian, 2006). Ce sont les microdomaines constitués de stérols et sphingolipides, pauvres en phospholipides polyinsaturés comme les glycérolphospholipides. Cette structure chez la levure peut être visualisée par coloration fluorescente avec la sonde filipine (Grossmann *et al.*, 2007). Les rafts sont proposés comme jouant un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires importantes : la compartimentalisation membranaire, le trafic membranaire (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007), la signalisation membranaire (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002), le facteur de croissance (Pike, 2005) etc.

1.2.2. Les corps lipidiques

Les principaux lipides neutres chez la levure sont les triacylglycérol (TAG) et les esters de stéryle (SE). Ces composés sans groupes chargés n'ont pas pour destination la membrane plasmique. Ils sont séquestrés dans des particules appelées corps lipidiques (LB – lipid bodies) dont la structure est simple : un noyau chargé par des lipides neutres entouré par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont insérées des protéines. Ces LB sont considérés comme un dépôt de composants pour la formation des membranes chez la levure plutôt qu'une réserve énergétique. Il a aussi été suggéré qu'ils pourraient avoir un rôle dans le

transport de stérols entre LB – réticulum endoplasmique (ER) – membrane (Zweytick *et al.*, 2000a).

1.2.2.1. Formation des corps lipidiques

La biogenèse des LB est toujours en discussion. Un modèle de bourgeonnement (budding model) semble actuellement le plus proche (

Figure 4). Dans ce modèle, les enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides s'accumulent dans un domaine spécifique du réticulum endoplasmique (ER) et favorisent la synthèse « sur place » des lipides neutres. Comme des TAG et SE ne sont pas capable d'intégrer la membrane plasmique, ils forment des microgouttelettes – précurseur de LB – entre la bicouche de ER. Après avoir atteint une certaine taille, les LB matures bourgeonnent du ER et flottent dans le cytoplasme. Le diamètre moyen des LB chez *S. cerevisiae* varie de 0,3 à 0,4 μm bien que des gouttelettes plus grandes de diamètre 1,2 – 1,6 μm peuvent aussi être observées. Chez *Y. lipolytica*, la taille des LB dépend du temps et des conditions de croissance. Les cellules cultivées sur glucose donnent des LB de petite taille 0,65 μm , tandis que les cellules cultivées sur oléate de méthyle comme source de carbone forment des LB plus gros 2 – 2,5 μm (Athenstaedt *et al.*, 2006). (Mlickova *et al.*, 2004) ont rapporté aussi l'influence des enzymes de la β -oxydation sur la formation de LB. Le triple mutant $\Delta\text{pox2}\Delta\text{pox3}\Delta\text{pox5}$ forme seulement quelques petits LB. L'introduction de *POX2* augmente la taille des LB en formant de grosses gouttelettes. Selon ces auteurs, le gène *POX2* régule la taille et le nombre de LB formés chez *Y. lipolytica* tandis que les observations non publiées de Zweytick et Athenstaedt sur les mutants tronqués de gènes localisés sur LB montrent que ces gènes « sur place » n'influence pas la taille et les propriétés physiques des LB formés.

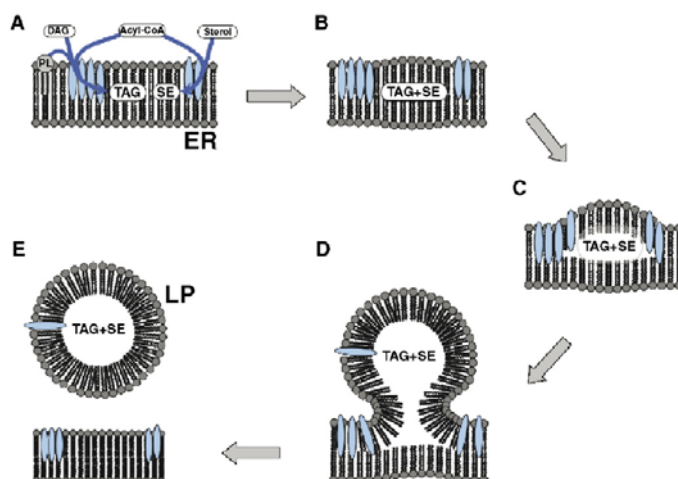


Figure 4 : Mécanisme de la formation des corps lipidiques selon le modèle de bourgeonnement (Czabany *et al.*, 2007).

1.2.2.2. Composition des corps lipidiques

Deux des principaux composants des LB sont les TAG et les SE. Chez *S. cerevisiae*, le rapport entre ces deux composants est environ 1 : 1 (Clausen *et al.*, 1974). Par contre, les LB chez les levures oléagineuses comme *Y. lipolytica* contiennent principalement du TAG et seulement une quantité mineure de SE (Mlickova *et al.*, 2004) et ce rapport varie en fonction de la source de carbone (Athenstaedt *et al.*, 2006). Les cellules ayant poussé sur glucose synthétisent plus de TAG tandis que les cellules ayant poussé sur lipides synthétisent plus de SE.

Les protéines possèdent une partie modeste dans la composition des LB. La plupart d'entre elles sont des protéines intervenant dans le métabolisme des lipides, par exemple : les Erg1p, Erg6p, Erg7p impliquées dans la synthèse de stérols ; Faa1p, Faa4p, Fat1p impliquées dans l'activation des acides gras (Athenstaedt *et al.*, 1999), Tgl1p, Yeh1p impliquées dans la transformation de SE en stérols libres (Czabany *et al.*, 2007). Ces protéines ont été caractérisées chez *S. cerevisiae*, et récemment identifiées chez *Y. lipolytica* (Athenstaedt *et al.*, 2006).

Tableau 5 : Composition de LB chez *Y. lipolytica* W29 en fonction de la source de carbone (adapté de Athenstaedt *et al.*, 2006)

Source de carbone	Glucose	Lipide
	% masse	
TAG	84,5	79,7
SE	7,8	14,1
Ergostérol	0,6	0,5
Protéines	5,1	4,0
PL	2,0	1,6
TAG/ SE	10,8	5,6

1.2.2.3. Mobilisation des lipides neutres dans les corps lipidiques

Normalement, la formation des LB a lieu quand la cellule entre dans la phase stationnaire. Ils semblent fonctionner comme un compartiment de stockage des composants lipidiques nécessaires à la formation de la membrane dans des conditions restrictives. Dans les condition de carence des acides gras, TAG et SE sont les deux mobilisés pour libérer leurs acides gras qui sont ensuite utilisés pour la synthèse des phospholipides. Au cours de la

déplétion de stérol causée par exemple par la présence de terbinafine, inhibiteur de la squalène époxidase, les SE sont hydrolysés pour libérer des stérols utilisés pour la formation des membranes (Zweytick *et al.*, 2000a).

La première enzyme impliquée dans la transformation de SE en stérol libre identifiée est Yeh2p qui se localise dans la membrane plasmique et pas dans les LB (Mullner *et al.*, 2005; Zinser *et al.*, 1993). Le mutant dépourvu de ce gène *YEH2* est absent d'activité SE hydrolase dans la membrane plasmique tandis que le mutant qui sur-exprime ce gène a une augmentation significative de cette activité enzymatique. Deux autres enzymes impliquées dans l'hydrolyse de SE en stérol sont Yeh1p et Tgl1p qui sont localisées dans le LB. Le triple mutant dépourvu de ces trois gènes *YEH1*, *YEH2*, *TGL1* conduit à une absence complète de SE chez *S. cerevisiae*. Ces trois gènes sont impliqués seulement dans la transformation de SE et pas des TAG car la mobilisation de TAG n'est pas influencée chez ce triple mutant.

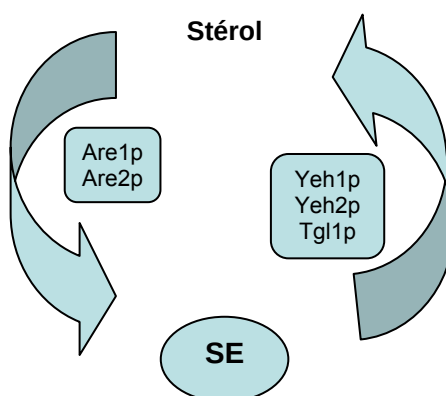


Figure 5 : Interconversion entre esters de stéryle (SE) et stérol : les enzymes impliquées

Les esters de stéryle chez la levure sont synthétisés par deux acyl-CoA : stérolacyltransferases codés par les gènes *ARE1*, *ARE2* (Czabany *et al.*, 2007; Zweytick *et al.*, 2000a). Ces deux gènes sont identifiés chez *S. cerevisiae* et homologues avec les gènes humains. Un double mutant $\Delta are1 \Delta are2$ conduit à une absence totale de SE qui suggère que Are1p et Are2p sont les deux seuls enzymes de stérol estérification chez cette levure. Les études enzymatiques et par microscopie GFP ont montré que Are1p et Are2p sont localisés dans ER (Zinser *et al.*, 1993; Zweytick *et al.*, 2000c). Ce fait renforce le modèle de bourgeonnement de LB.

L'interconversion entre stérol libre et SE est réversible selon les besoins de la cellule (Figure 5) (Taylor & Parks, 1978). La biogenèse et l'estérification de stérol sont étroitement liées. Le double mutant $\Delta are1 \Delta are2$ est toujours viable mais le taux de synthèse de stérol est

diminué par un rapport de deux ou trois par rapport à la souche sauvage (Yang *et al.*, 1996). La délétion combinée ou non de ces deux gènes réduit aussi l'expression de Erg3p (Arthington-Skaggs *et al.*, 1996) et Erg1p (Sorger *et al.*, 2004). Les mutants dont *ARE1* et *ARE2* sont tronqués ont une expression normale de Erg1p au niveau transcriptionnel, pourtant, la stabilité de cette enzyme est fortement diminuée.

1.3.1. Les perturbations causées par la présence des composés hydrophobes dans le milieu

(d'après (Weber & de Bont, 1996b))

La première cible des composés hydrophobes est la membrane cellulaire. Plusieurs études ont montré que l'hydrophobicité d'un composé et sa partition dans la membrane sont bien corrélées avec sa toxicité posée à la cellule. L'hydrophobicité d'un composé est exprimée par le log P_{ow} qui correspond à la partition du composé dans le système biphasique octanol/ eau. Plus ce log P_{ow} est élevé, plus la toxicité augmente. L'éthanol dont le log $P_{ow} = 0,28$ n'est toxique qu'à concentration élevée (quelques %) tant dis que le toluène dont le log $P_{ow} = 2,5$ est déjà toxique à partir de l'ordre de mM. Pourtant, les solvants dont le log P_{ow} est supérieur de 4 sont généralement non toxiques pour les microorganismes (Weber & de Bont, 1996a).

L'effet de composés lipophiles sur la membrane dépend de leur position dans la membrane où ils s'accumulent. Un soluté (éthanol) qui se situe dans la zone des têtes polaires des phospholipides impose un effet différent qu'un soluté (alcane) qui se trouve en profondeur dans la bicouche.

1.3.1.1. Effet des composés hydrophobes sur les propriétés structurales de la bicouche

Les composés amphiphiles se partitionnent dans la membrane avec leur tête polaire insérée dans la partie polaire de la bicouche quand leur chaîne acyle se place entre les chaînes acyles des phospholipides. L'effet de ces composés sur la bicouche dépend du changement au niveau de la chaîne latérale et de la conformation de la tête polaire.

En participant dans la bicouche lipidique de la membrane, il serait attendu que les composés hydrophobes changent la structure de cette dernière. Plusieurs études ont été effectuées sur cette interaction. Les résultats montrent que les changements dans la structure membranaire peuvent être au niveau de l'ordre des lipides, de l'épaisseur de la bicouche, ou

de sa stabilité. D'autre part, ces changements dépendent de la structure des solutés, notamment leur polarité, et par conséquent, leur localisation dans la membrane.

Ordre des lipides

L'ordre des lipides est souvent exprimé à travers la température de transition de phase lamellaire-gel (L_β - conformation ordonnée) à phase liquide-cristalline (L_α - conformation désordonnée), abrégée T_m et le terme fluidité membranaire exprimé par le degré d'anisotropie (r).

La perturbation au niveau de l'ordre des lipides causée par la présence des composés hydrophobes peut être expliquée par le fait que certains phospholipides présents dans la bicouche préfèrent la structure non lamellaire. L'importance de la perturbation, à son tour, dépend de l'origine du composé car celle-ci décide de sa position dans la bicouche. Une molécule d'alcane non amphiphile s'insère plus ou moins profondément dans la membrane selon sa longueur de chaîne donc interfère avec l'os glycérol des phospholipides. Au contraire, les composés amphiphiles jouent tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires de ces composants membranaires. En général, l'influence structurale d'un composé hydrophobe (amphiphile ou non) dépend de sa longueur de chaîne carbonée. Des composés à courte chaîne, comme ils s'ancrent sur la partie polaire de la membrane, interviennent fortement dans l'arrangement des phospholipides. Des composés à chaîne moyenne ont moins d'effet quant aux composés à longue chaîne, ils s'arrangent avec les queues phospholipidiques.

Citons ici les deux exemples des n-alcanols et des lactones.

Le décanol, donc une chaîne de dix carbones, ne pose aucune contrainte sur le T_m d'une membrane liposomale de dipalmitoyl (C16 :0) phosphatidylcholine (DPPC). L'accumulation des n-alcanols dont la longueur chaîne carbonée est supérieure à 10 carbones augmente le T_m quant à ceux dont la chaîne hydrocarbonée est inférieure à 10 carbones causent un effet de désordre sur la bicouche.

Au contraire, les lactones se comportent de manière inverse quand elles interagissent avec la membrane modèle de dimyristoyl (C14 :0) phosphatidylcholine (DMPC-d27) (Figure 6). La butyrolactone (C4) n'impose qu'un faible effet sur le T_m tandis que les décalactones (C10) et dodécalactone (C12) diminuent significativement le T_m . Vu ces résultats, nous constatons que, à côté de paramètre de longueur de la chaîne latérale, la forme de la tête polaire (cycle aromatique de type δ ou γ) joue aussi un rôle dans la perturbation membranaire.

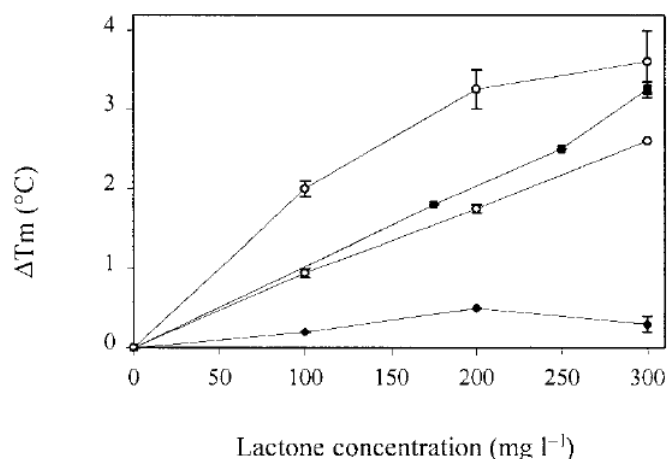


Figure 6 : Variation de la température de transition de phase lamellaire- gel à phase liquide-cristalline (T_m) induite par lactones sur DMPC-d27 : (O) δ -décalactone ; (□) γ -dodécalactone ; (■) γ -décalactone ; (◆) γ -butyrolactone. (Aguedo *et al.*, 2002a)

Le changement de T_m correspond bien avec la variation de fluidité membranaire. Une membrane plus rigide demande plus d'énergie pour la transition d'une phase à l'autre donc une T_m plus élevée. Les composés à longue chaîne qui imposent une augmentation de T_m expriment donc aussi un effet de rigidification sur la membrane et vice-versa. Dans le cas de lactones, la diminution de T_m est en parallèle avec une fluidification de la membrane (Figure 7).

La stabilité d'une membrane biologique est représentée par la capacité de maintenir sa configuration de bicouche et de ne pas la transformer en configuration hexagonale (micelle ou type I ; micelles inversée ou type II) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Comme le T_m représente l'ordre des lipides membranaire, le terme T_{LH} est utilisé pour mentionner la stabilité d'une bicouche. C'est la température à laquelle aura lieu la transition de phase lamellaire L_β en phase hexagonale inversée H_{II} . Pour une membrane de phosphatidyléthanolamine (PE), cette température est aux alentours de 30°C.

Pour déterminer l'influence d'un composé hydrophobe sur la stabilité de la bicouche, il faut tenir compte de l'effet géométrique de la molécule où l'on distingue trois formes de lipides : cône, cylindre et cône inversé. Les lipides comme les PE possédant une tête polaire relativement plus petite que leur chaîne hydrocarbonée supposent une préférence pour la phase H_{II} .

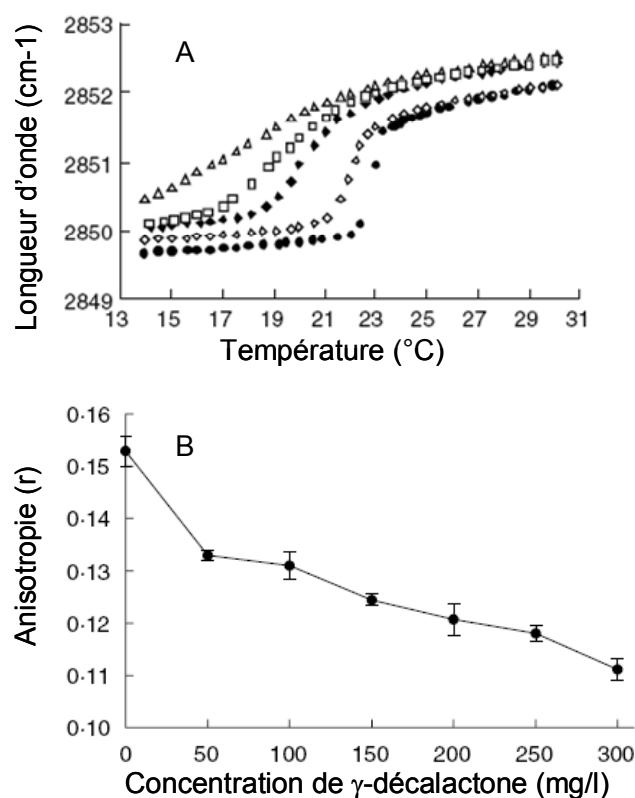


Figure 7 : Effet de la γ -décalactone : (A) sur la température de transition de bicouche DMPC en fonction de la concentration : (●) référence (0,5% éthanol), (◆) 50, (◇) 100, (□) 175, (△) 300 mg/l ; (B) sur fluidité membranaire de *Y. lipolytica* W29 (Aguedo *et al.*, 2003b)

Stabilité de la bicouche

L'effet des alcanols sur le T_{LH} est aussi rapporté comme dépendant de la longueur de chaîne hydrocarbonée. Le décanol et l'octanol diminuent le T_{LH} quand l'éthanol la augmente. Autrement dit, la présence des alcanols à longue chaîne déstabilise la bicouche quand les courtes chaînes ont tendance à la stabiliser. Cet effet est expliqué par le fait que les longues chaînes augmentent le volume des lipides au niveau de leur chaîne acyle ce qui augmente leur paramètre géométrique $((v/l)/a)$. Ce dernier démarre la formation de phase hexagonale inversée des lipides. Au contraire, la présence des courtes chaînes augmente le volume de partie polaire des lipides donc diminue le paramètre géométrique ce qui conduit à une condition défavorable de la formation de phase H_{II} . Il est possible qu'une insertion des alcools à petite molécule puisse transformer la bicouche en phase micellaire (H_I). Les diacyles lipides à courte chaîne (6 ou 8 carbones) peuvent s'agréger sous forme de micelles. Pourtant, cette configuration est plutôt favorable pour les phospholipides contenant une seule chaîne hydrocarbonée et ce n'est pas le cas de la plupart de phospholipides qui constituent la membrane des microorganismes.

Dimension de la bicouche

Un changement dans la dimension de la membrane a été observé au moment de l'insertion de solutés dans la bicouche. Les composés ayant un groupe polaire ou chargé peuvent augmenter le volume de la membrane, par exemple les acides gras libres. L'accumulation des acides gras libres augmente la surface de la bicouche, le volume membranaire, et étend sa dimension latérale en raison de leur alignement avec des queues phospholipidiques (Leekumjorn *et al.*, 2009). Les acides gras insaturés, oléiques et linoléiques, induisent une augmentation plus importante de la surface que les acides gras saturés comme l'acide palmitique. Cela se voit car les queues lipidiques d'acides insaturés occupent une plus grande surface latérale lorsqu'elles sont emballées dans la membrane par rapport à la queue droite d'acides saturés.

Les hydrocarbures ont été observés comme ayant un effet dans la région polaire de la membrane aussi bien que dans le cœur de la bicouche. Cet effet est le résultat des interactions entre les chaînes acyles de soluté et des phospholipides. Les alcanes à courte chaîne comme le hexane n'ont aucun effet sur l'épaisseur de la membrane, tandis que les plus longues chaînes l'augmentent.

En conclusion, l'effet d'un composé hydrophobe sur la structure membranaire n'est pas simple à prédire. Un peut diminuer l'ordre de la bicouche mais en revanche augmenter sa stabilité sans avoir d'effet sur son épaisseur comme le cas des alcanols à courte chaîne. Un autre peut n'avoir aucun effet sur les propriétés membranaires comme c'est le cas du décanol (Weber & de Bont, 1996b). Mais, en général, l'effet de ces composés dépend de leur structure géométrique comme la chaîne hydrocarbonée et la structure de la partie polaire. La δ -décalactone a plus d'effet sur la fluidité membranaire de *Y. lipolytica* que la γ -décalactone (Aguedo *et al.*, 2003a). Au niveau structural de la chaîne aliphatique, une chaîne insaturée sert pour stabiliser la membrane au changement de fluidité même si sa structure insaturée favorise le désordre de la bicouche tandis que les acides saturés ayant la même longueur de chaîne carbonée causent une déstabilisation de la membrane (Leekumjorn *et al.*, 2009).

1.3.1.2. Perturbation dans les fonctions membranaires

La membrane biologique porte des fonctions importantes pour la vie d'une cellule. Les principales fonctions concernent le rôle de barrière imperméable régulant entrée et sortie des solutés environnementaux, ce qui nécessite de bonnes conditions pour les enzymes insérées dans la membrane.

Perméabilité membranaire

Une membrane intacte assure une fonction vitale pour la cellule. Depuis le modèle chemiosmotique de Peter Mitchell en 1961, prix Nobel de Chimie en 1978, la membrane est reconnue comme très importante dans la transduction d'énergie. Le gradient de protons et le potentiel de membrane forment la force proton-motrice qui est utilisée pour conduire la synthèse d'ATP. En effet, le gradient de pH agit comme une «batterie» qui stocke l'énergie pour produire de l'ATP. Le modèle est aussi accepté pour d'autres ions comme le sodium. Une augmentation de la perméabilité membranaire conduit à une dissipation de la force proton-motrice résultant en une réduction de la transduction énergétique.

(Aguedo *et al.*, 2003a) ont rapporté que l'accumulation de γ -décalactone (> 200 mg/L) fait dissiper le potentiel membranaire qui conduit à la perméabilisation de la membrane. Pourtant, cette molécule n'a aucun effet sur le pH intracellulaire, par opposition à l'acide octanoïque.

Comme montré dans les paragraphes précédents, l'accumulation des solutés a différents effets sur T_m de la membrane. Cette accumulation, causant des changements de géométrie et intervenant dans la courbure spontanée de monocouche lipidique, peut aussi entraîner une perméabilité membranaire. La perturbation causée par l'incorporation des acides gras insaturés (exemple : acide oléique), et pas par les acides gras saturés (exemple : acide stéarique), entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire mais sans altération des propriétés thermodynamiques de la membrane (Langner & Hui, 2000). Un tel effet est aussi observé pour différentes membranes suite à l'accumulation de solvants augmentant le désordre des lipides comme l'éthanol, des composés aromatiques, des antibiotiques... (Sikkema *et al.*, 1995). L'interaction entre les alcanols à très courte chaîne peut transformer la structure normale de la bicouche en phase interdigitée $L_{\beta}I$ (Figure 8). Dans cette agrégation, des chaînes acylées sont exposées à l'interface phospholipides – eau. Comme la partie polaire est très importante pour les propriétés de barrière de la membrane, une telle structure est prévue pour un entraînement d'une augmentation de perméabilité membranaire. Une forte augmentation de la perméabilité aux protons est observée à la concentration d'éthanol qui cause une conversion en phase interdigitée.

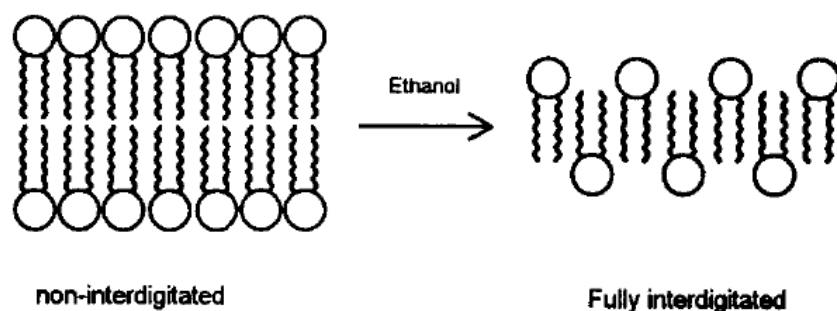


Figure 8 : Ethanol induit la conversion en phase interdigitée de membrane Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (Weber & de Bont, 1996b)

Fonctionnement des enzymes membranaires

La membrane, à côté d'être une barrière, est aussi la matrice de nombreuses enzymes importantes pour la cellule comprenant les enzymes intervenant dans le transport des solutés et les enzymes participant dans la chaîne de transport électronique. Il est connu depuis plusieurs années que les aspects intrinsèques d'une membrane biologique affecte fortement la fonction des protéines intégrées dans cette membrane. Des paramètres comme l'épaisseur membranaire, l'hydratation des têtes polaires des phospholipides, la fluidité, la composition des acides gras etc. régulent l'activité des enzymes membranaires. Tous ces paramètres sont affectés par les interactions entre les composés hydrophobes et la membrane, comme montré ci-dessus.

L'épaisseur de la membrane est augmentée par l'insertion des alcanes. L'activité des protéines transmembranaires est fortement affectée par le degré d'adéquation entre les lipides de la bicouche et l'épaisseur de la partie hydrophobe des protéines, et par conséquent, les composés hydrophobes affectent indirectement ces processus de transport. Yuan *et al.*, (2004) ont montré que l'épaisseur de la bicouche module la conductance du canal BK de membrane modèle 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE)/1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoserine (POPS).

Les études de (Aguedo *et al.*, 2003a) sur l'influence de la lactone sur la fonction membranaire ont aussi montré une chute dans l'activité H^+ -ATPases à concentration de 300 mg/l de γ -décalactone. L' H^+ -ATPase est une protéine située dans la membrane plasmique et qui contrôle le flux de proton dans la cellule de levure.

1.3.2. Adaptation au stress des microorganismes – rôle des lipides

Plusieurs études ont montré l'importance des modifications de composition lipidique de la membrane de divers microorganismes dans leur adaptation à des changements environnementaux comme la température, la pression, l'activité de l'eau, le pH, la pression

osmotique. La modulation des phospholipides anioniques a été observée dans l'adaptation à la salinité, celle du contenu de tréhalose sous condition de déshydratation, le changement du ratio de PC/PE pour acclimations à la température... D'ailleurs, les chaînes acyles et les molécules structurées de la bicouche comme les stérols sont les plus impliquées dans l'adaptations aux stress externes et au niveau des ajustements membranaires.

