

Métabolisme des lipides chez la levure : catabolisme peroxysomal des acides gras et applications biotechnologiques.

Yves Waché, Mario Aguedo, Jean-Marc Nicaud et Jean-Marc Belin.

Laboratoire de Microbiologie, UMR UB/INRA 1082, ENSBANA, Dijon,
et Laboratoire de Génétique des Microorganismes URA1925 INRA/CNRS, Thiverval-Grignon.
ENSBANA, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, Tél: 03 80 39 66 80, e-mail : ywaché@u-bourgogne.fr

A quelques exceptions vraiment antipathiques près, les levures font partie depuis des millénaires des « meilleurs amis de l'homme ». Il semble en effet y avoir eu des boissons fermentées dans plusieurs sociétés antiques. Pourtant, ces relations privilégiées entre l'homme et la levure concernaient, jusqu'à il y a peu, principalement *Saccharomyces cerevisiae* et quelques autres espèces capables de fermenter des sucres.

Bien que le métabolisme des substances hydrophobes ne soit pas négligeable dans les produits fermentés, en particulier dans la genèse de composés d'arômes, son étude ne s'est développée réellement qu'au siècle passé quand des souches capables de se développer sur des milieux hydrophobes ont été identifiées. Bien sûr, *S. cerevisiae* a servi de modèle pour bon nombre d'études mais la part de ces levures non-conventionnelles particulièrement adaptées aux milieux hydrophobes ne cesse d'augmenter. On peut citer par exemple la levure *Yarrowia lipolytica* (syn. *Saccharomycopsis lipolytica* ou *Candida lipolytica* pour sa forme imparfaite) comme exemple de souche capable de se développer sur des substrats hydrophobes puisqu'on la retrouve régulièrement sur des produits alimentaires gras ou dans des procédés biotechnologiques de transformation de paraffines, d'huiles, de dépollution de sols contaminés par du diesel... Les outils génétiques qui existent pour cette espèce font qu'elle fait l'objet de beaucoup de recherches servant à la fois de modèle dans la biologie des peroxysomes et intervenant dans de multiples applications.

L'ensemble des recherches sur le métabolisme des lipides chez la levure tiré à la fois par les applications biotechnologiques et la simplicité d'étude de ces organismes eucaryotes, ont amené ces derniers temps à des résultats notables

permettant de combler progressivement quelques lacunes qui existent dans la connaissance de ce métabolisme par rapport à ce qui est connu chez les organismes supérieurs. Cette présentation fait le point sur le métabolisme des lipides chez la levure partant du contact entre le substrat et la cellule jusqu'à la dégradation des acyl-CoA dans les peroxysomes en mentionnant les données connues sur la régulation de cette voie. Elle s'appuie également sur les connaissances acquises chez d'autres organismes. Certains aspects ne seront pourtant que peu développés car ils font l'objet de synthèses récentes comme la génétique du métabolisme des lipides chez *S. cerevisiae* (Trotter, 2001) ou les voies de production de lactones chez la levure (Endrizzi *et al.*, 1996; Aguedo *et al.*, 2000).

I- Introduction aux propriétés physico-chimiques des substrats apolaires dispersés en phase aqueuse

Pour bien comprendre les problèmes liés à la croissance de microorganismes sur des acides gras, il est important de rappeler quelques notions de physico-chimie liées aux substrats apolaires et aux milieux polyphasiques.

Tout d'abord et contrairement aux alcanes correspondants, les acides aliphatiques possèdent, en plus de leur chaîne apolaire, une extrémité polaire, le groupement carboxyle. Cette caractéristique leur donne des propriétés tensio-actives mais elle influe aussi sur la solubilité dans l'eau qui va dépendre de la taille de la chaîne apolaire : en dessous de C5, les acides sont totalement miscibles, puis la solubilité diminue pour être quasi nulle à partir de C16. Les sels alcalins des acides de faibles poids moléculaires sont généralement solubles dans l'eau et forment des solutions vraies tandis qu'à

partir du C12, ils forment des savons et les solutions sont de nature colloïdale.

Les insaturations et hydroxylations ont une influence sur les propriétés de la chaîne carbonée. Plus l'insaturation est rapprochée du groupe acide, plus elle va favoriser la dissociation et donc, rendre la molécule plus acide. De son côté, le groupe hydroxyle va augmenter la polarité de la chaîne carbonée.

Pour deux liquides non miscibles, il existe une tension interfaciale entre les deux phases. La présence d'impuretés abaisse toujours cette tension. Certaines substances dites tensio-actives l'abaissent très fortement car, lorsque leur concentration dépasse une limite minimale, elles modifient la structure de la surface, généralement en formant une couche monomoléculaire adsorbée et orientée. Les agents tensio-actifs provoquent l'émulsification ou la dissolution (pouvoir dispersant ou solubilisant).

Au-dessus d'une certaine concentration en agent tensio-actif, dite concentration micellaire critique (CMC), la tension superficielle n'est plus abaissée car les molécules tensio-actives supplémentaires s'agrègent à celles qui sont déjà présentes et forment avec ces dernières des particules appelées micelles. Le nombre de particules « actives » n'augmente donc plus et la surface interfaciale n'est plus réellement modifiée. Ce phénomène s'observe avec toutes les molécules amphiphiles capables de former des micelles comme les acides gras et leurs esters possédant un groupe polaire et une chaîne carbonée apolaire (esters de CoA...). Ainsi, lors de l'étude de phénomènes dépendant de la concentration de molécules amphiphiles, il faut savoir qu'au delà de la CMC, l'ajout de composés ne se traduit plus par une augmentation de la concentration dans la phase aqueuse mais par une augmentation des micelles et de la phase organique.

Il existe des agents tensio-actifs ioniques ou non ioniques. Les propriétés des molécules ioniques dépendent surtout d'interactions électrostatiques et peuvent être considérablement modifiées par les électrolytes et le pH.

II - Entrée des lipides dans la cellule

2.1) Lipases (glycérol ester hydrolases, EC 3.1.1.3)

Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison ester de triacylglycérols formée avec des acides gras à chaîne longue. Elles sont caractérisées par la capacité, voire la nécessité, de fonctionner à l'interface entre la phase aqueuse et son substrat insoluble (Brockerhoff, 1974). Cette famille d'enzymes est très vaste, présente dans les domaines végétal et animal. La taille de ses représentants varie de 19 à 60 kDa et le niveau d'identité des acides aminés est faible (environ 25 %). Pourtant, la structure tridimensionnelle est voisine. Elle contient un domaine α/β comportant un feuillet β central composé de chaînes parallèles et entouré d'hélices α (Ollis *et al.*, 1992). Le site catalytique est composé de la triade d'acides aminés suivante : sérine, acide aspartique (ou glutamique) et histidine.

Les lipases ont été classées en deux groupes en fonction des substrats qu'elles acceptent. Dans le premier groupe, la lipase ne montre aucune spécificité quant à la position de la liaison ester, elle peut donc hydrolyser complètement le triacylglycérol en glycérol et acides gras. Dans le second, elles hydrolysent seulement certaines liaisons du triglycéride et donnent naissance à un 1,2-, un 2,3-diacylglycérol ou à un monoacylglycérol. Récemment, et notamment chez *Candida antarctica*, des lipases plus spécifiques ont été décrites permettant la coupure sélective d'une seule liaison.

Certaines propriétés des lipases sont à l'origine du formidable développement des applications biotechnologique de ces enzymes. Elles sont notamment stables en solvants organiques, n'ont pas besoin de cofacteurs, possèdent une large gamme de spécificités de substrats et font preuve d'une grande énantiosélectivité. Ces propriétés sont présentées dans une revue récente (Jaeger et Reetz, 1998)

2.2) Entrée des substances hydrophobes dans les cellules

Pour pénétrer dans les cellules, les molécules doivent traverser la paroi

glycopeptidique puis la membrane composée de phospholipides. Dans un cas comme dans l'autre, le passage de composés comprend trois étapes : l'adsorption, la traversée de la structure et la désorption. Ces trois points seront exposés dans ce paragraphe après l'étude des notions d'hydrophobicité des microorganismes et de production de biosurfactants qui sont fondamentales pour le contact microorganisme/substrat.

2.2.1) Hydrophobicité des microorganismes

Les microorganismes peuvent avoir des propriétés tensio-actives si leur affinité pour l'une ou l'autre des phases les place préférentiellement à l'interface. De même, pour pouvoir assimiler les lipides, les cellules doivent entrer en contact avec, ce qui est souvent permis par leur hydrophobicité de surface même si les interactions de type acide-base de Lewis, le potentiel de surface (ζ), les interactions de type van Der Waals ou les charges électrostatiques interviennent aussi.

Après des études anciennes menées par Mudd et Mudd en 1924 (citées par Rosenberg, 1991), les recherches sur ce thème ont réellement commencé dans les années 1970, à l'époque de l'engouement pour les croissances microbiennes sur hydrocarbures. Outre l'étude sur la disposition des cellules à l'interface huile/eau (Marshall et Cruickshank, 1973), les premières mesures de l'angle de contact furent rapportées sur des couches de bactéries (van Oss, 1978) et l'adhésion à l'huile fut étudiée (Reisfeld *et al.*, 1972; Horowitz *et al.*, 1975; Käppli et Fiechter, 1976; Neufeld *et al.*, 1980) menant à l'observation par McLee et Davies (1972) d'une croissance linéaire de *Torulopsis* sur hydrocarbures. Käppli et Fiechter (1976) étudièrent la répartition d'hexadécane marqué sur la surface de *C. tropicalis* et notèrent que les détergents (Tween 80 et Triton X-100) réduisaient l'adsorption. Neufeld *et al.* (1980) observèrent que *Acinetobacter calcoaceticus* se retrouvait entièrement à l'interface lors de la croissance sur hexadécane. Ces observations lancèrent un grand débat sur la nécessité d'avoir une adhésion des cellules à l'interface, une « pseudosolubilisation » de la phase insoluble ou une combinaison des deux pour avoir une croissance microbienne. Différents travaux conclurent que seuls les microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures pouvaient adhérer à l'interface. Des travaux déjà

anciens avaient auparavant observé que les acides gras à courte chaîne, c'est-à-dire solubles dans l'eau, sont le plus souvent toxiques pour les microorganismes (Azoulay *et al.*, 1964).

Quelques années plus tard, il fut montré que *A. calcoaceticus* RAG-1, un microorganisme « adhérent », était capable de produire un bioémulsifiant polysaccharidique et polyanionique, l'emulsan (Rosenberg *et al.*, 1979a et b). La question fut alors posée de savoir si cet émulsifiant, alors qu'il était encore lié sous la forme de minicapsules à la surface cellulaire, était l'agent d'adhésion de RAG-1 aux hydrocarbures.

C'est à ce moment qu'a été mis au point un test simple de mesure de l'adhésion microbienne à des solvants organiques (Rosenberg, 1991). Ce test a permis de clarifier certains points. Tout d'abord, certains microorganismes ne dégradent pas les huiles adhèrent très bien tandis que d'autres capables de dégrader les hydrocarbures n'adhèrent que peu. De plus, il ne semble pas y avoir de spécificité d'adhésion aux substrats métabolisables puisque RAG-1 adhère aussi bien au *n*-hexadécane, qu'il est capable de métaboliser, qu'au *n*-octane qu'il ne dégrade pas. Ce test permet donc de discriminer les cellules hydrophobes des cellules non-hydrophobes. De plus, il est à noter que des agents de surface comme l'isopropanol permettent de libérer les cellules adsorbées à la phase organique. Ce test, d'abord appelé « bacterial adhesion to hydrocarbons » (BATH) fut ensuite renommé MATH (Microbial adhesion to hydrocarbons). L'équipe de M.-N. Bellon-Fontaine a également mis au point une variante de ce test qui permet d'inclure l'étude des propriétés de donneurs ou d'accepteurs d'électrons des cellules en utilisant différents solvants. Ce test est alors appelé MATS (Microbial Adhesion To Solvents) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

2.2.2) Biosurfactants

Ce sujet a fait, dans les dernières années, l'objet de plusieurs synthèses qui ont en partie servi à rédiger cette partie (Banat, 2000; Georgiou *et al.*, 1992; Hommel, 1990)

2.2.2.1) PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS

Beaucoup de microorganismes (principalement des bactéries, les plus étudiées) sont connus pour produire des biosurfactants. Ces composés possèdent

en général une partie polaire et une partie apolaire, ce qui les place préférentiellement aux interfaces hydrophile/hydrophobe. A côté de la structure amphiphilique du peptide en hélice α où les acides aminés hydrophiles et hydrophobes sont arrangés sur les faces opposées, il existe une grande variété de molécules : glycolipides, lipopeptides, complexes polysaccharide-protéine, phospholipides, acides gras et lipides neutres. Le liposan, le bioémulsifiant de *C. lipolytica* serait composé de 83 % de sucres (glucose, galactose, galactosamine et acide galacturonique) et 17 % de protéines (Cirigliano et Carman, 1984, 1985).

La synthèse de ces surfactants peut avoir lieu *de novo* ou par biotransformation du substrat. Les molécules peuvent être produites en une seule fois ou, séparément, le groupe hydrophobe et celui hydrophile. A cause de la nature complexe de ces composés, la régulation de leur synthèse est mal connue même si des gènes responsables de cette synthèse ont été isolés (Sullivan, 1998 cité par Banat (2000)). En règle générale, les biosurfactants ne sont pas produits instantanément et leur effet n'est souvent visible qu'à partir de la fin de la phase exponentielle. Toutefois, ils peuvent être quelquefois apparentés aux composés de surface dont il était question dans le paragraphe précédent.

De nombreuses études traitent de l'effet de surfactants, principalement non biologiques, sur la croissance des microorganismes et l'on remarque que ces effets peuvent être la stimulation ou l'inhibition de l'oxydation des substrats par les microorganismes. Ceci pouvant s'expliquer par l'interaction directe des surfactants avec les microorganismes et par la compatibilité stérique et conformationnelle entre les deux. Une étude sur l'influence d'un rhamnolipide, biosurfactant de *Pseudomonas*, sur l'hydrophobicité cellulaire et sur la dégradation d'octadécane par ces bactéries relate que ce surfactant augmente l'hydrophobicité des cellules et la dégradation des hydrocarbures pour des souches dégradant lentement les alcanes mais, au contraire, ces molécules montreraient un léger effet inhibiteur sur la croissance des souches dégradant rapidement les alcanes (Zhang et Miller, 1994).

2.2.2.2) EFFET ANTIBIOTIQUE

Même si cela peut paraître paradoxal, certains organismes produisent des bio-

surfactants quand ils sont cultivés sur des milieux riches en composés hydrosolubles. Cette production allant même jusqu'à être inhibée, comme pour la surfactine produite par *B. subtilis*, par la présence d'hydrocarbures dans le milieu de culture. Cette observation est à relier à certaines propriétés antibiotiques que présentent les biosurfactants grâce peut-être à leur capacité à désorganiser la membrane lipidique des cellules. Ils interviendraient alors comme une « arme » dans la compétition pour la nourriture (Banat, 2000). Des études que nous avons menées au laboratoire sur la γ -décylactone, composé d'arômes sur lequel on reviendra par la suite, montrent que ce produit peut être assimilé à ces « armes » : par sa structure amphiphile avec une queue hydrophobe et un cycle oxygéné polaire, il rappelle les émulsifiants, bien que n'ayant qu'une faible capacité tensio-active. Sa toxicité, contrairement à celle d'un acide gras libre de taille comparable qui va principalement faire chuter le pH intracellulaire en transportant des protons dans le cytoplasme (Aguedo *et al.*, 2001), vient du fait que la lactone augmente la fluidité membranaire (Aguedo *et al.*, 2002a) en s'intégrant très rapidement aux membranes biologiques (Aguedo *et al.*, 2002b). Cette molécule est d'ailleurs produite en fin de phase exponentielle de croissance, ce qui coïncide avec la baisse de disponibilité du substrat.

