





RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1



**FACULTÉ DES :** Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)

**DÉPARTEMENT :** Biologie Appliqué

Mémoire élaboré en vue de l'obtention du Diplôme de Master en :  
Bioindustrie Analyse et Contrôle (B.A.C)

**Intitulé :**

Valorisation des margines et des huiles usées par la  
levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.

**Réaliser par :** GHORABE Fares Dia Eddine

**BADAoui Charaf Eddine**

**Jury compose de :**

**Président :** KACEM CHAOUICHE N.                      Professeur                      UFM Constantine1

**Encadrante :** BOUCHEDJA.D. N                      Maitre de conférences A                      UFM Constantine1

**Examinatrice :** BELLIL I.                      Maitre de conférences A                      UFM Constantine1

**Tuteur :** AL MUALIDE Wadie Doctorant UFM Constantine1

**Année universitaire**

2019-2020

# Remerciement

---

*Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices ; il n'a pu être mené à bien qu'avec le soutien de plusieurs personnes à qui nous voudrions, à travers ces quelques lignes, témoigner notre gratitude.*

*Nos remerciements vont d'abord au **Créateur de l'univers** qui nous a doté d'intelligence, et nous a maintenu en santé pour mener à bien cette année d'étude.*

*Le mérite d'un mémoire appartient certes à l'auteur, mais également au directeur qui l'encadre. C'est pour cela que nous voudrions adresser toutes nos reconnaissances à la directrice de ce mémoire, **Madame Naila Doria BOUCHEDJA**, pour sa patience, sa disponibilité, ses conseils avisés et surtout sa supervision éclairée tout au long de la rédaction du notre mémoire.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères au corps professoral et administratif de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 à leurs têtes **Monsieur Noredine KACEM CHAOUCHE** le chef de département de la Biologie appliquée et nos enseignants qui nous ont fourni le savoir et les outils nécessaires à la réussite dans notre parcours universitaires. Et de l'INATAA à leur tête **Monsieur BOUDJELAL** d'avoir nous autoriser de travailler au sein de ses laboratoires au niveau de l'institut et de prêter le matériel nécessaire disponible.*

*On remercie **nos chères parentes** qui ont toujours été là pour nous. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements qui nous ont été d'une grande aide.*

*Un merci spécial à **Wadie**, pour son soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche. Et on le souhaite bon courage dans ses recherches pour l'obtention de son doctorat.*

*Enfin, à **nos camarades** de la promotion **B.A.C 2017-2020** qu'on a servis avec humilité et avec lesquelles on a passé une scolarité exceptionnelle, riche d'enseignements, et d'expériences de rencontres, on veut ici dire nos sincères amitiés.*

*C'est certes avec joie et fierté qu'on dépose aujourd'hui ce mémoire, mais aussi avec un brin de nostalgie qu'on termine ce programme d'études et on conclut ce premier travail de recherche.*

# Sommaire

---

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

## **Partie 01 : synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : micro-organismes oléagineux**

1- Bactéries oléagineuses .....	2
2- Algues oléagineuses .....	3
3- Levures oléagineuses .....	4
4- Champignons oléagineux .....	5

### **Chapitre 2 : Levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica***

1- Historique.....	7
2- Taxonomie .....	7
3- Habitat et caractérisation physiologiques.....	8
3.1- HABITAT .....	8
3.2- PHYSIOLOGIE.....	9
4- Assimilation des sources de carbones .....	9
4.1- Assimilation des sucres .....	9
4.2- Assimilation des Acides organiques.....	10
4.3- Assimilation des alcools.....	10
4.4- Assimilation de substrats hydrophobes .....	10
A- transport indirect ou bien médié : .....	10
B- transport direct ou bien transport interfacial direct : .....	10
5- Phylogénétique et dimorphisme de la levure .....	11
6- Intérêt d'utilisation de la levures <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	11
6.1- <i>Yarrowia lipolytica</i> avantages : .....	12

### **Chapitre 3: Métabolisme lipidique de la levure *Yarrowia lipolytica***

1- Utilisation des substrats hydrophobes par <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	13
1.1- Contacte entre levure et substrat.....	13
1.2- Absorption et transport de substrats hydrophobes.....	14
1.3- Accumulation des lipides dans les corps lipidiques .....	17

2-	Les différentes voies d'accumulations des lipides par <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	18
2.1-	Voie d'accumulation <i>de novo</i> .....	18
1.1-	Voie d'accumulation <i>ex novo</i> .....	19
3-	Déclenchement de l'accumulation de lipides chez les microorganismes .....	20
3.1-	Paramètres influençant le processus d'accumulation lipidique.....	21

## **Partie 02 : Matériel et méthodes**

1-	Matériels.....	23
2-	Matériel biologique .....	25
3-	Milieus et conditions de culture.....	25
3.1-	Milieu de conservation .....	25
3.2-	Milieu d'activation .....	26
3.3-	Milieu de préculture .....	27
3.4-	Milieus de cultures YPDM et YPDHu.....	27
4-	Techniques analytiques : .....	28
4.1-	Croissance .....	28
4.2-	Activité cellulaire .....	28
4.3-	Accumulation lipidique .....	28

## **Partie 03 : Résultats et discussion**

1-	Résultats d'observation microscopique.....	31
2-	Morphologie et dimorphisme des cellules.....	32
3-	Croissance cellulaire de la levure <i>Y. Lipolytica</i> .....	35
4-	Concentration de ph .....	37
5-	Accumulation des lipides .....	38
6-	Le pouvoir antibactérien des milieux de culture .....	40
	<b>Conclusion et perspectives</b> .....	41
	<b>Références bibliographique</b> .....	43

### **ANNEXES**

#### **Résumé**

#### **Abstract**

#### **ملخص**

**ABC** : Cassette de liaison à l'ATP

**ACS**: fatty-acyl-CoA synthetase

**ACS I**: fatty-acyl-CoA synthetase I

**ACS II**: fatty-acyl-CoA synthetase II

**AGL**: Acides gras libres

**AMOS**: Alkane monooxygenase system

**ARS**: Autonomously Replicating Sequence

**ATP** : adénosine triphosphate

**C°** : degrés Celsius

**CL** : Corp lipidique

**DCA** : Dicarboxylic Acids

**ER**: Endoplasmique Reticulum

**FABP**: Fatty-acid-binding proteins

**FADH<sub>2</sub>**: Flavine adénine dinucléotide

**FAH**: Fatty Acid  $\omega$ -hydroxylase

**FDA**: Food and drug administration

**HS**: Hydrophobe Substrats

**LB** : Lipidic Body

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

**PUFA** : Polyunsaturated fatty acids / les acides gras polyinsaturés

**RE** : Réticulum endoplasmique

**STE** : Ester de stérol

**SH** : Substrat Hydrophobe

**TAG** : Triacylglycérols

**TCA** : Cycle des acides tricarboxyliques

**$\mu$ M** : Micro mol

<b>FIGURE 1 . CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>FIGURE 2 . PRINCIPALES VOIES METABOLIQUES ET COMPARTIMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DU SUBSTRAT HYDROPHOBE. ....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURE 3 . ANALYSE DE LA SURFACE CELLULAIRE DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> EN PRESENCE D'ACIDE OLEIQUE. ....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURE 4 . LES SUBSTRATS ALTERNATIFS S'ECOULENT DANS LA VOIE DE DEGRADATION DES ALCANES CHEZ LES LEVURES. ....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURE 5 . B-OXYDATION DES ACIDES GRAS. ....</b>	<b>17</b>
<b>FIGURE 6 . REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ASSIMILATION DU SUBSTRAT HYDROPHOBE (SH) PAR <i>Y. LIPOLYTICA</i>. ....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURE 7 . LEVURE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> CULTIVER OU BOITE DE PETRIE .....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURE 8 . OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA PRE-CULTURE DES CELLULES DE LA LEVURE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> APRES 24H .....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURE 9 . IMAGE MICROSCOPIQUE (×100) MONTRANT LA CROISSANCE CELLULAIRE A 24 H (A), 48H (B) ET A 72H (C) DE LA SOUCHE <i>Y. LIPOLYTICA</i> JMY775 CULTIVEE DANS DEFERANT MILIEU YPDM, YPDHU. ....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURE 10 . OBSERVATION MICROSCOPIQUE (×100) DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> APRES 48 DE CROISSANCE SUR MILIEUX YPDM SOUS UNE COLORATION DE NOIR SOUDAN. ....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURE 11 . CROISSANCE CELLULAIRE DE <i>Y. LIPOLYTICA</i> JMY775 CULTIVEE EN FIOLE DANS LES MILIEUX (YPDM, YPDHU). ....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURE 12 . VARIATION DU PH DES MILIEUX DE CULTURE (YPDM, YPDHU), LORS D'UNE CULTURE EN FIOLE DE LA LEVURE <i>Y. LIPOLYTICA</i> JMY775 A 30°C. ....</b>	<b>37</b>

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1 . TENEURS MAXIMALES EN LIPIDES TOTAUX ASSOCIEES AUX PROFILS EN ACIDES GRAS OBSERVEES CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE BACTERIES OLEAGINEUSES .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLEAU 2 . TENEURS MAXIMALES EN LIPIDES TOTAUX ASSOCIEES AUX PROFILS EN ACIDES GRAS POUR DIFFERENTES ESPECES DE LEVURES OLEAGINEUSES .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLEAU 3 . TENEURS MAXIMALES EN LIPIDES TOTAUX ASSOCIEES AUX PROFILS EN ACIDES GRAS POUR DIFFERENTES ESPECES DE CHAMPIGNONS OLEAGINEUX .....</b>	<b>6</b>
<b>TABLEAU 4. COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE YPD .....</b>	<b>26</b>
<b>TABLEAU 5. COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE YPDA .....</b>	<b>26</b>
<b>TABLEAU 6. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES YPDM ET YPDHU .....</b>	<b>28</b>
<b>TABLEAU 7 . FORME DES CELLULES PENDANT LA CROISSANCE .....</b>	<b>32</b>
<b>TABLEAU 8 . IMPACT DE LA NATURE DE LA SOURCE AZOTEE SUR LA MORPHOLOGIE DE <i>Y. LIPOLYTICA</i>. .....</b>	<b>33</b>

L'épuisement des gisements pétroliers, les variations imprévisibles du coût du baril de pétrole et la prise de conscience environnementale de la nécessité de proposer des options de rechange aux ressources fossiles stimulent la recherche pour développer de nouveaux matériaux renouvelables. Dans ce contexte, la production des lipides constitutifs des triacylglycérols (TAG) à partir de microorganismes hétérotrophes constitue une source renouvelable intéressante à explorer.

Divers microorganismes comme les bactéries, les moisissures et les levures se sont révélées capables de transformer les diverses huiles et même celles des restaurants (qui ont reçu une attention en raison de leur utilisation généralisée) à un produit de valeur, tout ça grâce à des microorganismes qu'on appelle « les oléagineux ».