1.3.2.1. Changement physiologique des levures cultivées en présence de substrats hydrophobes

Il est connu que les levures cultivées en utilisant des substrats hydrophobes comme seule source de carbone possèdent une morphologie différente de quand elles sont cultivées sur glucose. L'apparition de protrusions de 100 à 200 nm à la surface cellulaire a été observée chez *C. tropicalis* et *C. albicans* ayant poussé sur alcanes par (Osumi *et al.*, 1975). Un tel effet a été aussi observé chez *Y. lipolytica* quand cultivée dans milieu de ricinoléate de méthyle (Aguedo, 2002) ou oléate de méthyle (Mlickova *et al.*, 2004). La formation d'une telle structure est expliquée par l'acclimatation de la cellule pour faire entrer des substrats hydrophobes dans la cellule démarrant les étapes d'assimilation de ces substrats (Osumi *et al.*, 1975).

La formation de « microbodies » a été rapportée chez des levures ayant poussé sur différentes sources de substrats hydrophobes : *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Torulopsis* quand cultivées sur méthanol (Fukui *et al.*, 1975a; Fukui *et al.*, 1975b), *Y. lipolytica* quand cultivée sur oléate de méthyle (Athenstaedt *et al.*, 2006; Mlickova *et al.*, 2004), *Sporidiobolus salmonicolor* quand cultivée sur ricinoléate ou oléate de méthyle (Feron *et al.*, 1997). L'étude de Feron *et al* (1997) montre qu'il y a une incorporation de ces substrats en parallèle avec l'apparition de ces « microbodies » : les cellules cultivées avec oléate de méthyle possèdent 41% d'acide oléique en plus dans leur composition en acides gras par rapport aux cellules cultivées sans oléate de méthyle ; quant aux cellules cultivées avec ricinoléate de méthyle, les cellules possèdent 51% d'acide ricinoléique quand les cellules cultivées sans ricinoléate n'en contiennent pas.

1.3.2.2. Les lipides protègent la cellule contre les stress environnementaux

Les lipides, surtout les acides gras et les stérols jouent un rôle très important dans la maintenance de l'état physiologique membranaire et cellulaire. Des bactéries aux levures, plusieurs études ont abordé les changements dans la composition lipidique de la cellule soumise aux stress. Pour les bactéries, l'adaptation s'appuie sur la régulation du ratio *cis*/

trans des acides gras insaturés dépendant de l'activité *cis/trans* isomérase codée par le gène *cti*. Ce mécanisme est rapporté pour les cellules de *Pseudomonas* soumises à différents stress comme la présence d'éthanol et de toluène (Heipieper & de Bont, 1994), de métaux lourds (Heipieper *et al.*, 1996). D'ailleurs, l'altération de la composition des acides gras insaturés comme réponse aux stress est aussi observée chez des bactéries comme les *Lactobacilles* (Guerzoni *et al.*, 2001), *Rhodococcus* (Tsitko *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Ingram, 1977) etc. ainsi que les levures comme *Candida*, *Rhodosporidium*, *Sacharomyces* etc. contre les chocs de salinité (Turk *et al.*, 2004), de température (Sakamoto & Murata, 2002; Suutari *et al.*, 1990), de cuivre (Howlett & Avery, 1997), de solvants (Weber & de Bont, 1996b).

Comme cité ci-dessus, l'accumulation de solvants (alcanols) ou de composés amphiphiles (lactones) dans la membrane change les propriétés physicochimiques de la bicouche qui peut conduire à de sévères effets sur la viabilité cellulaire. Par contre, des changements dans la composition des lipides peuvent compenser ces perturbations chez les microorganismes en maintenant l'ordre optimal des lipides membranaires, régulant l'homéoviscosité membranaire, réduisant la partition des solutés dans la membrane donc diminuant ses toxicités. Les changements dépendent de l'origine du facteur de stress et de l'effet que celui-ci a sur la cellule. Par exemple, l'adaptation aux solvants polaires se traduit par une augmentation des acides gras insaturés quand pour l'adaptation aux solvants non polaires, une augmentation des acides gras saturés est observée (Weber & de Bont, 1996b).

Il est rapporté que les ajustements dans les lipides membranaires semblent importants dans l'adaptation des levures à l'éthanol, le solvant le plus étudié dans la littérature. Des changements au niveau de la longueur de chaîne et de l'insaturation des acides gras des phospholipides ou une diminution spécifique d'un composant lipidique sont parmi les altérations les plus induites par l'éthanol. D'autre part, les stérols étant des composants majeurs de la membrane cellulaire qui participent à l'intégrité membranaire, ils sont aussi impliqués dans la tolérance à l'éthanol. La diminution de la concentration de stérols pendant la croissance en présence d'éthanol a été observée (Walker-Caprioglio *et al.*, 1990). Aguilera *et al.*, (2006) ont aussi montré que la souche *S. cerevisiae* var. *capensis* qui exprime la concentration d'ergostérol la plus élevée est en même temps la souche la plus tolérante à l'éthanol.

L'ajout d'acides gras, phospholipides, ou ergostérol dans le milieu de culture peut augmenter la résistance des levures à l'éthanol en ajustant des changements dans la composition lipidiques induits par celui-ci. L'ajout d'acide oléique et ergostérol dans la culture augmente la viabilité de *S. cerevisiae* au stress de 25% éthanol (Pina *et al.*, 2004)

Le rôle d'acides gras comme l'acide oléique dans la tolérance de levures au stress a été élucidé par You *et al.*, (2003) en utilisant des mutants de *S. cerevisiae* L8-14C dépourvus du gène *ole1* donc incapables de produire des acides gras insaturés. Les résultats montrent que l'acide oléique est l'acide gras insaturé le plus efficace pour surmonter la toxicité de l'éthanol. Les auteurs ont également montré que le transformant le plus résistant à l'éthanol, qui exprime la *TniNPVE* désaturase d'insectes, produit deux fois plus d'acide oléique en l'absence d'éthanol et est quatre fois plus résistant en réponse à l'exposition à 5% d'éthanol. Les auteurs proposent l'hypothèse que la tolérance des levures au stress éthanol est le résultat de l'incorporation d'acide oléique dans les lipides membranaires en compensant la diminution de la fluidité membranaire donc neutralisant l'effet fluidifiant de l'éthanol. Une augmentation de la concentration d'acide oléique est aussi observée dans la membrane chez la mouche *Sarcophaga crassipalpis* pendant un choc froid et chrysalide diapause (Michaud & Denlinger, 2006). Dans ce cas, l'acide oléique n'est pas seulement expliqué pour favoriser la fluidité membranaire à basse température mais aussi pour permettre à la membrane de maintenir son état liquide-cristallin si la température augmente.

Pendant leurs applications biotechnologiques, les levures sont soumises à plusieurs stress qui provoquent des perturbations parfois graves. La membrane est la première cible d'attaque des composés toxiques se trouvant dans le milieu de bioconversion comme par exemple la lactone. Les perturbations causées jouent souvent sur la structure des phospholipides qui ont tendance à fluidifier puis déstabiliser la membrane. L'altération des lipides est une des réponses des levures au stress. La présence de lipides dans le milieu semble contribuer à donner aux cellules une meilleure résistance aux stress. Les explications s'appuient toujours sur un mécanisme hypothétique d'interaction entre ces molécules et la membrane cellulaire.

1.4. La levure *Y. lipolytica* et ses applications

Les levures sont des micro-organismes connus depuis longtemps. A côté de *S. cerevisiae* qui a dominé le sujet et est devenue un synonyme de la levure, il y a beaucoup de différentes espèces, dites « non-conventionnelles », qui sont également intéressantes pour diverses raisons, allant de leurs utilisations spécifiques et applications technologiques à la menace des infections causées par certaines d'entre elles. En fait, certaines espèces ont déjà attiré des chercheurs dans les dernières années pour différents motifs : *Kluyveromyces lactis* pour sa capacité à utiliser du lactosérum résiduel dans les industries laitières, certaines levures méthylotrophes pour leur efficacité pour la production de protéines hétérologues ou pour leurs

qualités particulières pour l'étude de la biogenèse des peroxysomes, sans parler de *C. albicans* ou *Cryptococcus neoformans* en raison de leur intérêt dans certaines questions de santé.

Y. lipolytica est l'une des espèces de levures non-conventionnelles les plus intensivement étudiées. Cette levure est très différente des levures bien étudiées *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* quant à son évolution phylogénétique, la physiologie, la génétique et la biologie moléculaire (Barth & Gaillardin, 1997).

1.4.1. Origine

Y. lipolytica est une levure ascomycète de la famille des *Saccharomycetaceae* (sous famille de *Saccharomycetoideae*). Elle est régulièrement retrouvée poussant sur des substrats d'origine animale ou végétale dont les sources de carbone principales sont sous forme d'alcanes, de lipides ou de protéines. Elle doit d'ailleurs son nom aux premiers isollements qui avaient eu lieu sur des margarines. Cette levure peut être isolée à partir des produits alimentaires riches en lipides et protéines (Sinigaglia *et al.*, 1994) tels que les fromages (Roostita & Fleet, 1996; Suzzi *et al.*, 2001) ou les saucissons (Gardini *et al.*, 2001). *Y. lipolytica* est une espèce prédominante dans le camembert et les fromages bleu-veinés, où elle peut être trouvée à des concentrations supérieures à 10^6 - 10^7 UFC (Fickers *et al.*, 2005).

1.4.2. Caractéristiques physiologiques

Contrairement à *C. albicans* et *C. tropicalis*, *Y. lipolytica* n'est pas considérée comme pathogène. Elle est très sensible aux températures supérieures à 32-34°C (Holzschu *et al.*, 1979). Plusieurs souches de *Y. lipolytica* sont incapables de se développer à une température supérieure à 32°C et elles sont strictement aérobies. *Y. lipolytica* est reconnue comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par le FDA (« American Food and Drug Administration »). Ceci permet de l'utiliser dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques.

C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction de conditions de culture comme l'aération, les sources de carbone ou d'azote, le pH, *etc.* (Ota *et al.*, 1984; Zinjarde *et al.*, 1998).

Y. lipolytica est capable d'assimiler des sucres comme le glucose, le galactose ou le mannitol mais elle ne peut pas assimiler le saccharose du fait du manque d'activité invertase (Barth & Gaillardin, 1997). Par contre, cette levure est connue pour sa capacité d'utilisation des substrats hydrophobes tels que les alcanes (exemple : hexadécane, décane), les acides gras (exemple : acides palmitique, acide ricinoléique, acide laurique) et des triglycérides (trioléine,

tripalmitine). *Y. lipolytica* peut aussi utiliser l'acétate comme seule source de carbone (Barth & Gaillardin, 1997).

1.4.3. Applications industrielles et environnementales de *Y. lipolytica*

Grâce à ses propriétés spécifiques décrites au-dessus et des disponibilités des principaux outils du génie génétique dans la levure, *Y. lipolytica* a ainsi émergé comme modèle biologique et pour les applications biotechnologiques. Les acides organiques, les arômes, les enzymes (protéases, lipases, estérases et phosphatases), les protéines d'organisme unicellulaire « single cell proteins », et les huiles d'organisme unicellulaire « single cell oils » sont les principaux produits obtenus avec les souches *Y. lipolytica* soit sauvages soit génétiquement modifiées (Barth & Gaillardin, 1997; Beckerich *et al.*, 1998; Beopoulos *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2003; Wache *et al.*, 2003). Des applications dans le domaine environnemental sont aussi recherchées en utilisant *Y. lipolytica* (Bankar *et al.*, 2009).

1.4.3.1. Sécrétion des protéines

(Barth & Gaillardin, 1997; Beckerich *et al.*, 1998)

Y. lipolytica représente une alternative à *S. cerevisiae*, pour la production de protéines. Elle se distingue par sa capacité à sécréter de façon naturelle diverses protéines avec un rendement élevé, y compris des protéases, lipases, RNases, estérases, phosphatases et chacune dans des conditions spécifiques.

Suivant le pH du milieu de culture, elle sécrète deux protéases (Barth & Gaillardin, 1997). La protéase alcaline (AEP) est codée par le gène *XPR2*. Celui-ci est induit en présence de peptone et à partir de pH 6, *Y. lipolytica* peut en sécréter une grande quantité de l'ordre de 1-2 g/L. La protéase acide (AXP) est produite lorsque le pH du milieu de culture est inférieur à 4,5. Cette protéase est sécrétée sous trois formes qui diffèrent dans leur glycosylation et par la quantité de glycane.

Les lipases et triacylglycérols hydrolases constituent un important groupe d'enzymes biotechnologiques ayant de vastes applications dans les aliments, les produits laitiers, les détergents et l'industrie pharmaceutique. Les lipases synthétisées par *Y. lipolytica* possèdent une activité préférentiellement sur les résidus oléiques en positions 1 et 3 de glycérides. Leurs caractéristiques ont été examinées par différents auteurs et dépendant de différentes souches au point de vue de la sensibilité au glucose, la stabilisation par l'acide oléique, le pH optimal etc. (Beckerich *et al.*, 1998). Les lipases sécrétées par *Y. lipolytica* soit extracellulaires, soit ancrées à la cellule, peuvent être intéressantes pour la synthèse d'acide 2,4-

diméthylglutarique monoesters, transesterification de méso-cyclopentane diols ou pour l'utilisations dans l'industrie du cuir ou dans la production de fromages (Barth & Gaillardin, 1997).

A côté des enzymes naturellement produites, *Y. lipolytica* est maintenant utilisée comme un modèle efficace pour la production de protéines hétérologues. Environ 42 protéines sont produites en utilisant cette levure à partir de protéines de virus, de champignons, de bactéries, d'animaux ou d'humain.

1.4.3.2. Production d'acides organiques

(d'après Finogenova *et al.*, 2005)

La production des acides carboxyliques par des microorganismes permet d'obtenir un ratio élevé parmi les processus biotechnologiques. La quantité d'acide citrique produit chaque année s'élève à 8000 tonnes et la production est toujours en augmentation avec un taux de 5% par an. La capacité de synthèse d'acide organique par la levure a été découverte d'une façon inattendue, dans les années 60, à partir de l'utilisation des hydrocarbures comme matières premières.

Y. lipolytica est capable de synthétiser plusieurs acides organiques : l'acide α -céto glutarique, l'acide pyruvique, l'acide citrique et l'acide isocitrique. Ces acides peuvent être synthétisés par la levure à partir de différentes sources de carbone comme le glucose, les alcanes, le glycérol, l'éthanol ect.

Tableau 6: Exemples de protéines hétérologues exprimées/ sécrétées par *Y. lipolytica*

Origine	Protéines	Références
Virus	Hépatitis B antigène (30 kDa)	(Hamsa & Chattoo, 1994)
	Bactériophage P1 Cre recombinase (41 kDa)	(Richard <i>et al.</i> , 2001)
Eubactérie	<i>E. coli</i> β -galactosidase (116 kDa)	(Gaillardin & Ribet, 1987; Madzak <i>et al.</i> , 2000)
	<i>E. coli</i> Tn5 phléomycine résistance gène	(Gaillardin & Ribet, 1987)
	<i>E. coli</i> β -glucosidase (68 kDa)	(Bauer <i>et al.</i> , 1993)
Champignons	<i>S. cerevisiae</i> invertase (85 kDa)	(Nicaud <i>et al.</i> , 1989)
	<i>A. aculeatus</i> galactanase I (44 kDa)	(Müller <i>et al.</i> , 1998)
	<i>A. aculeatus</i> polygalacturonase I	(Müller <i>et al.</i> , 1998)
	<i>H. insolens</i> xylanase I	(Müller <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase I	(Müller <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Aspergillus oryzae</i> leucine aminopeptidase (90 kDa)	(Nicaud <i>et al.</i> , 2002)
Plantes	<i>Oryza sativa</i> amylase (45 kDa)	(Park <i>et al.</i> , 1997)
Mammifères	Prochymosin du boeuf (40 kDa)	(Madzak <i>et al.</i> , 2000; Nicaud <i>et al.</i> , 1991)
	Porcine γ -interferon	(Nicaud <i>et al.</i> , 1991)
Humain	Facteur de coagulation du sang XIIIa (80 kDa)	(Tharaud <i>et al.</i> , 1992)
	Facteur de croissance de cellules épidermes (6 kDa)	(Hamsa <i>et al.</i> , 1998)

Y. lipolytica peut sécréter dans le milieu une grande quantité d'acides α -cétoglutarique jusqu'à 108.7 g/L. Cette production est thiamine-dépendante en particulier quand la culture a lieu sur glucose. Dans un milieu mélangé de glucose et glycérol, et en l'absence de thiamine, *Y. lipolytica* sécrète de l'acide pyruvique. Le ratio d'acide pyruvique synthétisé est de 75-80% par rapport à l'acide α -cétoglutarique (20-25%). Une culture de *Y. lipolytica* peut donner une concentration d'acide pyruvique de l'ordre de 50 g/L. L'acide

citrique est un acide prédominant quand la levure est cultivée sur milieu glucose par rapport à l'acide isocitrique. Ce rapport peut être régulé en ajoutant d'alcane par exemple hexadécane dans le milieu. Des possibilités de production d'acide organique par cette levure sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 7: Exemple d'acides organiques produites par *Y. lipolytica* (adapté de (Finogenova *et al.*, 2005))

Acides	Substrats	Productrices	Rendement	
			g/L	% substrat
α -cétooglutarique	Pétrole	Sauvage	109	120
	Ethanol	Mutant	50	50
Pyruvique	Glucose	Sauvage	50	50
	Glycérol	Sauvage	61	71
Citrique et isocitrique	Pétrole	Sauvage	102	142
Isocitrique	Pétrole	Sauvage	60	60
	Ethanol	Mutant	66	66
Citrique	Pétrole	Mutant	217	145
	Ethanol	Mutant	120	88

1.4.3.3. Production d'arômes

L'utilisation de *Y. lipolytica* permet également de produire des arômes tels que la γ -décalactone, les arômes de note verte comme l'hexanal.

Depuis sa première mention en 1983 dans un brevet décrivant la biotransformation d'huile de ricin en γ -décalactone (Farbood & Willis, 1983), *Y. lipolytica* n'a depuis lors cessé de faire régulièrement l'objet de brevets portant sur la production de lactones (Rabenhorst & Gatfield, 2000; Rabenhorst & Gatfield, 2001) et elle est aujourd'hui l'une des levures les plus utilisées dans ce type de procédés. Les voies métaboliques aboutissant à la synthèse de lactone sont étudiées chez ce microorganisme depuis quelques années et *Y. lipolytica* constitue de ce fait un très bon modèle pour mener des études fondamentales portant sur les mécanismes liés à la biotransformation. Les travaux de Pagot (1997) sont un exemple d'études de ce type : ils ont notamment permis d'aboutir à la sélection d'une souche auxotrophe (*Y. lipolytica* Po1D) qui, placée dans un fermenteur contenant un milieu de biotransformation en présence de

concentrations faibles en uracile (base aminée correspondant à l'auxotrophie) est capable de produire 9,5 g.L⁻¹ de γ -décalactone après 75 heures (Nicaud *et al.*, 1996).

1.4.3.4. Production d'huiles d'organisme unicellulaire

Les huiles d'organisme unicellulaire ou Single cell oils (SCO) est un terme qui décrit des composés lipophile synthétisés par les microorganismes possèdent un de l'intérêt potentiel industriel parmi lesquelles les acides gras polyunsaturés (PUFA) par exemple de l'acide arachidonique (ARA) et les acides docosahexaénoic (DHA) sont aujourd'hui commercialisés et largement utilisés comme compléments alimentaires dans les préparations pour nourrissons.

Parmi le petit nombre des microorganismes qui sont capables d'accumuler les lipides (Tableau 8), *Y. lipolytica* est une candidate qui peut transformer 45-57% de substrats en ses lipides dont 60% en masse sèche avec une composition assez similaire avec celle du substrat (Bati *et al.*, 1984). Plusieurs substrats peuvent être utilisés comme des huiles végétales, des acides gras, des huiles brutes, les savons, des hydrocarbure ou des graisses animales. Cette accumulation lipidique chez *Y. lipolytica* est fortement influencée par les conditions de culture comme le pH et la température. *Y. lipolytica* cultivée sur des gras animaux peut produire 0,44-0,54 g lipide/ g biomasse sèche à pH 6.0 et à une température de ordre de 28-33°C (Papanikolaou *et al.*, 2002). Une souche de *Y. lipolytica* génétiquement modifiée a aussi été rapportée comme ayant la capacité de produire de l'acide arachidonique avec une concentration élevée de 10% dans la fraction d'huile totale (Damude *et al.*, 2004).

Tableau 8: Pourcentage des lipides et acides gras produits par des levures les plus efficaces (d'après (Ratlledge & Zvi, 2008))

Levure	Contenu maximal en lipides (% masse/ masse)	Les acides gras principaux (% masse/ masse)			
		16 :0	18 :0	18 :1	18 :2
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58-60	32	15	44	8
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63-65	34	5	51	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66	18	3	66	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	3	47	8
<i>Waltomyces lipoter</i>	64	37	7	48	3

1.4.3.5. Les applications environnementales

Connue pour sa capacité d'utilisation des substrats hydrophobes, *Y. lipolytica* est utilisée dans la bioremédiation de pollutions pétrolières ou huileuses dans la terre, des environnements aquatiques et dans les traitements ou valorisation des déchets industriels. Cette levure est aussi rapportée comme une souche tolérante des métaux lourds (cuivre, nickel, zinc) et capable de les détoxifier (Tableau 12).

Tableau 9: Applications de *Y. lipolytica* dans les traitements et la valorisation de déchets (d'après Bankar *et al.*, 2009)

Souches de <i>Y. lipolytica</i>	Déchet	Autres produits/ applications
ATCC 20255	Eau usée dans la fabrication d'huile olive	Lipases, protéines d'organisme unicellulaire
W29	Eau usée dans la fabrication d'huile olive	Lipases
NCIM 3589	Effluent dans la fabrication d'huile de palm	
CECT 1240	Noix trituré	Lipases
ACA-DC 50109	Eau usée dans la fabrication d'huile olive	Acide citrique
NCIM 3589	Déchets de fabrication d'ananas	Acide citrique
UCP 0988	Déchets de raffinage d'huile végétale	Emulsifiants
	Déchets de raffinage d'huile de soja	Emulsifiants

1.4.3.6. Autres applications

Les bioconversions utilisant les microorganismes sont devenues populaires grâce à leur énantiosélectivité et stéréospécificité. *Y. lipolytica* est ainsi utilisée dans différents processus de biotransformation par exemple pour produire l'acide L-béta-hydroxy butyrique, utilisé dans l'industrie pharmaceutique, à partir d'acide butyrique ; la 3,4-dihydroxyphénylalanine ou L-Dopa, utilisée comme traitement de la maladie Parkinson, à partir de L-tyrosine. La levure est aussi étudiée pour transformer le mélange racémique de halohydrins en S-forme (Bankar *et al.*, 2009).

La levure *Y. lipolytica* est aussi utilisée dans les différents genres d'aliments, en soulignant l'importance de cette levure dans l'industrie agro-alimentaire. La participation et l'influence de *Y. lipolytica* sur la formation de pigments bruns à partir de tyrosine pouvant être

à l'origine d'un défaut de couleur pendant la production du fromage portugais ont été récemment étudiées (Carreira *et al.*, 2001; Carreira *et al.*, 2002). Il est actuellement reconnu que cette levure participe à la maturation, accélère l'affinage et améliore la qualité des fromages.

En conclusion, la levure *Y. lipolytica* avec toutes ses caractéristiques particulières, notamment sa capacité à métaboliser des lipides, présente un modèle parfait pour les études sur la résistance au stress dans les milieux lipidiques.

1.5. Conclusion de la partie bibliographique et problématique

L'évolution de l'industrie qui libère des tonnes de déchets gras chaque année nous donne une nouvelle source de matière première pour les processus utilisant des microorganismes. La biotechnologie des lipides émerge comme un nouveau domaine où les microorganismes sont utilisés pour transformer des lipides et des composés liposolubles. Parmi ces microorganismes, la levure *Y. lipolytica* est capable d'utiliser ces substrats hydrophobes comme seule source de carbone pour la croissance et pour la production d'arômes d'intérêt industriel (Wache *et al.*, 2003; Waché *et al.*, 2006). Par contre, les composés hydrophobes peuvent causer des perturbations sur la cellule comme un changement de la structure membranaire, la perméabilisation de la membrane, l'altération du fonctionnement des enzymes membranaires (Sikkema *et al.*, 1994; Weber & de Bont, 1996a). L'amplitude des perturbations dépend des propriétés du composé dont l'hydrophobicité, la longueur de chaîne acyle, la conformation de la tête polaire... (Weber & de Bont, 1996b).

Les membranes des microorganismes sont souvent les premières touchées lors d'un stress physicochimique (antibiotique, peptide antimicrobien, désinfectant...) (Sikkema *et al.*, 1995). Les composés amphiphiles comme les lactones sont toxiques pour la levure *Y. lipolytica* car elles ont tendance à se placer au niveau des membranes provoquant une augmentation de leur fluidité et une baisse de leur intégrité (Aguedo *et al.*, 2002a; Aguedo *et al.*, 2003b). Les lactones sont aussi des arômes d'intérêt dans l'industrie alimentaire qui peuvent être produites par bioconversion en utilisant des microorganismes (Dufossé *et al.*, 1994).

Au fil de cette étude bibliographique, le rôle des lipides comme source de carbone dans la résistance microbienne au stress émerge comme un point intéressant à étudier. la culture des cellules de levure en présence de substrats hydrophobes conduit à des changements physiologiques comme l'apparition de protrusions (Osumi *et al.*, 1975), la formation de « microbodies » (Athenstaedt *et al.*, 2006; Fukui *et al.*, 1975a; Mlickova *et al.*,

2004), le changement de la composition de lipides cellulaires (Feron *et al.*, 1997). L'ajout de lipides comme l'acide oléique ou l'ergostérol augmente la résistance cellulaire aux stress environnementaux comme le stress causé par l'éthanol (Michaud & Denlinger, 2006; Pina *et al.*, 2004).

Dans le cadre de ce travail, nous avons essayé à d'élucider le rôle de la source carbone : glucose (milieu YPD) et lipide (milieu YNBO et YPO) sur la résistance de la levure modèle *Y. lipolytica* au stress de la γ -dodécalactone. Nous avons aussi étudié le rôle de lipides comme l'ergostérol et les esters de stéryle dans la réponse cellulaire au choc lactone. Cela peut être intéressant pour la recherche de base ou aussi pour maîtriser les processus de production d'arômes ou d'autres composés d'intérêt.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Souches de levure, milieux et conditions de stress

2.1.1. Les souches de levure utilisées dans cette étude

Les souches utilisées dans cette étude sont présentées dans Tableau 10

Tableau 10 : Les souches utilisées dans cette étude

Souches	Caractères	Références
<i>Yarrowia lipolytica</i>		
W29	Sauvage	
MTLY37	$\Delta pox2 \Delta pox3 \Delta pox5 \Delta pox4 :: URA3$	(Wang <i>et al.</i> , 1999b)
MTLY36-2p	$\Delta pox2 \Delta pox3 \Delta pox5 pox2 - URA3$	(Wang <i>et al.</i> , 1999b)
MTLY40-2p	$\Delta pox2 \Delta pox3 \Delta pox5 \Delta pox4 POX2 - URA3$	(Wang <i>et al.</i> , 1999b)
<i>Candida guilliermondii</i> 591N	Sauvage	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Sauvage	
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> CBS2636	Sauvage	(Feron <i>et al.</i> , 1997)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180	Sauvage	

Les souches sont conservées dans l'azote liquide. Après décongélation, une activation est réalisée durant 48 heures à 27°C en boîte de pétri sur un milieu gélosé YPDA (Tableau 11). Ces boîtes sont ensuite conservées à 4°C et serviront à l'ensemencement des milieux de culture.