2.3) Mécanisme de contact entre cellule et substrat

Pour les alcanes, trois possibilités d'entrée dans les cellules ont été proposées (Tanaka et Fukui, 1989) :

- l'entrée par contact direct entre les gouttelettes d'alcane et les cellules microbiennes

- l'entrée à partir d'une phase d'alcane modifiée par des productions cellulaires

- l'entrée à partir d'alcanes solubilisés (ou pseudo-solubilisés)

Elles se résument en fait à un mécanisme direct d'accès interfacial ou transport direct interfacial (première possibilité) et un transport facilité par des biosurfactants (deux dernières possibilités). Récemment, Bouchez-Nañtali *et al.* (1999) ont testé 61 souches bactériennes vis-à-vis des critères suivants : hydrophobicité des cellules, tension de surface, production de biosurfactants glycolipidiques extracellulaires. Cette étude montre qu'il existe deux

familles de souche, l'une (47 % des souches de l'étude), présentant une hydrophobicité importante et pas de production de surfactant et l'autre (53 %), pour laquelle l'hydrophobicité est faible ou nulle mais qui produit des émulsifiants. On peut noter que chez *Y. lipolytica*, la présence d'acides gras dans le milieu n'induit pas une augmentation des propriétés d'hydrophobicité de surface mais une augmentation des caractères électro-donneur/électro-accepteur de la surface (Aguedo *et al.*, 2002c). Cette induction de caractères polaires pour une souche performante lors de la croissance sur des substrats apolaires pourrait correspondre à la production de surfactants même si, pour la souche étudiée, il n'ont pas encore été mis en évidence.

2.4) Passage des parois

La composition de la paroi de *Y. lipolytica* a été déterminée par Vega et Dominguez (1986) : 70 % de sucres neutres, 7 % de sucres aminés, 15 % de protéines et 5 % de lipides. L'ensemble formé constituerait, d'après De Nobel *et al.* (1990a et b), un réseau poreux perméable aux protéines globulaires jusqu'à 400 kDa. Medvedeva *et al.* (1969) ont observé que des sphéroplastes de *C. tropicalis* sont capables de métaboliser l'acide oléique, concluant que la paroi cellulaire n'est pas nécessaire à ce métabolisme. Leur étude ne donne pourtant pas d'informations sur le passage des molécules hydrophobes à travers la paroi. Par contre, en 1975, 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 (mélange de C10-C13) alors qu'elle est lisse si la source de carbone est un sucre. Sur des coupes de levures observées en microscopie électronique à transmission, les protrusions de 100-200 nm de diamètre paraissent composées de sous-unités de 50 nm de diamètre qui semblent former un canal dépassant légèrement sur la surface des levures. Ces protrusions ne sont présentes que pendant la croissance exponentielle sur alcane, elles disparaissent en phase stationnaire et réapparaissent suite à l'ajout d'alcane dans le milieu. Elles font, par contre, vraiment partie de la structure et ne sont pas constituées d'amats d'alcanes ou de lipides simplement attachés à la surface car elles ne disparaissent pas après lavage de la cellule avec des solvants organiques ou des détergents (Tanaka et Fukui, 1989). Meisel *et al.*

(1976, 1977) avaient déjà observé des canaux traversant les parois de *C. tropicalis* ayant poussé sur alcane. Juste après, Käppeli et Fiechter (1977), ont isolé un complexe polysaccharide-acide gras de la surface de *C. tropicalis* ayant poussé sur alcane suggérant un rôle dans le métabolisme des alcanes.

2.5) Passage de la membrane plasmique

Le passage d'acides gras au travers de la membrane plasmique pour sa part, même s'il a été étudié depuis longtemps fait toujours l'objet de controverses. Il est vrai que les études, même *in vitro*, sont rendues difficiles par l'état des acides gras en conditions expérimentales puisque, aux pH physiologiques et à des concentrations supérieures aux CMC, ils forment souvent un mélange de monomères et de savons précipités. Les données sont pourtant assez nombreuses chez les cellules animales, où les études *in vitro* se font, comme *in vivo*, par adsorption des acides gras à de l'albumine ce qui évite l'état saponifié mais qui rajoute une étape peu maîtrisée : la désorption en présence des membranes biologiques (Hamilton, 1998).

Chez la levure, Kohlwein et Paltauf ont montré en 1983 qu'acides laurique et oléique pénètrent dans les cellules de *S. cerevisiae* et *Saccharomycopsis lipolytica* (syn. *Y. lipolytica*) par diffusion pour des concentrations supérieures à 10 μ M alors qu'en dessous de ces concentrations, un transporteur n'utilisant pas d'énergie est requis. Les concentrations utilisées restaient, dans cette étude, inférieures aux CMC. Ces résultats sont comparables à ceux observés sur des cultures cellulaires animales, c'est-à-dire un transporteur non-énergie dépendant pour les concentrations physiologiques et au delà, de la diffusion.

Il faut préciser que des acides gras non ionisés ou leurs dérivés peuvent traverser une bicouche artificielle de phospholipides rapidement ($t_{1/2} < 1$ s) (Kamp *et al.*, 1993).

III - Cytoplasme

3.1) Stockage des acides gras

Des microorganismes cultivés sur lipides sont, dans certains cas, capables d'accumuler des acides gras (Endrizzi *et al.*, 1996). Des inclusions lipidiques ont ainsi été observées chez *Pseudomonas*

aeruginosa cultivé sur huile d'olive amenant à un contenu lipidique pouvant atteindre 38 % du poids sec de la cellule (De Andrès *et al.*, 1991). Cette augmentation de la part des lipides peut également être observée chez des levures cultivées sur acides gras (Ratledge et Evans, 1989). Le stockage peut prendre différentes formes. Gill *et al.* (1977) parlent de « vacuoles » lipidiques chez un *Candida* et Brennan et Lösel (1978) appellent « sphérosomes » les structures de stockage entourées de membranes qui restent au contact d'organites, facilitant ainsi l'apport des acides gras sur le lieu d'oxydation. Il semble que cette capacité à accumuler des lipides constitue un avantage pour les microorganismes évoluant dans des environnements hostiles froids (cité par Guerzoni *et al.* (1993).

Certains auteurs ont étudié plus spécifiquement le stockage du ricinoléate de méthyle. Feron *et al.* (1997) ont noté par exemple une accumulation d'acide ricinoléique dans des cellules de *Sporidobolus salmonicolor* mises en présence de ricinoléate de méthyle en fin de croissance sur substrat hydrosoluble. Par contre, ces cellules n'accumulent pas d'acide oléique en présence d'oléate de méthyle. Ces auteurs ont suggéré que le ricinoléate de méthyle pénètre plus facilement dans les cellules à cause d'une perméabilisation due à un produit du catabolisme, la γ -décalactone. Cette lactone, dont nous avons déjà parlé plus haut, semble avoir des effets toxiques sur les cellules car le métabolisme du ricinoléate de méthyle est plus lent et ils n'observent pas, en microscopie, d'augmentation du nombre d'organites.

Le stockage de ricinoléate de méthyle (marqué au rouge nil) par la levure *Yarrowia lipolytica* poussant sur cet ester d'acide gras a également été étudié au laboratoire et nos résultats montrent qu'il semble très dépendant de l'état physiologique des cellules (Aguedo *et al.*, 2000).

Parmi les applications liées au stockage des lipides chez les microorganismes, il faut mentionner que certains microorganismes, en particulier certaines souches de *Y. lipolytica*, sont utilisées pour produire de l'huile (qui s'accumule dans les cellules). Le point critique de cette production est la faible concentration d'huile atteinte par masse de cellule (0,25-0,33 g d'huile par g de poids sec) (Aggelis et Komaitis, 1999).

D'autres organismes, en particulier des bactéries, sont capables d'accumuler

des polymères d'acides gras (polyhydroxyalcanoate, PHA). Il s'agit de plastiques pouvant avoir différentes propriétés en fonction des sous-unités impliquées (Sudesh *et al.*, 2000), mais surtout, ayant une qualité appréciée : il est biodégradable (Shimao, 2001). De nombreux travaux visent à augmenter les productions en modifiant les voies génétiques notamment chez des organismes qui ne sont pas traditionnellement producteurs (Madison et Huisman, 1999). Ceci peut se faire en ajoutant le gène codant pour la PHA polymérase (ou synthase) qui peut provenir des genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*... Chez *S. cerevisiae*, cet essai est peu concluant car il mène seulement à une accumulation de PHA correspondant à 0,5 % du poids sec de la cellule (Leaf *et al.*, 1996). Ce problème semble provenir d'une faible disponibilité de sous-unités chez la levure (Mittendorf *et al.*, 1998).

3.1.1) Prise en charge des acides gras dans le cytoplasme

3.1.1.1) FABP (en partie d'après

Van Nieuwenhoven *et al.* (1996)

Les acides gras étant peu solubles en milieu aqueux, ils doivent être pris en charge dans la cellule pour jouer leur rôle dans la production d'énergie, la formation de phospholipides et dans les voies de transduction de signaux. Cette prise en charge peut se faire par des protéines qui se lient aux acides gras. Ces protéines sont appelées Fatty Acid Binding Proteins (FABP). Pourtant, si ces protéines ont été bien caractérisées chez les cellules animales, les travaux sont nettement moins avancés chez la levure et ils ont, de plus, rarement été couronnés de succès. Ainsi, Kurlandzka *et al.* (1995) à la recherche d'un gène codant pour une FABP chez *S. cerevisiae* ont observé un gène « essentiel » mais n'ayant pas d'homologie avec les gènes d'autres espèces. Les travaux ont alors plutôt porté sur l'introduction de FABP de mammifères chez *S. cerevisiae*. Smaczinska *et al.* (1994) n'ont pas décelé d'effet de cette FABP sur l'induction de l'acyl-CoA oxydase, par contre Scholz *et al.* (1990), s'ils n'ont pas observé d'effet de la FABP bovine sur la composition totale en lipides, ont détecté une diminution significative de la désaturation de l'acide palmitique exogène pour les transformants avec cette FABP. Chez *Y. lipolytica* par contre, Dell'Angelica *et al.* (1992) ont identifié une FABP.

3.1.1.2) ACTIVATION PAR LES ACYL-CoA SYNTHÉTASE (ACS)

(en partie d'après Shindo et Hashimoto, 1978)

Le métabolisme des acides gras nécessite une activation initiale en leur thioester de coenzyme A. Cette réaction est catalysée par l'acyl-CoA synthétase. Il existe plusieurs isoformes de cette enzyme présentant des différences de longueurs de chaîne des substrats acceptés, et de localisation dans la cellule. Elles servent à la prise en charge d'acides gras exogènes ou à la synthèse d'acides gras endogènes. Une acyl-CoA synthétase très active et spécifique des chaînes de 14 à 18 carbones a été décrite chez *C. lipolytica* il y a plus de 20 ans (Hosaka *et al.*, 1979). Chez *P. pastoris*, Kalish *et al.* (1995) ont observé que cette enzyme était peroxysomale si elle était spécifique des très longues chaînes, alors qu'elle était mitochondriale pour les longues chaînes. Dans les peroxysomes de *S. cerevisiae*, il existe une acyl-CoA synthétase spécifique des acides gras à longue chaîne (C12 à C20) et une autre spécifique des acyl-CoA synthétases à très longue chaîne (C22 et plus) (Watkins *et al.*, 1998). Cette levure possède en fait quatre gènes codant pour des acyl-CoA synthétases (Faa1p à Faa4p) dont seuls deux (Faa1p et Faa4p) servent à l'activation des acides gras pour leur dégradation (Trotter, 2001). Kasuya *et al.* (1996) ont testé l'effet inhibiteur d'acides carboxyliques hydroxylés sur une acyl-CoA synthétase spécifique des chaînes moyennes et ont noté que, pour les groupes hydroxyles situés sur le carbone 2 (comme l'acide 2-hydroxyoctanoïque qui est un intermédiaire dans le catabolisme de l'acide ricinoléique), cet effet est important.

3.1.1.3) LE SYSTÈME CARNITINE

Les pools acyl-CoA/CoA doivent être maintenus constants même dans les conditions de turn-over important d'acyl-CoA. Ce rôle de gardien de l'homéostasie des pools de CoA de la cellule peut être joué par le système carnitine. Il est basé sur la réaction de la carnitine acyl-transférase (CAT).

Pour tenir ce rôle, les dérivés de carnitine peuvent passer au travers des barrières intracellulaires fournissant un mécanisme de navette entre les microsomes, les peroxysomes et les mitochondries. Les études ont surtout porté sur les cellules de mammifères, toutefois Pagot et Belin (1996) ont également montré qu'un inhibiteur de CAT faisait diminuer la β -oxydation peroxysomale chez *Pichia*

guilliermondii. Chez *S. cerevisiae* et *C. lipolytica*, un seul gène code pour les deux isoformes de CAT mitochondriale et peroxysomale possédant à la fois un signal d'adressage AKL en l'extrémité C-terminale et une séquence interne d'adressage aux peroxysomes (PTS), et une séquence N-terminale d'adressage aux mitochondries (MTS) (Elgersma *et al.*, 1995).

3.1.1.4) LES ACYL-CoA BINDING PROTEINS (ACBP)

La prise en charge des acides gras énergisés sous forme d'ester de CoA peut également provenir des ACBP. Une revue récente décrit leur rôle dans le transport et le métabolisme des esters de CoA chez les cellules eucaryotes (Knudsen *et al.*, 1999). L'acyl-CoA binding protein a initialement été découverte comme impurité dans une préparation de FABP (Mogensen *et al.*, 1987). Elle est une protéine cytosolique de 10 kDa que l'on trouve chez toutes les cellules eucaryotes avec un degré de similarité important. Elle est repliée en quatre hélices α et le site actif se trouve dans une fente hydrophobe sur la surface de l'ACBP, la tête CoA protégeant la chaîne acyl des interactions avec le solvant. L'ACBP se fixe à des esters de CoA à chaînes moyennes ou longues avec une très grande affinité et une préférence pour les esters d'acyl-CoA de C14 à C22. *In vitro*, elle diminue l'effet inhibiteur des acyl-CoA à longue chaîne sur l'acyl-CoA carboxylase, protège les acyl-CoA contre les hydrolases et stimule les acyl-CoA synthases mitochondriales (Rasmussen *et al.*, 1993). Sa surexpression chez *S. cerevisiae* entraîne une augmentation du niveau d'acyl-CoA montrant qu'elle possède un rôle de formation du pool (Knudsen *et al.*, 1994; Mandrup *et al.*, 1993). De même, les perturbations engendrées par la délétion du gène codant pour l'ACBP chez *S. cerevisiae* suggèrent fortement un rôle de transporteur d'acyl-CoA (Schjerling *et al.*, 1996). D'après les expériences *in vitro*, les esters de CoA à longues chaînes interviennent dans la régulation de beaucoup de fonctions cellulaires comme, entre autres, celle des enzymes du métabolisme des lipides, des translocases, des pompes et des canaux ioniques, des kinases et des protéines de transport. Pourtant, ces expériences *in vitro* sont difficiles en raison du caractère amphiphile de ces molécules qui forment des micelles à faible concentration rendant difficile la prévision des concentrations en acyl-CoA libres.