Ces microorganismes connus par leurs accumulations d'un pourcentage supérieur ou égal à 20% de leur masse sèche en lipides, ces derniers qui seront stockés dans la cellule sous forme de triacylglycérol et d'ester de stérol, ils sont aussi connus par leur métabolisme assez particulier qui oxyde d'une manière préférentielle les lipides que les sucres.

Les microorganismes oléagineux sont divers, ils peuvent être des bactéries, des algues, des champignons et même des levures, les formes dont ils stockent les lipides dans la cellule sont considérés comme des alternatives énergétiques (biodiesel) et même alimentaire (arôme), ceci leur donne l'avantage et la fonctionnalité de valorisation.

Cette étude est focalisée sur l'utilisation de *Yarrowia lipolytica* comme un modèle d'accumulation de transformation de production de biodiesel à partir des différents types de lipides.



# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE 1

---

## Microorganismes oléagineux

Le métabolisme lipidique est présent chez tous les microorganismes. Néanmoins l'accumulation de réserves lipidiques majoritairement constituées d'acides gras existe principalement chez les cellules eucaryotes. Du fait de la toxicité des acides gras libres, c'est sous la forme d'esters de stérol et de triacylglycérols (ou triacylglycérols) qu'ils sont principalement stockés dans les cellules eucaryotes. (Cescute, 2009)

Les microorganismes oléagineux ont été utilisés afin d'étudier les aspects les plus complexes de la biochimie des lipides (Ratledge, 1987). En fait, avec une vitesse de croissance élevée et une panoplie enzymatique très intéressante, les microorganismes réalisent de nombreuses biotransformations (dégradation des sucres, des alcools, des lipides, des hydrocarbures ...) et constituent des modèles excellents pour ce type d'étude. (Ratledge, 1987)

Arbitrairement, on considère qu'un microorganisme est oléagineux s'il peut accumuler des quantités en lipides cellulaires, supérieures à 20% par rapport à sa matière sèche. (Ratledge, 1994).

Ces microorganismes sont en général autotrophes (algues photosynthétiques, cyanobactéries) ou hétérotrophes (bactéries, levures, champignons). (Ratledge, 1994). Ils peuvent appartenir aussi bien à des espèces bactériennes qu'à des eucaryotes. (Beopoulos, 2009)

Les levures oléagineuses sont capables de synthétiser et d'accumuler des lipides jusqu'à 72% de la masse sèche de la cellule. Même s'il existe des algues, des champignons et quelques bactéries oléagineuses, sur le plan biochimique et physiologique, l'accumulation lipidique est plutôt étudiée chez la levure. Ce sont les avantages que portent les levures au niveau culture, extraction et obtention des huiles qui ont conduit à cette discrimination entre les microorganismes. Parmi plus de 600 espèces de levures, seulement 25 entre elles sont connues pour être oléagineuses. (Beopoulos, 2009)

### 1- Bactéries oléagineuses

Peu de bactéries sont considérées comme oléagineuses et présentent, en général, un intérêt d'utilisation limité. Des bactéries du genre : *Nocardia sp.*, *Rhodococcus sp.* Et *Mycobacterium sp.* Peuvent contenir des pourcentages élevés en triglycérides intracellulaires (supérieurs de 50% en masse). Un inconvénient rendant presque impossible l'utilisation alimentaire de ces microorganismes, est qu'il n'existe pas de solvant sélectif pour l'extraction de ces lipides cellulaires. (Papanikolaou, 1998)

Un exemple d'utilisation des bactéries en tant que microorganismes oléagineux, est la bactérie *Arthrobacter AK 19*. (Papanikolaou, 1998)

Ce microorganisme contient aux alentours de 80% (en masse) de lipides par rapport à sa matière sèche. Ces lipides sont majoritairement composés des triglycérides. Le seul inconvénient concernant l'utilisation de ce microorganisme en tant que source potentielle de lipides, est sa faible vitesse spécifique de croissance. (Papanikolaou., 1998)

Mais le principal problème de la production lipidique chez la plupart des bactéries est la difficulté à extraire les lipides, menant vers une Co-extraction de produits non souhaités aux propriétés allergéniques et antinutritionnels. (Ochoa Estopier , 2012)

**Tableau 1 .** Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de bactéries oléagineuses [gAGi.gAG-1] (T : traces)

(Wayman *et al.*, 1984 d'après Ratledge et Boulton, 1985 et Alvarez *et al.*, 1997)

<i>Espèces</i>	% lipide						
	[g <sub>lip</sub> .g <sup>-1</sup> ]	%C16 :0	%C16 :1	%C18 :0	%C18 :1	%C18 :2	%C18 :3
<i>Arthrobacter AK 19</i>	78	30	14	6	30	T	T
<i>Rhodococcus ruber</i>	19	35	14	5	35	T	T
<i>Rhodococcus opacus</i>	48	26	9	7	33	T	T
<i>Nocardia corallina</i>	13	34	T	15	42	T	T

## 2- Algues oléagineuses

Les microalgues sont capables d'utiliser le CO<sub>2</sub> comme source carbonée et la lumière comme source d'énergie pour l'accumulation lipidique dans des conditions environnementales très spécifique (Li *et al.*, 2008) sous la forme d'acide gras polyinsaturés (Feofilova *et al.*, 2010). Ces microorganismes (rassemblés par la suite sous l'appellation abusive « micro algues ») dont la taille varie du micron à la centaine de microns se trouvent en abondance dans les milieux aquatiques (océans, rivières, lacs,...). Comme chez les végétaux terrestres, certaines espèces peuvent accumuler, dans certaines circonstances, le carbone absorbé sous forme de lipides (principalement triglycérides), ce qui permet d'envisager d'utiliser ces microorganismes pour produire des biocarburants. (Cadoret *et al.*, 2008)

*Botriyococcus braun II* est une espèce très connue qui arrive à accumuler des quantités importantes de lipides. Des pourcentages proches de 85% (en masse) en lipides cellulaires par rapport à la matière sèche ont été rapportés (Brown et al, 1969)

### 3- Levures oléagineuses

---

Dans le monde de levures oléagineuses, il existe plusieurs espèces, qu'on cite comme exemple : *Cryptococcus albidus*, *Lipolyces lipofera*, *Rhodotorula glutinis*, et *Yarrowia lipolytica*. (Ochoa Estopier, 2012)

En plus du pourcentage important qui peuvent accumuler par rapport à leur masse sèche ces microorganismes unicellulaires ont pleins d'autres avantages qui leurs distingues des autres microorganismes dit oléagineux, on prend comme avantages :

- Le temps de duplication inférieur à 1 heure.
- Ils ne sont pas affectés par les conditions saisonnières.
- Et enfin ils ont un mode de culture qui est assez simple à comprendre et maîtriser. (Ochoa Estopier, 2012)

La plupart des études biochimiques et physiologiques concernant le processus d'accumulation lipidique chez les microorganismes, ont été effectuées sur des levures qui sont considérées comme les microorganismes oléagineux les plus conventionnels. Une classification à propos du contenu lipidique des levures a été proposée telle que :

- I) levures à un taux lipidique faible (inférieure de 5%)
- II) levures à un taux lipidique moyen (pourcentage de 5-20%)
- III) levures oléagineuses (pourcentage supérieure de 20%). (Ratray et al., 1975).

Les lipides accumulés par les levures peuvent être composés jusqu'à 90 % de triacylglycérols (Rolph et al., 1989), avec une composition voisine du suif (Davies et al., 1988). Un contenu lipidique cellulaire de 40 % en masse est usuel chez les levures oléagineuses. Mais il peut atteindre jusqu'à 70 % (Davies et al., 1990), en condition de carence nutritionnelle (principalement l'azote) chez certaines espèces. (Tableau 2)

**Tableau 2 .** Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras pour différentes espèces de levures oléagineuses [gAGi.gAG -1] (T : Trace) (Ratledge, 1989)

<i>Espèces</i>	<b>% lipide</b>						
	<b>[g<sub>lip</sub>.g<sup>x-1</sup>]</b>	<b>%C16 :0</b>	<b>%C16 :1</b>	<b>%C18 :0</b>	<b>%C18 :1</b>	<b>%C18 :2</b>	<b>%C18 :3</b>
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	25	T	10	57	7	0
<i>Candida sp 107</i>	42	44	5	8	31	9	1
<i>Cryptococcus albidus</i>	65	12	1	3	73	12	0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	1	3	47	8	0
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	11	6	1	28	51	1
<i>Cunninghamella japonica</i>	60	16	0	14	48	4	8
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12
<i>Penicillium spinulosum</i>	64	18	4	12	43	21	T

#### 4-Champignons oléagineux

Beaucoup d'études concernant l'accumulation lipidique ont été effectuées chez les champignons. Ratledge (1994) identifia 64 espèces de champignons capables d'accumuler des graisses intracellulaires avec un pourcentage supérieur à 25% (en masse), mais il existe, également, beaucoup d'espèces accumulant des lipides avec un pourcentage compris entre 20 et 25%, ce qui leur confère un caractère partiellement oléagineux. Les champignons

accumulent, en général, des acides gras plus insaturés par rapport aux levures. L'étude des lipides cellulaires chez ces champignons montre une prédominance des acides gras de type C16 et C18. Seuls des champignons du genre *Entomophthora sp*, biosynthétisent des quantités élevées en acides aux chaînes aliphatiques moyennes (C 12 :0 et C 14 :0).

**Tableau 3 .** Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras pour différentes espèces de champignons oléagineux [gAGi.gAG -1]. (T : traces) (Ratledge, 1982)

<i>Espèces</i>	% lipid						
	[g.gX-1]	%C14 :0	%C16 :0	%C18 :0	%C18 :1	%C18 :2	%C18 :3
<i>Absidia corymbifera</i>	27	1	24	7	46	8	10
<i>Cunninghamella japonica</i>	60	T	16	14	48	14	8
<i>Entomophthora coronate</i>	43	31	9	2	14	2	1
<i>Aspergillus terreus</i>	57	2	23	T	14	40	21

La faible vitesse de croissance des champignons filamenteux et l'impact de la filamentation sur les transferts de masse, de chaleur et de quantité de mouvement rendent problématique la mise en œuvre industrielle de ces microorganismes.