2.1.2. Conditions de croissance

Les cellules sont cultivées dans 2 types de milieu de croissance selon la source de carbone fournie (Tableau 11), puis sont subies soit un stress thermique soit un stress chimique pour étudier l'effet du milieu de croissance sur la résistance cellulaire.

2.1.3. Conditions de stress

Les cellules sont récoltées au milieu de la phase exponentielle puis subies soit un stress thermique soit un stress chimique.

2.1.3.1. Rampe thermique

Les cellules en suspension dont l'absorbance à 600nm égale à 0,7 ont été utilisées pour ce traitement. La rampe est réalisée entre 27°C et 50°C avec une vitesse de 2°C/ min, puis maintenues à la 50°C. La fluidité et l'état physiologique cellulaire sont étudiés en fonction du temps maintenu à 50°C après la rampe.

Tableau 11 : Compositions des milieux utilisés dans cette étude (g/L)

Composants	Milieu glucose YPD	Milieux lipidiques		Milieux gélosés	
		YPO	YNBO	YPDA	YNBDA
Glucose	20	-	-	20	20
Oléate de méthyle	-	5	5	-	-
Extrait de levure	10	10	-	10	-
Peptone pepsique de viande	20	20	-	20	-
Yeast Nitrogen Base	-	-	6.7	-	6.7
Tween80	-	0.2	0.2	-	-
Agar-agar	-	-	-	15 - 20	15 – 20

2.1.3.2. Choc chimique

La γ -dodécalactone est utilisée comme agent de stress chimique tout au long de ces études. Une gamme de concentration en lactone de 0 à 6 g/L est appliquée et les prélèvements sont effectués au long du temps de contact avec cet agent pour étudier la résistance de la cellule contre ce choc chimique en fonction du milieu de croissance.

2.2. Estimation de la viabilité cellulaire

2.2.1. Coloration au bleu de méthylène

La population de cellules viables d'après le marquage au Bleu de méthylène (BM) est déterminée par comptage sur cellule de Malassez. Pour la coloration, 500 μ L de milieu contenant les levures lavées sont ajoutés à 500 μ L de solution de bleu de méthylène, le tout est agité par vortex et laissé reposer pendant 5 min. Un dénombrement des cellules considérées mortes (apparaissant en bleu, ne dégradant pas le colorant) est réalisé sur une population totale minimale de 30 cellules.

2.2.2. UFC sur milieu gélosé

Le milieu YPDA est utilisé pour cette estimation. Les suspensions cellulaires sont diluées successivement en décimal dont 10 μ L sont posées sur boîtes. Les calculs sont faits après 48h incubées à 27°C selon la formule suivante :

$\log = \log (N/N_0)$ dont N_0 est le nombre des colonies formées issue de la solution témoins et N est le nombre des colonies formées après le choc. Plus que $\log$ est négatif, plus que le choc est efficace.

2.3. Dosage des composés d'arôme

2.3.1. Extraction liquide-liquide

La γ -dodécalactone est extraite du milieu de biotransformation par l'éther diéthylique (pureté 99,8%, Prolabo, Vaulx-en-Velin). La γ -undécalactone (pureté 99%, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier) a été utilisée comme étalon interne de l'extraction et du dosage chromatographique. Nous avons optimisé l'extraction : 2 mL d'éther diéthylique sont ajoutés à 2 mL de milieu dans un vial en verre de 4 mL qui est retourné ensuite une dizaine fois de suite. Après 30 min de repos, la phase supérieure est prélevée et peut être injectée directement dans le chromatographe.

2.3.2. Quantification par chromatographie en phase gazeuse

L'appareil est un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard HP 6890 series (Agilent Technologies, Montluçon), équipé d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur à ionisation de flamme. Il comporte une colonne capillaire HP-Innowax (longueur 30 m, diamètre 320 μm , épaisseur du film 0,25 μm) (Agilent Technologies), dont la phase stationnaire est composée de polyéthylène glycol.

Le gaz vecteur est de l'azote U , son débit est de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les extraits sont injectés automatiquement à l'aide d'un passeur d'échantillons (HP-Injector modèle G1513A). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250°C et 300°C. La température du four est programmée de 60°C à 145°C à raison de 5°C par minute puis de 2°C par minute jusqu'à 180°C. Les données sont analysées grâce au logiciel d'acquisition et d'intégration HP-Chemstation (Agilent Technologies).

2.4. Analyses des stérols

Les stérols dans la cellule existent sous 2 formes soit libres dont dans la membrane plasmique, soit estérifiés (forme réserve) qui sont de principaux composés des corps lipidiques.

Nous avons estimé l'évolution des stérols en fonction du stress remis aux cellules. Les stérols sont extraits en utilisant n-heptane puis quantifiés par HPLC et spectrométrie. Les stérols libres sont extraits selon (Shobayashi *et al.*, 2005). Les stérols totaux sont extraits

selon (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Détails de démarches expérimentales sont décrites dans la *publication 2* (page 99).

2.5. Les techniques fluorescentes utilisées dans cette étude

Emission de lumière comprend soit incandescence dont le cas des corps chauds qui émet la lumière à cause de leur température, soit luminescence qui correspond aux restes. Un système émettant luminescence perd de l'énergie pour laquelle, une certaine forme d'énergie doit être appliquée d'ailleurs et la plupart des types de luminescence sont classés en fonction de la source de cette énergie : électroluminescence, radioluminescence, chemiluminescence, bioluminescence et photoluminescence. La fluorescence est un type de luminescence dans lesquels la lumière est émise à partir de molécules pour la période de temps très court ($\leq 10^{-8}$ s), suite à l'absorption de la lumière. Les composés émettant fluorescence sont appelés fluorophores ou fluochromes. Quand un fluorophore absorbe de l'énergie, la molécule est rehaussée au état excité à la suite du transfert d'électrons à une orbite plus haute énergie. Cet excès d'énergie est dissipé lors du retour des électrons à l'état original en libérant un quanta de la lumière. Le temps d'absorption est immédiate, de l'ordre de 10^{-15} s tandis que la durée de vie de fluorescence est environ 10^{-8} s.

2.5.1. Détermination de la fluidité membranaire

La méthode consiste en l'introduction *in vivo* d'une sonde fluorescente (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène = DPH) ou ses dérivés 1 - (4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-triène (TMA-DPH), qui a un groupe aminé chargé positivement et qui est ancré à la surface de la membrane en contact avec l'eau dans les membranes biologiques : le signal d'émission polarisé de cette sonde varie en fonction de son mouvement dans un environnement lipidique, donc de la fluidité du milieu. La technique est détaillée dans la *publication 1* (page 67).

2.5.2. Microscopie fluorescente et marquage des cellules

La microscopie en fluorescence est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie.

Dans cette étude, de différentes sondes fluorescentes sont utilisées servant à l'observation de la morphologie cellulaire et à l'évaluation de l'état physiologique des levures d'après visualisation en microscopie spectrale à fluorescence ou confocale.

2.5.2.1. Coloration des lipides au Rouge Nil

Le Rouge Nil (RN) (phenoxazone 9) (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier) est un composé fluorescent lorsqu'il se trouve dans un environnement apolaire : sa structure ainsi que ses spectres d'absorbance et d'émission sont présentés sur la Figure 9.

2.5.2.2. Marquage de paroi cellulaire au Calcofluor

Le Calcofluor White Stain (Fluka) est un fluorochrome non spécifique qui se lie à la cellulose et la chitine dans la paroi cellulaire des levures et des autres organismes. La coloration avec Calcofluor est rapide. Quand la longueur d'onde d'excitation est autour de 355 nm, une gamme de 300 à 440 nm (émission maximum à 433 nm) peut être prise pour la longueur d'onde d'émission.

2.5.2.3. Marquage de l'état énergétique de la membrane cellulaire au Bis-Oxonol

Le marqueur d'énergie membranaire Box (bis-oxonol ou diethylthiobarbituric acid trimethine oxonol (DiSBAC2(3))) est excité à la longueur d'onde de 540 nm et l'émission se fait à 580 nm. Ce marqueur hydrophobe possédant une charge négative délocalisée a une affinité pour les zones hydrophobes des cellules mais il ne peut passer une membrane qu'à condition que le potentiel membranaire soit très faible ou nul. La cellule marquée est alors considérée comme inactive (Cao-Hoang *et al.*, 2008a).

2.5.2.4. Marquage de l'intégrité membranaire avec Iodure de Propidium

Le marqueur d'intégrité membranaire Iodure de propidium (IP) a une longueur d'onde maximale d'excitation à 535 nm et d'émission à 617 nm. Il est utilisé pour la méthode d'exclusion de colorant : ce fluorochrome chargé possède une affinité pour l'ADN mais il ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes plasmiques ont perdu leur intégrité. La perte d'intégrité membranaire peut souvent être synonyme d'une perte de viabilité (Cao-Hoang *et al.*, 2008a).

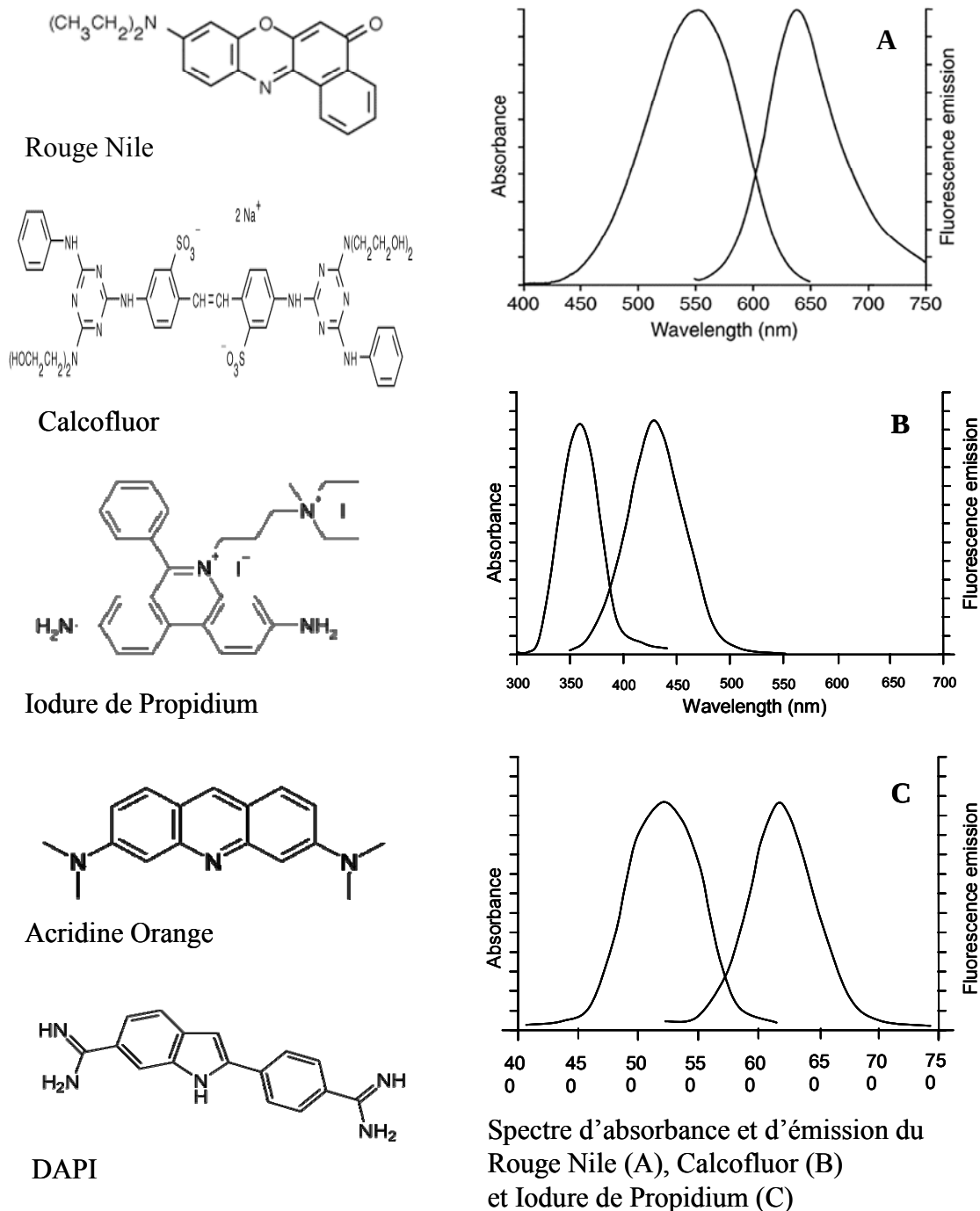


Figure 9: Structure et spectre de quelques sondes fluorescentes

2.5.2.5. Marquage d'ADN au Acridine Orange et au DAPI

Acridine orange (AO) est un acide nucléique fluorescent colorant sélectif de type cationique utile pour la détermination du cycle cellulaire. Il est cell-perméable et peut interagir avec l'ADN et l'ARN par insertion ou d'attractions électrostatiques respectivement. Lorsqu'elle est liée à l'ADN, il exhibe un spectre très semblable à la fluorescéine, avec un

maximum d'excitation à 502 nm et un maximum d'émission à 525 nm (vert). Quand il s'associe avec l'ARN, excitation maximale change pour 460 nm (bleu) et émission maximale est à 650 nm (rouge).

DAPI ou 4',6-diamidino-2-phénylindole est un fluorophore qui se lie fortement à l'ADN. Comme DAPI passe facilement à travers une membrane cellulaire intacte, elle est utilisée pour colorer les cellules vivantes et fixées. DAPI est excité par la lumière ultraviolette. Lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin, son maximum d'absorption est à 358 nm, et son maximum d'émission est à 461 nm.

2.5.2.6. Coloration et observation des levures en microscopie multispectrale et confocale

Les protocoles de colorations sont décrit en détail dans la *publication lactone* pour coloration aux IP et BOX ; dans la *publication 3* (page 126) pour coloration aux AO et DAPI ; dans la *publications 2* (page 99) pour colorations au RN.

Les cellules marquées sont observées sous microscopie confocale à fluorescence.

La microscopie confocale à balayage laser (Nikon, Japon) permet de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan focal. Toutes les observations sont réalisées à l'objectif de 100x (ouverture 1). Les images fluorescentes et les images en lumière transmises ont été enregistrées et traitées par le logiciel EZ.

3. Résultats

Cette partie présente les résultats de l'étude.

Dans la première partie de résultats, nous avons étudié l'effet de l'oléate de méthyle sur la résistance de *Y. lipolytica* à un choc de γ -dodécalactone et comparé avec différentes levures : *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus salmonicolor* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude de l'influence de la source de carbone sur la réponse cellulaire au choc lactone des cellules est approfondie ensuite chez la levure *Y. lipolytica*. Le travail s'intéresse en particulier dans cette première partie à des aspects comme la fluidité, l'intégrité membranaire, la viabilité cellulaire et la concentration d'ergostérol cellulaire.

3.1. Effet de la lactone sur la membrane cellulaire et rôle de la source de carbone dans la réponse des cellules à ce stress.

Publication 1: New insights into the effect of medium chain length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium.

Appl Microbiol Biotechnol accepté DOI: 10.1007/s00253-010-2560-0

Thi Minh Ngoc Ta, Lan Cao-Hoang, Hanh Phan-Thi, Hai Dang Tran, Nadhvirata Souffou, Joseph Gresti, Pierre-André Marechal, Jean-François Cavin, Yves Waché

Titre :

Nouvelles données sur l'effet de lactones à chaîne moyenne sur la membrane de levure. Importance du milieu de culture.

Résumé :

Dans la biotechnologie des lipides, les métabolites à chaîne moyenne perturbent souvent l'activité cellulaire. Ces effets sont normalement étudiés dans des conditions modèles avec une croissance sur glucose. Ici, nous avons étudié l'influence que les lipides peuvent avoir sur la résistance de *Y. lipolytica* à un tel composé : les cellules sont cultivées sur YPD (glucose), YPO (où le glucose est remplacé par l'oléate de méthyle) et YNBO (milieu minimum d'oléate de méthyle) puis soumises à la γ -dodécalactone. Après 60 min d'exposition à 3 g/L de lactone, environ 80% des cellules YPD perdent leur cultivabilité, 38% perdent leur intégrité membranaire (marquage avec Iodure de Propidium) et 31% perdent leur capacité de réduction de bleu de méthylène. Quant aux cellules ayant poussé sur oléate de méthyle, l'incubation avec la lactone jusqu'à 6 g/L n'a pas d'effet sur la cultivabilité cellulaire malgré une perte de l'intégrité membranaire qui a lieu dès 3 g/L de lactone. Les mesures d'anisotropie obtenues avec les sondes DPH et TMA-DPH montrent que les cellules ayant poussé sur oléate de méthyle possèdent une membrane plus fluide et moins sensible à la fluidification par la lactone par rapport aux cellules ayant poussé sur glucose. Une concentration en stérol plus importante est observée chez les cellules ayant poussé sur oléate de méthyle. L'ajout de la lactone cause une déplétion de stérol chez les cellules YPD et YNBO comme observé avec méthyl- β -cyclo-dextrine et entraîne une fluidification importante de la membrane. Une déplétion ou incorporation d'ergostérol peut augmenter ou diminuer, respectivement, la sensibilité de la cellule au choc lactone. Cette étude montre que

l'incorporation d'oléate, en même temps qu'une concentration importante de stérol jouent un rôle dans la résistance de la cellule YPO contre le choc lactone. Une induction similaire par l'oléate de la résistance des cellules au choc lactone est aussi observée chez les levures pouvant pousser sur oléate comme seule source de carbone comme *Rhodotorula* et *Candida*. Dans le cas des levures qui ne peuvent pas pousser dans ces conditions comme *Sporidiobolus* et *Saccharomyces*, l'induction par l'oléate rend les cellules plus sensibles au choc lactone.

Mots clé : membrane, fluidité, ergostérol, *Yarrowia lipolytica*, lactone, métabolisme de lipides

New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium

Thi Minh Ngoc Ta · Lan Cao-Hoang · Hanh Phan-Thi · Hai Dang Tran ·
Nadhuirata Souffou · Joseph Gresti · Pierre-André Marechal · Jean-François Cavin ·
Yves Waché

Received: 1 March 2010 / Revised: 9 March 2010 / Accepted: 12 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In hydrophobic compounds biotechnology, medium-chain-length metabolites often perturb cell activity. Their effect is usually studied in model conditions of growth in glucose media. Here, we study whether culture on lipids has an impact on the resistance of *Yarrowia lipolytica* to such compounds: Cells were cultured on glucose or oleate and submitted to γ -dodecalactone. After a 60-min exposure to 3 g L^{-1} , about 80% of the glucose-grown cells (yeast extract peptone dextrose (YPD) cells) had lost their cultivability, 38% their membrane integrity, and 31% their reducing capacity as shown with propidium iodide and methylene blue, respectively. For oleate-grown cells, treatment at 6 g L^{-1} did not alter cultivability despite some transient loss of membrane integrity from 3 g L^{-1} . It was shown with diphenylhexatriene and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene that oleate-grown cells had membranes more fluid and less sensitive

to the lactone-induced fluidization. Analyses revealed also higher contents of ergosterol but, for YPD- and minimum-oleate-grown cells (YNBO cells), the addition of lactone provoked a decrease in the concentration of ergosterol in a way similar to the depletion by methyl- β -cyclodextrin and an important membrane fluidization. Ergosterol depletion or incorporation increased or decreased, respectively, cell sensitivity to lactone. This study shows that the embedment of oleate moieties into membranes as well as higher concentrations of sterol play a role in the higher resistance to lactone of oleate-grown cells (YPO cells). Similar oleate-induced increase in resistance was also observed for *Rhodotorula* and *Candida* strains able to grow on oleate as the sole carbon source whereas *Saccharomyces* and *Sporidiobolus* cells were more sensitive after induction.

Keywords Membrane · Fluidity · Ergosterol · *Yarrowia lipolytica* · Stress · Lipid metabolism · Lactone

Ta and Cao-Hoang contributed equally to this work.

T. M. N. Ta · L. Cao-Hoang · H. Phan-Thi · H. D. Tran ·
N. Souffou · P.-A. Marechal · J.-F. Cavin · Y. Waché (✉)
Laboratoire GPMA, IFR92,
AgroSup Dijon & Université de Bourgogne,
1, esplanade Erasme,
21000 Dijon, France
e-mail: ywache@u-bourgogne.fr

L. Cao-Hoang
Laboratory of Post-harvest Technology, School of Biological
and Food Technology, Hanoi University of Technology,
1 Dai Co Viet Road,
Hanoi, Vietnam

J. Gresti
Centre de Recherche INSERM 866 Lipides, Nutrition,
Cancer, Equipe Physiopathologie des Dyslipidémies,
Université de Bourgogne,
Dijon, France

Introduction

Many microorganisms are able to metabolize lipids and other hydrophobic compounds and to use them for growth. In yeast, hydrophobic substrate degradation is widely used in biotechnology for soil bioremediation, oil-waste depollution, food fermentation, and production of compounds of interest (Aguedo et al. 2004; Fickers et al. 2005; Middelhoven 1993; Veen and Lang 2005; Waché et al. 2006). In these processes, cells are in the presence of high concentration of hydrophobic or amphiphilic compounds. These compounds are known to partition into membranes of microorganisms, interfering with the bilayer structure, modifying its fluidity, and causing thereby a membrane integrity and energetic perturbation (Aguedo et al. 2002, 2003a, b; Lanciotti et al.

Published online: 27 April 2010

 Springer

2004; Sikkema et al. 1994; Weber and de Bont 1996). For this reason, lipids, alkanes, and other hydrophobic compounds are a source of stress for microbial cells. However, investigation of the effect of these toxic compounds on cells deals usually with cells grown on hydrophilic substrates. The effect of the growth phase, pH, etc. on the physical and biochemical properties has often been considered (Cao-Hoang et al. 2008; Drici-Cachon et al. 1996; Heipieper and de Bont 1994) but not that of growth in the presence of hydrophobic substrates. Contrary to medium-chain-length and antifungal fatty acids, aroma compounds, detergents, and antibiotics that exhibit toxic effects (Avis and Belanger 2001; Lanciotti et al. 2004; Mukhopadhyay et al. 2002), C18 acyl-esters that are used as growth substrate by cells intercalate usually between membrane phospholipids without breaking the general bilayer structure and exhibit thus a low perturbation on membranes (Aguedo et al. 2003a, b). However, the adaptation of microbial membranes is an important point. Some papers have for instance investigated the adaptation of microorganisms to aromatic or amphiphilic compounds, highlighting the essential role played by sterols especially in the resistance mechanism of fungi to extracellular stress (Robichon and Dugail 2007) and to toxic compounds (Avis and Belanger 2001; Mukhopadhyay et al. 2002; Thati et al. 2007; Zweytick et al. 2000). Ergosterol in yeast is able to satisfy a variety of functions and particularly has a role in the resistance of cells to divalent cations and to a number of drugs such as cycloheximide, fluconazole, sodium dodecyl sulfate, etc. (Abe and Hiraki 2009; Abe et al. 2009; Bottema et al. 1983; Parks and Casey 1995; Zweytick et al. 2000). It has been reported that cells possessing a higher level of sterol are more resistant to chemical stress, but the amount of total sterols is reduced in the presence of fungal drug such as amphotericin B (Hahn and Hamdan 2000), fluconazole (Arthington-Skaggs et al. 1999), chlorotetrazolo[5,1-c]benzo [1,2,4]triazine (Cernicka et al. 2007), and silver(I)-coumarin complexes (Thati et al. 2007).

Understanding the parameters leading to a higher resistance of adapted cells is a crucial field of investigation both in the goal of developing antimicrobial treatments and to improve biocatalyst performance in biotechnological processes. For instance, compounds of interest produced by microorganisms are often toxic to the producing biocatalyst at high concentrations. Such a case occurs for the production of lactones, a family of compounds involved in cell-to-cell communication in bacteria (Bosgelmez-Tinaz et al. 2005; Leadbetter and Greenberg 2000; Taminiau et al. 2002) and between bacteria and yeast (McAlester et al. 2008) which has a biotechnological importance due to the flavoring properties of several members of the family. They can be obtained by bioconversion using several microorganisms like *Sporidiobolus*, *Yarrowia*, or *Trichoderma* spp. (Serrano-Carreón et al. 1993; Waché et al. 2003).

During biotransformation, the amphiphilic lactones accumulate in the culture causing thereby some toxicity toward the producing microorganism. This toxicity is often considered as the limiting step of the biotransformation (Feron et al. 1996), and continuous withdrawal of these compounds from the culture medium has been proposed (Souchon et al. 1998). In vitro or in glucose cultures, lactone partitions into membranes modifying the phase transition characteristics and inhibiting growth (Aguedo et al. 2002, 2003a, b). However, the effect of lactones on membranes of cells growing on lipids (corresponding to the biotransformation conditions) has not been investigated. A better knowledge of the fundamental action of these medium-chain-length amphiphilic and toxic compounds on lipid-growing cells should be useful to improve the performance of production processes through lipid biotransformation by microorganisms.

The present study aims at investigating whether cells of the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on nontoxic but fluidizing oleate exhibit different resistance to toxic medium-chain-length amphiphilic compounds compared to cells grown on glucose. For this purpose, cells were cultured in the presence of glucose or methyl oleate as the sole source of carbon and submitted to a γ -dodecalactone stress. The study focuses on the effect of this stress on the physical properties of cell membrane such as fluidity, permeability, and energization and investigates the role of ergosterol in the resistance mechanism.

Materials and methods

Strains, media, culture conditions, and lactone treatment

Y. lipolytica W29 (ATCC20460; CLIB89), *Candida guilliermondii* (CBS7099), *Rhodotorula glutinis* (TPJFC laboratory collection), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC26109; X2180), and *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS2636) were cultured in yeast extract peptone dextrose agar (YPDA) medium (yeast extract 10 g L⁻¹, peptone 20 g L⁻¹, glucose 20 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹) for 48 h and used to inoculate to the classical reference glucose-liquid medium YPD (YPDA without agar) and its oleate counterpart YPO (YPD in which glucose was changed for methyl oleate 5 g L⁻¹ and Tween 80 0.2 g L⁻¹) to investigate the effect of growth on oleate. To go further into the explanation of the effect of oleate, an oleate medium without source of peptide was used, YNBO (yeast nitrogen base 6.7 g L⁻¹, methyl oleate 5 g L⁻¹, Tween 80 0.2 g L⁻¹). Methyl oleate was used as the lipid as it is the common source used to investigate the lipid metabolism in yeast and because *Y. lipolytica* is able to grow on this substrate as the only carbon source. The methyl ester form which is usually considered as less toxic

to yeast than the free fatty acid form was used. Moreover, to stabilize the emulsion formed by the dispersion of methyl oleate into the aqueous phase, the Tween 80 surface-active compound was used as it is composed of oleyl as only acyl moieties and therefore will not modify the acyl composition of the medium. Cells were grown at 140 rpm in a baffled Erlenmeyer flask and cultured at 27°C for *Y. lipolytica* or 25°C for the other strains. Cells in the mid-logarithm growth phase (19 h for YPD, 24 h for YNBO and YPO with *Y. lipolytica*, and 16 h for YPD with *C. guilliermondii*, *R. glutinis*, *S. cerevisiae*, and *S. salmonicolor*) were treated with γ -dodecalactone at concentrations up to 6 g L⁻¹ and incubated at 27°C, 140 rpm. The treated cells were harvested after different times for viability estimation, fluorescent staining, or sterol analysis. As lactone was prepared in ethanol, a control made with 1% (v/v) ethanol-treated cells was analyzed.