En plus de la régulation directe par les esters de CoA, le complexe acyl-CoA/ACBP peut aussi avoir un rôle de substrat enzymatique et donc de régulateur pour certaines activités.

Pourtant, ce rôle semble se limiter au cytosol car les études d'immunolocalisation n'ont pas permis de détecter des ACBP dans les peroxysomes. Les concentrations peroxysomales d'acyl-CoA pourraient donc être susceptibles de variations plus importantes que celles cytosoliques.

3.1.2) Autres transports cytosoliques

Le cytoplasme n'est pas seulement situé sur le chemin des peroxysomes pour les acides gras mais il est également traversé par les produits de l'oxydation peroxysomale. Ainsi, les acétyl-CoA générés dans les peroxysomes doivent être transportés dans les mitochondries pour achever leur oxydation en CO_2 et H_2O . Deux voies ont été identifiées pour le transport des unités acétyl (van Roermond *et al.*, 1995). Dans la première, les acétyl-CoA vont intégrer le cycle peroxysomal du glyoxylate pour produire du succinate qui va ensuite être transporté vers les mitochondries probablement à l'aide de Acr1p, transporteur supposé du dicarboxylate (Palmieri *et al.*, 1997). La seconde implique la conversion intraperoxysomale de l'acétyl-CoA en acétyl-carnitine catalysée par la carnitine acétyl-transférase (Cat2p) (**figure 1**). Cette enzyme est responsable de plus de 95 % de l'activité carnitine acétyl-transférase chez les levures ayant poussé sur oléate (Kispal *et al.*, 1993).

3.2) β -Oxydation

3.2.1) Peroxysomes et mitochondries

La théorie de la β -oxydation a été émise dès 1905 par Knoop (cité par Endrizzi *et al.*, 1996) d'après l'observation que, lors de la dégradation des acides gras, apparaissent des acides gras plus courts de deux carbones. Depuis, les travaux ont permis de mettre en évidence deux systèmes enzymatiques différents catalysant les mêmes réactions dans des compartiments différents, la β -oxydation mitochondriale et celle peroxysomale (**figure 2**) (ou glyoxysomale chez les plantes).

Chez les cellules animales, la β -oxydation peut avoir lieu dans les deux compartiments, avec un rôle qui semble être de fournir de l'énergie dans les mitochondries et de prendre en charge des

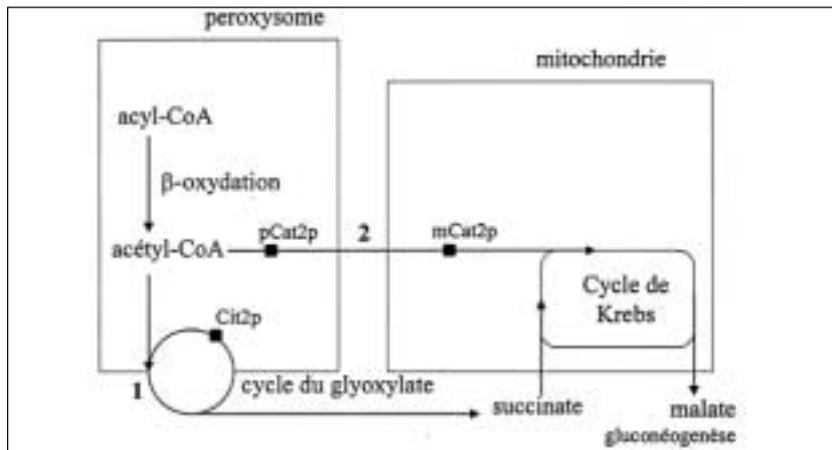


Figure 1 : Représentation schématique des deux voies de transport des unités acétyles des peroxyosomes aux mitochondries chez *S. cerevisiae*. Voie 1 : cycle du glyoxylate ; voie 2, transport d'acétyl-CoA carnitine dépendant (d'après van Roermund et al. (1999).

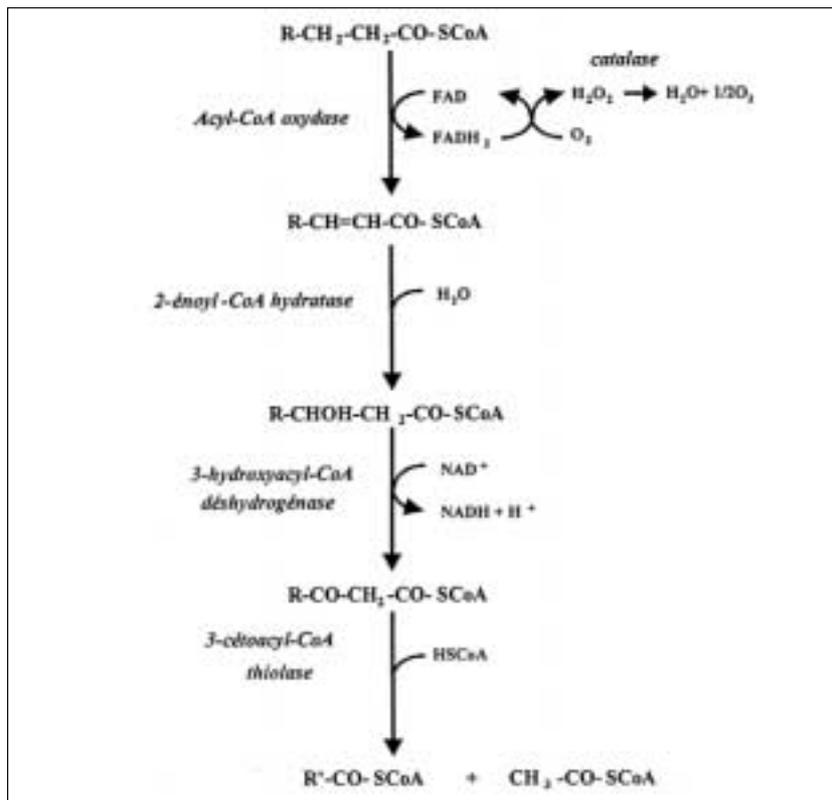


Figure 2 : Les différentes étapes de la β -oxydation peroxyosomale.

« substrats spéciaux » dans les peroxyosomes où elle accepte des substrats à chaîne très longue ou ramifiée. D'un point de vue enzymatique, la différence essentielle entre les deux systèmes se situe dans l'enzyme catalysant la première réaction, l'acyl-CoA oxydase chez les peroxyosomes, utilisant directement l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électron, et l'acyl-CoA déshydrogénase dans les mitochondries, qui utilise les chaînes de transfert électronique de cet organite, d'où un meilleur rapport énergétique (Bartlett *et al.*, 1994). L'or-

ganisation est également très différente puisque, dans les mitochondries, les enzymes sont liées aux membranes avec les trois activités énoyl-CoA hydratase, hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et thiolase regroupées au sein d'une même enzyme multifonctionnelle. Ce regroupement pourrait même inclure une enzyme régénérant le NAD^+ pour le complexe et ne pas utiliser le pool NAD/NADH de l'ensemble de l'organite (Eaton *et al.*, 1999 et 2000). Dans les peroxyosomes qui sont des organites inductibles, l'organisation semble moins poussées, les enzymes

sont matricielles, la thiolase est séparée de l'enzyme multifonctionnelle...

Chez la levure, seule la β -oxydation peroxyosomale a été observée jusqu'à présent bien que des travaux de l'équipe de Feron décrivent une souche de *Sporidobolus* possédant un comportement rappelant la β -oxydation mitochondriale (Blin-Perrin *et al.*, 2000). Elle prend donc en charge à la fois la détoxification et l'énergie de la cellule.

3.2.2) Les peroxyosomes

Les peroxyosomes ont été reconnus comme des organites par Rhodin en 1954 (cité par Endrizzi *et al.*, 1996). Ils sont présents dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes (Borst, 1989 ; Veenhuis et Harder, 1991). Isolés et caractérisés biochimiquement par DeDuve en 1965 (cité par Endrizzi *et al.*, 1996), ils possèdent un grand nombre d'enzymes (autour de 40) correspondant à des métabolismes très variés (Tanaka et Fukui, 1989) et catalysant des réactions menant à la formation de peroxyde d'hydrogène (De Duvé et Baudhuin, 1966). Chez les levures, l'existence des peroxyosomes a d'abord été démontrée chez *S. cerevisiae* (Avers et Federman, 1968) puis chez des levures capables d'utiliser comme seule source de carbone des alcanes (Teranishi *et al.*, 1974), des acides gras (*S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, (Tanaka *et al.*, 1982)), du méthanol (genres *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*) ; (Fukui *et al.*, 1975a et b)), de l'acide urique (Nicolay *et al.*, 1987) ou des amines (Veenhuis *et al.*, 1986).

Les peroxyosomes apparaissent en microscopie électronique à transmission comme des vésicules de petite taille (0,2 à 1,5 μm de diamètre), opaques aux électrons, de forme arrondie ou allongée, entourées par une membrane simple et fine (Meisel *et al.*, 1977 ; Veenhuis et Harder, 1988 ; Borst, 1989). Ils ne contiennent pas de ribosomes ou d'acides nucléiques (Veenhuis et Harder, 1991) et sont donc complètement dépendants du matériel génétique nucléaire.

Ils forment un compartiment au pH régulé différent de celui du cytosol qui a été décrit comme plus acide (1,1 à 1,3 unité pH) par Nicolay *et al.* (1987) et, récemment grâce à des sondes fluorescentes adressées aux peroxyosomes, comme plus basiques (Dansen *et al.*, 2000). Ce pH est régulé par une ATPase membranaire (Douma *et al.*, 1990) ce qui donne naissance à une force protomotrice influençant le transport à travers la

membrane. La perméabilité de la membrane de cet organite a fait l'objet de plusieurs études qui donnent des résultats controversés notamment concernant le passage des cofacteurs. En effet, il semble que les peroxysomes soient perméables aux petits solutés (saccharose, NAD^+ , CoA ATP et carnitine) *in vitro* et que ceci soit dû à la présence de protéines formant des pores (Van Veldhoven *et al.*, 1987). Des résultats plus récents suggèrent que, *in vivo*, la membrane est imperméable au NAD (H) et aux acétyl-CoA (van Roermund *et al.*, 1995). Enfin, Palmieri *et al.* (2001) et van Roermund *et al.* (2001) viennent d'identifier un transporteur impliqué dans l'entrée d'ATP dans le lumen peroxysomal.

3.2.3) Les enzymes de la β -oxydation

3.2.3.1) LES ACYL-CoA OXYDASES (Aox)

3.2.3.1.1) Réaction catalysée

Les acyl-CoA oxydases catalysent l' α - β insaturation des acyl-CoA, substrats de la β -oxydation peroxysomale. Elles oxydent leur substrat par une anti-élimination des hydrogènes *pro-2R* et *pro-3R* des thio-esters d'acyle avec réduction de la flavine liée (Jiang et Thorpe, 1983; Kawaguchi *et al.*, 1980). Elles sont ensuite réoxydées directement par l'oxygène moléculaire avec formation de peroxyde d'hydrogène (Osumi et Hashimoto, 1978). Un mécanisme d'élimination a été proposé par Rojas *et al.* (1985). Ils suggèrent que le groupe carbonyle de l'acyl-CoA soit protoné, provoquant ainsi le départ du proton en C_2 , sans énoisation et que cela soit suivi par l'élimination d'un hydrure en C_3 .

L' H_2O_2 produit par l'oxydase sera réduit par une catalase. Il existe chez *S. cerevisiae* deux catalases, une cytoplasmique, la catalase T, et l'autre liée à des organites, notamment présente dans les peroxysomes, la catalase A (Mate *et al.*, 1999). Cette dernière est co-induite avec les acyl-CoA oxydases par des acides gras de 10 à 18 carbones (Skoneczny *et al.*, 1988). Après de multiples travaux chez différents organismes, sa structure a été élucidée récemment chez la levure (Mate *et al.*, 1999) et continue de faire l'objet d'études, notamment sur le site actif, en particulier sur l'effet de mutations qui paradoxalement facilitent l'accès au site mais ralentissent la catalyse (Putnam *et al.*, 2000).

3.2.3.1.2) Spécificités

La plupart des eucaryotes possèdent des familles d'Aox avec deux ou trois représentants suivant les organismes et les tissus chez les mammifères et les végétaux, et, de un à cinq chez la levure avec le maximum pour *Y. lipolytica* (**tableau 2**). Il existe beaucoup d'Aox sélectives de divers substrats.

Le plus grand nombre de spécificités différentes a été observé chez les mammifères ce qui peut s'expliquer par la fonction de détoxification des peroxysomes notamment dans les cellules hépatiques de ces organismes : la palmitoyl-CoA oxydase pour les acides gras à longue chaîne, les acides dicarboxyliques et les prostaglandines (Osumi *et al.*, 1980; Schepers *et al.*, 1990; Mannaerts et Van Veldhoven, 1993), la pristanoyl-CoA oxydase, acceptant des substrats méthylés en 2 mais aussi des substrats non ramifiés (Van Veldhoven *et al.*, 1991; Mannaerts et Van Veldhoven, 1993; Van Veldhoven *et al.*, 1994) et enfin, la trihydroxycoprostanoyl-CoA oxydase (THC) catalysant l'oxydation des substrats ramifiés (Schepers *et al.*, 1990).

Chez la levure, comme chez les cellules végétales, les spécificités détectées jusqu'à présent ne concernent que la longueur de la chaîne carbonée : affinité pour les substrats à courte (C6-C8) ou à longue (C10-C16) chaîne chez les levures (Jiang et Thorpe, 1983; Shimizu *et al.*, 1979; Okazaki *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2000) et pour les courtes (C6), les moyennes (C10-14) et les longues (C16-C18) chaînes chez les végétaux. Pourtant, chez les levures « non-conventionnelles » ayant une grande affinité pour les substrats hydrophobes comme *C. tropicalis* et *Y. lipolytica*, plusieurs gènes codant pour des Aox faiblement spécifiques ou n'ayant pas d'activité détectée ont été observés (Masuda *et al.*, 1995; Waché *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998, 1999a et b). Les auteurs suggèrent un rôle de ces enzymes dans la régulation des autres Aox. Il est à noter que chez les levures ou les cellules végétales, les études ne mentionnent pas l'utilisation de substrats ramifiés dans les tests, ce qui peut expliquer la moins grande diversité des spécificités rencontrées.

3.2.3.1.3) Structure et propriétés

La structure primaire n'a, en général, pas été étudiée directement mais plutôt déduite des gènes correspondants. Les séquences permettent d'établir une parenté avec la superfamille à laquelle

appartiennent les acyl-CoA déshydrogénases (Nandy *et al.*, 1996). Les gènes codant pour les Aox présentent des homologies permettant de les classer en plusieurs groupes : les Aox des eucaryotes supérieurs d'un côté, elles-mêmes séparées entre celles d'origine animale et végétale et de l'autre les Aox de levures avec la branche de *Saccharomyces* et celle des *Candida*.

Les Aox de levures ont une structure quaternaire généralement homogène sous forme d'un octamère, bien que, chez *Y. lipolytica* Titorenko *et al.* (2002) ont montré que les cinq Aox de cette levure formaient un hétéro pentamère.