# CHAPITRE 2

---

Levure oléagineuse

*Yarrowia lipolytica*

La signification littéraire des termes utilisés pour les levures dans différentes langues peut souvent être associée à la propriété de fermentation. Le mot anglais « *Yeast* » est lié au mot Néerlandais « *Gist* » ou au mot Allemand « *Gischt* » qui signifie mousse. L'expression française levure est dérivée de lever (= pour augmenter) et du terme latin « *Levere* », qui se réfère à l'évolution du CO<sub>2</sub> qui pousse les substances solides pendant la fermentation. En dehors de *Saccharomyces*, de nombreux autres genres de levures sont d'une importance centrale dans la biotechnologie d'aujourd'hui. Entre autres, les souches de *Yarrowia lipolytica* qui appartient aux levures dites non conventionnelles qui sont utilisées dans une grande variété de processus biotechnologiques de grande importance économique. (Osiewacz, 2002)

## 1- Historique

---

Appelé en premier temps *Candida lipolytica*, l'intérêt de cette levure est d'abord surgi des caractéristiques physiologiques plutôt rares, les souches de *Candida lipolytica* utilisaient peu de sucres (principalement du glucose) comme source de carbone, mais assimilaient facilement divers polyalcools, acides organiques ou paraffines normales. Durant la fin des années 40 les souches de cette levure ont été notées par des technologues laitiers pour leurs activités élevées de protéases extracellulaires et de lipase, bien que ces enzymes purifiées n'aient jamais été mises au travail industriellement. (Wolf, 2012)

L'espèce a été classée dans un premier temps comme *Candida* car aucun état sexuel n'avait été décrit à l'époque. La forme parfaite de *C. lipolytica* a été identifiée à la fin des années 1960 par Wickerham au Northern Regional Research Laboratory de l'USDA à Peoria. Donc après cette découverte la forme parfaite a été reclassé pour que le classement devienne *Endomycopsis lipolytica* puis *Saccharomycopsis lipolytica* et enfin *Yarrowia lipolytica*. (Wolf, 2012)

## 2- Taxonomie

---

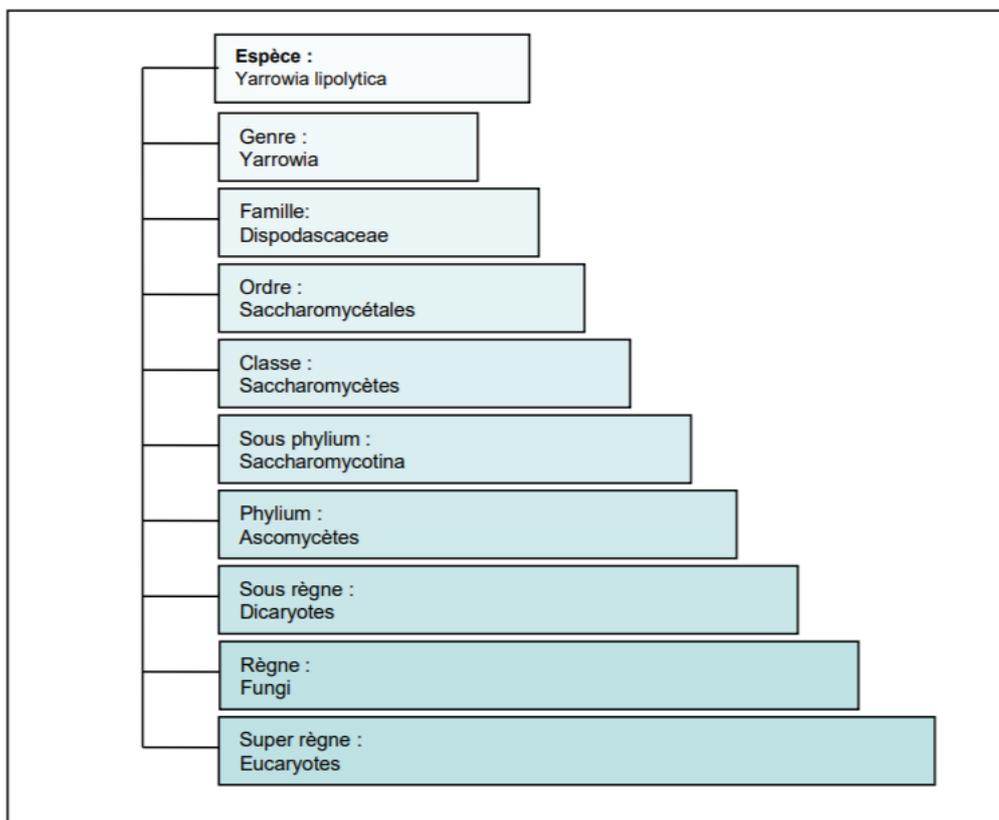
Van der Walt et von Arx (1980) ont observé que *Saccharomycopsis Lipolytica* semblait unique par rapport à d'autres espèces de *Saccharomycopsis*. La forme et la taille de ses ascospores diffèrent. (Yamada *et al*, 1976) ; et la composition glucidique cellulaire entière de *S.Lipolytica* diffère des autres espèces mentionnées en raison de la présence de galactose. En raison de ces différences, van der Walt & von Arx (1980) a décidé d'introduire un nouveau genre, *Yarrowia* (van der Walt & von Arx), et a réaffecté *S. lipolytica* à ce nouveau genre sous le nom de *Yarrowia lipolytica* qui est également l'espèce type de ce genre.

Depuis le début des années 1990, des efforts importants ont été entrepris pour reclassifier les espèces de levures à l'aide d'approches phylogénétiques (Barns *et al.*, 1991 ; Bigey *et al.*, 2003 ; Knutsen *et al.*, 2007 ; Kurtzman & Robnett, 1994, 1995, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1999).

Le dernier placement phylogénétique de *Yarrowia* est dans la classe *Saccharomycetes* et l'ordre *Saccharomycetales*. À l'heure actuelle, le genre n'est pas lié à une famille et même s'il est avec les *Saccharomycetales* la liaison est incertaine (Kurtzman *et al.*, 2011) et doit être étudié plus en détail.

Dans la 5e édition de « The Yeasts: a Taxonomic Study » (Kurtzman *et al.*, 2011), une clé d'identification basée sur ces caractéristiques est toujours incluse et, ce qui est important, *Y. lipolytica* peut être identifié en utilisant de telles caractéristiques de croissance. Dans certains cas, cependant, une distinction avec *C. deformans* étroitement apparentés n'est pas possible (Kurtzman *et al.*, 2011).

La classification hiérarchique de *Yarrowia lipolytica* est décrite dans la figure suivante :



**Figure 1 .** Classification hiérarchique de *Y. lipolytica*

### 3- Habitat et caractérisation physiologiques

#### 3.1- HABITAT

*Yarrowia lipolytica* est une espèce qui a une affinité aux solvants apolaires comme les lipides (corps gras), ses souches sont facilement isolées des milieux riches en composés lipidiques et d'hydrocarbures (Les aliments gras ou dans les champs de pétroles ...) peut être isolé aussi à

partir des : Produits laitiers comme le fromage, saucisses, viandes et produits carnés, crevettes, volailles, produits agro-industriels, et d'eaux usées et environnements marins. (Najjar, 2010 ; Wolf, 2012)

L'inhabilité de la levure de vivre sous des conditions anaérobiques permet leurs éliminations faciles des produits laitiers (Wolf, 2012). Elle est classée comme un microorganisme généralement qui n'est pas pathogène par la Food and Drug Administration (FDA). (Najjar, 2010)

L'injection intraveineuse de cellules *Yarrowia lipolytica* (Holzschu *et al.*, 1979) à des souris normales ou stressées par la cortisone n'a été associée à aucune mortalité (Contrairement à *Candida albicans* ou *Candida tropicalis*), et aucune cellule viable n'a pu être sauvée 6 jours après l'injection. (Wolf, 2012)

### 3.2- Physiologie

*Yarrowia lipolytica* est une levure aérobie stricte mésophile qui croit dans une température optimale allant de 30 à 32C°, considéré comme non-pathogène et qui accumule divers acides gras saturés et insaturés avec des pourcentages variés :

- Hexadécanoïque, Acide palmitique (C16 :0) avec un pourcentage de **11%**.
- Octadécanoïque, Acide Stéarique (C18 :0) avec un pourcentage de **28%**.
- Octadécadien 9c, 12c oïque, Acide Linoléique (C18 :2) avec un pourcentage de **52%** qui le rend le plus accumulé par la levure.
- Autre acide gras avec un pourcentage de **19%**.

(Bouchedja *et al.*, 2017)

## 4- Assimilation des sources de carbones

---

*Yarrowia lipolytica* est une levure qui se caractérise par la diversité d'assimilation de différents substrats :

### 4.1- Assimilation des sucres

Contrairement à la souche sauvage de *Yarrowia lipolytica* qui peut utiliser des sucres plus complexes à l'aide des enzymes Hexokinase et glucokinase, la souche utilisée dans cette étude ne peut utiliser qu'un nombre limité de sucres simples comme source de carbone vu qu'elle est dépourvue des gènes responsables de la production des enzymes qui ont un impact direct sur l'assimilation des sucres plus complexes , parmi les sucres cycliques simples à un

seul cycle assimilable par notre souche on cite : le glucose, le mannitol, le fructose, le mannose, le gluciole et le N-acetyl-glucoseamine. (Bouchedja et *al.*, 2017)

#### 4.2- Assimilation des Acides organiques

*Yarrowia lipolytica* peut croître sur d'autres et diverses sources de carbone et parmi ces sources l'acide organique mais à des concentrations bien déterminée pour une croissance, afin d'éviter l'inhibition de la croissance. (Bouchedja et *al.*, 2017)

Une concentration de 0,4% d'acétate dans le milieu de culture est suffisante pour démarrer la croissance, mais si la concentration est très élevée par exemple elle atteint les 1% la croissance peut être ralentie et même inhibée. (Bouchedja et *al.*, 2017)

#### 4.3- Assimilation des alcools

Elle peut utiliser aussi l'alcool comme source de carbone mais aussi à des concentrations inférieures à 3% sinon il devient un inhibiteur. On prend l'exemple du glycérol qui est assimilé autant que source de carbone par la voie de glycérol-3-phosphate. (Bouchedja et *al.*, 2017)

#### 4.4- Assimilation de substrats hydrophobes

La levure *Yarrowia lipolytica* a une forte activité de dégradation des lipides appelés activité lipolytique. Pour cela elle a deux systèmes de dégradation, un pour les C12 et C14, et un autre pour les C16 et C18 (Saturé ou insaturé). (Bouchedja et *al.*, 2017)

*Yarrowia lipolytica* assimile les hydrocarbures hydrophobes comme : les alcanes, les n-paraffines, les lipides, et les triglycérides qui entrent dans les cellules, par deux méthodes de transport :

##### *A- transport indirect ou bien médié :*

Par des sécrétions extracellulaires qui les solubilisent pour qu'ils puissent entrer dans la cellule

##### *B- transport direct ou bien transport interfacial direct :*

Par interaction directe avec la membrane après une augmentation des propriétés apolaires par des structures spécifiques qui dépendent de la phase de croissance.