Evaluation of cell reducing capacity and colony-forming ability

Cell reducing capacity was estimated in triplicate by the methylene blue staining method. The methylene blue dye is reduced to a colorless compound by a reaction taking place in living cells, so that when added to a cell suspension, it should stain all the dead cells. In brief, the cellular suspension is mixed with an equal volume of methylene blue solution carefully prepared and filtered (0.25 g L⁻¹ methylene blue, 9 g L⁻¹ NaCl, 0.42 g L⁻¹ KCl, 0.32 g L⁻¹ CaCl₂, 0.2 g L⁻¹ NaHCO₃, and 10 g L⁻¹ glucose to guarantee cell energization) and incubated for 5 min at room temperature then visualized and counted using Mallassez cell under light microscopy. The colony-forming ability was evaluated by the colony-forming unit (CFU) method: Successive decimal dilutions of cell suspensions were plated on YPDA, and the colonies were counted after 48-h incubation at 27°C.

Evaluation of membrane integrity and energetics

To evaluate membrane integrity and energization, cells were exposed to lactone in phosphate buffer (PBS; 20 mM, pH 5.6, $A_{600}=2.0$) for 60 min then washed twice and resuspended in the same buffer at $A_{600}=0.7$ for fluorescent staining. The membrane integrity marker propidium iodide (PI; Sigma) was prepared at 200 μ g mL⁻¹ in distilled water; a working concentration of 2 μ g mL⁻¹ was used. This fluorescent probe stains the DNA of cells that have lost their membrane integrity (Cao-Hoang et al. 2008; Deere et al. 1998). In the case of bis-oxonol (BOX), a hydrophobic fluorophore for membrane potential used to mark the cell membrane energetic state, the stock solution was prepared in dimethyl-sulfoxide at 1 mg mL⁻¹; the working solution was 5 μ g

mL⁻¹. The observations were made using a multispectral confocal laser scanning microscope Eclipse TE 2000E, Nikon, with He/Ar laser multiray system. Excitation wavelengths were 561 and 514 nm for PI and BOX, respectively. The images were visualized and taken using software EZ-C1 version 3.50. Cell counting was performed on the Zeiss Axioplan 2 imaging fluorescence microscope.

Fluidity evaluation

The membrane fluidity was evaluated through the fluorescent anisotropy of diphenylhexatriene (DPH) and its derivative 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH), which, due to its positively charged amino group, is anchored at the membrane surface in contact with water. A 1-mM stock solution was prepared in dimethylformamide and conserved at room temperature. The cell suspension was prepared in PBS (20 mM, pH 5.6) at $A_{600}=0.6-0.7$. After addition of 2 μ L of 1 mM DPH or TMA-DPH into 3 mL of cell suspension, the sample was placed in a thermostat chamber, protected from light, at 27°C, and stirred. The measurements were made with a spectrofluorometer Jobin Yvon-Horiba model Fluorolog 3. The excitation wavelength was set to 360 nm and the emission to 450 nm. The measured fluorescence intensities were corrected for background fluorescence and light scattering from the unlabelled samples. Fluorescence anisotropy (r) was calculated as follows:

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH}), G = I_{HV} / I_{HH}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the fluorescence intensities determined at vertical and horizontal orientations of the emission polarizer when the excitation polarizer is set in the vertical position. This applies similarly for I_{HV} and I_{HH} with the horizontal excitation polarizer. G is a correction factor for background fluorescence and light scattering (Aguedo et al. 2003a, b).

Ergosterol analysis

Cells treated with lactone at different concentrations were harvested after 150 min for ergosterol extraction. Total intracellular sterol was extracted as previously described (Arthington-Skaggs et al. 1999) with modification. Fifty milliliters of cell culture was harvested (8,000×g, 4°C, 5 min), washed twice with cold sterile distilled water, and the wet weight was determined. Three milliliters of 25% alcoholic KOH (25 g KOH in 35 mL sterile distilled water brought to 100 mL with absolute ethanol) was then added and vortexed for 1 min. The cellular suspension was transferred into sterile borosilicate glass screw-cap tube and incubated at 85°C for 1 h. After incubation, tubes were allowed to cool to room temperature. Sterols were then

extracted by addition of a mixture of 1 mL of sterile distilled water and 3 mL of *n*-heptane followed by vigorous vortex mixing for 3 min. The heptane layer was transferred to a clean borosilicate glass screw-cap tube and stored at -20°C for 24 h before analysis. Two methods were used for sterol analysis: HPLC and spectrometry. HPLC analysis was adapted from protocol of Lamacka and Sajbidor (1997) with modification: Sterols were separated in chromolith column $2\times 100\times 4$ C18. Methanol/water 95:5 (v/v) was used as mobile phase at 1.6 mL min^{-1} with pressure of 57 atm. Analysis was performed at room temperature and monitored at 280 nm. Amount of ergosterol was calculated using standard curves. Prior to spectrometry analysis, a 200- μL aliquot of sterol extract was diluted fivefold in absolute ethanol and scanned spectrophotometrically between 220 and 320 nm with a Thermo Spectronic Spectrophotometer (Biomate). A standard curve was established with pure ergosterol based on the absorbance at 282 nm. Ergosterol content was then calculated as a percentage of the wet weight of the cell: $\% \text{ ergosterol (g g}^{-1}) = [\text{ergosterol}] \times F/m$ where F is the dilution factor and m is the cell wet weight (grams). The results obtained showed no significant differences between the two analytical methods so the spectrometry method was used for all analyses.

Ergosterol depletion/incorporation by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) at different concentrations

Cells in mid-log phase were harvested, washed with PBS, and incubated with M β CD at 5, 10, and 20 mM for depletion or complex of M β CD/ergosterol at 5 mM of M β CD and 0.25 mM of ergosterol for incorporation prepared in PBS for 20 min at 27°C and 140 rpm. Complex of M β CD/ergosterol was prepared as described by Scanlon et al. (2001).

Cell lipid induction using methyl oleate

As all the strains could not grow on methyl oleate as the sole carbon source, for comparison of the effect of this compound on the sensitivity for lactone, cells in mid-log phase, harvested, washed, and resuspended with PBS as described above, were incubated with 5 g L^{-1} methyl oleate in the presence of Tween 80 as surfactant for 4 h before undergoing the lactone shock.

Results

γ -Dodecalactone affects the cell reducing capacity differently depending on the carbon source

Various conditions of lactone treatment were tested, and the cellular reducing capacity was determined by coloration

with methylene blue. The results obtained with 3 g L^{-1} γ -dodecalactone treated cells are presented in Fig. 1. After a 150-min incubation with 3 g L^{-1} γ -dodecalactone, almost all the cells cultured in lipid media were not stained and could thus be considered as still possessing their reducing activity, whereas 56% of cells cultured in glucose medium had lost their ability to degrade methylene blue. When incubating with 6 g L^{-1} , the reducing capacity of oleate-grown cells was also affected for $43\pm 7\%$ of cells after 150 min incubation (whatever the oleate-containing medium) and for $81\pm 8\%$ of the glucose-grown cells. Interestingly, the effect of the lactone shock on the ability to form colonies on YPDA (CFU) was not correlated with results of the methylene blue test: Oleate-grown cells were not affected by the lactone shock whereas a 1.8-log CFU decrease was observed for glucose-grown cells treated with 3 or 6 g L^{-1} lactone (results not shown). This result suggests that γ -dodecalactone perturbed first specifically the colony-forming ability of glucose-grown cells and then the reducing capacity as evaluated with methylene blue.

The loss of reducing capacity correlates with loss of membrane integrity for glucose- but not for oleate-grown cells

It has been shown that lactones exhibited certain toxicity to the yeast *Y. lipolytica* through interactions with cell membrane lipids and components (Aguedo et al. 2003a, b), causing changes in the cellular physiologic state. Two aspects of the membrane state, membrane integrity and membrane potential, were explored in the present study.

The membrane integrity was determined using PI. No cells were stained by PI without lactone treatment whatever their culture media, confirming that all cells possessed an intact membrane before the lactone shock. After the treatment with lactone, a part of the cellular population

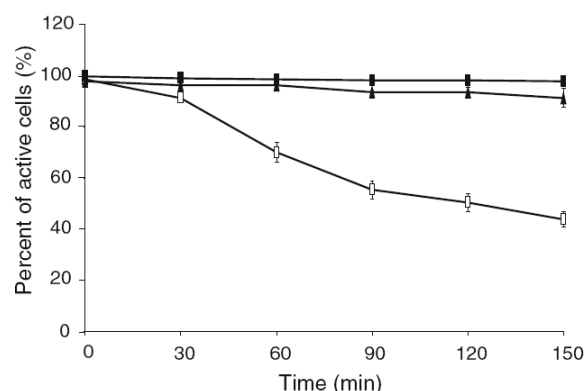


Fig. 1 Evolution of the activity (evaluated with methylene blue) of cells grown in open square YPD, filled square YPO, and filled triangle YNBO during a treatment of 3 g L^{-1} γ -dodecalactone

was stained with PI, but the number of stained cells varied with the culture media (Table 1).

To study the cellular energy, we used bis-oxonol which is a voltage-sensitive probe, so it can only cross-depolarized membranes, binding then to lipid-rich domains (Cao-Hoang et al. 2008). Cells maintaining their membrane potential exclude BOX. Observation by microscopy showed that γ -dodecalactone affected the cellular energetic state of all the cells submitted to the lactone shock, as 100% of treated cells were stained with BOX (Table 1). However, all the cells grown on lipids kept their ability to form colonies on YPDA plates after the lactone treatment while only 23% of glucose-grown cells were able to develop on agar plates.

The pattern of the lactone-induced fluidization of membranes depends on the culture medium

An interesting characteristic of cellular membrane is the movements of their components. These movements give the membrane a certain fluidity which can be evaluated using different fluorescent probes (Cao-Hoang et al. 2008). The effect of lactone-induced changes in membrane fluidity of cells grown on different culture media was studied using DPH and its derivative TMA-DPH. The fluorescence anisotropy of these probes is directly related to the fluidity of their environment, as a decrease in the anisotropy reflects an increase in the fluidity. The location of the probes was checked by confocal microscopy observation and the absence of displacement by evaluating the stability of the signal with time. For both probes, the fluorescence anisotropy was lower for cells grown on oleate, reflecting the presence of oleate in membranes. To check whether the oleate was well integrated in the phospholipid bilayer, membranes were submitted to temperature-induced liquid-crystalline/gel phase transitions (Fig. 2a). In all cases, after

Table 1 Physiologic state of cells of *Y. lipolytica* after 60 min lactone treatment using different indicators (percent of marked cells for colored or fluorescent probes)

Fluorescent probe	Culture media		
	YPD	YPO	YNBO
Methylene blue	31±8	2±1	4±2
Propidium iodide	38±4	14±1	nd
Bis-oxonol	100	100	100
CFU (%)	23±3	100	100

Cells were grown on glucose (YPD) or oleate (YPO) and minimum oleate (YNBO) media. Methylene blue stains inactive cells, propidium iodide I stains cells having lost their membrane integrity, and bis-oxonol stains cells without membrane energy (without membrane electrical gradient). A control is given with the number of cells able to form colonies on agar media (CFU)

nd nondetermined

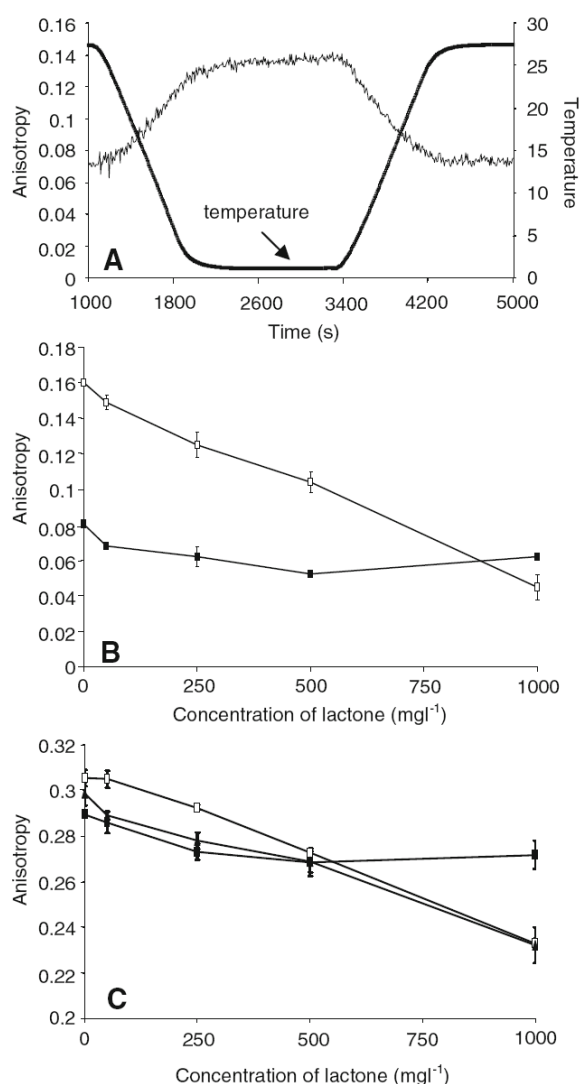


Fig. 2 Membrane fluidity of the yeast *Y. lipolytica* as evaluated through fluorescence anisotropy using DPH (a, b) and TMA-DPH (c). a Depending on the temperature (right axis) for oleate grown cells. b, c Depending on γ -dodecalactone concentration. Open square YPD, filled square YPO, filled triangle YNBO

return to initial conditions (i.e., 27°C), the fluorescence anisotropy was similar to that of the beginning and the amplitude of the anisotropy modification was comparable regardless of the culture medium. As a control, DPH was added to oleate droplets and a far lower anisotropy was measured (about 0.03 at 27°C).

The effect of the addition of lactone on the fluorescence anisotropy of the two probes was monitored, resulting in different patterns of anisotropy decrease depending on the culture medium (Fig. 2b, c). With TMA-DPH, lactone fluidized all three membranes but at different degrees. At

concentrations of lactone below 500 mg L^{-1} , the membrane of cells grown on lipid was more fluidized by lactone than the one of cells grown on glucose. The membrane fluidity of cells grown on lipid (YPO, YNBO) increased immediately with 50 mg L^{-1} of lactone, while this concentration had no effect on the membrane fluidity of glucose cells. However, concentrations of lactone over 500 mg L^{-1} had a similar impact on YPD and YNBO cells, for which the membrane fluidity increased linearly with the lactone concentration while the membrane fluidity of YPO cells remained relatively stable (Fig. 2c). With DPH, anisotropy reflects the fluidity in the hydrophobic core of the membrane. In that case, lactone fluidized the membrane of glucose-grown cells in a rather linear way while it had almost no effect on the already very fluid YPO-cell membrane. Interactions between the probe, lactone, and the envelope of YNBO cells affected the measurement of membrane anisotropy and the membrane fluidity of these cells could not be evaluated.

Lactone provokes a decrease in sterol concentration

Sterols are well known as important components in the regulation of membrane physiological properties. They contribute to the purpose of maintaining an appropriate membrane fluidity, particularly in response to changes in the environmental conditions (Bottema et al. 1983). Here, we report the implication of culture conditions (carbon source) and lactone on the total ergosterol content of cells of *Y. lipolytica*. First, the concentration of ergosterol depended on the carbon source. Cells grown on lipid possessed more sterol than cells grown on glucose (Fig. 3). This may explain at least partially the better resistance toward the toxicity of lactone of cells cultured in lipid

compared to cells cultured in glucose. Similarly to the fluidity results, the lactone had a marked effect on the sterol concentration as the cell ergosterol content decreased in all three conditions of culture but with different amplitudes. Cells grown on YNBO were the most sensitive to the lactone shock: At a 250-mg L^{-1} lactone treatment, the cell content of ergosterol fell immediately to the same level as cells grown on YPD (Fig. 3).

Cells grown in YPO resist to sterol depletion by M β CD in contrast with cells grown in glucose or YNBO

Results obtained at our laboratory through observations by transmission electronic microscopy showed that cells grown in YPO possessed a thicker envelope ($0.3\text{--}0.35 \mu\text{m}$) than cells grown in YPD or YNBO ($0.18\text{--}0.2 \mu\text{m}$; Romero-Guido et al., unpublished results) which could explain the differential depletion by M β CD. YPD and YNBO cells were depleted respectively of about 20% and 34% of their sterol content when incubated with M β CD 5 mM (Fig. 4). In regard to the role of sterol in the capacity of maintaining membrane fluidity, we measured the anisotropy using the fluorochrome DPH, as sterol is reported to locate in the raft structure which installs in the core of the membrane (Grossmann et al. 2007), and also with TMA-DPH as an effect on the inner membrane might have an effect on the polar interface. We observed that the sterol content has an impact on the membrane fluidity as a decrease in sterol provokes a diminution in anisotropy, indicating a more fluid membrane (0.148 instead of 0.160 without depletion for YPD cells). However, when adding lactone to sterol-depleted cells, a high fluidization was observed without differences regarding the concentration of M β CD-depleted sterol (0.05–0.06).

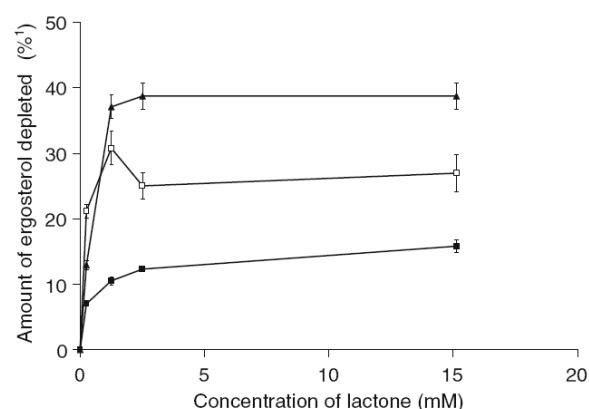


Fig. 3 Effect of γ -dodecalactone on the ergosterol depletion of cells of *Y. lipolytica*. Open square YPD, filled square YPO, filled triangle YNBO

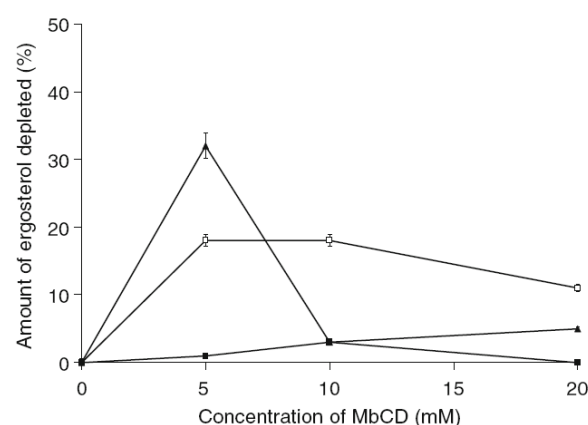


Fig. 4 Effect of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) on cells sterol depletion; open square YPD, filled square YPO, filled triangle YNBO

Effect of sterol depletion/incorporation on cells sensitivity toward lactone shock

In order to investigate the role of sterol on cells resistance toward lactone, we have studied the effect of sterol depletion/incorporation on cell sensitivity when incubated with lactone. Cells were depleted by incubating with M β CD 5 mM or incorporated with ergosterol 0.25 mM as described above. They underwent then a lactone shock at 3 g L⁻¹ of γ -dodecalactone. Undepleted cells were used as the control, and the difference in the number of cells having lost their reducing capacity (marked by methylene blue) is presented in Fig. 5. In both cases of YPD- and YNBO-grown cells, cells depleted were more sensitive to the lactone shock than control cells. For incorporation of sterol into the membrane using M β CD, we have tested on YPD-grown cells and, in the condition described, cells after incorporation had about 124% of sterol in comparison with control cells (100%). Sterol incorporated cells were less sensitive to the lactone shock than control cells (about 20% difference after 150 min of incubation). These results confirm our hypothesis of the role of ergosterol in cell resistance toward lactone stress.

Effect of methyl oleate on cells resistance toward lactone stress

To generalize the effect of lipids on cells resistance to environmental stress, we have investigated the effect of methyl oleate on cell resistance toward lactone stress in different yeast strains. Cells were incubated with methyl oleate for 4 h and submitted to the lactone shock. The results show that each strain expressed different response toward lactone shock when induced by methyl oleate. In general, we observed that, for *C. guilliermondii* and *Y.*

lipolytica, methyl oleate enhanced cell resistance toward lactone. An opposite effect was observed in *S. cerevisiae* and *S. salmonicolor*. In the case of *R. glutinis*, a slight increase in cells resistance was observed for cells induced by methyl oleate, but it is not as clear as for *C. guilliermondii* and *Y. lipolytica* (Fig. 6).

Discussion

The physical impact that toxic lipids, alkanes, and other hydrophobic compounds have on cells has been shown especially on cell membrane structures (Weber and de Bont 1996). Some authors have also identified some responses of cells against these stresses, such as the production of ergosterol. However, the impact of poorly toxic compounds and particularly of lipids that can be growth substrate or that do not alter growth has been less investigated. The present study shows with a yeast species used as a model for hydrophobic compounds metabolism (Fickers et al. 2005) that resistance to a medium-chain-length amphiphilic compound is dramatically increased for cells grown on lipids compared to cells grown on glucose.

For glucose-grown cells, the loss of reducing capacity was well correlated with the loss of membrane integrity as evaluated with methylene blue and propidium iodide, respectively. This confirms previous reports showing that lactones interact with model or microbial membranes (Aguedo et al. 2002, 2003a, b) and suggests that this interaction, through a deleterious effect provoking membrane disruption, causes cell death. The membrane of oleate-grown cells had very different physical properties. For DPH and TMA-DPH, the fluorescence anisotropy was much lower for cells grown on oleate, indicating that the fluidity of the environment of the probe increased significantly. Moreover, the addition of oleate to glucose-grown cells had also an immediate and drastic fluidizing effect (results not shown). There are similarities between oleate and long-chain-length alcohols as these latter have been shown to provoke a loss in the lipid order but, due to the good insertion in both the polar-head and acyl-chain regions of the membranes, they have less impact on the vital properties of the membrane than their shorter-chain counterparts (discussed in Weber and de Bont 1996). This fluidizing effect is likely to reflect the partition of oleate in membranes, resulting in a change in the bilayer structure. The oleate-containing membrane forms a relatively stable structure which is not degraded by temperature-induced liquid–gel–liquid transitions (Fig. 2a), suggesting that oleate is located among phospholipids in the frame of the global bilayer organization. However, oleate may perturb this organization. For instance, Lockshon et al. (2007) have observed that, despite the integration of oleyl moieties in

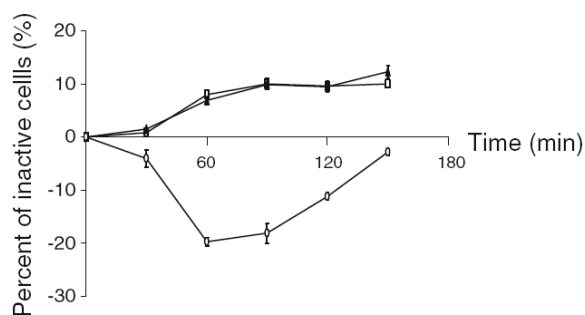


Fig. 5 Effect of sterol depletion or incorporation on cell sensitivity toward lactone. Cells were treated with 5 mM M β CD for depletion and M β CD with ergosterol for incorporation and then incubated with 3 g L⁻¹ γ -dodecalactone. Cells activity is determined using methylene blue staining. Cells without depletion were used as control. *Open square* YPD depleted, *filled triangle* YNBO depleted, *open circle* YPD incorporated

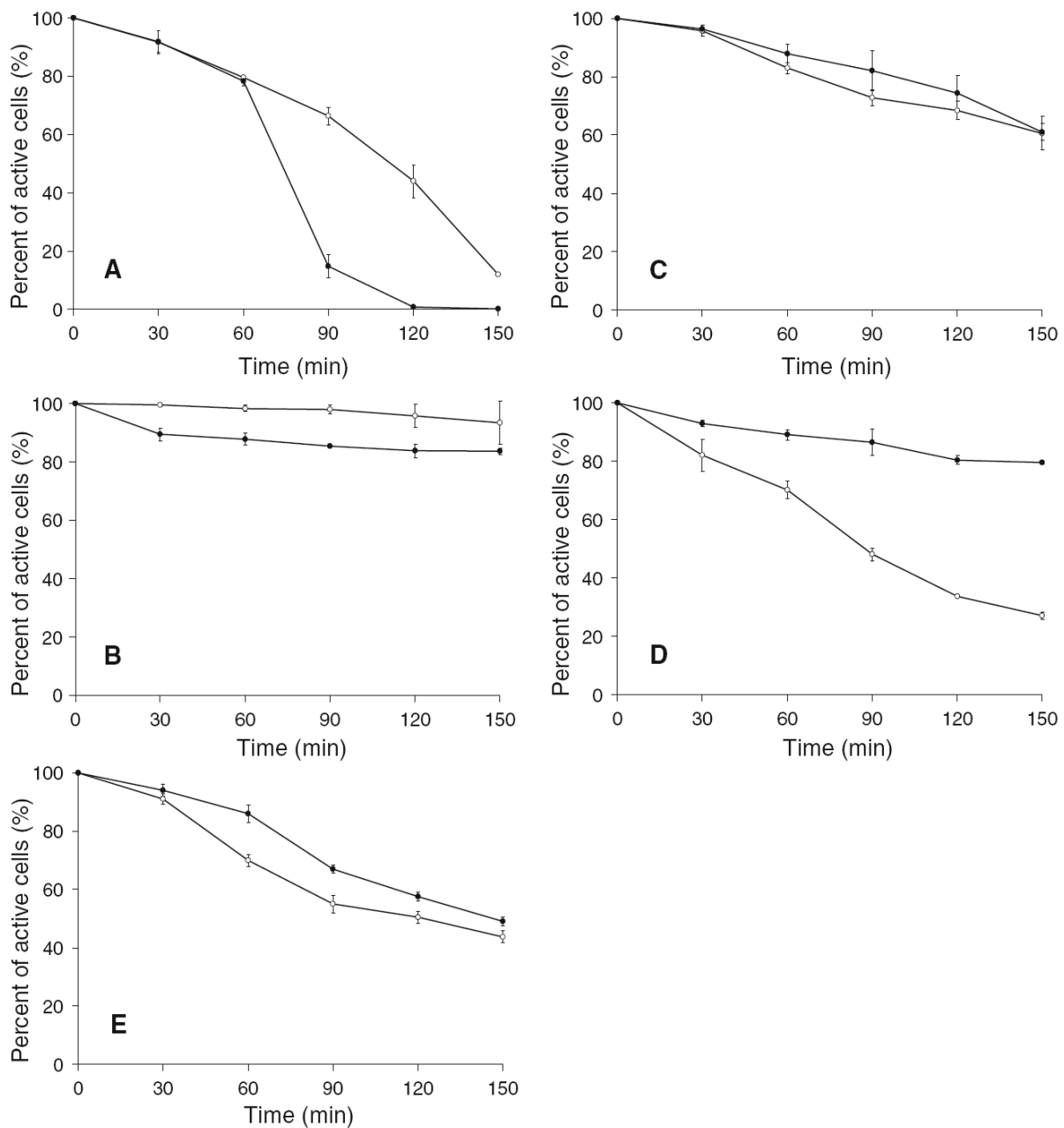


Fig. 6 Effect of γ -dodecalactone on cell activity (evaluated by methylene blue staining) of different strains: **a** *S. salmonicolor*, **b** *S. cerevisiae*, **c** *R. glutinis*, **d** *C. guillermoidii*, **e** *Y. lipolytica* after induction by methyl oleate (filled circle) or noninduced cells (open circle)

phospholipids which increases the tolerance to stresses (Swan and Watson 1999), after 4 h of growth on an oleate medium, about 15% cells of *S. cerevisiae* had lost their membrane integrity. This percentage could increase to more than 50% for *pex6* Δ strains. However, the role of *pex6* in membrane integrity is not yet known. In our study, *Y. lipolytica* cells did not become PI permeant in the presence

of oleate but some cells grown on YNBO became bis-oxonol permeant.