3.2.3.1.4) Applications biotechnologiques

L'Aox catalysant l'étape limitante de la β -oxydation, elle est la première cible lors des études visant à modifier cette voie. Ainsi, le groupe de Picataggio (Picataggio *et al.*, 1992) a supprimé toutes les Aox fonctionnelles d'un *Candida* pour diriger la voie vers la production d'acides α - ω -dicarboxyliques à chaîne longue, substrat pour produire de l'éthylène brassylate (tridécanedioïque) aux notes musquées très demandées par l'industrie des cosmétiques (Fabritius *et al.*, 1998). Il semble pourtant que, chez la souche de *Candida* utilisée industriellement, des mutants ayant encore une activité Aox possèdent les mêmes rendements de production d'acides dicarboxyliques montrant que, pour cette souche, l'étape cruciale est l' ω -oxydation et non l'absence de β -oxydation (Hara *et al.*, 2001).

On peut également imaginer d'intégrer les données sur les spécificités de substrats pour obtenir des mutants produisant des produits à chaîne carbonée de taille moyenne. Nous avons notamment montré l'importance de ces enzymes dans la production de γ -déalactone (Pagot *et al.*, 1998; Waché *et al.*, 1998, 2000) et dans sa dégradation (Waché *et al.*, 2000, 2001). D'autres procédés font appel à des microorganismes pour produire des acides gras à chaînes moyennes notamment pour préparer des stéroïdes ou des cétones aliphatiques (anonyme, 1961), des poly-3-hydroxycanoates à chaînes moyennes (anonyme, 1998; Green, 2001) et des huiles (Katayoon, 1998) (dans ce cas, la production a lieu par des cellules végétales). Ils pourraient donc être améliorés par une maîtrise des Aox présentes. Sur ce sujet, on peut mentionner les travaux actuels de

J.-M. Nicaud et T. Chardon à Grignon sur l'évolution dirigée des Aox.

3.2.3.2) ENZYME MULTI-FONCTIONNELLE (MFE)

Elle se nomme ainsi car elle possède plusieurs activités. La MFE peroxysomale présente les activité 2-énoyl-CoA hydratase et hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, catalysant les deuxième et troisième réactions de la β-oxydation.

Il existe deux MFE appelées MFE1 et MFE2. La première métabolise les *trans*-2-acyl-CoA en 3-céto métabolites via le (3*S*)-hydroxy-acyl-CoA tandis que la deuxième le fait via la forme (3*R*). Il existe MFE1 et MFE2 chez les mammifères et elles prennent en charge des substrats non ramifiés pour la première et ramifiés pour la seconde. Chez la levure, il n'existe que MFE2 qui a été purifiée, caractérisée chez *S. cerevisiae* (Kunau *et al.*, 1988; Hiltunen *et al.*, 1992) et *C. tropicalis* (Moreno de la Garza *et al.*, 1985). Chez cette dernière levure, une activité 3-hydroxyacyl-CoA épimérase a également été détectée dans cette enzyme par contre et contrairement à ce qui est rencontré chez *E. coli*, les activités 2,3-énoyl-CoA isomérase et 3-oxoacyl-CoA thiolase ne sont pas coéluées (Moreno de la Garza *et al.*, 1985). La stéréochimie de la voie ne semble pas être une obligation de la cellule puisqu'en remplaçant le gène codant pour MFE2 chez *S. cerevisiae* par celui codant pour MFE1 issu des peroxysomes de rat, il est possible d'inverser la chiralité (Filppula *et al.*, 1995).

Parmi les différences entre les MFE2 de levures et de mammifères, on note, en comparant les séquences d'acides aminés que les MFE2 de levures contiennent les deux domaines A et B appartenant à la superfamille des déshydrogénases/réductases d'alcools à courte chaîne alors que celles de mammifères n'ont qu'un domaine (Jörnvall *et al.*, 1995). L'activité (3*R*)-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de MFE2 appartient d'ailleurs à ces domaines (Qin *et al.*, 1999). En exprimant les deux domaines de cette protéine

provenant de *C. tropicalis* chez *E. coli*, les spécificités de substrat ont pu être précisées (Qin *et al.*, 2000). Cette protéine catalyse la déshydrogénation des (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA non ramifiés et ne possède pas d'activité sur les substrats *S* ni sur les 2-énoyl-CoA. Par contre, elle possède également, comme ses équivalents de mammifères, des activités déshydrogénases sur des dérivés de cholestanoyl-CoA et de 17-β-estradiol intervenant dans le métabolisme des acides biliaires. La régulation de l'expression du gène codant pour MFE2 chez *C. tropicalis* (Sloots *et al.*, 1991), l'adressage de son produit aux peroxysomes et son importance dans la régulation de la taille de ces organites chez *Y. lipolytica* (Smith *et al.*, 2000) ont également été étudiés. Ces observations seront décrites dans les paragraphes correspondants (3.2.4.2.2.1.).

La MFE a également une importance en biotechnologie car, après les travaux de Huang *et al.* (1993) suggérant l'implication de la β-oxydation dans la conversion de l'acide férulique en acide vanillique et guaïacol chez *Rhodotorula rubra*, un procédé a été récemment breveté utilisant l'activité hydratase de *Pseudomonas fluorescens* pour produire de la vanilline (Gasson *et al.*, 2001)

3.2.3.3) THIOLASE

Les thiolases catalysent la coupure thiolytique du 3-cétoacyl-CoA. Il existe deux types de thiolases, l'acétoacétyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.9) qui catalyse la coupure de l'acétoacétyl-CoA ou, dans l'autre sens, la condensation de l'acétyl-CoA, et, la 3-cétoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16) qui possède une spécificité de substrat assez large pour les 3-cétoacyl-CoA de longueur de chaîne carbonée supérieure ou égale à 4 carbones.

Chez la levure, le gène codant pour la thiolase a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* en 1991 (Igal *et al.*, 1991), chez *Y. lipolytica* en 1993 (Berninger *et al.*, 1993), puis celui de l'acétoacétyl-CoA thiolase de *S. cerevisiae* a été étudié (Hiser *et al.*, 1994) et enfin

l'équipe de Kanayama a repéré ces gènes chez *Candida tropicalis* (Kanayama *et al.*, 1997; Kanayama *et al.*, 1998). Chez *S. cerevisiae*, cette protéine est dimérique (Mathieu *et al.*, 1997). La réaction catalysée comprend deux étapes qui sont présentées sur la **figure 3**.

La détermination de la structure de cette protéine a permis d'affiner les connaissances sur cette réaction et en particulier sur les quatre étapes: formation d'un intermédiaire covalent, remplacement de l'acétyl-CoA par le CoA, activation du CoA et formation du produit (Mathieu *et al.*, 1997).

3.2.3.4) LES ENZYMES AUXILIAIRES DE LA β-OXYDATION

A côté des activités enzymatiques de la β-oxydation des acides gras saturés, d'autres activités sont nécessaires à la prise en charge des chaînes insaturées. Il s'agit des activités 2,4-diénoyl-CoA réductase (ScSps19p) et Δ³-Δ²-énoyl-CoA isomérase (ScEci1p). L'étude des activités de ces protéines et de la croissance de mutants ne possédant pas ces activités a permis d'établir le modèle présenté sur la **figure 4** (Geisbrecht *et al.*, 1998; Gurvitz *et al.*, 1999a; Gurvitz *et al.*, 1999b).

Il faut noter par rapport à ces voies proposées chez *S. cerevisiae* qu'il existe, semble-t-il, une diversité quant à la prise en charge des doubles liaisons lors de la dégradation des acides gras chez la levure. En témoigne l'identification d'intermédiaires différents lors de la production de γ-décalactone à partir de ricinoléate de méthyle chez *Sporidiobolus odorus*, 2-*trans*, 5-*cis*-diénoyl-CoA et 3-*trans*, 5-*cis*-diénoyl-CoA (voie de la réductase) (Haffner et Tressl, 1995), chez *Pichia Guillermondii*, 3-*cis*, 5-*cis*-diénoyl-CoA (Iacazio *et al.*, 2002) et chez *Y. lipolytica*, dodéc-3-én-6-olide (voie de l'isomérase) (Gatfield *et al.* 1993).

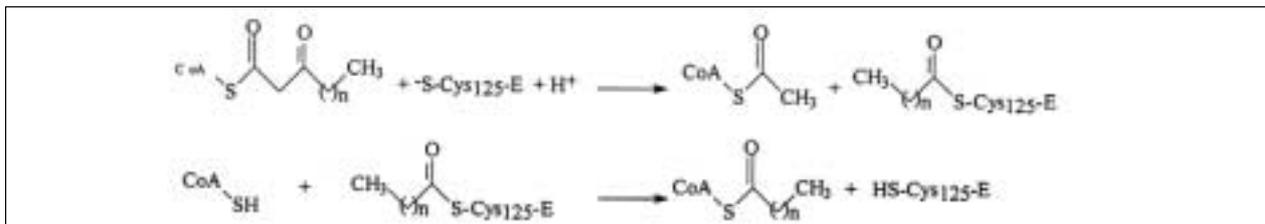


Figure 3: Les deux étapes de la dégradation thiolytique d'une molécule de 3-cétoacyl-CoA. Un intermédiaire est formé avec la Cys₁₂₅ (d'après [Mathieu et al., 1997]).

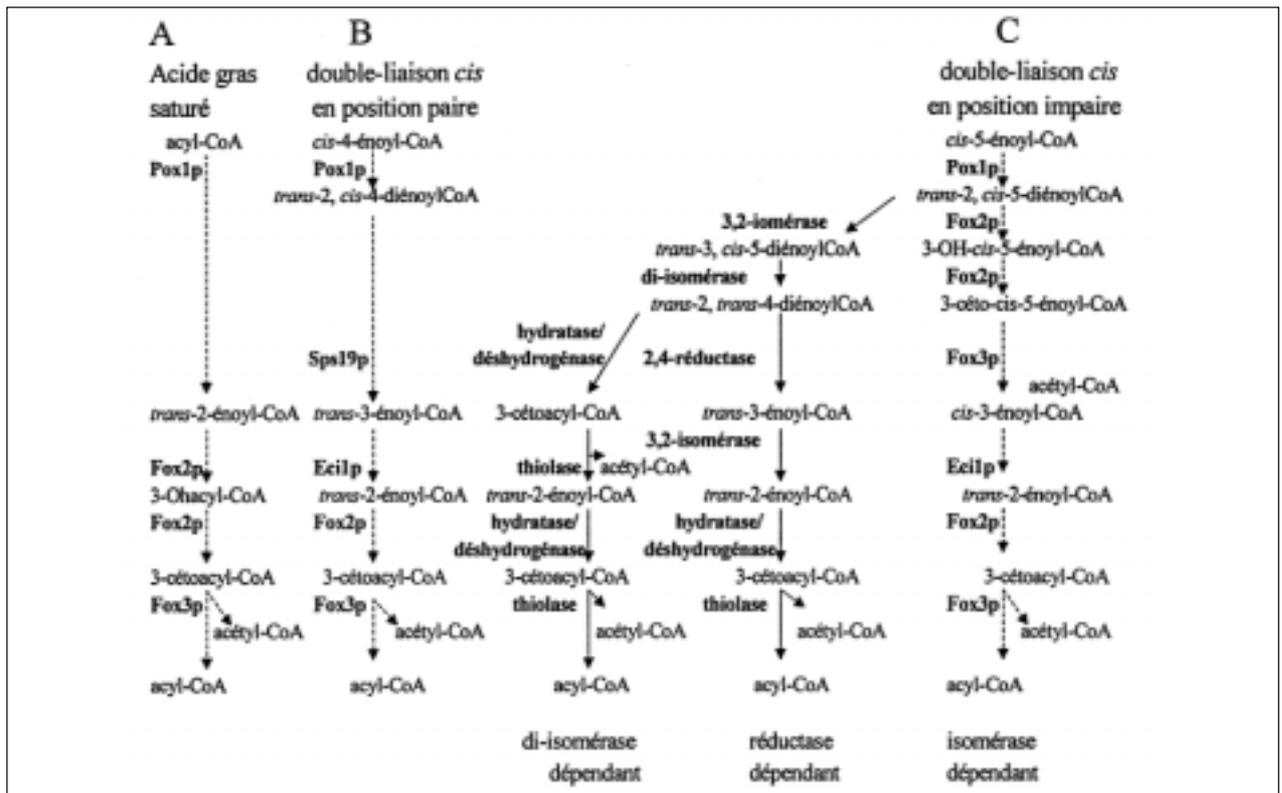


Figure 4 : Voies de dégradation des acides gras. **A**, Spirale de β -oxydation de la dégradation des acides gras saturés. Les enzymes de *S. cerevisiae* sont : ScFox1p (acyl-CoA oxydase), ScFox2p (2-énoyl-CoA hydratase 2 et D-spécifique 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase), et ScPot1p/Fox3p (3-cétoacyl-CoA thiolase). Les enzymes sont indiquées à gauche des flèches en pointillé et les métabolites sont notés en dessous en italique. **B**, la position des enzymes auxiliaires ScSps19p (2,4-diénoyl-CoA réductase) et ScEci1p (Δ^2 - Δ^2 -énoyl-CoA isomérase) dans la dégradation des acides gras insaturés avec la double liaison en position paire. **C**, les trois voies possibles de dégradation des acides gras dont les doubles liaisons sont en position impaire. La voie dépendante de l'isomérase (flèches pointillées) a été montrée précédemment comme nécessaire pour la croissance des levures sur acide oléique. Les voies postulées chez les mammifères, dépendantes de la réductase ou de la di-isomérase, sont indiquées par des flèches pleines (d'après Gurvitz et al., 1999a).

3.2.4) Régulation de la β -oxydation

3.2.4.1) INTRODUCTION

La β -oxydation peroxysomale est constituée d'une suite de cycles de réactions impliquant un organite et ses enzymes en interrelation avec le reste de la cellule. De multiples facteurs interviennent donc dans sa régulation : induction des peroxysomes et des enzymes, fonctionnement des enzymes, régénération des cofacteurs et apport des co-substrats, disponibilité du substrat et utilisation des produits. Tout ceci rend le système extrêmement complexe et, de ce fait, une vision globale est difficile à saisir. Nous allons donc discuter séparément de la régulation génétique et de celle des flux tenant compte des différents pools, du fonctionnement des enzymes et de la régénération des cofacteurs. Enfin, sera abordée l'organisation de la β -oxydation peroxysomale.

3.2.4.2) INDUCTION ET RÉGULATION GÉNÉTIQUE

3.2.4.2.1) Biogenèse des peroxysomes

L'étude de l'induction des peroxysomes s'appuie sur l'observation de cellules. Les levures constituent un matériel de choix notamment pour la facilité

d'étudier des souches mutantes. Plusieurs microorganismes capables de pousser sur acides gras ou sur alcanes ont été utilisés comme modèles pour l'étude de la biogenèse des peroxysomes dont *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* et *Yarrowia lipolytica*. Les levures présentent un ou deux peroxysomes en présence de glucose et beaucoup plus avec des acides gras.

L'analyse de mutants affectés dans la croissance sur alcanes et sur acides gras a permis d'identifier 23 gènes impliqués dans la biogenèse des peroxysomes et l'importation des protéines peroxysomales. En 1996, une nouvelle nomenclature, désignant ces gènes par, « PEX », pour peroxynes a été adoptée (Distel et al., 1996). La liste des gènes PEX est disponible sur le web à l'adresse suivante : <http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/reviews/pexetable.html>.

Ce domaine en pleine expansion a été présenté dans plusieurs revues récentes dont certaines basées principalement sur des résultats obtenus sur la levure *Y. lipolytica* (Titorenko et Rachubinski, 2001a

et b) aussi ne détaillerons nous pas cet aspect.