Les substrats transportés à l'intérieur de la levure sont utilisés après dans le cycle de Bêta-oxydation qui est la principale voie métabolique de dégradation des molécules d'acides gras pour produire enfin : l'acétyl-CoA, dont le groupe acétyle est oxydé par le cycle de Krebs, et le NADH et le FADH<sub>2</sub>, qui alimentent la chaîne respiratoire. (Bouchedja et *al.*, 2017)

## 5- Phylogénétique et dimorphisme de la levure

---

Des données récentes sur les gènes d'ARN 7s, sur la structure des introns ou sur le fonctionnement des ARS ont toutes confirmées que cette espèce était assez particulière par rapport à la plupart des autres levures. Les arbres évolutifs basés sur la comparaison de séquences de gènes codants pour des fonctions bien conservées (gènes glycolytiques, gènes d'ARN ribosomique) localisent *Yarrowia lipolytica* sur une branche isolée. (Wolf, 2012)

En plus de la haute teneur en GC, elle possède une structure particulière de l'ADNr couplé avec un manque de quelques séquences d'ARN polymérase trouvé dans d'autres levures et une similarité de taille d'ARN avec celle trouvé dans les eucaryotes. (Wolf, 2012)

Un aspect positif sur cette levure est qu'elle conserve bien ses caractères sur tout fonctionnels à travers les générations mieux que lorsqu'elle se produit entre des levures étroitement apparentées. (Wolf, 2012)

*Y. lipolytica* est une levure dimorphe naturelle, qui forme des cellules de levure, des pseudohyphaes et des hyphes cloisonnés, parce que la levure peut se présenter avec plusieurs formes on l'appelle une levure dimorphe. (Wolf, 2012)

Les souches du type sauvage de *Y. lipolytica* présentent diverses formes de colonies, allant de lisses et brillantes à fortement alambiquées et mates. La morphologie coloniale est déterminée à la fois par les conditions de croissance (aération, sources de carbone et d'azote, pH, etc.) et par le contexte génétique de la souche. (Wolf, 2012)

## 6- Intérêt d'utilisation de la levure *Yarrowia lipolytica*

---

Chez *Y. lipolytica* l'accumulation de lipides est plus faible que pour les autres microorganismes oléagineux, mais c'est la seule levure connue capable d'accumuler de l'acide linoléique en grandes proportions (plus de 50% des acides gras). Cette particularité de *Y. lipolytica* a attiré notre attention, car les acides gras longs et insaturés, présentent un grand intérêt alimentaire et biotechnologique. Ils constituent des lipides essentiels de l'alimentation, comme les oméga-3 et les acides gras polyinsaturés (PUFA), ainsi que de bons candidats pour une utilisation comme biocarburants ou comme précurseurs de la synthèse de plusieurs produits de la pétrochimie (plastiques, peintures, adhésifs, etc.). De plus, *Y. lipolytica* possède le potentiel remarquable de croître et d'accumuler des lipides sur des milieux hydrophobes. (Beopolose, 2006)

Sa présence dans une vaste variété d'environnements pollués par le pétrole témoigne de sa capacité à dégrader des composés organiques. Elle est déjà considérée comme un modèle pour la production de protéines, des enzymes et de bioconversion de dérivés de lipides à partir de substrats hydrophobes. (Beopolose, 2006)

*Y. lipolytica* est également présente dans des environnements marins, hypersalins, ce qui en fait un modèle pour des études du stress osmotique. Ces dernières années son génome a été séquencé et de nombreux outils génétiques ont été développés pour l'analyse fonctionnelle et l'ingénierie génétique de cette levure. (Beopolose, 2006)

### 6.1- *Yarrowia lipolytica* avantages :

- Peut utiliser une grande variété des substrats.
- Bonne tolérance ou forte constataion en substrat.
- Productivité élevée en lipide et en acide citrique.
- Nature uni cellulaire plus facile à utilisait contrairement ou champignon.
- La reproduction rapide chaque 20 à 30 min

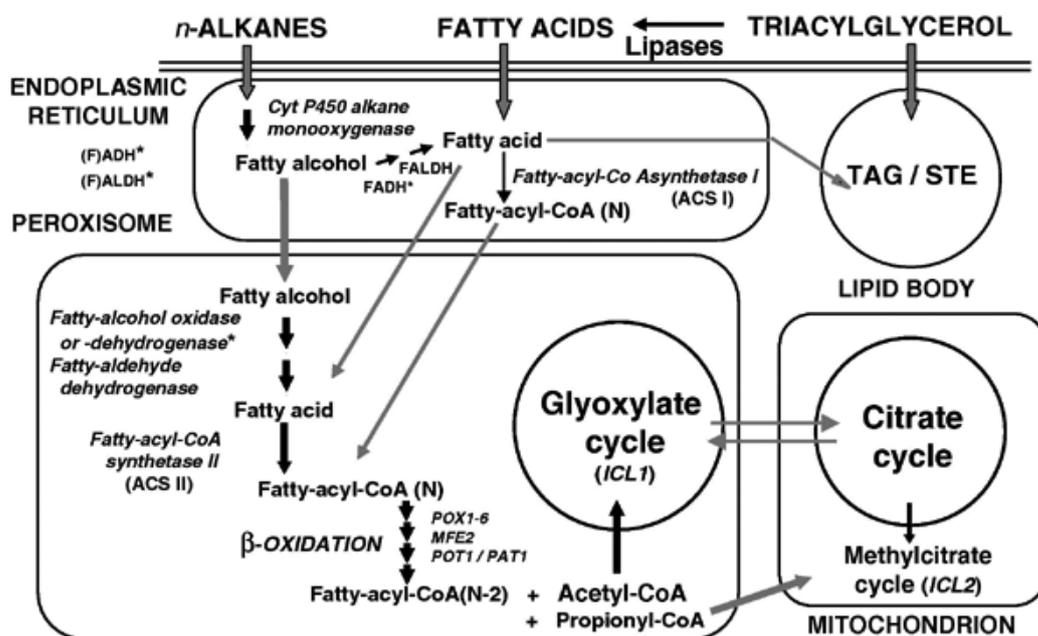
# CHAPITRE 3

---

Métabolisme lipidique  
de la levure *Yarrowia*  
*lipolytica*

### 1- Utilisation des substrats hydrophobes par *Yarrowia lipolytica*

Le catabolisme des substrats hydrophobes, tels que les alcanes, les acides gras et les triglycérides, est un métabolisme assez complexe qui implique plusieurs voies métaboliques se déroulant dans différents compartiments subcellulaires, une caractéristique importante de l'assimilation des substrats hydrophobes par les levures est le flux métabolique du carbone des substrats vers la synthèse des composants cellulaires ou la production des métabolites via les acides gras, ce qui est assez différent du cas des substrats conventionnels comme les glucides. (Fickers *et al.*, 2005).



**Figure 2 .** Principales voies métaboliques et compartiments cellulaires impliqués dans la dégradation du substrat hydrophobe. (Fickers *et al.*, 2005)

L'assimilation des substrats hydrophobes par les levures s'est produite principalement par les voies d'oxydation Monoterminal et Diterminal (Fickers *et al.*, 2005). Les principales étapes des voies de dégradation du HS chez les levures sont :

#### 1.1- Contacte entre levure et substrat

*Yarrowia lipolytica* a la capacité de produire des tensioactifs pendant la croissance sur substrats hydrophobes et une corrélation a été observée entre l'induction de l'adhésion entre les cellules et les substrats hydrophobes, et l'augmentation des propriétés apolaires de la surface cellulaire. Cette modification de l'hydrophobicité de surface semble liée à la présence de protubérances à la surface des cellules en croissance sur substrats hydrophobes. Leur

présence dépend de la phase de croissance et semble être régulée de manière sensible, c'est-à-dire inductible par l'alcane et l'acide oléique et réprimé par le glucose (Albertyn et Smit, résultats non publiés). (Fickers *et al.*, 2005)

## 1.2- Absorption et transport de substrats hydrophobes

### 1.2-1. Hydrolyse des triglycérides

*Yarrowia lipolytica* peut utiliser des triglycérides comme source de carbone. La première étape de leur catabolisme implique l'hydrolyse en acides gras libres et en glycérol par des enzymes lipolytiques (lipases), elle est capable de produire plusieurs lipases (a activités extracellulaires, liées à la membrane et intracellulaires), sachant que la production de lipase dépend de la composition du milieu et des conditions environnementales. (Fickers *et al.*, 2005)

### 1.2-2. Transport d'alcanes et d'acides gras

À l'exception des triglycérides, l'utilisation des substrats hydrophobes commence par l'absorption par les cellules de levure. Malgré de nombreux efforts, les principes de base de ce processus ne sont pas encore élucidés. La plupart des résultats soutiennent la suggestion que l'absorption d'alcanes par les cellules de levure est un processus de diffusion, qui est facilitée par des propriétés hydrophobiques spéciales et des structures de la cellule. (Fickers *et al.*, 2005)

Les observations ont conduit à l'hypothèse que les alcanes attachés aux protubérances ou excroissances hydrophobes peuvent migrer à travers les canaux via la membrane plasmique à l'ER, site d'hydroxylation des alcanes. L'exact mécanisme par lequel passent les composés hydrophobes à travers une membrane est dans tous les organismes encore très controversés. (Fickers *et al.*, 2005)

Concernant l'absorption des acides gras, des enquêtes ont été menées par Kohlwein et Paltauf dans *S. uvarum* et *Saccharomyces cerevisiae*. *Y. lipolytica* a conclu qu'en dessous d'un seuil de 10  $\mu\text{M}$ , un transporteur sans énergie était nécessaire, alors qu'au-dessus de cette concentration, les acides gras comme le laurique ou l'acide oléique diffuse librement. De plus, ces auteurs ont proposé qu'au moins deux transporteurs différents sélectifs en fonction de la longueur de la chaîne soient présents. La susmentionnée structure ressemblant à des canaux traversant la membrane qui pourrait jouer ce rôle. Néanmoins, cette protéine ayant une activité de liaison

aux acides gras semble être importante pour l'utilisation efficace des acides gras par *Y.lipolytica*. (Fickers *et al.*, 2005)