Contrasting with oleate, the medium-chain-length amphiphilic compounds γ -dodecalactone caused not only an increase in membrane fluidity but also an important decrease in the reducing capacity for YPD cells but not for oleate-grown cells (Fig. 1; Table 1). When interfering

with membranes, it is likely that the hydrophobic carbon chain of lactones comes inside the acyl chain part of the membrane whereas the polar oxygenated cycle anchors the molecule to the polar head region of phospholipids. For volatile lactones, the perturbing effect is growing with the length of the carbon chain (Aguedo et al. 2002). It seems also that, due to steric hindrance, the lactone cycle perturbs the membrane surface, normally consisting in ordered phospholipid polar heads, in a way more drastic than hydroxyl or carboxylic groups from alcohols or acids (Feron et al. 1996).

The addition of 3 g L⁻¹ lactone in the environment of oleate-grown cells had no effect on the reducing capacity neither on the ability to form colonies. Exposure to higher concentrations (up to 6 g L⁻¹) provoked a loss of the reducing capacity but without effect on the formation of colonies, suggesting that the perturbation induced by lactone during exposure was reversible. Interestingly, in these conditions, despite the absence of effect on cell division, propidium iodide became also membrane permeant for 14% of cells. However, as cells kept their growing capacity, the loss of membrane integrity was only a transient nonlethal phenomenon affecting some lactone-treated cells growing on oleate. Contrasting with membrane integrity, membrane energization (or permeability to cationic probes) was affected by lactone addition: Whatever the carbon source, all cells were stained intracellularly by bis-oxonol. To explain the modification of the membrane structure caused by the addition of lactone, the observation of the patterns of fluidization for cells grown on the various media is of interest. First considering the hydrophobic core of the membrane (evaluated with DPH), lactone exhibited an effect on YPD but not on YPO cells. In this lesser-ordered part of the membrane, the addition of oleate, which increases fluidity, had a buffering effect. The instability of signals obtained with YNBO cells and interactions of the probe with cell wall did not permit us to evaluate properly cells from this medium. For the polar-head part of the membrane (TMA-DPH), it can be noted that low concentrations of lactone had only an effect on membranes charged with oleate (Fig. 2c), suggesting that the presence of oleate weakens the organization of the membrane surface which becomes more sensitive to lactone. However, for higher concentrations, the same oleate buffering effect was observed. Without oleate (YPD), the phospholipid polar-head interface was more stable and perturbed only at higher concentrations of lactone. In this region of the membrane, similarities of patterns between YPD and YNBO cells can be discussed in regard to the ergosterol concentration. Indeed, beside the physical incorporation of oleate into membranes, cells exhibited also a physiological response as shown with the higher content of sterol of oleate-grown cells. However, during the γ -dodecalactone exposure, the

sterol content decreased, especially for YPD and YNBO cells. This decrease was well correlated with an increase in membrane fluidity (Figs. 2c and 3) confirming that, as in other cases (Dufourc 2008), ergosterol plays an important role in the regulation of the microfluidic state of the membrane in the presence of lactone. The diminution of the amount of sterol provoked by lactone depending on the medium was similar to the depletion of sterol by methyl- β -cyclodextrin. This property depends on many parameters (Mahammad and Parmryd 2008; Zidovetzki and Levitan 2007) linked to the fact that sterols are in the membrane microdomains in association with proteins often implicated in cell signaling and membrane traffic (Maxfield 2002; Smith et al. 2000). The organization of these microdomains depends probably on the culture medium resulting in various sensitivities to the lactone treatment. An increase in the cell sensitivity of sterol-depleted cells, together with an increase in the cell resistance of sterol-incorporated cells toward the lactone shock, proves the role of sterol in cell response to physicochemical environmental stresses.

It is of particular interest to note that the lactone used in the present study belongs to a family of compounds identified for their role as signaling molecule in cell-to-cell communication. These lactones are known to bind to cytoplasmic receptor proteins and inhibit their binding to specific DNA target (Taminiau et al. 2002). Most of these proteins are repressor so that binding to lactone molecule relieves the repression and induces the expression of the target gene. Although much of the mechanism of lactone's action in signaling pathway has been elucidated, the interactions of these compounds with membranes may also have a role.

As a conclusion, cells grown on lipids resist better to the medium-chain-length amphiphilic γ -dodecalactone than cells grown on glucose. One reason is that, among other cell phases, oleate intercalates in yeast membranes without affecting their general function but changing some physical properties, in particular providing membranes with a buffering property enabling cells to decrease their sensitivity to chemical compounds. Oleate was shown to be a good fluidizing agent that could be used instead of benzyl alcohol in some cases of investigation of membranes. This study gives also new insights into the mechanism of action of γ -dodecalactone: This compound does not only fluidize membranes by partitioning inside the bilayer but also decreases the concentration of ergosterol probably through the destructuration of sterol-rich microdomains. Such an effect has already been shown with M β CD and some antibiotics (Abe et al. 2009; Zidovetzki and Levitan 2007) but is original for this monocyclic molecule. A role of ergosterol in cell sensitivity to dodecalactone was established as ergosterol depletion or incorporation had a negative or positive effect on cell resistance, respectively.

Interestingly, there is no deleterious effect on YPO-grown cells which undergo no ergosterol depletion. Apparently, this membrane resistance can be related to the presence of oleate as well as peptone in the culture medium. In glucose-grown cells, the toxic effect of lactone is directly related to the effect on membrane but with oleate-grown cells, a high fluidization of membranes as well as transient loss of membrane integrity are not sufficient to alter cell reducing capacity and development. If growth on all lipidic substrates of lactones is comparable, this suggests that, contrary to what is usually admitted, the high concentrations of lactones encountered in the biotransformation medium are not lethal to cells of *Y. lipolytica* but it could decrease activity. We are now focusing on other cell functions that can explain cell resistance to high concentrations of lactone. Moreover, it was of interest to evaluate whether this effect of increase in resistance to amphiphilic compounds could be generalized to other yeast species. Interestingly, this effect was observed for other strains able to grow on oleate as the sole carbon source but an opposite effect was observed for strains requiring another source of carbon.

Acknowledgments This work was partly granted by the French Agency for Research (ANR program "Transaronat"). T.M.N. Ta possesses a fellowship from the French Ministry for Research and H. Phan-Thi a grant from the Agence Universitaire de la Francophonie. The authors are thankful to C. Bernard-Rojas for technical help. An important part of the investigations were carried out in the Spectral Imaging Platform of the Federal Institute for Research IFR 92.

References

- Abe F, Hiraki T (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1788:743–752
- Abe F, Usui K, Hiraki T (2009) Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48:8494–8504
- Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin JM, Gervais P (2002) Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnol Lett* 24:1975–1979
- Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin JM (2003a) Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. *Int J Food Microbiol* 80:211–215
- Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin JM (2003b) Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* 94:258–265
- Aguedo M, Ly MH, Belo I, Texeira J, Belin JM, Waché Y (2004) The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. *Food Technol Biotechnol* 42:327–336
- Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ (1999) Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 37:3332–3337
- Avis TJ, Belanger RR (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Appl Environ Microbiol* 67:956–960
- Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Aridogan B, Eroglu F, Kaya S (2005) N-Butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiol Res* 160:399–403
- Bottema CDK, McLean-Bowen CA, Parks LW (1983) Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 734:235–248
- Cao-Hoang L, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P, Waché Y (2008) Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol J* 3:890–903
- Cernicka J, Kozovska Z, Hnatova M, Valachovic M, Hapala I, Riedl Z, Hajos G, Subik J (2007) Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 29:170–178
- Deere D, Shen J, Vesey G, Bell P, Bissinger P, Veal D (1998) Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* 14:147–160
- Drici-Cachon Z, Cavin JF, Diviès C (1996) Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Lett Appl Microbiol* 22:331–334
- Dufourc EJ (2008) Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* 1:63–77
- Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnamme P, Quere JL, Spinnler H (1996) Production, identification, and toxicity of γ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* 62:2826–2831
- 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 Res* 5:527–543
- Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO* 26:1–8
- Hahn RC, Hamdan JS (2000) Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1997–2000
- Heipieper HJ, de Bont JA (1994) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* 60:4440–4444
- Lamacka M, Sajbidor J (1997) Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of different methods. *Biotechnol Technol* 11:723–725
- Lanciotti R, Gianotti A, Patrignani F, Belletti N, Guerzoni ME, Gardini F (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci Technol* 15:201–208
- Leadbetter JR, Greenberg EP (2000) Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* 182:6921–6926
- Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaeberlein M, Kennedy BK (2007) The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175:77–91
- Mahammad S, Parmryd I (2008) Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl-(beta)-cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochim Biophys Acta* 1778:1251–1258
- Maxfield FR (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 14:483–487
- McAlester G, O'Gara F, Morrissey JP (2008) Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 57:563–569

- Middelhoven W (1993) Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeast like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:125–144
- Mukhopadhyay K, Kohli A, Prasad R (2002) Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3695–3705
- Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* 49:95–116
- Robichon C, Dugail I (2007) De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. *Biochimie* 89:260–264
- Scanlon SM, Williams DC, Schloss P (2001) Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* 40:10507–10513
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM (1993) Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl(α)-pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. *Appl Environ Microbiol* 59:2945–2950
- Sikkema J, de Bont JA, Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269:8022–8028
- Smith JJ, Brown TW, Eitzen GA, Rachubinski RA (2000) Regulation of peroxisome size and number by fatty acid β -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 275:20168–20178
- Souchon I, Spinnler HE, Dufossé L, Voilley A (1998) Trapping of γ -decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents: application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Tech* 12:109–113
- Swan TM, Watson K (1999) Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Can J Microbiol* 45:472–479
- Taminiau B, Daykin M, Swift S, Boschirolì M-L, Tibor A, Lestrade P, De Bolle X, O'Callaghan D, Williams P, Letesson J-J (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 70:3004–3011
- Thati B, Noble A, Rowan R, Creaven BS, Walsh M, McCann M, Egan D, Kavanagh K (2007) Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol In Vitro* 21:801–808
- Veen M, Lang C (2005) Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem Soc Trans* 33:1178–1181
- Waché Y, Aguedo M, Nicaud JM, Belin JM (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:393–404
- Waché Y, Husson F, Feron G, Belin JM (2006) Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89:405–416
- Weber FJ, de Bont JA (1996) Adaptation mechanisms of micro-organisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1286:225–245
- Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768:1311–1324
- Zweytick D, Hrstnik C, Kohlwein SD, Daum G (2000) Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24 (28) reductase, erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 470:83–87

Conclusion :

Les résultats qui viennent d'être présentés montrent l'effet de la source carbone sur la réponse cellulaire au stress. Les cellules ayant poussé sur lipide ont une meilleure résistance à la γ -dodécalactone par rapport aux cellules ayant poussé sur glucose. L'explication peut s'appuyer sur le rôle des stérols car les cellules ayant poussé sur lipide possèdent plus d'ergostérol que celles ayant poussé sur glucose. La lactone et la méthyle- β -cyclo-dextrine ont moins d'effet de déplétion de stérol chez les cellules ayant poussé sur lipide que chez les cellules ayant poussé sur glucose. Cet effet est rapide (après 10 min d'incubation avec la lactone) et marqué (à partir de 0.25 mM de lactone). Dans la deuxième partie, nous allons approfondir les aspects des stérols de la cellule dont les différentes formes : stérols libres et esters de stéryle ; et l'organite qui renferme les esters de stéryle : les corps lipidiques (LB).

3.2. Rôle des corps lipidiques dans la résistance des cellules au choc lactone.

Partie confidentielle

Publication 2: Lipid bodies play a role in the resistance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to amphiphilic compounds

Thi Minh Ngoc Ta, Hanh Phan-Thi, Hai Dang Tran, Thi Hanh Tam Dinh, Abiramy Sivagurusingham, Joseph Gresti, Yves Waché

Titre :

Les corps lipidiques jouent un rôle dans la résistance de la levure *Y. lipolytica* en réponse à un stress de composés amphiphiles

Résumé:

Les lipides comme l'oléate de méthyle ont un effet positif sur les cellules dans la résistance à des stress environnementaux causés par un autre composé amphiphile, la lactone. Les lactones sont des composés d'arômes présents dans de nombreux fruits et aliments fermentés, qui sont utilisés dans les industries alimentaires et des boissons et peuvent être produits par certains micro-organismes. A des concentrations élevées, ces molécules sont souvent toxiques pour les cellules productrices. Chez la levure *Yarrowia lipolytica* qui peut utiliser les lipides comme seule source de carbone, la croissance sur lipides rend les cellules plus résistantes au stress lactone. L'objectif de ce travail est de comprendre comment les lipides comme source de carbone influencent la réponse de la levure *Y. lipolytica* au stress lactone. A cet effet, les cellules ont été cultivées sur glucose ou sur oléate de méthyle comme seule source de carbone et soumises à la γ -dodécalactone. Nous avons ciblé l'étude sur les mécanismes d'action de la lactone sur l'activité des cellules, et les changements dans les corps lipidiques pendant le traitement. L'homéostasie du stérol a été également étudiée en ce qui concerne l'interconversion entre les stérols et leurs esters de stéryle. Les résultats ont montré que les cellules ayant poussé sur lipides ont exprimé une réponse inverse au choc lactone par rapport aux cellules cultivées sur glucose. Les résultats supposent aussi une implication des corps lipidiques ainsi que des acyl Coenzyme A oxydase Aox2p, Aox3p dans la réponse de la cellule au stress lactone.

Conclusion :

Dans cette partie, nous avons observé des changements au niveau des LB chez *Y. lipolytica* quand elle est soumise au stress lactone. Ces changements sont peut-être liés avec l'effet de déplétion de stérol par la lactone. Chez les cellules YPD, une augmentation de concentration d'esters de stéryle en parallèle avec une diminution de concentration de stérol libre est observée. Cette diminution pourrait expliquer la sensibilité des cellules YPD à la lactone car les stérols libres sont pour stabiliser la membrane plasmique. Une déplétion de stérol membranaire peut conduire à une structure plus fragile aux stress qui expliquerait la sensibilité de la cellule au choc lactone. Au contraire, chez les cellules YPO et YNBO, une diminution en concentration d'ester de stéryle est observée en même temps avec une invariabilité en concentration de stérol libre. Il semblerait que les stérols soient mobilisés contre l'effet de déplétion par la lactone. Une telle réponse pourrait stabiliser la membrane et rendre la cellule plus résistante au stress.

Les LB où se trouvent les esters de stérols sont donc proposés comme jouant un rôle dans la résistance de la cellule *Y. lipolytica* au choc lactone. Il est intéressant de savoir si ce comportement se retrouve aussi face à d'autres stress environnementaux. Dans la partie suivante, nous présentons l'influence de la source de carbone sur la résistance de la cellule à un choc thermique. Le comportement des LB est aussi étudié, et en parallèle, l'interaction avec la β -oxydation.

3.3 Effet de la source de carbone sur la résistance de *Y. lipolytica* en réponse à un stress thermique

Préambule

La préparation de levures se retrouve dans plusieurs applications intéressantes (Figure 10). Le levain est une préparation utilisée depuis très longtemps et qui se trouve encore appliquée à ce jour. Il se trouve aujourd'hui sous forme fluide, pressée ou sèche selon le procédé de fabrication (Figure 11). Au contraire du levain qui contient des levures actives, les extraits de levure utilisés comme source nutritive pour les aliments sont préparés avec des cellules mortes/inactives autolysées. Dans plupart des procédés, pour une préparation de levure active ainsi que pour une préparation de levure inactive, les cellules subissent des stress différents parmi lesquels le changement de température.

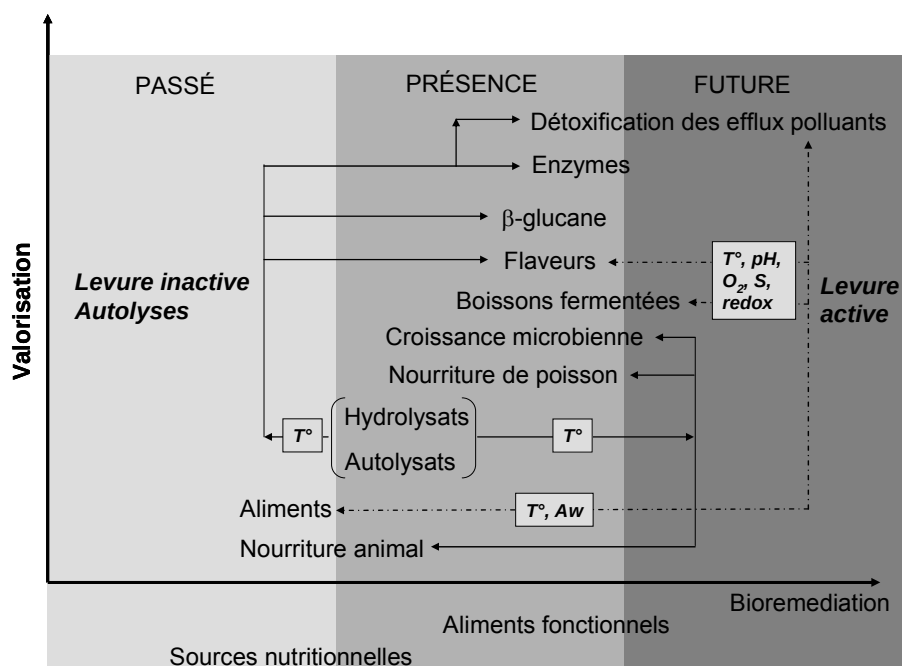


Figure 10 : Schématisation des utilisations de levure et des stress auxquelles les microorganismes sont exposés (adapté de Ferreira, 2009)

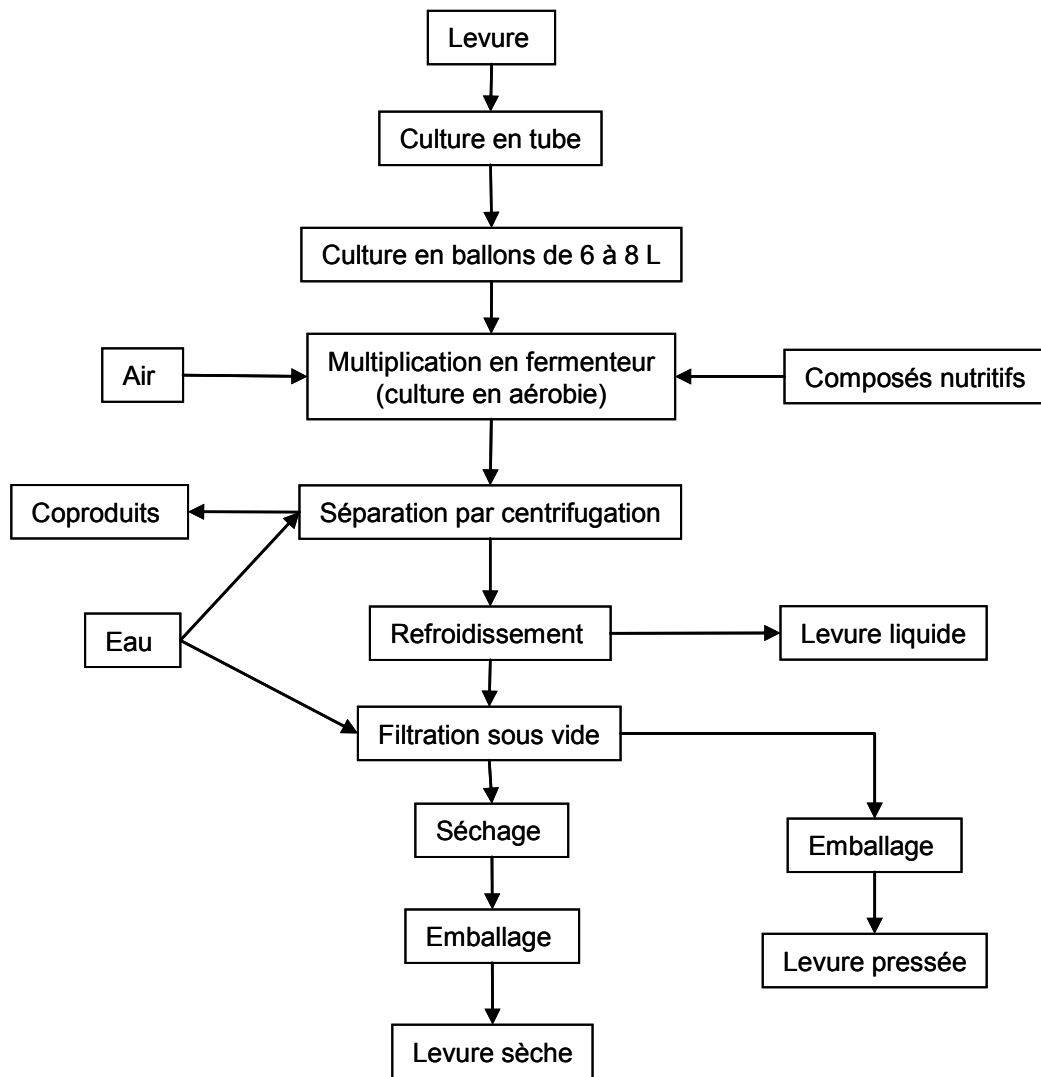


Figure 11 : Schéma d'un processus de production de levure boulangère.

La température, comme elle décide l'état énergétique des mouvements des molécules, est un facteur important pour maintenir la stabilité d'un système. Chaque système possède un domaine de température optimal où se trouve une vraie stabilité. Tout changement qui déplace en dehors de ce domaine conduit à une déstabilisation du système et pour un microorganisme, celle là peut se traduire par de graves conséquences.

Un changement de la température, selon la vitesse, peut être une rampe (changement lent) ou un choc (changement brutal). Ces deux types de changement provoquent un stress chez la cellule. L'effet du choc thermique dépend de la cinétique du stress (Martinez de Maranon *et al.*, 1999). En général, ce stress se traduit tous d'abord au niveau de la membrane et entraîne ensuite des changements dans le plus profond de la cellule (Figure 12).

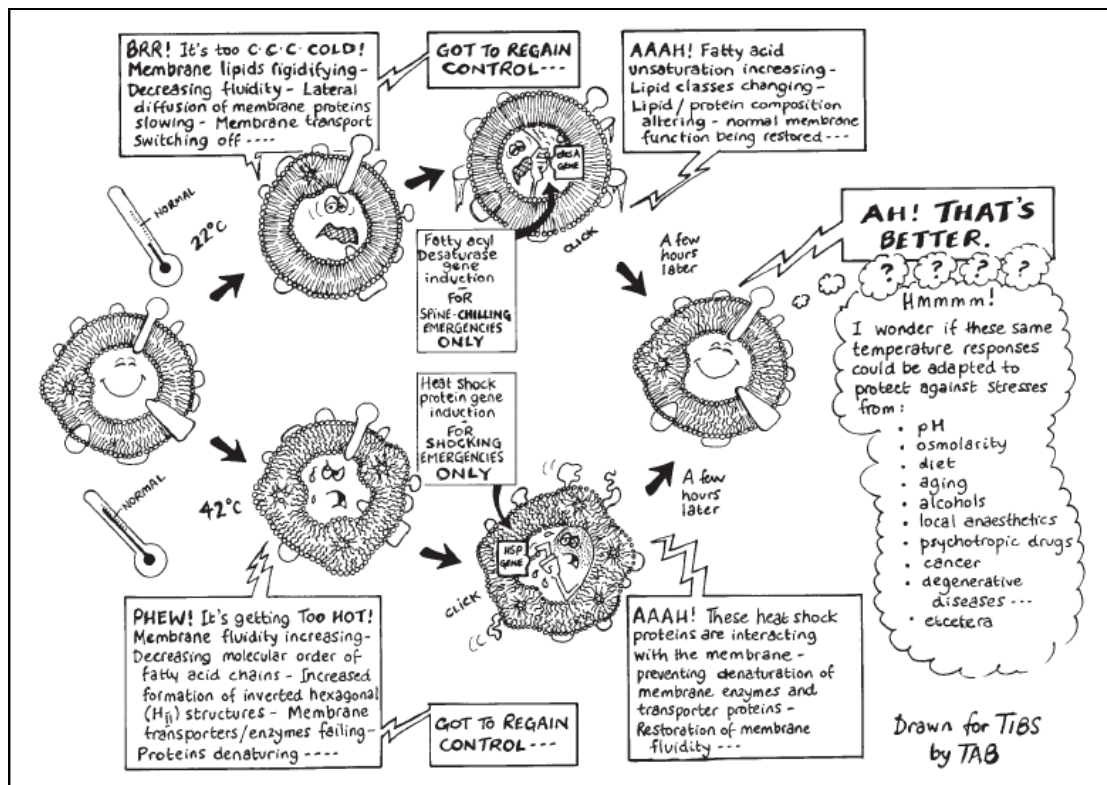


Figure 12 : Schématisation de l'effet de la température et de la réponses de la cellule (Vigh *et al.*, 1998)

Au contraire d'un choc froid, une augmentation de température apporte au système de l'énergie qui augmente les mouvements libres de leurs composants. Dans un premier temps, cette augmentation faciliterait la flexibilité du système donc renforcerait sa stabilité malgré une diminution possible dans l'ordre des lipides. Un tel effet est aussi observé pendant une perturbation causée par des composés hydrophobes comme abordés plus haut.

Plusieurs études ont montré que la fluidité de la membrane cellulaire se modifie avec la température. Une fluidification de la membrane est observée chez *Y. lipolytica* soumise à une température au-dessus la température de croissance cellulaire. Cette diminution en anisotropie est en linéaire avec la température

La perte de l'intégrité membranaire serait la principale cause de mort cellulaire pendant un stress thermique (Bischof *et al.*, 1995). Les membranes interviennent comme barrière physique pour les solutés et permettent de réguler l'utilisation de l'énergie produite par des gradients ioniques transmembranaire. La perturbation de l'intégrité membranaire due à une augmentation de la température induirait un déséquilibre très important dans la physiologie cellulaire. En effet, le contenu ionique et le pH intracellulaire, qui sont attribuées à l'augmentation de la perméabilité de la membrane, peuvent être modifiés par une augmentation de la température. Ces modifications peuvent avoir un effet sur les activités

cellulaires telles que l'activité des ATPases. (Bischof *et al.*, 1995) qui suggèrent que la perte de l'intégrité membranaire des fibroblaste 3T3 dépend à la fois de la température du choc thermique et du temps d'exposition aux fortes températures. La variation de perméabilité au cours du temps montre l'altération continue de la membrane lors de l'exposition des cellules à la haute température.