3.2.4.2.2) Adressage des enzymes aux peroxysomes

Outre la β -oxydation des acides gras, les peroxysomes sont le siège de fonctions variées. Pourtant, ces organites étant séparés du reste de la cellule par une membrane et ne possédant pas d'ADN propre, il se pose le problème de l'adressage de la machinerie enzymatique vers les peroxysomes, sujet qui fait l'objet d'une revue assez récente (Subramani, 1998).

Les protéines de la matrice peroxysomale sont synthétisées sur des polyribosomes libres et importées de manière post-traductionnelle. Deux classes de signaux d'adressage totalement différents ont été identifiées. Il s'agit de PTS1 et PTS2 (PTS pour Peroxisomal Targeting Sequence).

3.2.4.2.2.1) PTS1 :

La luciférase d'insecte est la première protéine peroxysomale pour laquelle un signal d'adressage a été caractérisé

(Gould *et al.*, 1987, 1989). Contrairement à la plupart des autres séquences d'adressage localisées à l'extrémité N-terminale, le signal est localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine et n'est pas clivé lors de l'importation. A partir de nombreux mutants, il a été possible de déterminer les caractéristiques minimales de la partie C-terminale permettant une importation dans le peroxyosome.

La présence des trois derniers résidus, sérine, lysine, leucine, est nécessaire ; leur délétion inhibe l'importation. Une séquence C-terminale de type S-K-L a été retrouvée dans une trentaine de protéines peroxyso-males ce qui confirme l'importance de ce tripeptide. Enfin, argument définitif, l'addition d'un tripeptide S-K-L à des protéines normales cytoplasmiques suffit dans un certain nombre de cas à les diriger vers les peroxyosomes.

Il a été montré que YIMFE2 possédait une séquence d'adressage aux peroxyosomes de type PTS1, que sans elle, la protéine était cytosolique et surtout, que des mutants ne possédant pas YIMFE2 avaient des peroxyosomes de plus grande taille et moins abondants (Smith *et al.*, 2000).

3.2.4.2.2.2) PTS2

Certaines protéines peroxyso-males ne comprennent pas la séquence C-terminale S-K-L. Elles sont adressées au peroxyosome par l'intermédiaire d'une séquence N-terminale qui peut être clivée au cours de l'importation. Une CoA thiolase a constitué le premier exemple de cette classe de protéines qui a été également identifiée chez l'amine oxydase de *Hansenula polymorpha* (Faber *et al.*, 1995). La séquence consensus minimale est : RLXXXXX (H/Q) L.

Cette séquence N-terminale est très différente des autres séquences N-terminales responsables de l'adressage au réticulum endoplasmique, aux mitochondries ou aux chloroplastes. On ne trouve ni la région hydrophobe centrale caractéristique des séquences responsables de l'adressage au réticulum, ni l'abondance de résidus hydroxylés et de résidus chargés positivement caractéristiques des séquences responsables de l'adressage aux mitochondries et aux chloroplastes. Elle permet donc un adressage spécifique aux peroxyosomes.

3.2.4.2.2.3) RÉCEPTEURS DES PROTÉINES MATRICIELLES

Des levures mutantes incapables de transporter dans la matrice du peroxyosome des protéines possédant soit PTS1, soit PTS2 ont été isolées. Ceci suggère l'existence de deux voies d'importation. L'étude de divers mutants a permis d'identifier les récepteurs de PTS1 et PTS2.

3.2.4.2.2.3.1) RÉCEPTEUR DE PTS1

Le mutant Pppas8/Scpas10 (PEX5) est déficient pour l'importation de protéines possédant une séquence d'adressage de type PTS1 mais est capable d'importer des thiolases qui possèdent une séquence d'adressage de type PTS2. Le gène PpPAS8 a été cloné. Exprimée *in vitro*, la protéine fixe avec une très forte affinité un dodécapeptide se terminant par SKL ; elle ne fixe pas le nonapeptide délété de SKL. Il s'agit donc d'un récepteur de PTS1 (Brocard *et al.*, 1994).

Le récepteur (PEX5p) est une protéine de 68 kDa. Bien qu'elle n'ait aucune des caractéristiques des protéines transmembranaires, on la trouve fortement associée à la face cytoplasmique des peroxyosomes : la protéine est à la fois localisée dans le cytoplasme et à l'intérieur du peroxyosome. Le récepteur serait donc capable d'être lui-même transporté à travers la membrane (Rehling *et al.*, 1996).

3.2.4.2.2.3.2) Récepteur de PTS2

Le mutant Scpas7 (PEX7) est déficient pour l'importation de thiolases possédant une séquence de type PTS2 (Zhang et Lazarow, 1995). La protéine ScPAS7p fixe la thiolase aussi bien *in vivo* que *in vitro*. On peut montrer que la fixation s'effectue sur la partie C-terminale de la protéine ; il s'agit bien d'un récepteur de PTS2. Certaines données expérimentales indiquent que la protéine ScPAS7p a une localisation cytosolique (Rehling *et al.*, 1996).

La séquence PTS2 est localisée en position N-terminale, avec comme signature le motif suivant : (R/K) (L/V/I) XXXXX (H/Q) (L/A) (Swinkels *et al.*, 1991 ; Gietl *et al.*, 1994 ; Glover *et al.*, 1994). Chez les mammifères et les plantes, cette séquence est clivée au cours de l'entrée dans les peroxyosomes. En revanche, la séquence PTS2 n'est pas clivée chez les levures, excepté dans la cas de la thiolase de *Y. lipolytica* (Nuttley *et al.*, 1994).

3.2.4.2.2.4) STRUCTURE DES PROTÉINES IMPORTÉES

Contrairement aux autres translocations (réticulum, mitochondrie, bactérie, chloroplaste), où la protéine transloquée doit être dans un état peu structuré (structure compétente), pour l'importation peroxyso-male, une destruction de la protéine importée n'est pas nécessaire.

La protéine DHFR est une protéine cytosolique de la souris. DHFR peut être fusionnée en amont d'une séquence de type PTS1 (DHFR-PTS1) (Häusler *et al.*, 1996). La protéine est alors importée dans les peroxyosomes. Cette même protéine peut être importée dans la matrice mitochondriale si on la fusionne en aval de la préséquence de la sous-unité IV de la cytochrome c oxydase (pré cyt-DHFR). Toutefois, l'addition du méthotrexate, un inhibiteur de DHFR qui stabilise la structure de la protéine inhibe l'importation mitochondriale (Eilers et Schatz, 1986) (Vestweber et Schatz, 1988). Par contre l'addition du méthotrexate à DHFR-PTS1 est sans effet sur l'importation dans le peroxyosome.

Une protéine hybride a été construite constituée de DHFR à laquelle est fusionnée en amont la préséquence de la sous-unité IV de la cytochrome C-oxydase (pcyt) et en aval, une séquence de type PTS1 (pcyt-DHFR-PTS1). En l'absence de méthotrexate, la protéine est importée, *in vivo*, partiellement dans les mitochondries et partiellement dans les peroxyosomes. En présence de méthotrexate dans la cellule, l'importation mitochondriale est fortement inhibée au détriment de l'importation peroxyso-male qui est stimulée.

Il a même été possible d'importer dans les peroxyosomes des particules d'or greffées à une protéine possédant un signal d'adressage peroxyosomal. Cette observation pose un problème en ce qui concerne le mécanisme de translocation dont rien n'est connu pour l'instant. Deux hypothèses sont avancées. Une première stipule l'existence d'une machinerie de translocation. Mais alors, le pore du translocateur doit avoir une taille suffisante pour laisser passer des protéines de diamètre important. Une deuxième propose qu'à la suite de l'adressage, l'importation s'effectue par invagination de la membrane, ce qui conduit, dans le peroxyosome, à une vésicule contenant la protéine importée. Cette deuxième hypothèse permettrait de rendre compte de la localisation simultanément cytoplasmique

et peroxysomale observée pour les deux récepteurs de PTS1 et PTS2.

3.2.4.2.2.5) PROTÉINES MEMBRANAIRES

Un certain nombre de protéines de la membrane du peroxysome ont été identifiées. Elles sont insérées dans la membrane de manière post-traductionnelle. Des séquences de type PTS1 ou PTS2 ne sont pas impliquées dans l'adressage. La nature de la séquence d'adressage a été étudiée dans le cas de la protéine CbPmp47 (Dyer et al., 1996). Elle possède six segments transmembranaires en hélice α . L'utilisation de mutants a permis de définir la boucle matricielle comprise entre les segments 4 et 5 comme l'élément responsable de l'adressage. En effet, des mutants tronqués au résidu 267 ou 244 sont associés au peroxysome alors que des mutants tronqués au résidu 224 ou 200 demeurent cytosoliques. On trouve dans la séquence de la boucle une concentration importante de résidus R ou K en son centre. On retrouve des caractéristiques similaires dans les séquences d'autres protéines peroxysomales. Ceci permet de définir les caractéristiques minimales nécessaires à un adressage correct: (K/R) (K/R) (X3 à X6) TXX (D/E).

La boucle comprise entre les résidus 224 et 244 placée en amont de la protéine CAT (protéine cytosolique) permet son adressage vers le peroxysome. Elle peut donc s'avérer suffisante.

3.2.4.2.3) Induction et régulation des enzymes peroxysomales

Les peroxysomes ont un comportement inductible dépendant, chez la levure, de la source de carbone présente. Les enzymes intervenant dans ces organites sont donc également induites en fonction du substrat. Chez les cellules animales, la recherche dans ce domaine a été révolutionnée par la découverte de Issemann et Green (1990) sur la présence de proliférateurs de peroxysomes (PPAR). Chez la levure, en revanche, ces PPAR n'ont pas été mis en évidence et les premiers travaux concernant l'expression des gènes des protéines peroxysomales ont été menés chez *S. cerevisiae* dans les années 1980. En 1987, Veenhuis et al. ont d'abord montré que cette expression était réprimée en présence de glucose, déréprimée en présence d'une source de carbone non fermentescible et activée par l'acide oléique. Au même moment, il a été montré que la régulation de l'expression se faisait au niveau transcriptionnel (Skoneczny et al., 1988). L'utilisation de gènes rapporteurs placés

après le promoteur des gènes étudiés a permis de mettre en évidence une répression par le glucose et une induction par l'acide oléique du niveau de la transcription des gènes codant pour l'acyl-CoA oxydase, l'enzyme multi-fonctionnelle et la thiolase (Dmochowska et al., 1990; Iguar et al., 1991; Simon et al., 1991; Einerhand et al., 1992).

Les équipes de Small aux Etats-Unis et de Tabak aux Pays-Bas se sont alors lancées dans la recherche de séquences régulatrices agissant sur les promoteurs des gènes codant pour l'acyl-CoA oxydase (*POX1*) et la thiolase.

En utilisant des délétions, des expériences de retard sur gel et des gènes rapporteurs, deux éléments répondant au glucose (glucose responsive éléments) ont été identifiés sur le promoteur de *ScPOX1*: un premier en 1992 (Wang et al., 1992) puis un autre en 1994 (Wang et al., 1994). Les séquences répresseur (glucose repressing sequences) consistent, pour l'une, en une répétition inversée d'un motif de neuf nucléotides et, pour l'autre, en une répétition directe d'un motif de dix nucléotides. La délétion de l'une ou l'autre de ces séquences de répression en amont (URS, upstream regulating sequence) réduit la répression par le glucose sans l'annuler (Small et al., 1996). L'équipe de Small a alors cherché à identifier d'éventuelles interactions entre ces URS et des gènes connus pour être impliqués dans la répression par le glucose mais n'a détecté qu'une interaction possible entre *ScADR1* et *ScURSI* sans que la protéine à l'origine du retard sur gel soit clairement identifiée.

Une séquence d'activation en amont (UAS, upstream activating sequence) a également été repérée avec un retard sur gel lors de croissance sur oléate et pas sur glucose ou glycérol.

3.2.4.3) RÉGULATION DES FLUX

Outre la régulation liée à l'induction des peroxysomes, les flux à travers la β -oxydation peuvent être régulés par les enzymes de cette voie et par celles, en amont, gérant l'arrivée de substrat.

3.2.4.3.1) Les enzymes de la β -oxydation

Comme pour d'autres voies métaboliques comprenant plusieurs étapes (Fell et Thomas, 1995), le contrôle des flux de β -oxydation semble être partagé entre les différentes enzymes plutôt qu'appartenir à une seule étape limitante (Eaton et al., 1999). Les données présentées ici

proviennent presque exclusivement de résultats obtenus sur des cellules animales car, malgré l'importance potentielle de ce domaine en biotechnologie, il n'a pratiquement pas été étudié chez la levure.

Les *acyl-CoA oxydases* sont généralement considérées comme les enzymes exerçant le plus grand contrôle sur cette voie (Inestrosa et al., 1979). Chez le rat, les études *in vitro* ont montré que l'hexadécanyl-CoA oxydase était inhibée d'une manière compétitive par le CoA ou l'acétyl-CoA (Davidson et Schultz, 1982), par les produits (esters de *trans*-2-énoyl-CoA), ou par le substrat (Beckmann et al., 1981). Ce phénomène est notamment visible quand on mesure la β -oxydation par l'intermédiaire de la réduction du NAD⁺. L'importance de l'inhibition par le substrat dépend alors de la longueur de chaîne et du degré d'insaturation des acyl-CoA (Watmough et al., 1990).

L'inhibition de l'une ou l'autre des enzymes de la β -oxydation se traduit par des modifications des *flux métaboliques*. Plusieurs études ont été menées chez le rat en analysant les esters d'acyl-CoA présents dans des incubations peroxysomales contenant par exemple de l'acide [¹⁴C] hexadécanoïque. Avec ce substrat en C16, des esters d'acyl-CoA de 14 à 2 carbones s'accumulent suggérant que la β -oxydation peroxysomale pour les cellules animales peut complètement oxyder ses substrats (Bartlett et al., 1990).

L'efficacité de la β -oxydation dépend à la fois de la quantité de CoA ajouté et de la concentration d'acide hexadécanoïque. A une faible concentration de CoA (25 μ M), seuls le tétradécanyl-CoA et l'hexadécanyl-CoA sont détectables, montrant que l'acyl-CoA synthase et que la β -oxydation sont, toutes deux, actives. A partir de 50 μ M de CoA, la gamme complète d'intermédiaires est détectable avec une augmentation des quantités d'intermédiaires à 12 carbones, ou, plus courts pour des concentrations de CoA augmentant jusqu'à 200 μ M. Pour des concentrations supérieures, le raccourcissement des chaînes carbonées diminue. Ceci suggère que des concentrations importantes de CoA limitent le raccourcissement des chaînes carbonées après le premier cycle de β -oxydation. On peut aussi supposer que l'hexadécanyl-CoA oxydase est sujette à une inhibition par le substrat venant de l'accumulation d'esters d'acyl-CoA à longues chaînes.

L'étendue du raccourcissement des chaînes carbonées est également nettement diminuée par l'augmentation de la concentration d'acide hexadécanoïque. Par exemple, à 400 μM d'acide hexadécanoïque, on observe deux cycles de β -oxydation alors qu'à faible concentration, l'oxydation est complète. La β -oxydation peroxysomale est donc très dépendante de la concentration de substrat contrairement à celle mitochondriale hépatique qui convertit rapidement tous les acyl-CoA en acétyl-CoA.