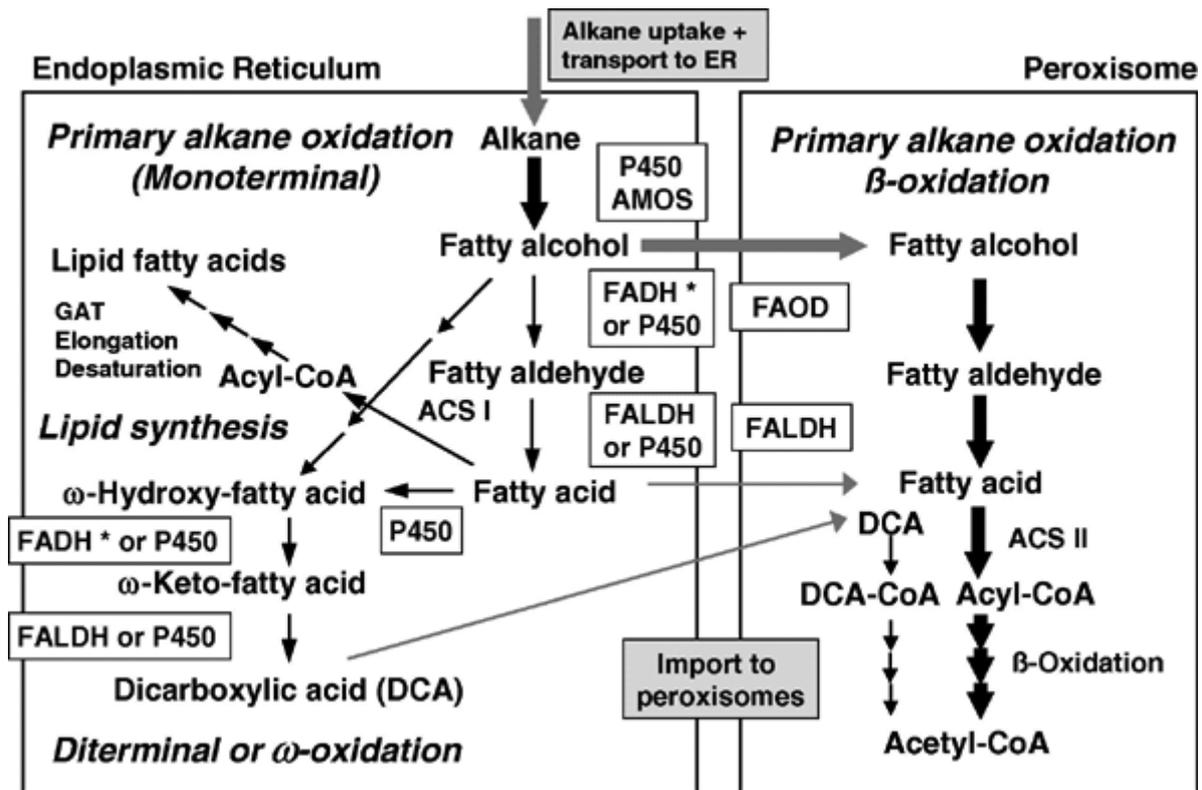
Hormis le FABP qui est absent de *S.cerevisiae*, plusieurs autres gènes suggérés comme étant impliqués dans l'absorption des acides gras et le transport intracellulaire chez *S.cerevisiae* sont probablement présents chez *Y. Lipolytica*, bien que leur fonction dans les processus de transport HS reste à établir pour *Y. Lipolytica*. (Fickers *et al.*, 2005)



**Figure 3 .** Analyse de la surface cellulaire de *Y. lipolytica* en présence d'acide oléique.

Les cellules de *Y. lipolytica* se développent sur un milieu minimum en présence d'acide oléique. Des gouttelettes lipidiques (flèche rouge) et des protusions (flèches bleues) sont observées (Mlickova *et al.*, 2004).

## 1.2-3. Utilisation des alcanes et des acides gras

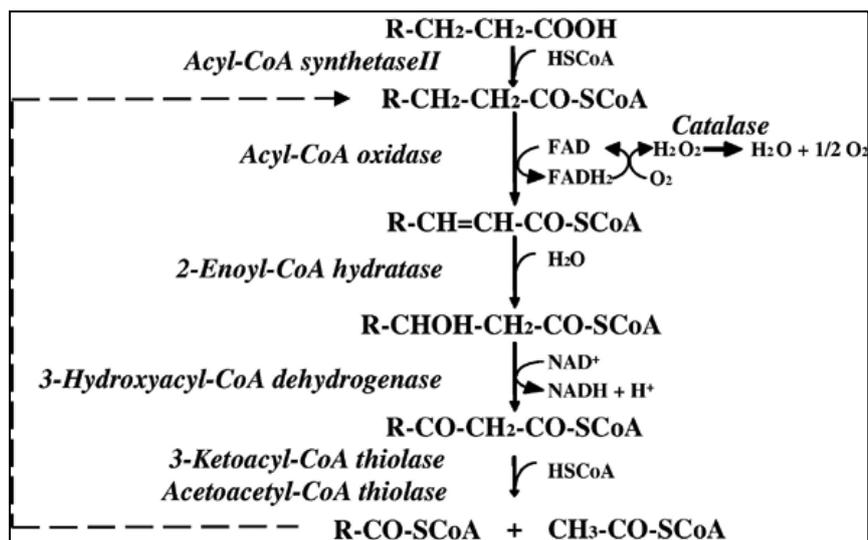


**Figure 4 .** Les substrats alternatifs s'écoulent dans la voie de dégradation des alcanes chez les levures.

Le flux métabolique principal pendant l'oxydation des alcanes est représenté par des flèches noires en gras (étapes enzymatiques) et grises en gras (étapes de transport), y compris les étapes d'oxydation des alcanes primaires ou mono-terminaux en acides gras dans les ER et / ou les peroxysomes et, après la formation d'acyl-CoA, par la gras-acyl-CoA synthétase II (ACS II) dans la β-oxydation paroxysmique donnant de l'acétyl-CoA (ou propionyl-CoA à partir d'alcanes à chaîne impaire) en tant qu'intermédiaires principaux, qui subissent une oxydation supplémentaire dans les cycles glyoxylate, citrate et méthyl citrate. Alternativement, une partie des acides gras libres dérivée d'alcanes de longueurs correctes (C14-C18) est également utilisée pour la synthèse des lipides (flèches noires), y compris l'activation par la gras-acyl-CoA synthétase I (ACS I dans ER), l'élongation des acides gras et la glycérol-3-phosphate acyltransférase, entraînant des phospholipides et des triglycérides, à transporter vers les corps lipidiques et à stocker sous forme de triacylglycérol ou d'esters de stéryle. De plus, à partir d'acides gras dérivés ou de 1-alkanol (deuxième chaîne de réactions, via 1, x-alkane-diol, xhydroxy-aldéhyde gras en x-hydroxy-acide gras, non représentés ici) le diterminal ou la voie d'oxydation x (flèches noires et grises)

entraîne la formation d'acides dicarboxyliques (DCA), qui sont également dégradés davantage par la  $\beta$ -oxydation. L'implication possible des P450 avec une spécificité de substrat différent envers les alcanes et les dérivés d'acides gras dans les étapes d'oxydation mono- et di-terminale, la localisation des enzymes et les interactions ER-peroxysome pendant la dégradation sont principalement conclu à partir de résultats sur la fonction P450 chez *C. maltosa*. (Fickers *et al.*, 2005)

Il a été démontré que le P450 est induit pendant la croissance de *Y. lipolytica* sur les alcanes et les acides gras et qu'il est impliqué dans les activités AMOS et FAH. (Fickers *et al.*, 2005)



**Figure 5.**  $\beta$ -Oxydation des acides gras.

Les acides gras sont convertis en esters d'acyl-CoA (par ACS) et entrent ensuite dans la séquence de  $\beta$ -oxydation en quatre étapes. Chaque cycle entraîne la perte de deux carbones (acétyl-CoA).

L'ACS I est répartie entre différentes fractions subcellulaires et semble impliquée dans la synthèse des lipides, tandis que l'ASC II est présente dans les peroxysomes où la  $\beta$ -oxydation, la principale voie de dégradation de ces esters d'acide gras et de CoA, a lieu. (Fickers *et al.*, 2005)

### 1.3- Accumulation des lipides dans les corps lipidiques

Selon les conditions environnementales, les cellules de levure sont capables de mobiliser des acides gras libres ou de les stocker sous forme de triacylglycérols (TAG) et d'esters de stéryle (STE) dans LB. Les corps lipidiques (LB) sont constitués d'un noyau hydrophobe formé de lipides neutres, principalement TAG et dans une moindre mesure STE, qui est entouré d'une monocouche de phospholipides avec quelques protéines incorporées. Peu de LB ont pu être

observée chez *Y.lipolytica* lorsqu'ils étaient cultivés en milieu glucose alors qu'une accumulation de LB a été observée pendant la culture en milieu acide gras ou triglycéride. Après 6h de croissance dans le milieu YNBO Milieu d'acide oléique minimal, de petits LB ont pu être observés. Ensuite, la taille des LB a augmenté et ils ont commencé à fusionner, donnant des LB plus gros mais moins nombreux dans les cellules et seuls quelques LB importants ont pu être observés pendant la phase stationnaire. La teneur et la composition de LB dépendent des conditions de croissance et de la composition du substrat. Il a également été démontré que le génotype de la levure pouvait améliorer l'accumulation de LB. (Fickers *et al.*, 2005)

## 2- Différentes voies d'accumulations des lipides par *Yarrowia lipolytica*

---

L'accumulation des lipides chez *Y. lipolytica* peut se produire par deux voies distinctes :

La première est la biosynthèse *De novo* des acides gras qui correspond à la production dans des conditions définies des précurseurs des acides gras comme l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA et leur intégration dans la voie de biosynthèse de lipides (voie de Kennedy).

La deuxième, appelé la voie d'accumulation *Ex novo* correspond à l'incorporation des acides gras, des huiles et des triglycérides du milieu de culture et leur accumulation dans un état inchangé ou modifié à l'intérieur de la cellule. (Beopolose, 2006)

### 2.1- Voie d'accumulation *de novo*

La biosynthèse *de novo* des lipides chez *Y. lipolytica* s'effectue par l'intermédiaire de l'acyl-CoA synthétase **1** anabolique, située au niveau des peroxyosomes, des mitochondries et du cytosol. Chez une souche de *Y. lipolytica*, il a été montré qu'une présence d'acides gras exogènes à longue chaîne, même en faible concentration (p. e. 0,3% w/v), réprime complètement l'activité de ce système de biosynthèse (Meyer et Schweizer, 1976).

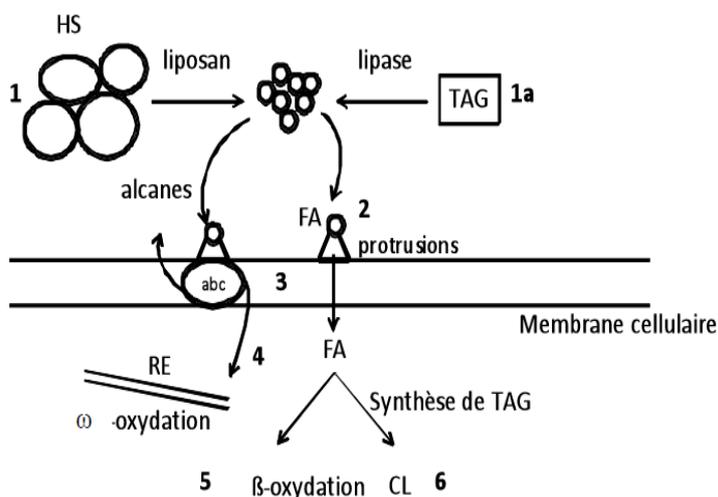
*Y. lipolytica* possède un système lipasique très actif, qui agit de façon préférentielle sur les positions sn 1 et sn 3 de la molécule du triglycéride (Barth et Gaillardin, 1997). L'activité lipasique ainsi que la purification des lipases est un sujet qui présente un intérêt scientifique et économique important. Des études relativement anciennes (Barth et Gaillardin, 1997) ont montré une seule activité lipasique, sujette à une répression catabolique par la présence du glucose dans le milieu de culture. D'autres études ont montré qu'il existe au moins une activité lipasique extracellulaire, en présence d'acide oléique jouant le rôle d'activateur stabilisateur, et une activité lipasique intracellulaire, qui présentent des différences biochimiques, comme la masse moléculaire, le pH optimum etc. (Barth et Gaillardin, 1997).