Par rapport avec variation de l'enthalpie pour une transition liquid - cristallin - gel phase qui est favorisé par le refroidissement, l'enthalpie nécessaire pour la formation de phase hexagonale H_{II} est beaucoup plus faible et il est facilement fourni par la chaleur (Vigh *et al.*, 1998). Une telle formation peut conduire à une transition en phase interdigitée de la membrane (Figure 8) et déstabiliser la membrane.

Il est intéressant que les effets causés par la température et par les composés amphiphiles aient des points similaires comme les deux facteurs jouent sur la structure et la stabilité de la membrane cellulaire. La question posée est : quel est l'effet qu'un pré-stress de cellules par un composé hydrophobe comme l'oléate de méthyle apporte aux cellules en réponse au choc thermique ?

Dans cette partie, nous avons étudié le comportement de *Y. lipolytica* en réponse au stress thermique en fonction de la source de carbone soit glucose soit oléate de méthyle.

Publication 3: A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*.

Appl Microbiol Biotechnol en révision

Thi Minh Ngoc Ta, Lan Cao-Hoang, Morgane Lourdin, Hanh Phan-Thi, Sébastien Goudot, Pierre-André Marechal, Yves Waché

Titre :

Un choc thermique à 50°C provoque la mort cellulaire en différentes manières chez les cellules *Yarrowia lipolytica* ayant poussé sur glucose ou sur oléate de méthyle.

Résumé:

Basé sur les observations qui montrent que choc thermique et choc par les composés amphiphile présentent de similarité, nous avons étudié l'effet de l'oléate de méthyle comme source de carbone sur la réponse de la cellule au choc thermique. Il est montré que les cellules ayant poussé sur oléate sont plus résistantes au choc thermique que les cellules ayant poussé sur glucose. Pourtant, les cellules YNBO perdent leur cultivabilité dans un même cinétique par rapport avec les cellules YPD (plus de 7 log après 18 min par rapport avec 3 log pour les cellules YPO). Malgré cette différence, les cellules ayant poussé sur oléate expriment de similaires comportements : (i) perte de la capacité de former de colonies à 27°C, (ii) perte de l'intégrité membranaire et (iii) lyse (observé pour quelques cellules YNBO). Les cellules ayant poussé sur glucose ont de membrane moins fluide qui devient rigide après la rampe, perdent rapidement leur activité cellulaire, leur ADN n'est pas marqué par les sondes spécifiques, et lysent rapidement quand elles sont retournées à la température ambiante. Les LB impliquent différemment pendant la rampe. Il est probable que les LB coalescent avec la membrane nucléaire chez les cellules YPD. Quant aux cellules ayant poussé sur lipide, les LB coalescent et forment de gros globules qui seraient ensuite libérés dans le milieu. Il est aussi observé mais rarement que les LB de cellules YPO se divisent en formant de petites gouttelettes qui chargent toute la volume cellulaire. Les résultats montrent aussi que choc thermique peut démarrer un mort cellulaire programmé chez les cellules ayant poussé sur glucose et un mort de type nécros chez les cellules ayant poussé sur oléate de méthyle.

Mots clé : rampe, intégrité membranaire, fluidité membranaire, fluorescence, *Y. lipolytica*, mort cellulaire programmé, lipide, oléate.

A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*.

Thi Minh Ngoc Ta^{1,*}, Lan Cao-Hoang^{1,2,*}, Morgane Lourdin¹, Hanh Phan-Thi¹, Sébastien Goudot¹, Pierre-André Marechal¹, Yves Waché^{1,**}

¹Laboratory GPMA, IFR92, Université de Bourgogne & AgroSup Dijon, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France, ²Laboratory of Post-harvest Technology, Institute of Biological and Food Technology, Hanoi University of Technology, 1 Dai Co Viet Road, Hanoi, Vietnam.

*: Ta and Cao-Hoang contributed equally to this work.

**: corresponding author: ywache@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

Based on the observation that shocks provoked by heat or amphiphilic compounds present some similarities, this work aims at studying whether cells grown on oleate (amphiphilic pre-stress) acquire a tolerance to heat-shock. Changing glucose for oleate significantly enhanced the cell resistance to the shock, however, cells grown on a minimal oleate-medium lost their ability to grow on agar with the same kinetic with glucose-grown cells (more than 7 log decrease in 18 min compared to 3 log for oleate-grown cells). Despite this difference in kinetics, the sequence of events was similar for oleate-grown cells maintained at 50°C with a (i) loss of ability to form colonies at 27°C, (ii) loss of membrane integrity and (iii) lysis (observed only for some minimal-oleate-grown cells). Glucose-grown cells had less fluid membranes, they were rapidly inactivated but 90% of these cells had their DNA which was poorly stainable by DNA-specific cationic fluorescent probes but became stainable by hydrophobic ones and they underwent dramatic increase in membrane viscosity. Lipid-bodies evolved differently during the heat-shock. In glucose-grown cells, they seemed to coalesce with the nuclear membrane whereas for oleate-grown cells, they coalesced together forming big droplets which could be released in the medium. In some rare cases of oleate-grown cells, lipid-bodies were fragmented and occupied all the cell volume. These results show that heat triggers programmed-cell-death with uncommon hallmarks for glucose-grown cells and necrosis for methyl-oleate-grown cells.

Keywords: heat, membrane integrity, membrane fluidity, fluorescence, *Yarrowia lipolytica*, programmed cell death, lipid, oleate.

INTRODUCTION

Understanding the sequence of events resulting in cell death after a heat-shock is, as all questions concerning the life and death of cells, an important concern of modern biology. It is of particular interest in microbiology, field in which the incomplete inactivation of pathogens or other contaminants results in health and industrial problems. The resistance of cells to an increase in temperature depends to a large extent on the physiological state of the cell and on the subsequent physiological response. In eukaryotic cells, the response to heat stress is relatively conserved from yeast to mammals (Jenkins, 2003). This includes, among others, the production of heat shock proteins, the accumulation of trehalose, a heat-induced transient G0/G1 cell cycle arrest and the sphingosine activation of an ubiquitin protein degradation pathway. A major impact of temperature is the denaturation and aggregation of proteins which accumulate, saturating the ubiquitin- and proteasome-degradation systems (Riezman, 2004). In some cases, heat triggers an apoptotic response. The occurrence of such a reaction is common and well documented for multicellular organisms but less defined for unicellular cells (Madeo *et al.*, 2004), even though heat is a common mean to induce the economically important yeast autolysis. In these processes, yeasts are usually heated to 40 to 60°C which induces the production of autolysis enzymes that are active at this temperature, provoking a slow lysis which usually takes several days for completion (Akin & Murphy, 1981; Chao *et al.*, 1980).

The plasma membrane plays an important role in the response to heat-shock. Important modifications take place in this structure in response to heat (eg: synthesis of sphingolipids (Jenkins, 2003) which can include modification of the level of sterols (Gaspar *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2004)). In a physical point of view, the plasma membrane has to keep its role of selective barrier at a temperature which can cause a fluidisation of the membrane lipid phase, an increased diffusion of solutes such as protons through the lipid bilayer, inactivation of transport proteins and the subsequent alteration of energetic gradients (Tolner *et al.*, 1997; van de Vossenberg *et al.*, 1999). Interestingly, taken globally, the effect of temperature on membranes presents some similarities with the effect of lipids. Lipids present in the cell environment will accumulate in the membrane bilayer causing thereby structural and physicochemical changes (Weber & de Bont, 1996b). In particular and depending on their own structure, they will alter the membrane fluidity or phase transition temperature, the permeability and, as a result of structural changes, the activity of enzymes embedded into the bilayer. The effect on cell physiology depends on the structure of the considered lipids. Lipids possessing one polar end will be easily incorporated into the membrane, whereas compounds

possessing more polar groups will be extracted by membranes depending on the size and arrangement of the apolar and polar regions (Subczynski & Wisniewska, 2000). Moreover, depending on the chain length and location of the compound in the bilayer, they will exhibit a very different toxic effect. Short-chain monopolar compounds will localise in the polar head region and this will change the balance between the apolar centre and the polar edge of the bilayer, causing a destabilisation of the membrane whereas long-chain compounds will change the membrane fluidity without perturbing the general arrangement of the membrane (Aguedo *et al.*, 2002b; Aguedo *et al.*, 2003c; Aguedo *et al.*, 2003d; Weber & de Bont, 1996b). Similarities between heat and chemical shocks have already been observed concerning the response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol (Piper, 1995). However, a major difference between long-chain lipids and ethanol is the catabolisation of these substrates. Cells growing in presence of oleate are submitted to a fluidising stress due to the incorporation of oleate molecules into the membrane but they manage this stress and are able to grow on this substrate.

The aim of the present study is to investigate whether the impact of a temperature shift is the same for cells grown on oleate than for cells grown on glucose. The focus will particularly be on the membrane by monitoring its integrity, fluidity and energetic as well as on the ability to form colonies on the reducing capacity, and on cell damages.

MATERIALS AND METHODS

Strain, media and culture conditions.

The strain *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460; CLIB89) was cultured in YPDA medium (yeast extract 10 g L⁻¹, peptone 20 g L⁻¹, glucose 20 g L⁻¹, Agar 15 g L⁻¹) at 27°C for 48 h. After this culture, cells were used to inoculate ($A_{600}=0.25$ corresponding to 6.5×10^6 cells mL⁻¹) various liquid media: YPD (YPDA without agar), YPO (YPD with glucose replaced by methyl oleate 5 g L⁻¹ and Tween 80 0.2 g L⁻¹) or YNBO (yeast nitrogen base 6.7 g L⁻¹, methyl oleate 5 g L⁻¹, Tween 80 0.2 g L⁻¹) and grown at 27°C, 140 rpm in baffled Erlenmeyer flasks as described earlier (Groguein *et al.*, 2004; Wache *et al.*, 2000; Wache *et al.*, 2001). Cells were harvested in the mid-logarithmic growth phase (19 h for YPD, 24 h for YNBO and YPO) and washed twice in phosphate buffer (PBS) pH 5.6 25 mM and finally resuspended to $A_{600}=0.7$ in PBS. Methyl oleate was chosen as the source of lipids as it is the lipid source the most commonly used for lipid metabolism studies and Tween 80 as it is efficient to emulsion methyl oleate and as it does not bring other lipidic moieties to the medium than oleate moieties.

Heat treatment.

Cell suspensions at $A_{600}=0.7$ in PBS buffer (about 2×10^7 cells mL^{-1}) were shifted from 27°C to 50°C at 2°C min^{-1} and maintained at 50°C . The treated cells were harvested and cooled to room temperature after different times for monitoring of cell number, colony forming ability and fluorescent staining.

Reducing capacity evaluation by methylene blue and ability to form colonies by the CFU method.

The cell suspension was mixed with an equal volume of methylene blue and incubated for 5 min at room temperature then visualised and counted using a Malassez cell under light microscopy (Aguedo *et al.*, 2004b). Non-coloured cells were still possessing a reducing capacity whereas cells coloured in blue were considered as having lost this property. For CFU, successive decimal dilutions of cellular suspensions were plated on YPDA and YNBGA (YNB 6.7 g L^{-1} , glucose 20 g L^{-1} , agar-agar 15 g L^{-1}) and colonies were counted after 2 days of culture at 27°C .

Fluorescent evaluation of membrane integrity, membrane energetic, DNA and lipid bodies staining.

Cells were exposed to lactone in phosphate buffer (PBS) (20 mM , $\text{pH } 5.6$, $A_{600}=2.0$) for 60 min then washed twice and resuspended in the same buffer and adjusted to $A_{600}=0.7$ for fluorescent staining. The membrane integrity marker Propidium Iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was prepared at $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ in distilled water; a working concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used. This fluorescent probe stains the DNA of the cells that lost their membrane integrity (Deere *et al.*, 1998). In the case of bis-oxonol (BOX), a hydrophobic fluorophore for membrane potential, marker of the cell membrane energetic state, the stock solution was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) at 1 mg mL^{-1} ; the working solution was $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lipid bodies were observed after Nile Red (NR) staining (Sigma-Aldrich). NR was prepared in acetone solution at a stock concentration of 1 mg mL^{-1} and used at a concentration of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. DNA staining was evaluated using Acridine Orange (AO) with stock solution in distilled water at 5 mg mL^{-1} and used at a concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ or DAPI (stock solution in distilled water at 1 mg mL^{-1}). The observations were made using a multispectral confocal microscopy Eclipse TE 2000E, Nikon, with He/Ar laser multiraies system. Excitation wavelengths were 561 nm for PI and NR, 514 for BOX and AO respectively. The images were visualised and taken using software EZ-C1 version 3.50.

Fluidity evaluation.

The fluidity of lipid phases was evaluated through the fluorescent anisotropy using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), probe of the hydrophobic core of the membranes, and its trimethyl ammonium derivative (TMA-DPH), which has a positively charged amino group anchoring the compound at the membrane surface in contact with the water. The probe was prepared in dimethylformamide at a stock concentration of 1 mM and conserved at -20°C. The cell suspension was prepared as described above but resuspended to a lower concentration ($A_{600}=0.6$). After addition of 2 μ l of the fluorescent probe at 1 mM into 3 mL cell suspension, the sample was placed in a thermostated chamber, protected from light, at 27°C and stirred. The measurements were made with a Jobin Yvon-Horiba model Fluorolog 3 spectrofluorometer. The excitation wavelength was set to 360 nm and the emission to 450 nm. The measured fluorescence intensities were corrected for background fluorescence and light scattering from the unlabelled samples. Fluorescence anisotropy (r) was calculated as follows:

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH}), G = I_{HV} / I_{HH}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the fluorescence intensities determined at vertical and horizontal orientations of the emission polarizer when the excitation polarizer is set in the vertical position. This applies similarly for I_{HV} and I_{HH} with the horizontal excitation polarizer. G is a correction factor for background fluorescence and light scattering (Aguedo *et al.*, 2003d; Ouvry *et al.*, 2002)

Membrane fluidity was also evaluated by measuring fluorescence generalized polarization of 2-dimethylamino-6-lauroyl-naphthalene (Laurdan) (Sigma). Laurdan fluorescence emission spectra were recorded in the range from 400 nm to 550 nm, using both 350 nm and 390 nm excitation wavelengths, whereas the fluorescence excitation spectra were obtained in the range from 320 nm to 420 nm, using both 440 nm and 490 nm emission wavelengths. Generalised polarisation (GP) was calculated by the following formula:

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

where I_{440} , I_{490} are the intensities measured, at each excitation wavelength (from 320 nm to 420 nm), on the fluorescence excitation spectra obtained by fixed emission wavelength of 440 nm and 490 nm, respectively. The membrane fluidity was evaluated as the GP value obtained at 350 nm.

RESULTS

Loss of ability to grow on agar plates affects primarily cells grown on glucose

After the heat shift to 50°C, the cells grown on YPD, YPO or YNBO were counted and observed on a Malassez cell to monitor the evolution from the initial number (2×10^7 cells mL⁻¹). The number of cells grown on glucose (YPD) increased of about 17% during the 12 min of the temperature shift (from 27°C to 50°C at 2°C min⁻¹) and then decreased to its initial value and remained constant for at least three hours (results not shown). It can be noted that cells undergoing the temperature shift had been harvested in log growing phase and many cells were observed with their daughter cell attached to their surface even after a 3 h-incubation at 50°C, showing no shift to the G0 cell cycle stage. For cells grown on oleate, cell counts did not significantly change during the 3 h at 50°C for cells grown on the rich YPO whereas the number of cells grown on the minimal YNBO medium decreased as early as during the temperature shift (13% reduction compared to the initial number of cells when the temperature reached 50°C) and continued to decrease afterwards (about 20% reduction after 3 h at 50°C). For oleate-grown cells also, association between mother and daughter cells was still observable after 3 h (but in a lesser extent than for glucose grown cells) (Fig 5D).

The ability of cells to form colonies on agar media is a classical way to evaluate the physiological state of microorganisms as cells in a state of quiescence, death or too much damaged cannot grow. To evaluate the effect of the heat-shock on this property, the number of cells able to form colonies during the heat treatment (CFU) was monitored on rich (YPDA) and minimal (YNBGA) glucose agar media (Fig 1A). Results were similar regardless of the recovery medium. Cells grown on glucose or minimal oleate medium behaved similarly with about 30-40% loss of ability to form colonies when reaching 50°C and no more detectable colony after 18 min at this temperature. YPO cells were less perturbed by the heat shock and the decline in the number of colony forming unit was of 3 logs after 18 min and no more colony was observed after 120 min.

Shift in temperature provokes a loss of membrane integrity and structural changes

To get further inside the mechanisms explaining the difference observed at the cellular level depending on the carbon source, the behaviour of probes reporting the state of the membrane was investigated. To evaluate whether the loss of ability to grow was due to membrane damages, the membrane integrity probe propidium iodide was used. This nucleic acid marker compound possessing two positive charges becomes membrane permeant only if membranes are damaged and have lost their integrity (Cao-Hoang *et al.*, 2008a). The number of cells stained with PI is shown on Fig 1B. For glucose-grown cells, only 5% of the cells

were stained by PI after 3 h-incubation at 50°C whereas all lipid-grown cells were stained by PI after 3 h. The membrane integrity loss began after 18 minutes for lipid minimal medium and after 80 min for YPO-grown cells. For both cultures, this period corresponds to the time of complete loss of cultivability, showing for oleate-grown cells a good correlation between the loss of membrane integrity and the loss of cultivability. To explain why glucose-grown cells were not stained by PI despite their loss of cultivability, cells were observed in confocal microscopy after staining with PI (Fig 1C) and, as controls for DNA staining, with other DNA intercalating agent such as DAPI and Acridine orange. These observations showed that beside the 5% cells that were normally stained by PI, the other cells were actually marked by these probes and that PI entered almost all the cells after only 18 min at 50°C. However, the staining was very low and appeared only in some spots, suggesting that either DNA had partially lost its stainability and that only small fragments were stainable or PI could only slightly cross membranes (Fig 1C). A further staining was carried out with bis-oxonol. This anionic lipophilic compound behaves similarly to Nile red, staining membranes and lipid bodies in the cell in absence of electrostatic repulsion. For YPD grown cells maintained at 50°C, a difference appeared in the staining by these two probes as BOX coloured more the cell nucleus (Fig 2). This nuclear staining was not observed for oleate-grown cells (results not shown).

Another relatively non-permeant probe was used to better define the impact of the heat stress on the cells: methylene blue. This probe is classically used to discriminate between non-coloured cells actively reducing methylene blue and cells coloured in blue by the probe. Surprisingly, although this probe can stain *Y. lipolytica* cells after various stresses (Aguedo *et al.*, 2004b), Ta et al. 2010), the amount of cells stained after the heat-shock was very low: about 10% for YPD cells after 3 h and less than 1% for oleate-grown cells (results not shown). It can be noted that for dividing cells, the proportion of daughter cells stained by methylene blue or propidium iodide was far higher than average while the mother cells were not stained (results not shown).

The energetic state of the cell membranes was also investigated with the membrane potential probe bis-oxonol. This compound stained cells from the beginning of the time at 50°C regardless of the culture medium. Actually, unshocked cells possessed a coloured envelope (Fig 3) and after the temperature shift, all the lipid-rich parts of the YPD-grown cells were marked such as mitochondria or various membranes suggesting that cells had lost both the plasma membrane gradient but also the mitochondrial energy. For oleate-grown cells, mitochondria were not observable.

Membrane fluidity probes reveal different membrane structures depending on the substrate

As the kinetics of loss of membrane integrity depended on the culture medium, we focussed on the membrane fluidity. To investigate this parameter we used the apolar DPH and the monopolar TMA-DPH (Fig 4). DPH has an affinity for all lipid phases of the cells and diffuses easily through membranes. When localised in a membrane, its fluorescence anisotropy accounts for the apolar part in the centre of the lipid bilayer. TMA-DPH is a derivative of DPH which possesses a cationic group anchoring the compound at the polar head end of the membrane bilayer and decreasing its diffusivity across membranes. In a membrane, its fluorescence anisotropy will account for the fluidity of the membrane less in depth than DPH (Kaiser & London, 1998; Pebay-Peyroula *et al.*, 1994) and the fact that it is anchored on the polar head layer decreases the global movement of the compound. For both probes, the ratio of the fluorescence anisotropy for lipid grown cells was lower than for glucose grown cells, showing that the probes were located in a more fluidic phase. Despite the difference of initial value, the effect of temperature on the variation of fluorescence anisotropy was equivalent for cells grown on the various media (Fig 4A, 4B). Interestingly, this effect was very low for the polar TMA-DPH suggesting that the ordered part of the membrane at the polar end was much less sensitive to temperature than the less ordered part inside the hydrophobic core of the membrane (Fig 4A, 4B). From this result showing a low modification of the membrane surface in response to the heat-shift, it seemed interesting to evaluate fluidity with another probe anchored to the membrane surface. Laurdan, a monopolar probe responding, in addition to the fluidity of the environment, to its polarity was chosen (Fig 4C). Surprisingly, the response of the probe was comparable to that of DPH with a marked phase variation for glucose-grown cells and to that of TMA-DPH with only a slight change with temperature with YNBO-cells. Notably, the Generalised polarisation was similar at the growth temperature regardless of the culture medium (GP around 0.35 at 27°C).

Holding cells at 50°C triggers a rigidification of the DPH environment for glucose-grown cells

It is also particularly interesting to note that the DPH-fluorescence anisotropy of cells grown on YPD continued to increase when the cells were maintained at 50°C (Fig. 5), whereas it was stable for lipid-grown cells. This shows a dynamic modification of the environment of the probe in stable conditions of temperature suggesting either an increase in the membrane rigidity or a migration of the probe to a highly rigid phase. For DPH, CLSM

coupled with spectral analysis showed clearly that the probe was in the plasma membrane after incorporation (results not shown).

Heat-shock stimulates the coalescence of lipid-bodies or, in some cases, their fragmentation

Y. lipolytica is oleaginous yeast which stores lipids in lipid bodies inside the cell. The observation of the changes in the structure of these droplets during the heat shock could inform us on the physiological state of the cells. During log-phase, there are normally about two or three small lipid bodies inside the cells grown on glucose, three or four medium-sized lipid bodies in cells grown on minimal oleate medium and more than four big droplets for cells grown on YPO (Fig 6). The effect of the temperature shift on the lipid bodies' structure was almost not detectable for cells grown on glucose but a modification of the localisation occurred and, after the shift, these particles were seen in the neighbourhood of the nuclear membrane (Fig 6). For oleate-grown cells, the modification of the structure of the lipid bodies was notable. For cells grown on both oleate-media, the number of lipid bodies inside the cells decreased after 1 h to 3 h but the size of the remaining droplets grew after that time showing that the lipid particles coalesced inside the cells (Fig 6B, 6C). Moreover, for YNBO-grown cells, cell lysis resulted in the liberation of lipid bodies (and of the numerous lipid droplets adsorbed on the cell surface after growth in this medium) in the environment (Fig. 6B). We observed also for some YPO-grown cells an drastic fragmentation of the lipid bodies resulting in some cases in the covering of all the cell area by lipid aggregates (Fig. 6D).

DISCUSSION

The impact of growth in the presence of amphiphilic or hydrophobic compounds on the cell response to stresses has not been much investigated. Although long-chain monopolar compounds are usually not toxic, they are extracted by membranes and perturb their structure and homeoviscosity (Weber & de Bont, 1996b). Our results highlight this point as the fluorescence anisotropy of DPH and TMA-DPH was significantly lower for cells grown on oleate. In correlation with this observation, the staining by PI of heat-shocked oleate-grown cells was much higher, suggesting that the high fluidity could decrease membrane integrity. However, after careful observation of glucose-grown cells, it could be established that these cells had lost their membrane integrity (maybe only very partially) before oleate-grown cells. We investigated then whether beside the global fluidity, a relationship could be established between this earlier loss of integrity and the membrane structure. The fluidity of oleate-grown cells reflects probably the presence of oleate embedded in the membrane which modifies the

structure of the bilayer. As methyl oleate fluidises both the hydrophobic core and the polar ordered part of the membrane, it is likely that the carboxylate-end anchors the compound in the phospholipid polar head part while the acyl-chain is embedded inside the apolar part. However, although the fluidity of the polar part is enhanced, the structure is not completely changed if we consider the rather low effect of the temperature shift on the fluidity of this region for both glucose- and oleate-grown cells. We can suppose that the methyl oleate orientation, between the polar group and the *cis* double bond of the molecule, is more or less normal to the membrane surface, perturbing thus fluidity but not the global order of the membrane polar edge. To investigate more in depth this effect, we used laurdan as a polar lipophilic probe reflecting membrane fluidity near the membrane surface but also, through a dependence of fluorescence to polarity, the interface state. Interestingly, this probe exhibited a rather different behaviour depending on the culture medium. A phase transition was notable with glucose- but not with oleate-grown cells. It can be assumed that the membrane interface is differently organised depending on the culture medium especially at the polar interface but it is also possible that, as a result from this different structure, laurdan locates more or less in depth. In that case, laurdan would be more in depth in a region undergoing a notable phase transition with an interface composed almost exclusively of phospholipids whereas, in the presence of oleate, it would be more in the surface of the membrane in the region less sensitive to the heat shift. These structural differences at the edge of membranes might result in differences in the membrane permeabilisation upon treatments. We have suggested that this modification could be caused by the incorporation of oleate into the bilayer but it is also possibly due to the cell adaptation to oleate involving a change in the membrane composition. For instance, we observed that, beside modification of cell envelope properties (Aguedo *et al.*, 2003e), cells grown on oleate possess more ergosterol than those grown on glucose (Ta et al, 2010).

Despite some similarities in the kinetics of permeabilisation of the membrane and of loss of cultivability of YPD and YNBO cells, fundamental differences were observed. For instance, for YPD cells maintained at 50°C, DNA was poorly stained by propidium iodide (95% of the cells). Stainability by PI is not only used to evaluate cell death but also apoptosis. Apoptotic cells undergo normally hyperchromicity, however, there are different stages as early apoptotic cells are only slightly fluorescent and the hyperchromicity appears only at the final stages (Bedner *et al.*, 1999). In our study, no PI hyperchromicity was observed even after long periods and it is rather unlikely that cells could stay at the early stage of programmed cell death (PCD) for so long. It seems more likely that this low staining observed for three DNA

intercalating probes could be explained by changes in the structure of DNA. Differential staining depending on the chromatin condensation has already been observed for human cells and the authors postulated that these differences could be due to differences in the in situ accessibility of DNA to PI (Bedner *et al.*, 1997). Interestingly the nucleus of heat-shocked YPD cells that was not stainable by the cationic PI became stainable by the anionic and hydrophobic Bis-oxonol and, to a lesser extent, by the uncharged hydrophobic Nile red. This suggests that the modifications of the chromatin structure perturbing DNA stainability are related to hydrophobicity and electrostatic changes. Another specificity of glucose-grown cells was the dramatic increase in membrane fluidity when exposed to 50°C. Such a phenomenon has already been reported for apoptotic human cells (Artwohl *et al.*, 2008) and could be related to the production of membrane degrading-reactive oxygen species as proposed by (Feng & Zhang, 2004).