L'étendue du raccourcissement de la chaîne dépendant de la concentration peut s'expliquer en termes de compétition pour l'accès à la β -oxydation entre l'hexadécanoyl-CoA fraîchement formé et les intermédiaires résultant d'un cycle d'oxydation. Les quantités d'intermédiaires détectés correspondent à ce qu'on pourrait attendre d'une relation produit/précurseur sauf pour les intermédiaires à dix et huit carbones qui ne sont détectés qu'en très faible quantité, peut-être à cause de la présence d'une acyl-CoA hydrolase avec une spécificité optimale pour les longueurs de chaîne moyennes (Osmundsen *et al.*, 1994).

La β -oxydation mitochondriale hépatique dépend d'une manière critique de la ré-oxydation du NADH, H^+ pour maintenir le flux des acyl-CoA (Bremer et Osmundsen, 1984). Ce point est moins clair pour ce qui est de la β -oxydation dans les peroxysomes de cellules hépatiques. En effet, alors que l'imperméabilité de la membrane interne des mitochondries au NAD (H) est bien établie, ces propriétés pour la membrane peroxysomale sont moins claires même si, *in vitro*, cette membrane semble être perméable aux métabolites de faible poids moléculaire notamment au travers de pores formés par des protéines (Van Veldhoven *et al.*, 1987). *In vivo*, les résultats suggèrent par contre que la membrane est imperméable au NAD^+ (van Roermund *et al.*, 1995). Le compartiment où le NADH, H^+ produit par la β -oxydation peroxysomale est ré-oxydé n'est pas sûrement établi même si, *in vitro*, la β -oxydation peroxysomale est stimulée par la présence de métabolites facilitant la ré-oxydation de NADH, H^+ comme l'oxaloacétate ou le pyruvate. Pourtant les enzymes impliquées dans cette régénération du coenzyme pourraient provenir du cytosol (Osmundsen, 1982). Les transports de métabolites dans les peroxysomes sont résumés sur la figure suivante (figure 5).

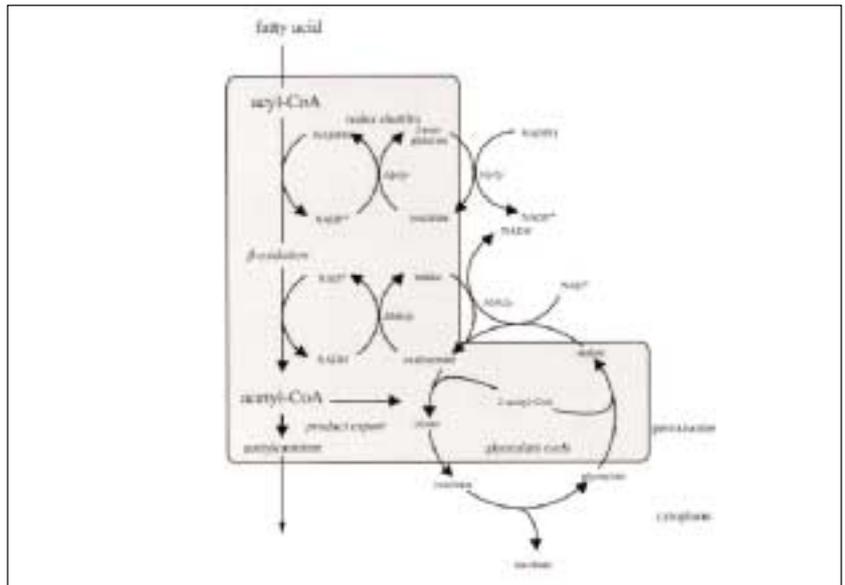


Figure 5 : Modèle de transport des métabolites à travers la membrane peroxysomale pour régénérer le NAD (P) et exporter les unités en C2 formées pendant la β -oxydation chez *S. cerevisiae* (d'après Hettema et Tabak (2000)).

La stimulation de la voie métabolique par un système de génération de NAD^+ a été démontrée en utilisant des esters d'acyl-CoA ou des acides gras libres comme substrats de réaction (Osmundsen, 1982 ; Bartlett *et al.*, 1990). Sans régénérateurs de NAD^+ , les taux de β -oxydation sont nettement diminués et l'accumulation d'esters de 3-hydroxyacyl-CoA et de 2-énoyl-CoA est observée suggérant que l'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de l'enzyme multi-fonctionnelle est inhibée par l'accumulation de NADH, H^+ . L'apparition d'esters de *trans*-2-énoyl-CoA pourrait être causée par un équilibre de la réaction de l'énoyl-CoA hydratase dont le sens a pu être inversé par l'accumulation d'esters de 3-hydroxyacyl-CoA. Ces résultats suggèrent que l'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des peroxysomes est relativement sensible à l'inhibition par le NADH, H^+ . Ce type de résultats a également été obtenu chez la levure *Y. lipolytica* qui lors de cultures peu aérées accumule des intermédiaires 3-hydroxylés (Waché *et al.*, 2002b).

La **thiolase** n'est normalement pas considérée comme ayant un rôle majeur dans la régulation de la β -oxydation. Pourtant Bartlett *et al.* (1990) ont montré que des esters de 3-oxo-acyl-CoA s'accumulaient dans des conditions où l'apport de CoA peut être considéré comme limitant, par exemple quand les peroxysomes sont incubés en présence de concentrations importantes ($>200 \mu\text{M}$)

d'acides gras ou quand la quantité de CoA ajoutée à l'incubation est insuffisante (Bartlett *et al.*, 1990). Dans ces conditions, le raccourcissement des chaînes carbonées est aussi observé. Dans certains cas, il y a accumulation d'acétoacyl-CoA laissant supposer que, comme pour son enzyme équivalente chez la mitochondrie (Wang *et al.*, 1991), l'acétyl-CoA est un inhibiteur de thiolase (Hovik *et al.*, 1991).

Cet acétyl-CoA peut ensuite simplement être hydrolysé en acétate (Hovik *et al.*, 1991). Devant l'importance mineure de l'acétate par rapport à l'acétyl-CoA, cette étape semble être un gaspillage si ce n'est qu'elle évite peut-être une acylation excessive des CoA. Dans ce cas, l'activité **acétyl-CoA hydrolase** pourrait avoir un rôle dans le système de régulation et notamment provoquer l'accumulation d'esters de 3-oxo-acyl-CoA (Osmundsen *et al.*, 1994).

3.2.4.3.2 Régulation du pool de substrat (de CoA)

La régulation du pool de CoA est faite par le système carnitine. Les acyl-CoA provenant de l'action des acyl-CoA synthases sur les acides gras libres ou des phospholipides sont stockés sous forme d'acyl-carnitine afin de maintenir les concentrations physiologiques dans la cellule. Les connaissances sur ce sujet proviennent encore une fois essentiellement de travaux sur les cellules animales (Ramsay et Arduini, 1993).

3.2.4.4) ORGANISATION DE LA β -OXYDATION

Les K_m de beaucoup d'enzymes (10^{-3} à 10^{-6} M) impliquent que, si les composants cellulaires étaient disposés au hasard, beaucoup de molécules de chaque substrat seraient présentes. Pour les métabolites qui ne sont utilisés que dans une voie, cet arrangement nécessiterait un excès d'énergie pour maintenir la concentration élevée en ce métabolite qui utiliserait une bonne part de la capacité de solvant de la cellule. Pour « surmonter » ce problème, la cellule peut s'appuyer sur différentes stratégies dont certaines sont liées à la compartimentation : beaucoup de réactions sont physiquement compartimentées dans des organites cellulaires comme le noyau, les mitochondries, les peroxysomes ou dans les membranes. Ceci limite le volume qu'un intermédiaire doit remplir pour atteindre la concentration nécessaire à l'enzyme suivante. Cette compartimentation peut être poussée plus loin avec la notion de micro-environnement : des mécanismes empêcheraient les intermédiaires de s'éloigner des enzymes concernées. Pendant longtemps, les intermédiaires libres, ou non-liés, étaient considérés comme exclus de ce mécanisme car on pensait que la diffusion de la molécule était plus rapide que le turnover de l'enzyme suivante. Pourtant des études sur la viscosité de la cellule et des organites ont indiqué que les coefficients de diffusion des molécules de petits métabolites sont suffisamment différents des coefficients de diffusion dans l'eau (Scalettar *et al.*, 1991) pour faire douter de l'hypothèse de l'équilibre avant le turn-over (Srere et Sumegi, 1994).

Une stratégie moins controversée pour maintenir un potentiel thermodynamique élevé avec peu de molécules consiste à séquestrer l'intermédiaire avec une liaison covalente comme pour le complexe de la pyruvate déshydrogénase, ou par immobilisation physique dans l'enzyme comme c'est le cas pour la tryptophane synthase (Hyde *et al.*, 1988).

Des exemples illustrent ce type de métabolisme comme la biosynthèse de macromolécules, protéines ou acides nucléiques. Dans ces cas, seul le produit final a une importance biologique et tous les intermédiaires sont apparemment bien fixés au complexe protéique chargé de la synthèse de la molécule.

Un tel système de compartimentation des réactions est appelé canalisation. Il

pourrait s'appliquer à ce qui peut être la plus longue voie métabolique sans embranchement dans la cellule : la β -oxydation. En effet, entre le palmitoyl-CoA et l'acétyl-CoA, 28 étapes ont lieu donnant naissance à 27 intermédiaires dont aucun n'a un autre rôle majeur dans le métabolisme que celui d'intermédiaire de la β -oxydation (Cornish-Bowden, 1994). Une indication dans ce sens a été fournie par Garland *et al.* (1965) qui ont observé que les concentrations des intermédiaires de la voie d'oxydation étaient extrêmement faibles ce qui les a amenés à postuler que le système consistait en un complexe enzymatique. D'autres études ont confirmé la très faible concentration des intermédiaires qui semblent être du même ordre de grandeur que les sites actifs présents dans les mitochondries. Ainsi, le 3-hydroxy-CoA et le 2-énoyl-CoA ont été trouvés respectivement à 2,2 et 2,8 nmol/g de tissus cardiaque (Lattipaa *et al.*, 1988) alors que les quantités calculées de déshydrogénase et de crotonase spécifiques des courtes chaînes présentes sont respectivement de 11 et 6 nmol/g de tissus (Olowe et Schulz, 1982) (Yang *et al.*, 1987). Ceci mènerait à la conclusion que tous les intermédiaires présents sont liés à des sites actifs ce qui correspond à la canalisation (Srere et Sumegi, 1994).

Il est pourtant à noter que ces conclusions sur les très faibles concentrations d'intermédiaires liées à la canalisation sont remises en question par les travaux de Cornish-Bowden sur la modélisation de ces systèmes (Cornish-Bowden, 1994). D'après cet auteur, la concentration d'intermédiaires lors d'un flux continu de β -oxydation est indépendante du degré de canalisation de la voie même si l'on ne détecte pas d'intermédiaires (car le contrôle du flux résulterait de la première étape). Les techniques d'analyse du contrôle métabolique (MCA) n'ont pourtant pas été développées dans le système β -oxydatif à cause de la difficulté rencontrée pour doser les intermédiaires ou pour inhiber une activité du cycle et bien sûr, de la confusion apportée par le fait que les mêmes enzymes fonctionnent plusieurs fois. De ce fait, les coefficients de contrôle des flux ou des concentrations (flux control coefficient et concentration control coefficient) des enzymes de la voie ne sont pas connus et leur mesure *in vivo* semble difficile à réaliser. En leur absence, il faut se contenter de l'étude de la « force de contrôle » (control strength), notion plus ancienne

que les coefficients de contrôle dans le MCA, qui est appréciée à partir de l'accumulation d'intermédiaires.

Il demeure que, pour la β -oxydation mitochondriale, il existe de fortes présumptions de type métabolon provenant du regroupement des activités mais il semble également y avoir un pool de NAD^+ lié à ce métabolon et qui serait indépendant du pool mitochondrial (Eaton *et al.*, 2000).

En revanche, beaucoup d'arguments disparaissent pour le système peroxysomal : plus d'enzymes différentes, non localisées à un endroit spécifique des peroxysomes mais dans la matrice...

Pratiquement, il résulte de ces études plusieurs modèles d'organisation, celui de canalisation totale des substrats pour lequel on n'observerait pas d'intermédiaires (Garland *et al.*, 1965), celui du « tuyau qui fuit » proposé suite à la détection d'intermédiaires saturés du C14 au C8 en faible proportion au cours de la β -oxydation mitochondriale de l'acide palmitique (Stanley et Tubbs, 1975) et celui des intermédiaires libres proposé par Broadway *et al.* (1992) suite à l'observation d'une relation de type précurseur-produit lors de l'oxydation de l'acide palmitique par des extraits cellulaires de *Corynebacterium* sp.7E1C. Bien que très peu de résultats soient disponibles chez la levure, il faut noter les travaux de l'équipe de Feron qui a observé, pour différentes espèces de *Sporidiobolus*, les trois modèles différents lors de la dégradation de l'acide ricinoléique en γ -décylactone (Blin-Perrier *et al.*, 2000). Bien que cette diversité dans les modèles ne soit pas expliquée, différents indices semblent relier la détection du modèle de canalisation totale à une β -oxydation mitochondriale. En effet, les auteurs ne détectent pas d'activité acyl-CoA oxydase chez cette espèce mais une activité acyl-CoA déshydrogénase, en chromatographie les activités ne sont pas coéluées avec des marqueurs de peroxysomes... Alors que ce système ne donne pas du tout de γ -décylactone, les autres systèmes décrits qui sont à l'origine de cette lactone (tuyau qui fuit et intermédiaires libres) correspondent bien à de la β -oxydation peroxysomale. Dans tous les cas, l'application des techniques de MCA à ces systèmes pour calculer au moins les coefficients de contrôle des concentrations permettraient d'avancer dans cette compréhension. Certains auteurs notent en

particulier que suivant les conditions, la concentration d'intermédiaires peut varier sensiblement sans forcément modifier les flux. De plus amples renseignements sur ces techniques peuvent être obtenus sur les sites de l'université de Aberystwyth

« <http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/metab/mcaehome.htm> » et de Cornish-Bowden au CNRS de Marseille « <http://bip.cnrs-mrs.fr/bip10/mcafaq2.htm#biotech> ».

Conclusion

Le métabolisme des lipides chez la levure constitue un point très important des biotechnologies. Il est impliqué dans diverses applications importantes comme la production d'arômes (Picataggio *et al.*, 1992, Endrizzi *et al.*, 1996, Waché *et al.*, 2002c), de polymères (Poirier *et al.*, 2001), de surfactants (Cirigliano et Carman, 1985), dans la dépollution d'effluents des industries agro-alimentaires (Scioli et Vollaro, 1997) ou de sols contaminés (Margesin et Schinner, 1997), dans l'élaboration des qualités organoleptiques des aliments fermentés (Wanikawa *et al.*, 2000)... Au terme de cette présentation, il apparaît que, si certains aspects ont été assez bien étudiés de par le rôle de modèle des levures (genèse des peroxysomes, adressage des protéines à ces organites...) ou à cause de l'importance biotechnologique majeure de certaines voies (enzymes de la β -oxydation), certains domaines demeurent assez flous comme le devenir des acides gras dans le cytoplasme et leur transport jusqu'aux peroxysomes ou l'explication des flux de β -oxydation. La modélisation de ces flux, en particulier par l'application de matrices, est pourtant un domaine qui pourrait permettre de réaliser des économies très importantes dans les procédés industriels.