## 2.2- Voie d'accumulation *ex novo*

Les levures sont capables de synthétiser *de novo* tous les acides gras dont elles ont besoin à partir d'une source de carbone (Ratledge, 1994 ; Daum *et al.*, 1998). Mais, dans le cas où des nutriments proches de la structure des acides gras nécessaires sont disponibles dans leur milieu de croissance elles peuvent les utiliser directement pour leurs fonctions biologiques. C'est le cas des acides gras ou de leurs dérivés présents dans l'environnement.

Pour que les acides gras provenant du milieu participent à une réaction métabolique, leur incorporation, transport et activation en thiol esters est nécessaire. Si le substrat est sous forme de TAG, les acides gras libres sont obtenus après hydrolyse des TAG par les lipases. Néanmoins, les mécanismes d'incorporation des AGL dans la cellule restent mal connus.

(Beopoulos, 2009)



**Figure 6 .** Représentation schématique de l'assimilation du substrat hydrophobe (SH) par *Y. lipolytica*.

(1a, 1b) Les SH forment des émulsions et la taille des gouttelettes est réduite par le liposan sécrété. (1b) les TAG sont clivés par la lipase extracellulaire afin de libérer les acides gras. (2) Les gouttelettes de substrat s'accrochent aux protrusions cellulaires. (3) L'incorporation se fait par les mécanismes de transport (i.e. transporteurs ABC,). (4) La modification du substrat se fait par des différentes voies (i.e.  $\omega$ -oxydation pour les alcanes au RE, et le système monooxygénase P450. (5) Dégradation par la voie de la  $\beta$ -oxydation où (6) Accumulation des lipides en forme de TAG.

Les phases intervenant dans la synthèse de lipides « *ex novo* » ou dégradation chez *Y. lipolytica* sont :

1. l'activation des acides gras en esters-CoA
2. la  $\beta$ -oxydation, où les esters-CoA subissent soit une dégradation en acétyl-CoA (pour des acides gras à chaîne paire) et propionyl-CoA (pour des acides gras à chaîne impaire) soit une incorporation directe des acyls gras aux lipides cellulaires après une élongation et désaturation de la chaîne carbonée (Ochoa Estopier, 2012).
3. la  $\omega$ -oxydation, où les alcanes afin d'être dégradés, subissent une oxydation par le système cytochrome P450 monooxydase situé au réticulum endoplasmique et aux peroxysomes
4. une synthèse des intermédiaires du cycle de TCA à partir des acétyls-CoA par la voie du cycle de glyoxylate suivi de la gluconéogenèse et l'activation du cycle du méthyle citrate pour l'utilisation du propionyl-CoA (Ochoa Estopier, 2012 ; Fickers, Benetti *et al.*, 2005)

### 3- Déclenchement de l'accumulation de lipides chez les microorganismes

---

Chez les organismes oléagineux le déclenchement de l'accumulation de lipides est dû à la carence en un nutriment majeur du milieu de culture. Il s'agit le plus souvent de l'azote (Beopoulos, 2009). Pour mesurer le taux d'accumulation des lipides dans une levure, le milieu de culture doit être préparé de façon à être limitant en azote et en excès de carbone. Lorsque l'azote devient indisponible, les cellules ne peuvent plus proliférer, car l'azote est essentiel à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques. Pourtant, le carbone continue à être assimilé par les cellules. Ces dernières, convertissent le substrat incorporé en acide gras et en triglycérols, qui vont immédiatement être stockés dans les corps lipidiques. Outre l'azote, d'autres nutriments peuvent également être limitants pour la croissance (Beopoulos, 2009). Il peut s'agir, par exemple, du phosphate, du magnésium, du sulfate ou du fer. Néanmoins, ces nutriments sont susceptibles d'affecter des processus métaboliques autres que la biosynthèse de protéines et la production des acides nucléiques. Cela conduit à un taux de croissance moins important. Les organismes non – oléagineux n'accumulent pas autant de lipides. Lors d'une limitation en azote, certains de ces organismes cessent de croître et peuvent accumuler les hydrocarbures disponibles dans le milieu de culture et les convertir en divers polysaccharides (glycogène, glucanes, mannanes). Dans ce dernier cas l'accumulation de lipides peut atteindre 15% de la biomasse (Ratledge, 1994).

### 3.1- Paramètres influençant le processus d'accumulation lipidique

La composition des lipides microbiens est influencée, parfois de façon très importante, par divers paramètres comme la source carbonée, azotée, la vitesse spécifique de croissance, la température d'incubation, l'aération etc. (Yoon et Rhee, 1983 ; Hansson et Dostalek, 1986).

#### 3.1-1. Source carbonée

Comme il a été déjà cité, la nature de la source carbonée utilisée, peut influencer beaucoup la composition des lipides accumulés. De même, plusieurs fois, la quantité et non seulement la composition des lipides peut varier énormément d'un substrat à l'autre (Thorpe et Ratledge, 1972; Choi et *al.*, 1982; Montet et *al.*, 1985).

#### 3.1-2. Source azotée

Elle peut avoir un effet considérable sur la quantité et la composition des lipides microbiens (Hansson et Dostalek, 1986; Davies et Holdsworth, 1992). L'effet de l'asparagine, de L-glutamate et du chlorure d'ammonium en tant que sources azotées, a été étudié chez plusieurs souches de levures oléagineuses (Evans et Ratledge, 1984). Il a été démontré que l'azote organique stimule le processus d'accumulation lipidique. Le résultat le plus marquant a été obtenu avec *Rhodospiridium torulojdes*, dont le contenu lipidique a été augmenté de 18% (w/w) à 51% (w/w) grâce à une source organique azotée. La même observation a été faite par Moreton (1982) (d'après Davies et Holdsworth, 1992).

#### 3.1-3. Température

Le rôle de la température d'incubation peut avoir une importance critique vis à vis de la quantité ainsi que de la composition des lipides accumulés (Hansson et Dostalek, 1986 ; Davies et Holdsworth, 1992 ; Saxena et *al.*, 1998). En général, le fait de diminuer la température favorise la présence d'acides gras insaturés (Ratray et *al.*, 1975). Des études réalisées chez *Candida lipolytica*. Ont montré que la diminution de la température d'incubation de 25°C à 10°C a induit une augmentation du pourcentage de l'acide oléique et linoléique (d'après Davies et Holdsworth, 1992). Chez *Rhodotorula siutinjs*. De même, une augmentation de la température d'incubation a provoqué une diminution du degré d'insaturation et une augmentation de la présence des acides gras saturés à une chaîne aliphatique courte (études sur *Rhodotorula minuta* Saxena et *al.*, 1998).

A l'inverse, selon Davies (1992), des cultures en continu à différentes températures d'incubation de *Apiotrichum curvatum*, n'ont montré que très peu de changements dans la composition des lipides cellulaires.

### 3.1-4. pH

Le pH est un facteur, qui, en général, a peu d'influence tant au niveau composition qu'au niveau vitesse d'accumulation des lipides cellulaires. Des études réalisées avec *Candida 107* dans une large gamme de pH (de 3,5 jusqu'à 7,5) ont montré peu de changements sur la réponse de cette souche à propos de l'accumulation lipidique (vitesse de production et composition) (Ratledge, 1994).

### 3.1-5. Taux d'aération du milieu de la fermentation

Le taux d'aération du milieu de la fermentation, contrairement au pH, a une importance critique vis-à-vis du processus d'accumulation lipidique. (Choi *et al.*, 1982) ont rapporté que le microorganisme aérobic stricte *Rhodotorula gracilis*, cultivé en continu en limitation d'azote, présente une altération significative de son profil lipidique quand la concentration de l'oxygène dissous diminue ; le taux de stéarate et d'oléate augmente, tandis que celui des acides gras polyinsaturés diminue. (Roux *et al.*, 1995) ont montré que la croissance de *Mucor circjnelloides*, à faible concentration d'oxygène dissous, ont provoqué une diminution notable du taux des acides gras polyinsaturés (en l'occurrence de l'acide  $\gamma$ -linoléinique) avec une augmentation simultanée de l'acide stéarique et des triglycérides symétriques SIS. Ceci a abouti à la synthèse d'une huile de composition proche de celle du beurre de cacao. (Papanikolaou, 1998).

### 3.1-6. Nutriments

L'accumulation lipidique chez les levures oléagineuses nécessite une limitation nutritionnelle pour pouvoir être déclenchée. Diverses études avec des limitations en phosphore, zinc, fer ou magnésium ont été réalisées permettant que l'excès de carbone soit dirigé vers l'accumulation de lipides (Granger *et al.*, 1993). Les meilleurs rendements d'accumulation de lipides sont obtenus en réalisant une limitation en azote (Yamauchi *et al.*, 1983). Dans ces conditions, l'augmentation du contenu des acides gras provient de la synthèse des acides gras saturés et mono insaturés (Choi *et al.*, 1982 ; Hansson et Dostalek, 1986). Les nutriments exerçant l'impact le plus important sur la production de métabolites chez les levures oléagineux sont décrits à continuation.



# MATÉRIEL ET METHODE

Le travail suivant a été réalisé dans l'Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaire (INATAA) au sein du laboratoire de biotechnologies et qualités des aliments (BIOQUAL).

En raison du manque de matériel nécessaire et à cause de la pandémie COVID-19 qui nous a empêché de travailler au niveau des laboratoires du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) contenant le matériel nécessaire pour la partie bioréacteur et la reconfirmation de nos résultats avec haute précision, nous nous sommes contentés des résultats obtenus au sein du laboratoire niveau fioles avec le matériel et réactif mis à notre disposition qui malheureusement ne nous a pas permis d'atteindre les objectifs tracés au début.

## 1- Matériel

---

- Bécher de 50ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml.
- Erlenmeyers de 150 ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml.
- Eprouvettes de 5 ml, 250 ml et 1000 ml.
- Flacons 150, 250, 500ml.
- Tubes d'essais en verre.
- Verre de montre.
- Lames.
- Lamelles.
- Cellule de thoma.
- Pipette pasteur.
- Pipette graduée.
- Entonnoir.
- Etuve : régler à 30 C° qui est la température optimale pour la croissance de la levure *Yarrowia Lipolytica*.

- Cocotte à pression (Qui remplace l'Autoclave) : à 180C° ou plus pour la stérilisation de la verrerie, milieu de culture.
- Balance analytique : Pour mesurer une petite masse avec une grande précision de 0,0001g (0,1 mg), muni d'un pare-vent.
- Balance de précision : pour peser les enchantions équipé d'un afficheur LCD d'une précision 0.01 g
- Agitateur électrique : pour mélanger les enchantions et obtenir des milieux homogènes.
- Microscope optique binoculaire.
- PH mètre.
- Congélateur réglé a -35 C°.
- Bec benzènes.
- Micropipettes.
- Ance de platine.
- Ruban adhésive.
- Papier aluminium.
- Papier cellophane.
- Coton cardée.
- Boite de pétrie.
- Cryotube.
- Barreau magnétique.
- Spatule, Pissette.
- Huile d'immersion.
- Peptone de caséine.