After a long period in which apoptosis was considered as restricted to higher eukaryotic cells, many examples of PCD were observed in yeast with induction by several sources (Buttner *et al.*, 2006; Madeo *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 2004). However, contrasting with mammals, the induction of apoptosis by heat in yeast is less known, particularly the pathway of cell response. Although the first mention of an apoptosis-like process in yeast was related to a temperature modification, this concerned a sublethal temperature and a mutant strain (Madeo *et al.*, 1997). From that report, heat-shock was not mentioned as a cause of apoptosis-like process in wild-type yeast. The interest of cellular suicide for a pluricellular organism is well understood but it seems often less obvious for unicellular organisms. In the evolution of a population, a character can be selected if it brings an improvement to the population. PCD can favour the survival of non-damaged cells, increase genetic diversity through meiotic recombination and trigger genetic variation for adaptation of continuously changing conditions (Buttner *et al.*, 2006). In our conditions, 5 to 10% of the glucose-grown cells did not undergo the PCD process but even so they did not exhibit significantly longer cultivability. Cells grown on oleate survived longer and did not undergo apparent PCD. The presence of lipids appears to inhibit the PCD process. With the big lipid bodies occupying the cell volume, it could be possible that these structures would play a role in the response to the heat shock. For glucose-grown cells, lipid bodies were found close to the nuclear membrane after the shift. In oleate grown cells, no such a movement was observed but lipid bodies coalesced giving a limited number of huge lipid bodies inside cells. In rare cases, spectacular lipid bodies' fragmentation was observed suggesting that lipid bodies possessing cells could also undergo PCD. It seems thus more likely that the lipid metabolism acts as a repressor of

PCD and such a hypothesis is currently under investigation. The effect of the carbon source on apoptosis has already been observed in response to aspirin but the presence of lipids was not investigated (Balzan *et al.*, 2004). The factor inhibiting PCD for oleate-grown cells remains to be found. For human cells, the inhibiting effect of ceramid protein kinase has been observed (Gómez-Muñoz *et al.*, 2005) and the regulation of ceramid by lipids is likely.

In conclusion, the presence of oleate in the medium perturbs the membrane of yeast cells and induces the presence of lipid bodies. Despite these structural modifications, lipid-grown cells are more resistant to the heat-shock than glucose grown cells. This study reports that heat-shock at lethal temperature can induce a programmed cell death process in yeast but that this process appears to be inhibited by oleate. It also highlights a very unusual DNA change resulting in the absence of staining by cationic DNA-specific probes but in the staining of nucleus by the anionic Bis-oxonol.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded by the French Agency for Research (ANR, programme Transaronat). Ta was granted by the French Ministry For Research (MESR) and Phan-Thi by the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). An important part of the work was carried out in the Spectral Imaging Plateform of IFR 92. The authors are thankful to Christine Bernard-Rojas for technical help.

REFERENCES

- Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin J-M and Gervais P (2002) Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnol Lett* 24:1975-1979
- Aguedo M, Beney L, Wache Y and Belin JM (2003a) Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. *Int J Food Microbiol* 80:211-215
- Aguedo M, Beney L, Wache Y and Belin JM (2003b) Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* 94:258-265
- Aguedo M, Wache Y, Mazoyer V, Sequeira-Le Grand A and Belin JM (2003c) Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J Agric Food Chem* 51:3007-3011
- Aguedo M, Waché Y, Coste F, Husson F and Belin J-M (2004) Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Catal* 29:31-36
- Akin C and Murphy RM (1981) Method for accelerating autolysis of yeast US Patent 4285976
- Artwohl M, Lindenmair A, Sexl V, Maier C, Rainer G, Freudenthaler A, Huttary N, Wolzt M, Nowotny P, Luger A and Baumgartner-Parzer SM (2008) Different mechanisms of saturated versus polyunsaturated FFA-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Lipid Res* 49:2627-2640

Balzan R, Sapienza K, Galea DR, Vassallo N, Frey H and Bannister WH (2004) Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* 150:109-115

Bedner E, Burfeind P, Gorczyca W, Melamed MR and Darzynkiewicz Z (1997) Laser scanning cytometry distinguishes lymphocytes, monocytes, and granulocytes by differences in their chromatin structure. *Cytometry* 29:191-196

Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR and Darzynkiewicz Z (1999) Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35:181-195

Buttner S, Eisenberg T, Herker E, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G and Madeo F (2006) Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* 175:521-525

Cao-Hoang L, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P and Wache Y (2008) Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol J* 3:890-903

Chao KC, McCarthy EF and Mcconaghy GA (1980) Yeast autolysis process US Patent 4218481

Deere D, Shen J, Vesey G, Bell P, Bissinger P and Veal D (1998) Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* 14:147-160

Feng Z and Zhang J-t (2004) Protective effect of melatonin on [beta]-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 37:1790-1801

Gaspar ML, Jesch SA, Viswanatha R, Antosh AL, Brown WJ, Kohlwein SD and Henry SA (2008) A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *J Biol Chem* 283:25735-25751

Gómez-Muñoz A, Kong JY, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, González M, Eivemark S, Salh B, Duronio V and Steinbrecher UP (2005) Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett* 579:3744-3750

Groguen A, Waché Y, Garcia EE, Aguedo M, Husson F, LeDall M-T, Nicaud J-M and Belin J-M (2004) Genetic engineering of the beta-oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. *J Mol Catal* 28:75-79

Jenkins GM (2003) The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. *Cell Mol Life Sci* 60:701-710

Jones DL, Petty J, Hoyle DC, Hayes A, Oliver SG, Riba-Garcia I, Gaskell SJ and Stateva L (2004) Genome-Wide Analysis of the Effects of Heat Shock on a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant With a Constitutively Activated cAMP-Dependent Pathway. *Comp Funct Genomics* 5:419-431

Kaiser RD and London E (1998) Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37:8180-8190

Madeo F, Frohlich E and Frohlich KU (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139:729-734

Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T and Frohlich KU (2004) Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7:655-660

Ouvry A, Waché Y, Tourdot-Maréchal R, Diviès C and Cachon R (2002) Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 214:257-261

Pebay-Peyroula E, Dufourc EJ and Szabo AG (1994) Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophys Chem* 53:45-56

Piper PW (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134:121-127

Riezman H (2004) Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* 3:61-63

Subczynski WK and Wisniewska A (2000) Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim Pol* 47:613-625

Ta TMN, Cao-Hoang L, Phan-Thi H, Tran HD, Souffou N, Gresti J, Marechal PA, Cavin JF, Waché Y (2010) New insights into the effect of medium chain length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI: 10.1007/s00253-010-2560-0

Tolner B, Poolman B and Konings WN (1997) Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118:423-428

van de Vossenberg JL, Driessen AJ, da Costa MS and Konings WN (1999) Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochim Biophys Acta* 1419:97-104

Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud JM and Belin JM (2001) Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67:5700-5704

Waché Y, Laroche C, Bergmark K, Moller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall MT, Wang H, Nicaud JM and Belin JM (2000) Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66:1233-1236

Weber FJ and de Bont JA (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* 1286:225-245

Figure and table legends

Fig. 1 Cell cultivability (A) and PI marked cells (%) evolution (B) during the shift and maintain at 50°C. (C) Staining of YPD-grown cells with propidium iodide after different time at 50°C (to identify cells, the cell wall is also stained with calcofluor): (a) 17 min, (b) 4h, (c) 5 h and comparison with a reference observation of a PI-stained cell (d). Bar: 1 μ m. (□) YPD; (■) YPO; (▲) YNBO

Fig 2. Staining of YPD-grown cells with nile red (a) and bis-oxonol (b) after 2h at 50°C: Bar: 1 μ m. Continuous spears show nucleus, dash spears show mitochondria

Fig 3. Staining of YPD-grown cells with bis-oxonol after different times at 50°C: (a) before temperature shift, (b) arrived at 50°C, (c) after 2 h, (d) 4 h and an example of BOX staining after a lactone shock (e). Bar: 1 μ m. Continuous spears show LBs, dash spears show mitochondria.

Fig. 4 Effect of temperature on membrane fluidity as evaluated using fluorescent probes: (A) TMA-DPH; (B) DPH; (C) Laurdan (□) YPD; (■) YPO; (▲) YNBO

Fig. 5 Membrane fluidity evaluation during temperature shift and holding at 50°C using DPH: (A) YPD, (B) YPO

Fig. 6 Evolution of lipids bodies during temperature shift and holding at 50°C. (A) YPD, (B) YNBO, (C, D) YPO. Small letters refer to time holding at 50°C: (a) before the shift, (b) arrived at 50°C, (c) 1 h, (d) 2 h, (e) 3 h (see scheme at the bottom right of the figure). Continuous spears show LBs and the dash spear shows nuclear membrane. To facilitate observation, cells were marked with Calcofluor in some cases.

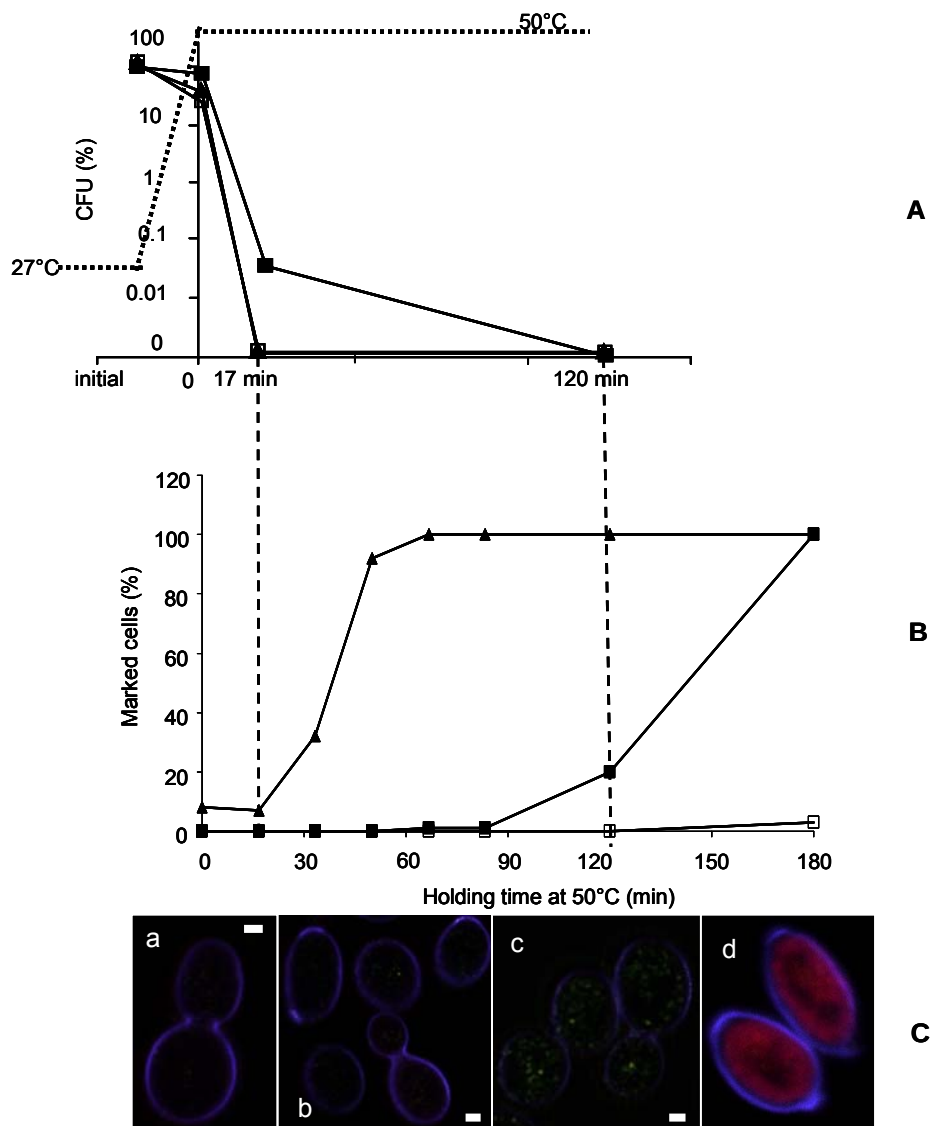


Fig. 1 Cell cultivability (A) and PI marked cells (%) evolution (B) during the shift and maintain at 50°C. (C) Staining of YPD-grown cells with propidium iodide after different time at 50°C (to identify cells, the cell wall is also stained with calcofluor): (a) 17 min, (b) 4h, (c) 5 h and comparison with a reference observation of a PI-stained cell (d). Bar: 1 μ m. (□) YPD; (■) YPO; (▲) YNBO

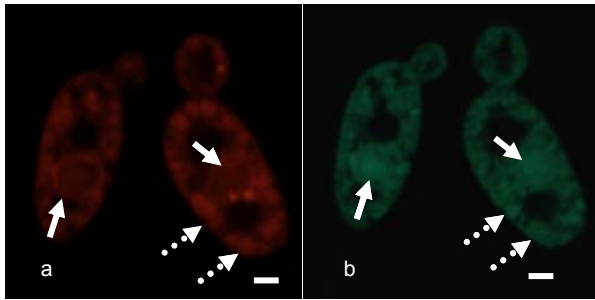


Fig 2. Staining of YPD-grown cells with Nile red (a) and bis-oxonol (b) after 2h at 50°C: Bar: 1 μ m. Continuous spears show nucleus, dash spears show mitochondria

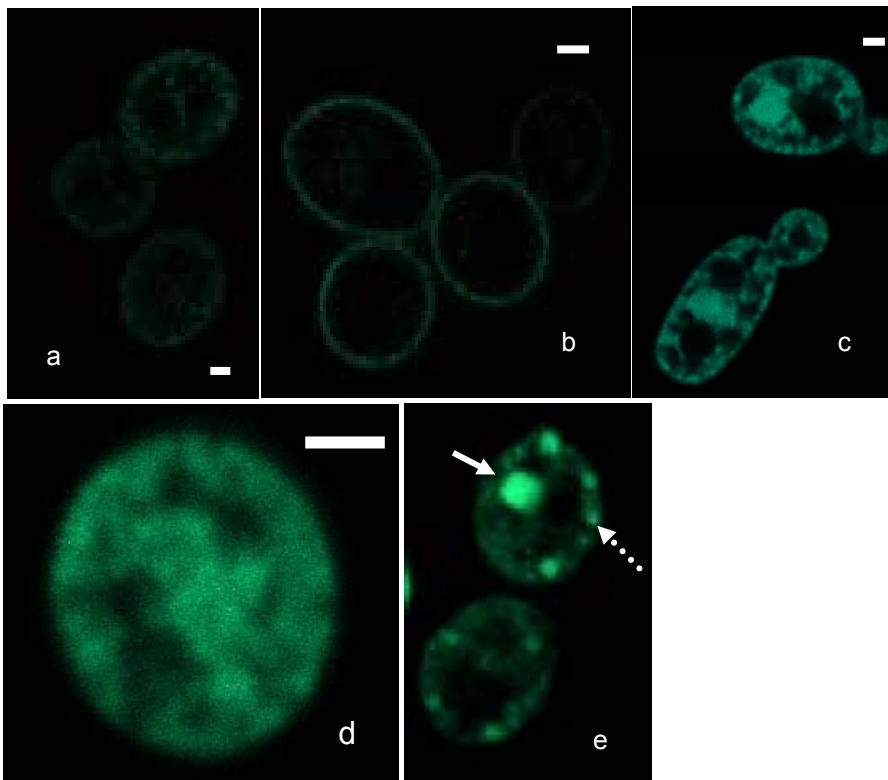


Fig 3. Staining of YPD-grown cells with bis-oxonol after different times at 50°C: (a) before temperature shift, (b) arrived at 50°C, (c) after 2 h, (d) 4 h and an example of BOX staining after a lactone shock (e). Bar: 1 μ m. Continuous spears show LBs, dash spears show mitochondria.

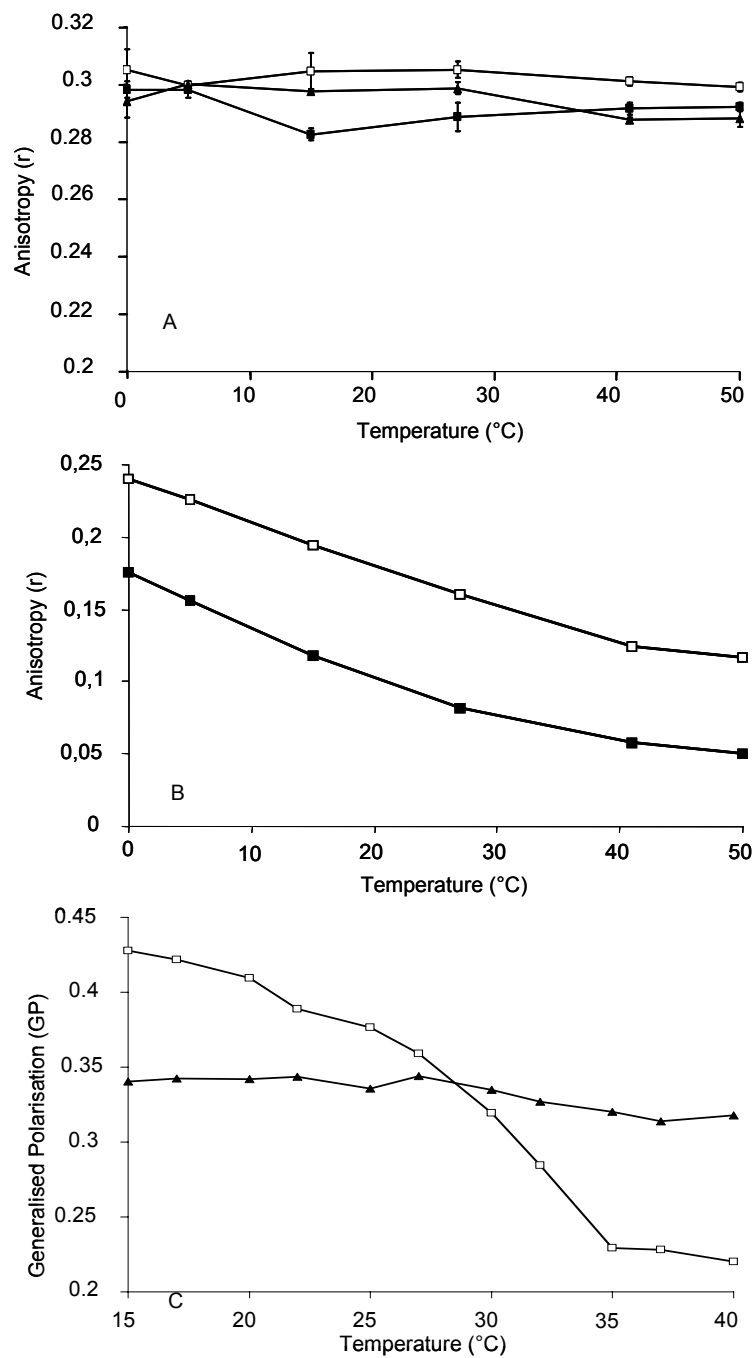


Fig. 4 Effect of temperature on membrane fluidity as evaluated using fluorescent probes: (A) TMA-DPH; (B) DPH; (C) Laurdan (□) YPD; (■) YPO; (▲) YNBO

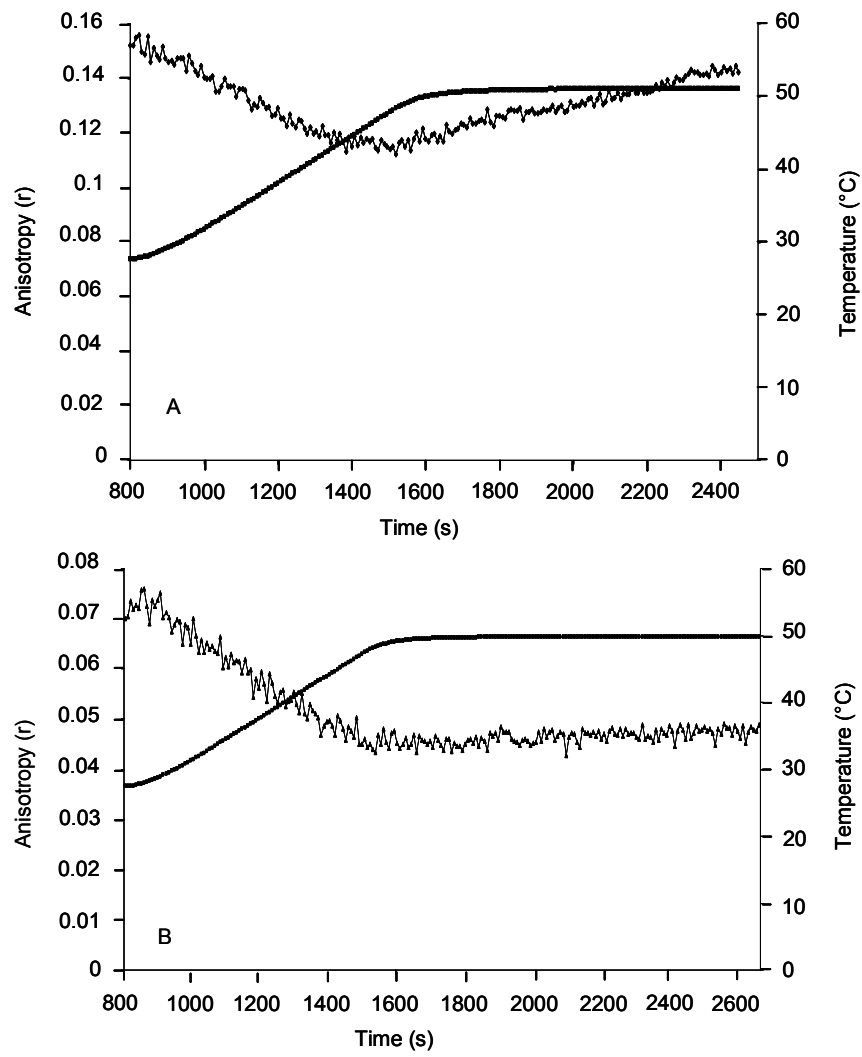


Fig. 5 Membrane fluidity evaluation during temperature shift and holding at 50°C using DPH: (A) YPD, (B) YPO

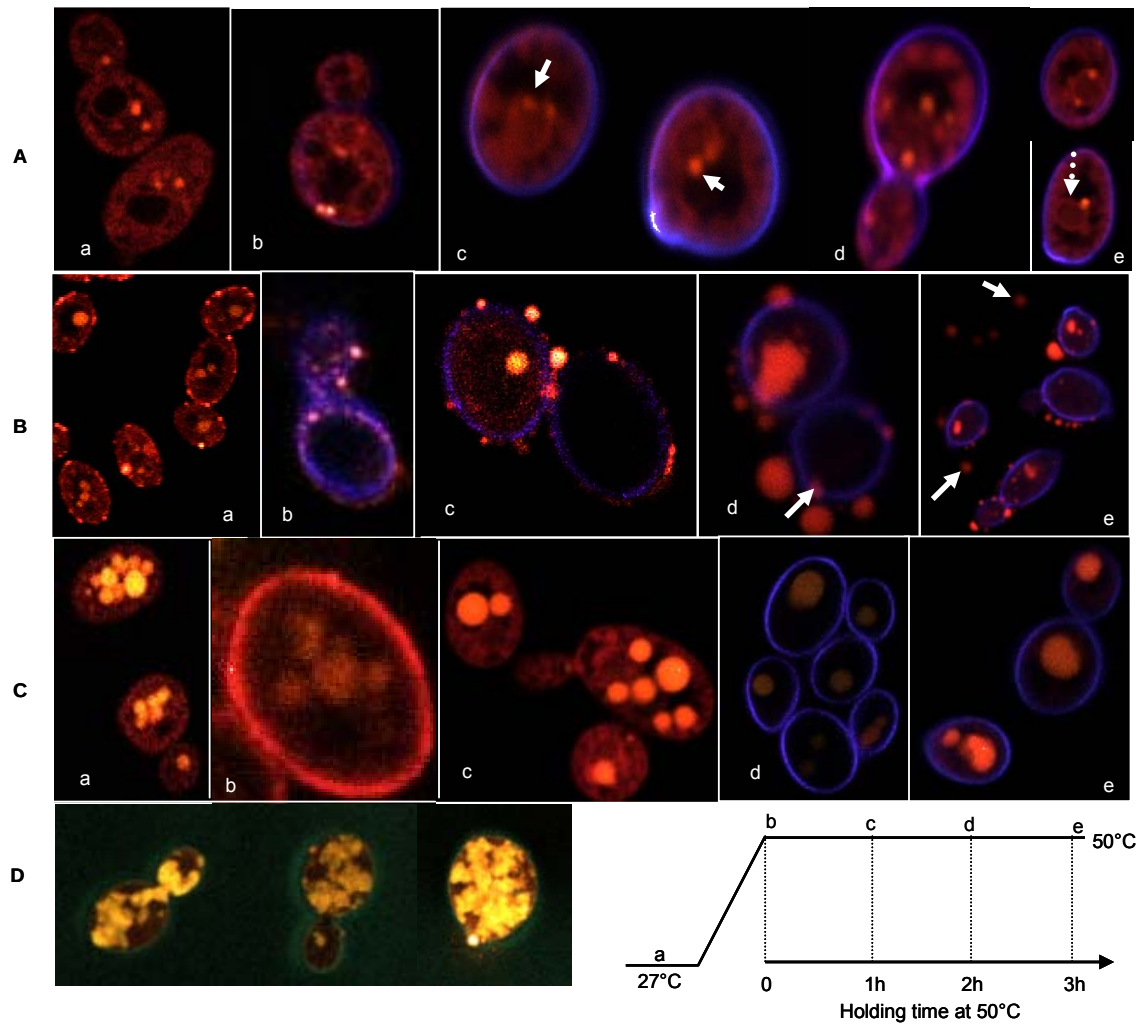


Fig. 6 Evolution of lipids bodies during temperature shift and holding at 50°C. (A) YPD, (B) YNBO, (C, D) YPO. Small letters refer to time holding at 50°C: (a) before the shift, (b) arrived at 50°C, (c) 1 h, (d) 2 h, (e) 3 h (see scheme at the bottom right of the figure). Continuous spears show LBs and the dash spear shows nuclear membrane. To facilitate observation, cells were marked with Calcofluor in some cases.

Conclusion:

Un choc thermique à une température létale 50°C cause la mort chez la levure *Y. lipolytica* n'importe qu'elle soit cultivée sur glucose ou lipide mais avec les cinétiques différentes. Les cellules YPD perdent une cultivabilité de 7 log après 17 min de maintien à 50°C et 3 log chez les cellules YPO. Les résultats montrent aussi différentes réponses de la cellule contre le choc thermique en fonction du milieu de culture. Par exemple, les cellules YPD gardent bien leur intégrité membranaire quant aux cellules YPO et YNBO, elles la perdent totalement après 3h de maintien à 50°C. Il est intéressant à noter que les cellules ayant poussé sur glucose expriment un phénomène de mort cellulaire programmé comme elles expriment un comportement anormal au niveau du marquage d'ADN et d'autolyse.

4. Conclusions et perspectives

4.1. Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous permettent d'arriver aux conclusions suivantes :

L'action de la lactone se trouve au niveau de la membrane où elle cause une fluidification membranaire et une déplétion de stérols. Ces effets sont considérés comme la cause de la mort cellulaire observée chez les cellules ayant poussé sur glucose. Par contre, pour les cellules ayant poussé sur oléate, l'effet toxique de la lactone est plutôt réversible : une concentration élevée en lactone (6 g/L) cause des perturbations dans l'activité de réduction de bleu méthylène (presque 50%) mais n'a aucun effet sur la cultivabilité cellulaire (100% des cellules peuvent former de colonies). L'intercalation d'oléate de méthyle dans la membrane jouerait un effet tampon qui conduit à une diminution de la sensibilité de la cellule à la lactone.