Références

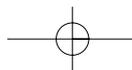
1. Agarwal, A. K., Y. Qi, D. G. Bhat, B. M. Woerner et S. M. Brown (2001). *Plant Molec. Biol.* **47**: 519-531.
2. Aggelis, G. et M. Komaitis (1999). *Biotechnol. Lett.* **21**: 747-749.
3. Aguedo, M., L. Beney, Y. Waché et J.-M. Belin (2002a). *J. Appl. Microbiol.* (accepté).
4. Aguedo, M., L. Beney, Y. Waché et J.-M. Belin (2002b). *Int. J. Food Microbiol.* **80**: 211-225.
5. Aguedo, M., Y. Waché, Mazoyer V., Sequeira-LeGrand A. et J.-M. Belin (2002c). (en préparation).
6. Aguedo, M., Y. Waché et J.-M. Belin (2000). Production of g-decalactone, recent progress and

current questions. in: *Recent Research Developments in Biotechnology and Bioengineering. Pandalai, Trivandrum, India, Research Signpost.* **3**: 167-179.

7. Aguedo, M., Y. Waché et J.-M. Belin (2001). *FEMS Microbiol. Lett.* **200** (2): 185-189.
8. Anonyme (1961). Improvements in a microbiological process for the preparation of steroids and ketones. Brevet GB883500.
9. Anonyme (1998). Production of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates in *Escherichia coli*, and monomers derived therefrom. Brevet EP0881293.
10. Avers, C. J. et M. Federman (1968). *J. Cell Biol.* **37**: 555-559.
11. Azoulay, E., P. Couchoud-Beaumont et J. C. Senez (1964). *Ann. I. Pasteur* **107** (4): 520-533.
12. Bakhuis, E. et P. Bos (1969). *Anton. Leeuw.* **35** (suppl.: Yeast symp. 1969): F47-F48.
13. Banat, I. M. (2000). *Biofutur* **198**: 44-47.
14. Barth, G. et C. Gaillardin (1997). *FEMS Microbiol. Rev.* **19** (4): 219-237.
15. Bartlett, K. et S. Eaton (1994). *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 432-436.
16. Bartlett, K., R. Hovik, S. Eaton, N. J. Watmough et H. Osmundsen (1990). *Biochem. J.* **270**: 175-180.
17. Beckmann, J. D., F. E. Frerman et M. C. McKean (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102** (4): 1290-1294.
18. Bellon-Fontaine, M.-N., J. Rault et C. J. Van Oss (1996). *Colloid Surf. B* **7**: 47-53.
19. Berninger, G., R. Schmidtchen, G. Casel, A. Knörr, K. Rautenstrauss, W.-H. Kunau et E. Schweizer (1993). *Eur. J. Biochem.* **216**: 607-613.
20. Blin-Perrin, C., D. Molle, L. Dufossé, J.-L. Le-Quére, C. Viel, G. Mauvais et G. Féron (2000). *FEMS Microbiol. Lett.* **188** (1): 69-74.
21. Borst, P. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* **1008** (1): 1-13.
22. Bouchez-Naïtali, M., D. Blanchet, V. Bardin et J. P. Vandecasteele (2001). *Microbiol. (UK)* **147**: 2537-2543.
23. Bouchez-Naïtali, M., H. Rakatozafy, R. Marchal, J. Y. Leveau et J. P. Vandecasteele (1999). *J. Appl. Microbiol.* **86** (3): 421-428.
24. Bredholt, H., K. Josefsen, A. Vatland, P. Bruheim et K. Eimhjellen (1998). *Can. J. Microbiol.* **44** (4): 330-340.
25. Bremer, J. et H. Osmundsen (1984). in: *Fatty acid metabolism & regulation. S. Numa. Amsterdam, Elsevier*: 113-154.
26. Brennan, P. J. et D. M. Lösel (1978). in: *Advances in Microbial Physiology. A. H. Rose et J. F. Wilkinson. Londres, Academic Press.* **17**: 47-179.
27. Broadway, N. M., F. M. Dickinson et C. Ratledge (1992). *Biochem. J.* **285**: 117-122.
28. Brocard, C., F. Kragler, M.M. Simon, T. Schuster et A. Hartig (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204** (3): 1016-1022.
29. Brockerhoff, H. (1974). *Lipids* **9** (9): 645-650.
30. Bruheim, P., H. Bredholt et K. Eimhjellen (1997). *Can. J. Microbiol.* **43** (1): 17-22.
31. Bruheim, P. et K. Eimhjellen (1998). *Can. J. Microbiol.* **44** (2): 195-199.
32. Cirigliano, M. C. et G. M. Carman (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (4): 747-750.
33. Cirigliano, M. C. et G. M. Carman (1985). *Appl. Environ. Microbiol.* **50** (4): 846-850.
34. Cornish-Bowden, A. (1994). *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 451-454.

35. Coudron, P. E., F. E. Frerman et D. B. Schowalter (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **226** (1): 324-336.
36. Davidson, B. et H. Schultz (1982). *Arch. Biochem. Biophys.* **213** (1): 155-162.
37. De Andrés, C., M. J. Espuny, M. Robert, M. E. Mercades, A. Manresa et J. Guinea (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 813-816.
38. De Duve, C. et P. Baudhuin (1966). *Physiol. Rev.* **46** (2): 323-357.
39. Dell'Angelica, E.C., Stella, C.A., Ermàcora, M.A. et E.H. Ramos (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* **102B** (2): 261-265.
40. De Nobel, J. G., F. M. Klis, T. Munnik, J. Priem et H. Van Den Ende (1990). *Yeast* **6**: 483-490.
41. De Nobel, J. G., F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik et H. Van Den Ende (1990). *Yeast* **6**: 491-499.
42. Distel, B., R. Erdmann, S. J. Gould, G. Blobel, D. I. Crane, J. M. Cregg, G. Dodt, Y. Fujiki, J. M. Goodman, W. W. Just, J. A. Kiel, W. H. Kunau, P. B. Lazarow, G. P. Mannaerts, H. W. Moser, T. Osumi, R. A. Rachubinski, A. Roscher, S. Subramani, H. F. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. van der Klei, P. P. van Veldhoven et M. Veenhuis (1996). *J. Cell Biol.* **135** (1): 1-3.
43. Dmochowska, A., D. Dignard, R. Maleszka et D. Y. Thomas (1990). *Gene* **88** (2): 247-252.
44. Douma, A. C., M. Veenhuis, G. J. Sulter, H. R. Waterham, K. Verheyden, G. P. Mannaerts et W. Harder (1990). *Arch. Microbiol.* **153**: 490-495.
45. Dyer, J.-M., JA McNew et JM Goodman (1996). *J. Cell Biol.* **133**: 269-280.
46. Eaton, S., K. Bartlett et M. Pourfarzam (1999). *Biochim. Biophys. Acta* **1437** (3): 402-408.
47. Eaton, S., T. Bursby, B. Middleton, M. Pourfarzam, K. Mills, A. W. Johnson et K. Bartlett (2000). *Biochem. Soc. Trans.* **28** (2): 177-182.
48. Eilers, M. et G. Schatz (1986). *Nature* **322** (6076): 228-232.
49. Einerhand, A. W. C., I. Van Der Leij, W. T. Kos, B. Distel et H. F. Tabak (1992). *Cell Biochem. Funct.* **10**: 185-191.
50. Elgersma, Y., C. W. van Roermund, R. J. Wanders et H. F. Tabak (1995). *EMBO J.* **14** (14): 3472-3479.
51. Endrizzi, A., Pagot, Y., LeClainche, A., Nicaud, J.-M. et J.-M. Belin (1996). *Crit. Rev. Biotechnol.* **16**: 301-329.
52. Engelvin, G., G. Feron, C. Perrin, D. Mollé, R. Talon (2000). *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 115-120.
53. Erdtsieck, B. et K. Rietema (1969). *Anton. Leeuw.* **35** (Suppl.: Yeast Symp. 1969): F19.
54. Faber, K.N., Keizer, G.I., Pluim, D., Harder, W., Ab, G. et M. Veenhuis (1995). *FEBS Lett.* **357**: 115-120.
55. Fell, D. A. et S. Thomas (1995). *Biochem. J.* **311**: 35-39.
56. Feron, G., L. Dufossé, G. Mauvais, P. Bonnarne et H. E. Spinnler (1997). *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 17-24.
57. Filppula, S. A., R. T. Sormunen, A. Hartig, W. H. Kunau et J. K. Hiltunen (1995). *J. Biol. Chem.* **270** (46): 27453-27457.
58. Garland, P. B., P. Shepherd et D. W. Yates (1965). *Biochem. J.* (97): 587-594.
59. Gasson, M.J., M.J. Rhodes, A. Narbad et N. J. Walton (2001). « Production of vanillin » Brevet mondial WO9735999.
60. Geisbrecht, B. V., D. Zhu, K. Schulz, K. Nau, J. C. Morrell, M. Geraghty, H. Schulz, R. Erdmann et S. J. Gould (1998). *J. Biol. Chem.* **273** (50): 33184-33191.

61. Georgiou, G., S.-C. Lin et M. M. Sharma (1992). *Bio/technol.* **10**: 60-65.
62. Gietl, C., K. N. Faber, I. J. van der Klei et M. Veenhuis (1994). *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* **91** (8): 3151-3155.
63. Gill, C. O., M. G. Hall et C. Ratledge (1977). *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 231-239.
64. Glover, J. R., D. W. Andrews, S. Subramani et R. A. Rachubinski (1994). *J. Biol. Chem.* **269** (10): 7558-7563.
65. Gould, S.J., Keller, G.A. et S. Subramani (1987). *J. Cell Biol.* **105**: 2923-2931.
66. Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. et S. Subramani (1989). *J. Cell Biol.* **108**: 1657-1664.
67. Green, P. H. (2001). Medium chain length PHA copolymer and process for producing same. Brevet US6225438.
68. Guerzoni, M. E., R. Lanciotti et R. Marchetti (1993). *Internat. J. Food Microbiol.* **17**: 329-341.
69. Gurvitz, A., A. M. Mursula, A. I. Yagi, A. Hartig, H. Ruis, H. Rottensteiner et J. K. Hiltunen (1999a). *J. Biol. Chem.* **274** (35): 24514-24521.
70. Gurvitz, A., L. Wabnegger, A. I. Yagi, M. Binder, A. Hartig, H. Ruis, B. Hamilton, I. W. Dawes, J. K. Hiltunen et H. Rottensteiner (1999b). *Biochem. J.* **344**: 903-914.
71. Haffner, T. et R. Tressl (1996). *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1218-1223.
72. Hamilton, J. A. (1998). *J Lipid Res* **39** (3): 467-481.
73. Hara, A., M. Ueda, T. Matsui, M. Arie, H. Saeki, H. Matsuda, K. Furuhashi, T. Kanai et A. Tanaka (2001). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (3-4): 478-485.
74. Häusler, T., Stierhof, Y., Wirtz, E. et C. Clayton (1996). *J. Cell. Biol.* **132**: 311-324.
75. Hettema, E. H. et H. F. Tabak (2000). *Biochim. Biophys. Acta* **1486** (1): 18-27.
76. Hiltunen, J. K., B. Wenzel, A. Beyer, R. Erdmann, A. Fossa et W.-H. Kunau (1992). *J. Biol. Chem.* **267** (10): 6646-6653.
77. Hiser, L., M. E. Basson et J. Rine (1994). *J. Biol. Chem.* **269**: 31383-31389.
78. Hommel, R. K. (1990). *Biodegrad.* **1** (2-3): 107-119.
79. Horowitz, A., D. Gutnick et E. Rosenberg (1975). *Appl. Microbiol.* **30** (1): 10-19.
80. Hosaka, K., M. Mishina, T. Tanaka, T. Kamiryo et S. Numa (1979). *Eur. J. Biochem.* **93** (1): 197-203.
81. Hovik, R., B. Brodal, K. Bartlett, H. Osmundsen, H. (1991). *J. Lipid Res.* **32**: 993-999.
82. Huang, Z., L. Dostal et J. P. Rosazza (1993). *J. Biol. Chem.* **268** (32): 23954-23958.
83. Hyde, C. C., S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles et D. R. Davies (1988). *J. Biol. Chem.* **263** (33): 17857-17871.
84. Iacazio, G., Martini, D., Faure, B. et M.H. N'Guyen (2002). *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 57-62.
85. Igual, J. C., E. Matallana, C. Gonzalez-Bosch, L. Franco et J. E. Pérez-Ortín (1991). *Yeast* **7**: 379-389.
86. Il'chenko, A. P., N. V. Shishkanova, O. G. Chernyavskaya et T. V. Finogenova (1998). *Microbiol.* **67** (3): 293-297.
87. Inestrosa, N. C., M. Bronfman et F. Leighton (1979). *Biochem. J.* **182**: 779-788.
88. Issemann, I. et S. Green (1990). *Nature* **347** (6294): 645-650.
89. Jaeger, K. E. et M. T. Reetz (1998). *Trends Biotechnol.* **16** (9): 396-403.
90. Jiang, Z. Y. et C. Thorpe (1983). *Biochemistry.* **22**: 3752-3758.
91. Jörnvall, H., B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery et D. Ghosh (1995). *Biochemistry.* **34** (18): 6003-6013.
92. Kalish, J. E., C. I. Chen, S. J. Gould et P. A. Watkins (1995). *Biochem Biophys Res Co.* **206** (1): 335-340.
93. Kamp, F., J. A. Hamilton et H. V. Westerhoff (1993). *Biochemistry.* **32** (41): 11074-11086.
94. Kanayama, N., Y. Himeda, H. Atomi, M. Ueda et A. Tanaka (1997). *J. Biochem.* **122**: 616-621.
95. Kanayama, N., M. Ueda, H. Atomi et A. Tanaka (1998). *J. Bacteriol.* **180** (3): 690-698.
96. Käppeli, O. et A. Fiechter (1976). *Biotechnol. Bioeng.* **18**: 967-974.
97. Käppeli, O. et A. Fiechter (1977). *J. Bacteriol.* **131** (3): 917-921.
98. Kasuya, F., K. Igarashi et M. Fukui (1996). *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1643-1646.
99. Katayoon, D. (1998). Plant fatty acid synthases and use in improved methods for production of medium-chain fatty acids. Brevet WO9846776
100. Kawaguchi, A., S. Tsubotani, Y. Seyama, T. Yamakawa, T. Osumi, T. Hashimoto, T. Kikuchi, M. Ando et S. Okuda (1980). *J. Biochem.* **88** (5): 1481-1486.
101. Kirsch, T., H.-G. Löffler et H. Kindl (1986). *J. Biol. Chem.* **261** (18): 8570-8575.
102. Kispal, G., B. Sumegi, K. Dietmeier, I. Bock, G. Gajdos, T. Tomcsanyi et A. Sandor (1993). *J. Biol. Chem.* **268** (3): 1824-1829.
103. Knudsen, J., N. J. Faergeman, H. Skott, R. Hummel, C. Borsting, T. M. Rose, J. S. Andersen, P. Hojrup, P. Roepstorff et K. Kristiansen (1994). *Biochem. J.* **302**: 479-485.
104. Knudsen, J., M. V. Jensen, J. K. Hansen, N. J. Faergeman, T. B. Neergaard et B. Gaigg (1999). *Mol. Cell. Biochem.* **192** (1-2): 95-103.
105. Kohlwein, S. D. et F. Palttauf (1983). *Biochim. Biophys. Acta* **792**: 310-317.
106. Kunau, W. H., S. Buhne, M. de la Garza, C. Kionka, M. Mateblowski, U. Schultz-Borchard et R. Thieringer (1988). *Biochem. Soc. Trans.* **16** (3): 418-420.
107. Kurlandzka, A., J. Rytka, R. Gromadka et M. Murawski (1995). *Yeast* **11** (9): 885-890.
108. Latipaa, P. M., I.E. Hassinen, J.K. Hiltunen (1988). *Anal. Biochem.* **171**: 67-72.
109. Leaf, T. A., M. S. Peterson, S. K. Stoup, D. Somers et F. Srienc (1996). *Microbiol.* **142** (Pt 5): 1169-1180.
110. Luo, Y. S., H. J. Wang, K. V. Gopalan, D. K. Srivastava, J. M. Nicaud et T. Chardot (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **384** (1): 1-8.
111. Madison, L. L. et G. W. Huisman (1999). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (1): 21-53.
112. Mandrup, S., R. Jepsen, H. Skott, J. Rosendal, P. Hojrup, K. Kristiansen et J. Knudsen (1993). *Biochem. J.* **290**: 369-374.
113. Mannaerts, G. et P. Van Veldhoven (1993). «Metabolic pathways in mammalian peroxisomes.» *Biochimie* **75**: 147-158.
114. Margesin R. et F. Schinner (1997). *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 243-249.
115. Marshall, K. C. et R. H. Cruickshank (1973). *Arch. Mikrobiol.* **91** (1): 29-40.
116. Masuda, Y., S. M. Park, A. Ohta et M. Takagi (1995). *Gene* **167**: 157-161.
117. Mate, M. J., M. Zamocky, L. M. Nykyri, C. Herzog, P. M. Alzari, C. Betzel, F. Koller et I. Fita (1999). *J. Mol. Biol.* **286** (1): 135-149.
118. Mathieu, M., Y. Modis, J. Zeelen, C. Engel, R. Abagyan, A. Ahlberg, B. Rasmussen, V. Lamzin, W. Kunau et R. Wierenga (1997). *J. Molec. Biol.* **273**: 714-728.
119. McLee, A. G. et S. Davies (1972). *Can J Microbiol* **18** (3): 315-319.
120. Medvedeva, G., M. Meissel et T. Volkova (1969). *Anton. Leeuw.* **35**: B27-B28.
121. Meisel, M. N., T. M. Kozlova, G. A. Medvedeva, A. T. Novichkova, N. A. Pomoshchnikova et L. A. Seliverstova (1977). *Mikrobiologiya* **46**: 835-845.
122. Meisel, M. N., G. A. Medvedeva et T. M. Kozlova (1976). *Mikrobiologiya* **45**: 844-851.
123. Mittendorf, V., E. J. Robertson, R. M. Leech, N. Krüger, A. Steinbüchel et Y. Poirier (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13387-13402.
124. Mogensen, I. B., H. Schulenberg, H. O. Hansen, F. Spener et J. Knudsen (1987). *Biochem J.* **241** (1): 189-192.
125. Moreno de la Garza, M., U. Schultz-Borchard, J. W. Crabb et W. H. Kunau (1985). *Eur. J. Biochem.* **148** (2): 285-291.
126. Nandy, A., B. Küchler et S. Ghisla (1996). *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 105-110.
127. Neufeld, R., J. Zajic et D. Gerson (1980). *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 511.
128. Nicolay, K., M. Veenhuis, A. C. Douma et W. Harder (1987). *Arch. Microbiol.* **147**: 37-41.
129. Nuttley, W. M., A. M. Brade, G. A. Eitzen, M. Veenhuis, J. D. Aitchison, R. K. Szilard, J. R. Glover et R. A. Rachubinski (1994). *J. Biol. Chem.* **269** (1): 556-566.
130. Okazaki, K., T. Takechi, N. Kambara, S. Fukui et I. Kubota (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1232-1236.
131. Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag et al. (1992). *Protein Eng* **5** (3): 197-211.
132. Olowe, Y. et H. Schulz (1982). *J. Biol. Chem.* **257**: 5408-5413.
133. Osmundsen, H. (1982). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **386**: 13-29.
134. Osmundsen, H., R. Hovik, K. Bartlett et M. Pourfazam (1994). *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 436-441.
135. Osumi, M., F. Fukuzumi, N. Yamada, T. Nagatani, Y. Teranishi, A. Tanaka et S. Fukui (1975). *J. Ferment. Technol.* **53** (4): 244-248.
136. Osumi, T. et T. Hashimoto (1978). *Biochem. Biophys. Res. Co.* **83** (2): 479-485.
137. Osumi, T., T. Hashimoto et N. Ui (1980). *J. Biochem. (Tokyo)* **87** (6): 1735-1746.
138. Pagot, Y. et J.-M. Belin (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (10): 3864-3867.
139. Pagot, Y., A. Le Clairche, J.-M. Nicaud, Y. Waché et J.-M. Belin (1998). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (3): 295-300.
140. Palmieri, L., F. M. Lasorsa, A. De Palma, F. Palmieri, M. J. Runswick et J. E. Walker (1997). *FEBS Lett.* **417** (1): 114-118.
141. Palmieri, L., H. Rottensteiner, W. Girzalsky, P. Scarcia, F. Palmieri et R. Erdmann (2001). *Embo J.* **20** (18): 5049-5059.
142. Picataggio, S., K. Deanda et J. Mielenz (1991). *Molec. cell. Biol.* **11** (9): 4333-4339.
143. Picataggio, S., T. Rohrer, K. Deanda, D. Lanning, R. Reynolds, J. Mielenz et L. D. Eirich (1992). *Bio/technol.* **10**: 894-898.
144. Pignède, G., H. Wang, F. Fudalej, C. Gaillardin, M. Seman et J.-M. Nicaud (2000a). *J. Bacteriol.* **182** (10): 2802-2810.
145. Pignède, G., H. Wang, F. Fudalej, M. Seman, C. Gaillardin et J.-M. Nicaud (2000b). *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (8): 3283-3289.
146. Poirier Y., N. Erard et J.-M. Petetot (2001). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5254-60.
147. Putnam, C. D., A. S. Arvai, Y. Bourne et J. A. Tainer (2000). *J. Mol. Biol.* **296** (1): 295-309.