- Glucose.
- Margine.
- Huile usée.
- Extrait de levure.
- T-win80.
- Alcool ethylique a 90°
- Agar-Agar.
- L'eau physiologique.
- Noir soudan.
- Solutions tampons.
- Xylène
- Fuchsine
- Phénol
- Éthanol à 70°

## 2- Matériel biologique

---

La souche utilisée lors de ces manipulations est *Yarrowia lipolytica* JMY 775 hyper productrice de lipase, hyper accumulatrice des lipides, modifiés génétiquement (Bouchedja., *et al* 2017)

## 3- Milieux et conditions de culture

---

### 3.1- Milieu de conservation

La souche est conservée dans des cryotubes à -35C° sur milieu YPD après l'ajout de glycérol pur stérile, la composition du milieu de conservation est comme suite :

**Tableau 4.** Composition de milieu de culture YPD

Réactifs	Concentration [g/L]
Extrait de levure	5
Peptone de caséine	10
Glucose	15

**YPD:** Yeast Extract-**P**eptone-**D**extrose.

### 3.2- Milieu d'activation

Quelques gouttes provenant du cryotube de conservation de la levure *Yarrowia lipolytica* est étalé sur boîte de pétrie contenant le milieu de culture YPDA stérilisé préalablement lors de sa préparation, pour les incuber finalement dans une étuve à une température de 30C° pendant 48h afin de les utiliser dans les étapes qui suivent de la préculture, la composition du milieu de culture YPDA est la suivante :

**Tableau 5.** Composition de milieu de culture YPDA

Réactifs	Concentration [g/L]
Extrait de levure	5
Peptone de caséine	20
Glucose	15
Agar-agar	18

**YPDA:** Yeast Extract-**P**eptone-**D**extrose-**A**gar agar.

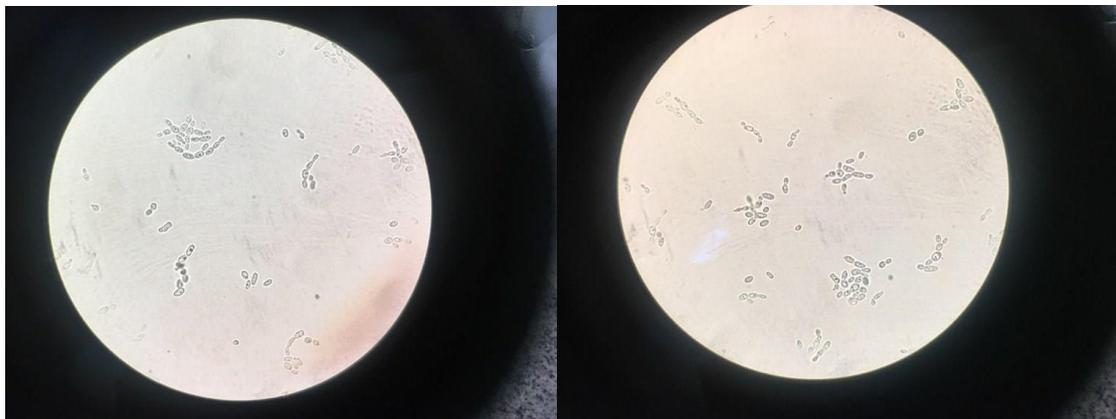
**Figure 7.** Levure *Yarrowia lipolytica* cultivée sur boîte de pétrie

## 3.3- Milieu de préculture

Un échantillon est pris à partir des boîtes de pétrie d'activation de la souche déjà incubé dans des conditions stériles, pour l'observation sur lame sous microscope avec grandissement x10 puis x40 pour avoir une image globale sur les cellules de la levure et enfin x100 à l'aide d'huile d'immersion pour les distinguer et afin de voir les résultats d'activation de la souche.

La pré-culture se fait par ensemencement de la levure dans 250 ml du milieu de culture YPD dans deux Erlenmeyer de 500 ml à partir des colonies de levures isolée des boîtes de pétries.

Les Erlenmeyer étaient bien fermé par du coton cardé et homogénéiser pour les incubé à une température optimale de 30C° durant 24h.



**Figure 8.** Observation microscopique de la pré-culture des cellules de la levure *Yarrowia lipolytica* après 24h

## 3.4- Milieux de cultures YPDM et YPDHu

Deux milieux de cultures ont été testés lors de l'étude à savoir l'YPDM et l'YPDHu qui ont été utilisé pour mesurer et comparé le potentiel d'accumulation *ex novo*, le produit de valeur et sa quantité eu à partir de l'accumulation de la levure *Yarrowia lipolytica*,

Pour la culture cellulaire une concentration de  $0,2 \times 10^8$  C prélever de la préculture et bien homogénéisé dans 50ml du milieu dans deux erlenmeyers de 250ml et dans 400ml du milieu de culture dans deux autres erlenmeyers de 1000ml pour chaque milieu.

L'incubation des cultures dans ces milieux a été faite dans l'étuve à une température optimale de 30 C° avec une prise des mesures de pH et de concentration cellulaire dans les milieux aux différents temps 0,24,48,72 h pour tracer l'évolution de la levure.

La composition des milieux YPDM et YPDHu est comme suite :

**Tableau 6.** Composition des milieux de cultures YPDM et YPDHu

Réactifs	Concentration [g/L] et Volume [ml]	Concentration [g/L] et Volume [ml]
	YPDM	YPDHu
Extrait de levure	5 g/L	5g/L
Peptone de caséine	10 g/L	5g/L
Glucose	10g/L	10g/L
Tween	1,0ml	1,0ml
Margine	22ml	-
Huile usée	-	22ml

**YPDM:** Yeast Extract-Peptone-Dextrose-Margine

**YPDHu:** Yeast Extract-Peptone-Dextrose-Margine- Huile usée.

#### 4- Techniques analytiques :

---

##### 4.1- Croissance

L'étude de la croissance s'est faite à partir des observations microscopiques sur lame normale et sur lame de comptage de type Thoma pour avoir une idée sur l'évolution du nombre des cellules de levure donc sa croissance.

##### 4.2- Activité cellulaire

L'activité cellulaire de la levure est suivie par la mesure des variations du pH aux différents temps de prélèvements qui indique la présence des activités enzymatiques responsables de la dégradation des substrats présents dans le milieu.

##### 4.3- Accumulation lipidique

L'usage du colorant Noir soudan B a permis l'observation de l'accumulation intracellulaire des lipides chez la levure *Yarrowia lipolytica*

##### 4.3-1. Coloration par le Noir soudan :

Le Noir de Soudan est un colorant très employé en microscopie optique. Il permet de mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des microorganismes.

Après avoir préparé les frottis, les lames ont été séchées à une température ambiante, puis quelques gouttes du colorant noir de soudan B (Annexe 3) ont été déposées pendant 10

minutes. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de xylène pendant 10 secondes ce qui mène à une décoloration complète.

La contre coloration est effectuée à la solution en fuchsine (Annexe 4) pendant 15 secondes. Les lames enfin subissent un lavage à l'eau courante puis égouttées sur papier absorbant. Les cellules colorées sont observées à l'objectif x 100 à l'aide de l'huile d'immersion (Ravikumar et *al.*, 2012).

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie nous allons exposer les résultats obtenus lors de l'étude menée sur la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*. Dans le but est de mettre la lumière sur le potentiel de la levure en question, quant à capacité croître sur des milieux lipidiques issus des déchets de l'industrie oléagineuse ou de la restauration, dans le but de valoriser ces produits.

Afin de suivre la croissance cellulaire dans des différents milieux lipidiques en est effectuait des cultures dans des conditions connues, nous voulons observer le potentiel que possède à la levure à croître sur des milieux polluants et confirme le pouvoir antimicrobien des margines et des huiles usées. Nous nous intéressons à l'évolution cinétique de la biomasse, l'observation microscopique afin d'observer l'aspect des cellules. Nous faisons chacun vingt quatre heures deux comptages des cellules sur la cellule de thomas.

L'observation microscopique des milieux des cultures YPDM, YPDHu a permis de voir la structure et le dimorphisme des cellules pendant les différentes étapes de la croissance, les résultats sont présentés dans la figure 9.

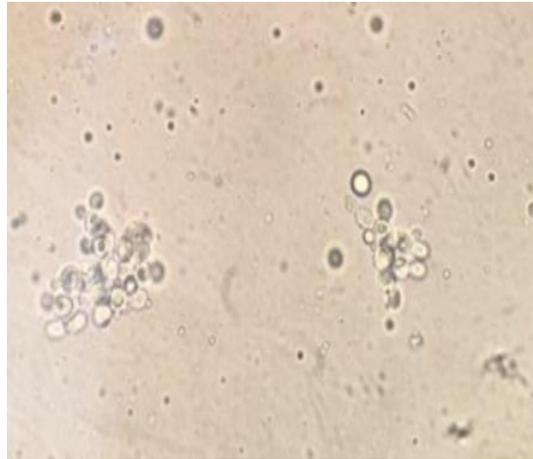
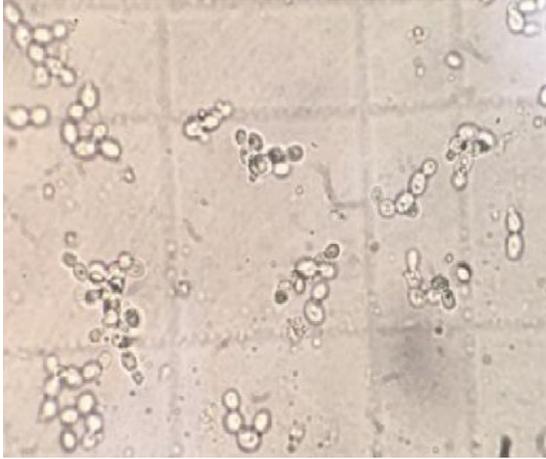
1- Résultats d'observation microscopique

---

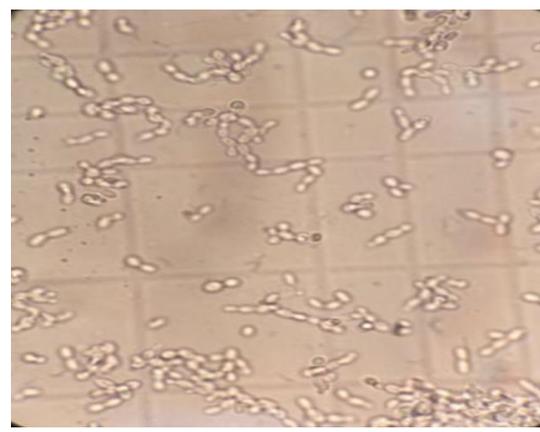
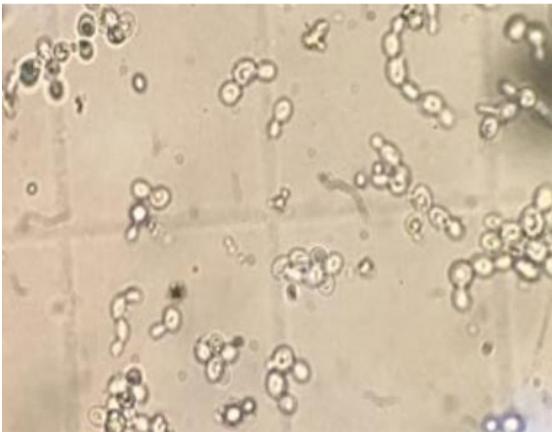
YPDM