Une accumulation des LB est requise pour la résistance de la cellule contre le choc lactone. Comme l'oléate induit la formation de LB (accumulation importante des LB chez cellules YPO, YNBO), les cellules ayant poussé sur oléate sont plus résistantes au choc lactone que les cellules ayant poussé sur glucose. Les LB sont aussi supposés pour isoler la lactone de cytosol donc diminuerait sa toxicité.

Un choc thermique peut induire une mort cellulaire programmée chez les cellules ayant poussé sur glucose et ce phénomène semble inhiber par la présence d'oléate de méthyle

En bref, la source de carbone joue un rôle important dans la réponse de cellules *Y. lipolytica* aux stress environnementaux. Les cellules ayant poussé sur milieu lipide comme oléate de méthyle sont plus résistantes qu'aux cellules ayant poussé sur milieu glucose quand elles sont soumises au stress comme la rampe thermique ou le choc d'un composé amphiphile à chaîne moyenne comme la γ -dodécalactone.

4.2. Perspectives et travaux en cours

Ce travail soulève des points intéressants qui demandent des travaux complémentaires pour les élucider sur le mécanisme de la réponse aux stress chez *Y. lipolytica*.

4.2.1. L'influence de la source carbone sur la réponse cellulaire au stress s'appuie sur l'homéostasie des stérols ?

Il est rapporté qu'il y a deux groupes d'enzymes qui sont chargées d'interconvertir les stérols en stéryles : les stérols estérases Are1p, Are2p ; et à l'inverse : les stérols hydrolases Tgl1p, Yeh1p, Yeh2p. Chez *S. cerevisiae*, ces protéines ont été bien caractérisées (Leber *et al.*, 1995; Zweyck *et al.*, 2000c) mais pas encore chez *Y. lipolytica*. Athenstaedt *et al.*, (2000) ont étudié les protéines des LB chez *Y. lipolytica* ayant poussé sur oléate de méthyle et ont constaté qu'il y a une bande protéique à une masse molaire égale à 55,4 kDa qui correspond à une Tgl1p putative. Dans notre cas, après un choc lactone, nous avons observé les changements et les interconversions entre les stérols libres et les esters de stéryle. Il est intéressant de mener une étude pour identifier ces gènes et mesurer leur expression ainsi que leur activité enzymatique.

4.2.2. Mécanisme d'apoptose en réponse au choc thermique chez *Y. lipolytica* ?

Des résultats obtenus montre qu'il y a un processus de mort cellulaire programmée de type apoptose chez *Y. lipolytica* quand elle est subit un stress thermique à 50°C. Ce processus est assez original par rapport à ce qui a été rapporté chez les autres levures quant aux évolutions de l'ADN, des corps lipidiques, des membranes et de l'autolyse. D'autre part, les cellules ayant poussé sur oléate au lieu de glucose résistent plus longtemps à la chaleur (3 h dans le cas des cellules d'oléate au lieu de 17 min dans le cas des cellules glucose) et ne semblent pas subir ce phénomène de mort cellulaire programmée. L'apoptose chez la levure est de plus en plus étudié en utilisant la levure modèle *S. cerevisiae* mais cette voie chez la levure reste encore peu connue. Il sera intéressant d'étudier les facteurs impliqués dans la voie d'apoptose comme les caspases, les kinases, les réacteurs d'oxygène ... chez *Y. lipolytica* sous stress thermique pour caractériser le mécanisme de la mort cellulaire programmée. Des comparaisons avec différents facteurs d'induction de l'apoptose chez la levure comme l'H₂O₂, l'acide acétique ou l'aspirine qui sont rapportés comme induisant l'apoptose en fonction de la source de carbone sera aussi un point intéressant à exploiter.

Références bibliographiques

- Abe, F. & Hiraki, T. (2009).** Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 743-752.
- Abe, F., Usui, K. & Hiraki, T. (2009).** Fluconazole Modulates Membrane Rigidity, Heterogeneity, and Water Penetration into the Plasma Membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **48**, 8494-8504.
- Aguedo, M. (2002).** Biotransformation de lipides en arômes par *Yarrowia lipolytica*: interaction avec le substrat, excrétion et toxicité des métabolites produits. *Thèse de l'Université de Bourgogne*.
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., Belin, J.-M. & Gervais, P. (2002a).** Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnol Lett* **24**, 1975-1979.
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., Belin, J.-M. & Gervais, P. (2002b).** Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnol Lett* **24**, 1975-1979.
- Aguedo, M., Beney, L., Wache, Y. & Belin, J. M. (2003a).** Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* **94**, 258-265.
- Aguedo, M., Beney, L., Wache, Y. & Belin, J. M. (2003b).** Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. *Int J Food Microbiol* **80**, 211-215.
- Aguedo, M., Beney, L., Wache, Y. & Belin, J. M. (2003c).** Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J Appl Microbiol* **94**, 258-265.
- Aguedo, M., Beney, L., Wache, Y. & Belin, J. M. (2003d).** Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. *Int J Food Microbiol* **80**, 211-215.
- Aguedo, M., Wache, Y., Mazoyer, V., Sequeira-Le Grand, A. & Belin, J. M. (2003e).** Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J Agric Food Chem* **51**, 3007-3011.
- Aguedo, M., Ly, M. H., Belo, I., Texeira, J., Belin, J.-M. & Waché, Y. (2004a).** The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. *Food Technol Biotechnol* **42**, 327-336.
- Aguedo, M., Waché, Y., Coste, F., Husson, F. & Belin, J.-M. (2004b).** Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Catal* **29**, 31-36.
- Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M. & Mauricio, J. C. (2006).** Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Inter J Food Microbiol* **110**, 34-42.
- Akin, C. & Murphy, R. M. (1981).** Method for accelerating autolysis of yeast *US Patent* 4285976
- Arora, A., Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. (2004).** Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 920-926.
- Arthington-Skaggs, B. A., Crowell, D. N., Yang, H., Sturley, S. L. & Bard, M. (1996).** Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (*ERG3*) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Lett* **392**, 161-165.
- Arthington-Skaggs, B. A., Jradi, H., Desai, T. & Morrison, C. J. (1999).** Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **37**, 3332-3337.
- Artwohl, M., Lindenmair, A., Sexl, V. & other authors (2008).** Different mechanisms of saturated versus polyunsaturated FFA-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Lipid Res* **49**, 2627-2640.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S. D. & Daum, G. (1999).** Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**, 6441-6448.
- Athenstaedt, K., Jolivet, P., Boulard, C., Zivy, M., Negroni, L., Nicaud, J. M. & Chardot, T. (2006).** Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics* **6**, 1450-1459.
- Avis, T. J. & Belanger, R. R. (2001).** Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 956-960.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. & Simons, K. (2000).** Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3254-3259.
- Balzan, R., Sapienza, K., Galea, D. R., Vassallo, N., Frey, H. & Bannister, W. H. (2004).** Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* **150**, 109-115.
- Bankar, A., Kumar, A. & Zinjarde, S. (2009).** Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**, 847-865.
- Barth, G. & Gaillardin, C. (1997).** Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**, 219-237.
- Bati, N., Hammond, E. & Glatz, B. (1984).** Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. *J American Oil Chemists' Society* **61**, 1743-1746.

- Bauer, R., Paltauf, F. & Kohlwein, S. D. (1993).** Functional expression of bacterial beta-glucuronidase and its use as a reporter system in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **9**, 71-75.
- Beckerich, J. M., Boisrame-Baudevin, A. & Gaillardin, C. (1998).** *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int Microbiol* **1**, 123-130.
- Bedner, E., Burfeind, P., Gorczyca, W., Melamed, M. R. & Darzynkiewicz, Z. (1997).** Laser scanning cytometry distinguishes lymphocytes, monocytes, and granulocytes by differences in their chromatin structure. *Cytometry* **29**, 191-196.
- Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M. R. & Darzynkiewicz, Z. (1999).** Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* **35**, 181-195.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribealarea, 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.
- Berk, P. D. & Stump, D. D. (1999).** Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* **192**, 17-31.
- Bischof, J. C., Padanilam, J., Holmes, W. H., Ezzell, R. M., Lee, R. C., Tompkins, R. G., Yarmush, M. L. & Toner, M. (1995).** Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophys J* **68**, 2608-2614.
- Black, P. N. & DiRusso, C. C. (2007).** Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 286-298.
- Boergel, D. H., Top 14, 1190 Wien, AT), Hueller, T. H. L., app. 14, 63454 Hanau, DE) & Schaffer, S. J., 63450 Hanau, DE) (2006).** Methods and materials for the transformation of the yeast *Pichia ciferrii* Patent EP20060113772
- Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., ArIdogan, B., Eroglu, F. & Kaya, S. (2005).** N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiol Res* **160**, 399-403.
- Bottema, C. D. K., McLean-Bowen, C. A. & Parks, L. W. (1983).** Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **734**, 235-248.
- Braun, P. E. & Snell, E. E. (1967).** The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *Hansenula ciferrii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**, 298-303.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G. & Madeo, F. (2006).** Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* **175**, 521-525.
- Cao-Hoang, L., Marechal, P. A., Le-Thanh, M., Gervais, P. & Wache, Y. (2008a).** Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol J* **3**, 890-903.
- Cao-Hoang, L., Marechal, P. A., Le-Thanh, M., Gervais, P. & Waché, Y. (2008b).** Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnol J* **3**, 890-903.
- Carreira, A., Ferreira, L. M. & Loureiro, V. (2001).** Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* **90**, 372-379.
- Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzinger, W. & Rohm, H. (2002).** Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *J Dairy Res* **69**, 281-292.
- Cernicka, J., Kozovska, Z., Hnatova, M., Valachovic, M., Hapala, I., Riedl, Z., Hajos, G. & Subik, J. (2007).** Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* **29**, 170-178.
- Chao, K. C., McCarthy, E. F. & McConaghy, G. A. (1980).** Yeast autolysis process US Patent 4218481
- Clausen, M. K., Christiansen, K., Jensen, P. K. & Behnke, O. (1974).** Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett* **43**, 176-179.
- Czabany, T., Athenstaedt, K. & Daum, G. (2007).** Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 299-309.
- Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E. & Daum, G. (2008).** Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 17065-17074.
- D'Antuono, C., del Carmen Fernández-Tomé, M., Sterin-Speziale, N. & Bernik, D. L. (2000).** Lipid-Protein Interactions in Rat Renal Subcellular Membranes: A Biophysical and Biochemical Study. *Arch Biochem Biophys* **382**, 39-47.
- Damude, H., G. , GILLIES, P., John , MACOOL, D., Joseph & other authors (2004).** High Arachidonic Acid producing strain of *Yarrowia lipolytica* WO 2006/055322 A3.
- Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P. & Veal, D. (1998).** Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* **14**, 147-160.

Domínguez, A., Costas, M., Longo, M. A. & Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **25**, 1225-1229.

Drici-Cachon, Z., Cavin, J. F. & Diviès, C. (1996). Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Lett Appl Microbiol* **22**, 331-334.

Dufossé, L., Latasse, A. & Spinnler, H. E. (1994). Importance des lactones dans les arômes alimentaires: Structure, distribution, propriétés sensorielles. *Sci Aliments* **14**, 19-50.

Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* **1**, 63-77.

Farbood, M. I. & Willis, B. J. (1983). Production of gamma-decalactone. *patent* WO 8301072.

Feng, Z. & Zhang, J.-t. (2004). Protective effect of melatonin on [beta]-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* **37**, 1790-1801.

Feron, G., Dufosse, L., Pierard, E., Bonnarme, P., Quere, J. L. & Spinnler, H. (1996). Production, Identification, and Toxicity of (gamma)-Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2826-2831.

Feron, G., Dufosse, L., Mauvais, G., Bonnarme, P. & Spinnler, H.-E. (1997). Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of [gamma]-decalactone. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 17-24.

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

Fielding, C. J. (2001). Caveolae and signaling. *Curr Opin Lipidol* **12**, 281-287.

Finogenova, T. V., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V. & Cherniavskaia, O. G. (2005). Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica* : a review of prospects. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **41**, 478-486.

Fukui, S., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Tanaka, A. & Osumi, M. (1975a). Microbody of methanol-grown yeasts. Localization of catalase and flavin-dependent alcohol oxidase in the isolated microbody. *Eur J Biochem* **59**, 561-566.

Fukui, S., Tanaka, A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y. & Osumi, M. (1975b). Ultrastructure of methanol-utilizing yeast cells: appearance of microbodies in relation to high catalase activity. *J Bacteriol* **123**, 317-328.

Gaillardin, C. & Ribet, A. M. (1987). LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **11**, 369-375.

Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M. A., Andrighetto, C., Schirone, M. & Tofalo, R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res* **1**, 161-167.

Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Viswanatha, R., Antosh, A. L., Brown, W. J., Kohlwein, S. D. & Henry, S. A. (2008). A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *J Biol Chem* **283**, 25735-25751.

Gómez-Muñoz, A., Kong, J. Y., Parhar, K. & other authors (2005). Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett* **579**, 3744-3750.

Groguenin, A., Waché, Y., Garcia, E. E., Aguedo, M., Husson, F., LeDall, M.-T., Nicaud, J.-M. & Belin, J.-M. (2004). Genetic engineering of the beta-oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. *J Mol Catal* **28**, 75-79.

Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I. & Tanner, W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *Embo J* **26**, 1-8.

Guerzoni, M. E., Lanciotti, R. & Cocconcelli, P. S. (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology* **147**, 2255-2264.

Hahn, R. C. & Hamdan, J. S. (2000). Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1997-2000.

Hamilton, J. A. (1998). Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**, 467-481.

Hamsa, P. V. & Chattoo, B. B. (1994). Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **143**, 165-170.

Hamsa, P. V., Kachroo, P. & Chattoo, B. B. (1998). Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **33**, 231-237.

Hanzal-Bayer, M. F. & Hancock, J. F. (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* **581**, 2098-2104.

Heipieper, H. J. & de Bont, J. A. (1994). Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4440-4444.

Heipieper, H. J., Meulenbeld, G., van Oirschot, Q. & de Bont, J. (1996). Effect of Environmental Factors on the trans/cis Ratio of Unsaturated Fatty Acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2773-2777.

Hettema, E. H. & Tabak, H. F. (2000). Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 18-27.

Hoekstra, D. & van Ijzendoorn, S. C. D. (2000). Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 496-502.

Holzschu, D. L., Chandler, F. W., Ajello, L. & Ahearn, D. G. (1979). Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia* **17**, 71-78.

Hou, C. T. (2009). Biotechnology for fats and oils: new oxygenated fatty acids. *New Biotechnol* **26**, 2-10.

Howlett, N. G. & Avery, S. V. (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2971-2976.

Ingram, L. O. (1977). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl Environ Microbiol* **33**, 1233-1236.

Jenkins, G. M. (2003). The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. *Cell Mol Life Sci* **60**, 701-710.

Jones, D. L., Petty, J., Hoyle, D. C., Hayes, A., Oliver, S. G., Riba-Garcia, I., Gaskell, S. J. & Stateva, L. (2004). Genome-Wide Analysis of the Effects of Heat Shock on a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant With a Constitutively Activated cAMP-Dependent Pathway. *Comp Funct Genomics* **5**, 419-431.

Kaiser, R. D. & London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* **37**, 8180-8190.

Kaufman, B., Basu, S. & Roseman, S. (1971). Isolation of glucosylceramides from yeast (*Hansenula ciferri*). *J Biol Chem* **246**, 4266-4271.

Kim, T.-H., Oh Young-Sook, Kim Sang-Jin (2000). The Possible Involvement of the Cell Surface in Aliphatic Hydrocarbon Utilization by an Oil Degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J Microbiol Biotechnol* **10**, 333-337.

Kohlwein, S. D. & Paltauf, F. (1983). Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **792**, 310-317.

Kubler, E., Dohlman, H. G. & Lisanti, M. P. (1996). Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J Biol Chem* **271**, 32975-32980.

Lamacka, M. & Sajbidor, J. (1997). Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of different methods. *Biotechnol Technol* **11**, 723-725.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E. & Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci Technol* **15**, 201-208.

Langner, M. & Hui, S. (2000). Effect of free fatty acids on the permeability of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayer at the main phase transition. *Biochim Biophys Acta* **1463**, 439-447.

Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* **182**, 6921-6926.

Leber, R., Zinser, E., Hrastnik, C., Paltauf, F. & Daum, G. (1995). Export of steryl esters from lipid particles and release of free sterols in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1234**, 119-126.

Leekumjorn, S., Cho, H. J., Wu, Y., Wright, N. T., Sum, A. K. & Chan, C. (2009). The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 1508-1516.

Leonard, A., Escribe, C., Laguerre, M., Pebay-Peyroula, E., Neri, W., Pott, T., Katsaras, J. & Dufourc, E. J. (2001). Location of Cholesterol in DMPC Membranes. A Comparative Study by Neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation. *Langmuir* **17**, 2019-2030.

Lockshon, D., Surface, L. E., Kerr, E. O., Kaeberlein, M. & Kennedy, B. K. (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* **175**, 77-91.

Madeo, F., Frohlich, E. & Frohlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 729-734.

Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T. & Frohlich, K. U. (2004). Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* **7**, 655-660.

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.

Mahammad, S. & Parmryd, I. (2008). Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl-[beta]-cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1251-1258.

Martinez de Marañon, I., Chaudanson, N., Joly, N. & Gervais, P. (1999). Slow heat rate increases yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity. *Biotechnol Bioeng* **65**, 176-181.

- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2009).** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, 217-232.
- Maxfield, F. R. (2002).** Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 483-487.
- McAlester, G., O'Gara, F. & Morrissey, J. P. (2008).** Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **57**, 563-569.
- McMurchie, E. J. & Raison, J. K. (1979).** Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochim Biophys Acta* **554**, 364-374.
- Metzger, J. O. & Bornscheuer, U. (2006).** Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 13-22.
- Michaud, M. R. & Denlinger, D. L. (2006).** Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J Insect Physiol* **52**, 1073-1082.
- Middelhoven, W. (1993).** Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, 125-144.
- Mlickova, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T. & Nicaud, J. M. (2004).** Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3918-3924.
- Mukhopadhyay, K., Kohli, A. & Prasad, R. (2002).** Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3695-3705.
- Müller, S., Thomas, S., Peter, K.-H. & Henrik, D. (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.
- Mullner, H., Deutsch, G., Leitner, E., Ingolic, E. & Daum, G. (2005).** YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 13321-13328.
- Nicaud, J.-M., Fabre, E. & Gaillardin, C. (1989).** Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Current Genetics* **16**, 253-260.
- Nicaud, J.-M., Catherine, M., Peter, B., Christof, G., Philippe, D., Peter, N. & Claude, G. (2002).** Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* **2**, 371-379.
- Nicaud, J. M., Fournier, P., La Bonnardiere, C., Chasles, M. & Gaillardin, C. (1991).** Use of ars18 based vectors to increase protein production in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* **19**, 259-270.
- Nicaud, J. M., Belin, J. M., Pagot, Y. & Endrizzi-Joran, A. (1996).** Bio-conversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound. Patent FR 2734843.
- Osumi, M., Fukuzumi, F., Yamada, N., Nagatani, T., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, S. (1975).** Surface tructure of som *Candida* yeast cells grown on n-alkanes. *J Ferment Technol* **53**, 244-248.
- Ota, Y., Shinzo Oikawa, Yuki Morimoto & Minoda, Y. (1984).** Nutritional Factors Causing Mycelial Development of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric Biol Chem* **48**, 1933-1939.
- Ouvry, A., Waché, Y., Tournet-Maréchal, R., Diviès, C. & Cachon, R. (2002).** Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 257-261.
- Pagot, Y. (1997).** Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la bêta-oxydation peroxysomale chez les levures. Effets sur la biotransformation du ricinoléate de méthyle en gamma-décalactone. *Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, France*.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. & Aggelis, G. (2002).** Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 308-312.
- Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J. Y., Ogrydziak, D. M. & Ryu, D. D. (1997).** Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **272**, 6876-6881.
- Parks, L. W. & Casey, W. M. (1995).** Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* **49**, 95-116.
- Pebay-Peyroula, E., Dufourc, E. J. & Szabo, A. G. (1994).** Location of diphenyl-hexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by neutron diffraction. *Biophys Chem* **53**, 45-56.
- Pike, L. J. (2005).** Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: An evolving story. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 260-273.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A. & Hogg, T. (2004).** Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiol* **21**, 439-447.
- Piper, P. W. (1995).** The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* **134**, 121-127.
- Rabenhorst, J. & Gatfield, I. L. (2000).** Process for the production of gamma-decalactone. European Patent 0997533.

Rabenhorst, J. & Gatfield, I. L. (2001). Method of producing gamma-decalactone. Patent WO 0024920.

Ratledge, C. & Zvi, C. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology* **20**, 155-160.

Richard, M., Quijano, R. R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F. & Gaillardin, C. (2001). Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **183**, 3098-3107.

Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K. & Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem* **274**, 12049-12054.

Riezman, H. (2004). Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* **3**, 61-63.

Robichon, C. & Dugail, I. (2007). De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. *Biochimie* **89**, 260-264.

Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int J Food Microbiol* **31**, 205-219.

Sakamoto, T. & Murata, N. (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr Opin Microbiol* **5**, 208-210.

Scanlon, S. M., Williams, D. C. & Schloss, P. (2001). Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* **40**, 10507-10513.

Schörken, U. & Peter, K. (2009). Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *Eur J Lipid Sci Technol* **111**, 627-645.

Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. & Belin, J. M. (1992). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol Lett* **14**, 1019-1024.

Shechter, E. (1990). Biochimie et biophysique des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels. Masson Editor, Paris, 414 pages.

Shobayashi, M., Mitsueda, S., Ago, M., Fujii, T., Iwashita, K. & Iefuji, H. (2005). Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 2381-2388.

Sikkema, J., de Bont, J. A. & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* **269**, 8022-8028.

Sikkema, J., de Bont, J. A. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**, 201-222.

Sinigaglia, M., Lanciotti, R. & Guerzoni, M. E. (1994). Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can J Microbiol* **40**, 54-59.

Smith, J. J., Brown, T. W., Eitzen, G. A. & Rachubinski, R. A. (2000). Regulation of peroxisome size and number by fatty acid β -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **275**, 20168-20178.

Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C. & Daum, G. (2004). A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *J Biol Chem* **279**, 31190-31196.

Souchon, I., Spinnler, H. E., Dufossé, L. & Voilley, A. (1998). Trapping of γ -Decalactone by Adsorption on Hydrophobic Sorbents : Application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Tech* **12**, 109-113.

Subczynski, W. K., Wisniewska, A., Yin, J. J., Hyde, J. S. & Kusumi, A. (1994). Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry* **33**, 7670-7681.

Subczynski, W. K. & Wisniewska, A. (2000). Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim Pol* **47**, 613-625.

Suutari, M., Liukkonen, K. & Laakso, S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol* **136**, 1469-1474.

Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. & Guerzoni, M. E. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int J Food Microbiol* **69**, 69-77.

Swan, T. M. & Watson, K. (1999). Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Can J Microbiol* **45**, 472-479.

Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S. & other authors (2002). Identification of a Quorum-Sensing Signal Molecule in the Facultative Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **70**, 3004-3011.

Taylor, F. R. & Parks, L. W. (1978). Metabolic interconversion of free sterols and steryl esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **136**, 531-537.

Tharaud, C., Ribet, A. M., Costes, C. & Gaillardin, C. (1992). Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **121**, 111-119.

Thati, B., Noble, A., Rowan, R., Creaven, B. S., Walsh, M., McCann, M., Egan, D. & Kavanagh, K. (2007). Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol In Vitro* **21**, 801-808.

Tolner, B., Poolman, B. & Konings, W. N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **118**, 423-428.

Tomczak, M. M., Hinch, D. K., Crowe, J. H., Harding, M. M. & Haymet, A. D. J. (2003). The effect of hydrophobic analogues of the type I winter flounder antifreeze protein on lipid bilayers. *FEBS Lett* **551**, 13-19.

Trigatti, B. L., Baker, A. D., Rajaratnam, K., Rachubinski, R. A. & Gerber, G. E. (1992). Fatty acid uptake in *Candida tropicalis*: induction of a saturable process. *Biochem Cell Biol* **70**, 76-80.

Trotter, P. J. (2001). The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **21**, 97-119.

Tsitko, I. V., Zaitsev, G. M., Lobanok, A. G. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1999). Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 853-855.

Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J. & Johnson, E. M. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* **25**, 412-417.

Turk, M., Méjanelle, L., Šentjurc, M., Grimalt, J., Gunde-Cimerman, N. & Plemenitaš, A. (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles* **8**, 53-61.

van de Vossen, J. L., Driessen, A. J., da Costa, M. S. & Konings, W. N. (1999). Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochim Biophys Acta* **1419**, 97-104.

Veen, M. & Lang, C. (2005). Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem Soc Trans* **33**, 1178-1181.

Vigh, L., Maresca, B. & Harwood, J. L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci* **23**, 369-374.

Wache, Y., Laroche, C., Bergmark, K., Moller-Andersen, C., Aguedo, M., Le Dall, M. T., Wang, H., Nicaud, J. M. & Belin, J. M. (2000). Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1233-1236.

Wache, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I. L., Nicaud, J. M. & Belin, J. M. (2001). Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5700-5704.

Wache, Y., Aguedo, M., Nicaud, J. M. & Belin, J. M. (2003). Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 393-404.

Waché, Y., Husson, F., Feron, G. & Belin, J. M. (2006). Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 405-416.

Wachtler, V. & Balasubramanian, M. K. (2006). Yeast lipid rafts? - An emerging view. *Trends Cell Biol* **16**, 1-4.

Wagner, A., Grillitsch, K., Leitner, E. & Daum, G. (2009). Mobilization of steryl esters from lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 118-124.

Walker-Caprioglio, H. M., Casey, W. M. & Parks, L. W. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2853-2857.

Wang, H., Le Clainche, A., Le Dall, M. T., Wache, Y., Pagot, Y., Belin, J. M., Gaillardin, C. & Nicaud, J. M. (1998). Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1373-1386.

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

Wang, H. J., Le Dall, M. T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J. M., Gaillardin, C. & Nicaud, J. M. (1999b). Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **181**, 5140-5148.

Weber, F. J. & de Bont, J. A. (1996a). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**, 225-245.

Weber, F. J. & de Bont, J. A. (1996b). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**, 225-245.

Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R. & Sturley, S. L. (1996). Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science* **272**, 1353-1356.

You, K. M., Rosenfield, C.-L. & Knipple, D. C. (2003). Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1499-1503.

Yuan, C., O'Connell, R. J., Feinberg-Zadek, P. L., Johnston, L. J. & Treistman, S. N. (2004). Bilayer Thickness Modulates the Conductance of the BK Channel in Model Membranes. *Biophys J* **86**, 3620-3633.

Zidovetzki, R. & Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1311-1324.

- Zinjarde, S. S., Pant, A. & Deshpande, M. V. (1998).** Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycological Research* **102**, 553-558.
- Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. (1993).** Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol* **175**, 2853-2858.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K. & Daum, G. (2000a).** Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 101-120.
- Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S. D. & Daum, G. (2000b).** Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **470**, 83-87.
- Zweytick, D., Leitner, E., Kohlwein, S. D., Yu, C., Rothblatt, J. & Daum, G. (2000c).** Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **267**, 1075-1082.