148. Qin, Y. M., M. S. Marttila, A. M. Haapalainen, K. M. Siivari, T. Glumoff et J. K. Hiltunen (1999). *J. Biol. Chem.* **274** (40): 28619-28625.
149. Qin, Y. M., M. H. Poutanen et D. K. Novikov (2000). *J. Lipid Res.* **41** (1): 93-98.
150. Ramsay, R. R. et A. Arduini (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **302** (2): 307-314.
151. Rasmussen, J. T., J. Rosendal et J. Knudsen (1993). *Biochem. J.* **292** (Pt 3): 907-913.
152. Ratledge, C. et C. T. Evans (1989). in: *The yeasts*. A. H. Rose et J. S. Harrison. Londres, Academic Press. 3: 367-455.
153. Rehling, P., M. Marzoch, F. Niesen, E. Wittke, M. Veenhuis et W.H. Kunau (1996). *Embo J.* **15** (12): 2901-2913.
154. Reisfeld, A., E. Rosenberg et D. Gutnick (1972). *Appl. Microbiol.* **24** (3): 363-368.
155. Rojas, C., J. Schmidt, M. Y. Lee, W. G. Gustafson et J. T. McFarland (1985). *Biochemistry.* **24**: 2947-2954.
156. Rosenberg, E., A. Perry, D. T. Gibson et D. L. Gutnick (1979a). *Appl. Environ. Microbiol.* **37** (3): 409-413.
157. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz et D. L. Gutnick (1979b). *Appl. Environ. Microbiol.* **37** (3): 402-408.
158. Rosenberg, M. (1991). *Crit. Rev. Microbiol.* **18** (2): 159-173.
159. Schepers, L., P. P. Van Veldhoven, M. Casteels, H. J. Eysen et G. P. Mannaerts (1990). *J. Biol. Chem.* **265** (9): 5242-5246.
160. Schjerling, C. K., R. Hummel, J. K. Hansen, C. Borsting, J. M. Mikkelsen, K. Kristiansen et J. Knudsen (1996). *J. Biol. Chem.* **271** (37): 22514-22521.
161. Scholz, H., S. D. Kohlwein, F. Paltauf, A. Lezius et F. Spener (1990). *Mol. Cell. Biochem.* **98** (1-2): 69-74.
162. Scioli, C. et L. Vollaro (1997). *Wat. Res.* **31** (10): 2520-2524.
163. Shima, M. (2001). *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (3): 242-247.
164. Shimizu, S., K. Yasui, Y. Tani et H. Yamada (1979). *Biochem. Biophys. Res. Co.* **91** (1): 108-113.
165. Shindo, Y. et T. Hashimoto (1978). *J. Biochem.* **84**: 1177-1181.
166. Simon, M., G. Adam, W. Rapatz, W. Spevak et H. Ruis (1991). *Molec. Cell. Biol.* **11** (2): 699-704.
167. Skoneczny, M., A. Chelstowska et J. Rytka (1988). *Eur. J. Biochem.* **174**: 297-302.
168. Sloots, J. A., J. D. Aitchison et R. A. Rachubinski (1991). *Gene* **105** (1): 129-134.
169. Smaczynska, I., M. Skoneczny et A. Kurlandzka (1994). *Biochem. J.* **301**: 615-620.
170. Small, G. M., Y. Luo, T. Wang et I. V. Karpichev (1996). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **804**: 362-372.
171. Smith, J. J., T. W. Brown, G. A. Eitzen et R. A. Rachubinski (2000). *J. Biol. Chem.* **275** (26): 20168-20178.
172. Srere, P. A. et B. Sumegi (1994). *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 446-450.
173. Stanley, K. K. et P. K. Tubbs (1975). *Biochem. J.* **150**: 77-88.
174. Subramani, S. (1998). *Physiol. Rev.* **78** (1): 171-188.
175. Sudesh, K., H. Abe et Y. Doi (2000). *Prog. Polym. Sci.* **25**: 1503-1555.
176. Swinkels, B. W., S. J. Gould, A. G. Bodnar, R. A. Rachubinski et S. Subramani (1991). *EMBO J.* **10** (11): 3255-3262.
177. Tanaka, A. et S. Fukui (1989). in: *The yeasts*. A. H. Rose et J. S. Harrison. London, Academic Press. 3: 261-287.
178. Tanaka, A., M. Osumi et S. Fukui (1982). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **386**: 183-198.
179. Teranishi, Y., A. Tanaka, M. Osumi et S. Fukui (1974). *Agr. Biol. Chem.* **38** (6): 1213-1220.
180. Titorenko, V. I. et R. A. Rachubinski (2001a). *Trends Cell. Biol.* **11** (1): 22-29.
181. Titorenko, V. I. et R. A. Rachubinski (2001b). *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **2** (5): 357-368.
182. Titorenko, V. I., J.-M. Nicaud, H. Wang, H. Chan et R.A. Rachubinski (2002). *J. Cell. Biol.* **156**: 481-494.
183. Trotter, P. J. (2001). *Annu. Rev. Nutr.* **21**: 97-119.
184. Van Nieuwenhoven, F. A., G. J. Van der Vusse et J. F. Glatz (1996). *Lipids* **31** Suppl: S223-227.
185. van Oss, C. J. (1978). *Annu Rev Microbiol* **32**: 19-39.
186. van Roermund, C. W., Y. Elgersma, N. Singh, R. J. Wanders et H. F. Tabak (1995). *EMBO J.* **14** (14): 3480-3486.
187. van Roermund, C. W., E. H. Hetteema, M. van den Berg, H. F. Tabak et R. J. Wanders (1999). *EMBO J.* **18** (21): 5843-5852.
188. van Roermund C. W., Drissen R., van Den Berg M., Ijlst L., Hetteema E. H., Tabak H. F., Waterham H. R. et R. J. Wanders (2001). *Mol. Cell. Biol.* **21** (13): 4321-4329.
189. Van Veldhoven, P. P., Casteels M., Mannaerts G.P. et M. Baes (2001). *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 292-298.
190. Van Veldhoven, P. P., W. W. Just et G. P. Mannaerts (1987). *J. Biol. Chem.* **262** (9): 4310-4318.
191. Van Veldhoven, P. P., P. Van Rompuy, M. Fransen, B. De Bethune et G. P. Mannaerts (1994). *Eur. J. Biochem.* **222** (3): 795-801.
192. Van Veldhoven, P. P., G. Vanhove, F. Vanhoutte, G. Dacremont, G. Parmentier, H. J. Eysen et G. P. Mannaerts (1991). *J. Biol. Chem.* **266** (36): 24676-24683.
193. Veenhuis, M. et W. Harder (1988). *Microbiol. Sci.* **5** (11): 347-351.
194. Veenhuis, M. et W. Harder (1991). in: *The yeasts* **4**: 601-653.
195. Veenhuis, M., M. Mateblowski, W. H. Kunau et W. Harder (1987). *Yeast* **3**: 77-84.
196. Veenhuis, M., I. J. Van der Klei et W. Harder (1986). *Arch. Microbiol.* **145**: 39-50.
197. Vega, R. et A. Dominguez (1986). *Arch. Microbiol.* **144**: 124-130.
198. Vestweber, D. et G. Schatz (1988). *EMBO J.* **7** (4): 1147-1151.
199. Waché, Y., M. Aguedo, A. Choquet, I. Gatfield, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (2001a). *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (12): 5700-5704.
200. Waché, Y., M. Aguedo, M.-T. LeDall, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (2002a). *J. Molec. Catal. B.* **19-20**: 197-201.
201. Waché, Y., M. Aguedo, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (2002b). *manuscrit en preparation*
202. Waché, Y., M. Aguedo, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (2002c). *soumis à Appl. Microbiol. Biotechnol (sous presse)*.
203. Waché, Y., C. Laroche, K. Bergmark, C. Møller-Andersen, M. Aguedo, M.-T. Le Dall, H. Wang, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (3): 1233-1236.
204. Waché, Y., Y. Pagot, J.-M. Nicaud et J.-M. Belin (1998). *J. Molec. Catal. B: enzym.* **149** (5): 165-169.
205. Wanders R.J., P. Vreken, S. Ferdinandusse, G.A. Jansen, H.R. Waterham, C.W. van Roermund et E.G. Van Grunsven. (2001). *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 250-267.
206. Wang, H. Y., C.F. Baxter, H. Schulz (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 274-280
207. Wang, H., A. Le Clainche, M.-T. Le Dall, Y. Waché, Y. Pagot, J. M. Belin, C. Gaillardin et J. M. Nicaud (1998). *Yeast* **14**: 1373-1386.
208. Wang, H., M.-T. Le Dall, Y. Waché, C. Laroche, J.-M. Belin, C. Gaillardin et J.-M. Nicaud (1999a). *J. Bacteriol.* **181** (17): 5140-5148.
209. Wang, H., M.-T. Le Dall, Y. Waché, C. Laroche, J.-M. Belin et J.-M. Nicaud (1999b). *Cell. Biochem. Biophys.* **31** (2): 165-174.
210. Wang, T., Y. Luo et G. M. Small (1994). *J. Biol. Chem.* **269** (39): 24480-24485.
211. Wang, T. W., A. S. Lewin et G. M. Small (1992). *Nucleic Acids Res.* **20** (13): 3495-3500.
212. Wanikawa, A., K. Hosoi, I. Takise et T. Kato (2000). *J. Inst. Brew.* **106** (1): 39-43.
213. Watkins, P. A., J. F. Lu, S. J. Steinberg, S. J. Gould, K. D. Smith et L. T. Braiterman (1998). *J. Biol. Chem.* **273** (29): 18210-18219.
214. Zhang J.W. et P.B. Lazarow (1995). *J. Cell. Biol.* **129** (1): 65-80.
215. Zhang, Y. et R. M. Miller (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (6): 2101-2106.