YPDHu

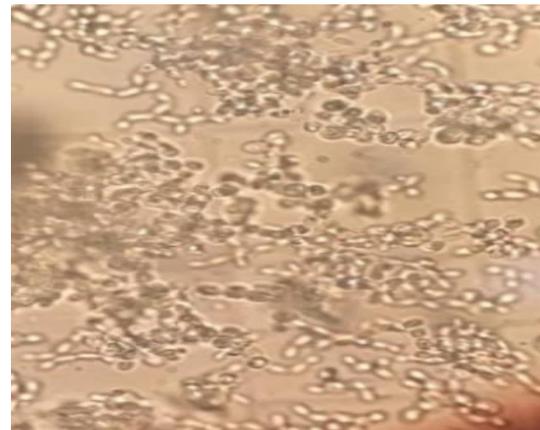
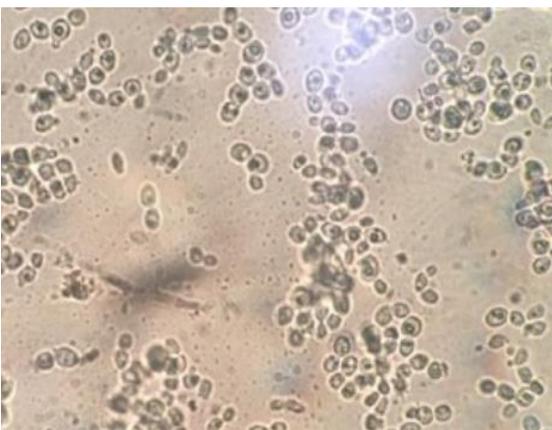
A



B



C



**Figure 9 .** image microscopique ( $\times 100$ ) montrant la croissance cellulaire à 24 h (A), 48h (B) et a 72h (C) de la souche *Y. Lipolytica* JMY775 cultivée dans déférant milieu YPDM, YPDHu.

## 2- Morphologie et dimorphisme des cellules

L'observation microscopique a permis de voir en plus de la croissance, la morphologie cellulaire de la levure dans les deux milieux de cultures (YPDM, YPDHu).

Concernant la morphologie des cellules nous observons des différentes formes des cellules pendant le développement. Soit ronds ou filamenteuse ou que les deux formes coexistent dans les milieux de culture à différentes périodes qui sont considérées comme les principales formes de la levure *Y. lipolytica* dans les conditions normales.

**Tableau 7.** Forme des cellules pendant la croissance.

- absence de la forme + Petite concentration, ++ constatation moyenne, +++ très grande constatation.

Milieu de culture	Ordre chronologique	Forme des cellules	
		Rondes	Ovoïde (Filamenteuse)
YPDM	24h	++	-
	48h	+	++
	72h	+	+
YPDHu	24h	++	-
	48h	-	+++
	72h	+	+++

Dans les premiers 24 h au début de la phase de croissance les cellules étaient en situation transitionnelle, et des tailles petites devenaient plus volumineuses au bout de 48h.

Selon le tableau 7 qui indique l'évolution du dimorphisme cellulaire pendant la culture on peut constater qu'on a deux formes principales : la forme ovoïde et la forme ronde. La morphologie de *Yarrowia lipolytica* est déterminée par des conditions environnementales telles que la source azotée, la source carbonée, le pH, la température, ainsi que par la génétique de la souche mais ces conditions peuvent varier en milieu liquide ou solide.

Dans ce cas les facteurs principaux qui influencent la forme des cellules sont :

- Le changement de pH qui est considéré comme le facteur le plus important parce qu'il diminue pendant toute l'expérience dans les deux milieux. Szabo et Stofanikova (Szabo et Stofanikova, 2002) ont montré que le pH régule la morphologie de manière indirecte en

modulant la disponibilité des sources azotées critiques à la formation et à la maintenance des hyphes.

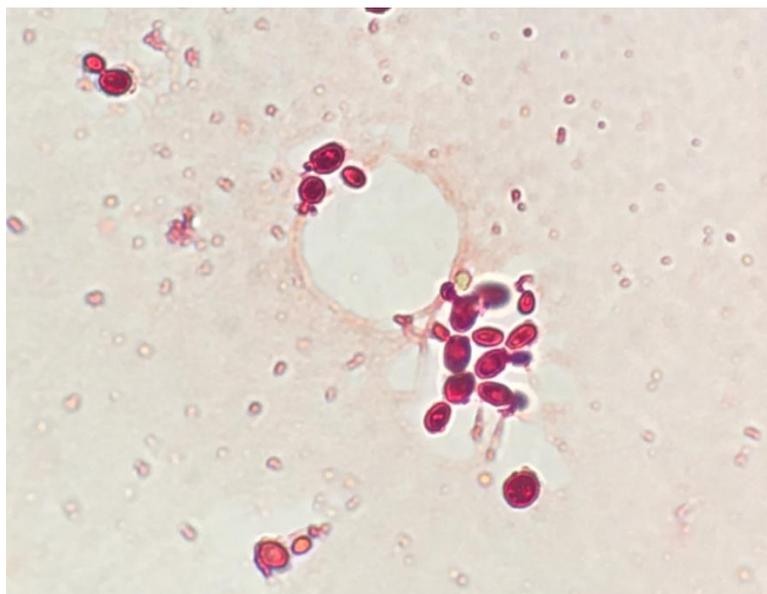
- La composition de milieu, elle agit directement sur les voies d'accumulation et le métabolisme des cellules donc sur sa forme. Les substrats plus importants sont la source d'azote et la source de carbone.

*Yarrowia lipolytica*, étant une levure aérobique stricte, n'est pas capable de croître dans des conditions anoxiques ou anaérobies. Des conditions semi-anoxiques entraînent une formation d'hyphes forme ovoïde, alors que nous travaillons dans des fioles la concentration d'oxygène diminue avec le temps.

Les résultats de Ruiz-Herrera et Sentandreu 2002 qui ont travaillé sur le dimorphisme cellulaire de *Yarrowia lipolytica* (tableaux 8) confirme nos résultats sur les causes principaux de dimorphisme cellulaire de *Y. Lipolytica*, le pH et la source d'azote.

**Tableau 8 .** Impact de la nature de la source azotée sur la morphologie de *Y. lipolytica*. D'après Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002.

Source azotée	pH final	Masse sèche (mg.mL <sup>-1</sup> )	Morphologie % Ronde	Morphologie % Mycélium
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,07	1,15	38	62
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,45	1,90	10	90
NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	7,12	1,90	93	7
KNO <sub>3</sub>	7,09	-	-	-
Glutamate	7,31	0,75	100	0
Glutamine	6,55	2,55	100	0



**Figure 10 .** Observation microscopique ( $\times 100$ ) de *Y. Lipolytica* après 48 de croissance sur milieu YPDM sous une coloration de noir soudan.

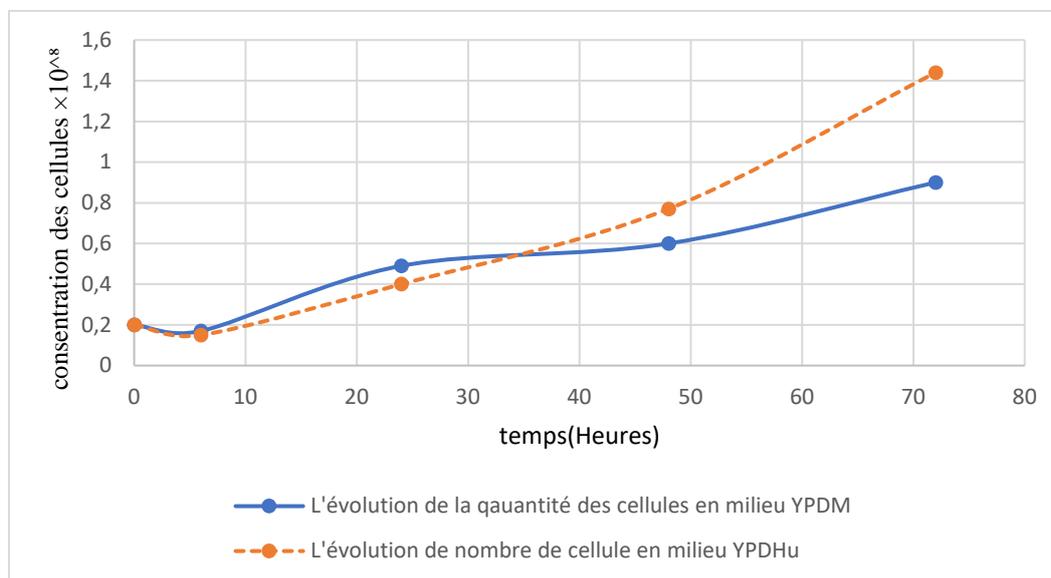
On peut aussi observer par microscope optique que les cellules subissent une forte agrégation et ont une tendance à s'agglomérer autour des gouttelettes d'huile dans les deux milieux (Figure 10). Les cellules forment des amas autour des gouttelettes lipidiques ce contact entre la paroi cellulaire de la levure et les gouttelettes lipidiques est due aux glycoprotéines présentes sur la paroi cellulaire, qui permettent l'adhésion des substrats hydrophobe. (Aguedo *et al.*, 2003).

Les deux milieux contiennent une matière grasse complexe et simple donc les triglycérides doivent d'abord être hydrolysés par l'action de la lipase extracellulaire (figure 10). *Y. Lipolytica* présente la particularité de synthétiser un biosurfactant (liposan) qui facilite cette étape (Kar *et al.*, 2005 et Beopoulos, 2009) affirment également qu'il semblerait que *Y. Lipolytica* consommait de préférence les C18 :1, C18 :2, C18 :3, C16 et C18 consommé dans une moindre mesure.

Les surfactants réduisent la taille des gouttelettes en augmentant ainsi la surface du contact entre la cellule et le substrat (Mlickova *et al.*, 2004). Elle sécrète de plus un émulsifiant extracellulaire, le liposan, et une lipase extracellulaire, Lip2p, permettant l'hydrolyse des TAG. Progressivement plusieurs petites gouttelettes se forment, facilitant le transport indirect par la surface. Alternativement, les alcanes peuvent être attachés à des protrusions formées à la surface de la cellule et puis migrant vers le réticulum endoplasmique via la membrane plasmique par transport direct d'interface.

## 3- Croissance cellulaire de la levure *Y. lipolytica*

Afin de confirmer la croissance en plus de l'observation macroscopique nous avons mesuré la croissance cellulaire par comptage sur les cellules de thomas (figures 12).



**Figure 11.** croissance cellulaire de *Y. lipolytica* JMY775 cultivée en fiole dans les milieux (YPDM, YPDHu)

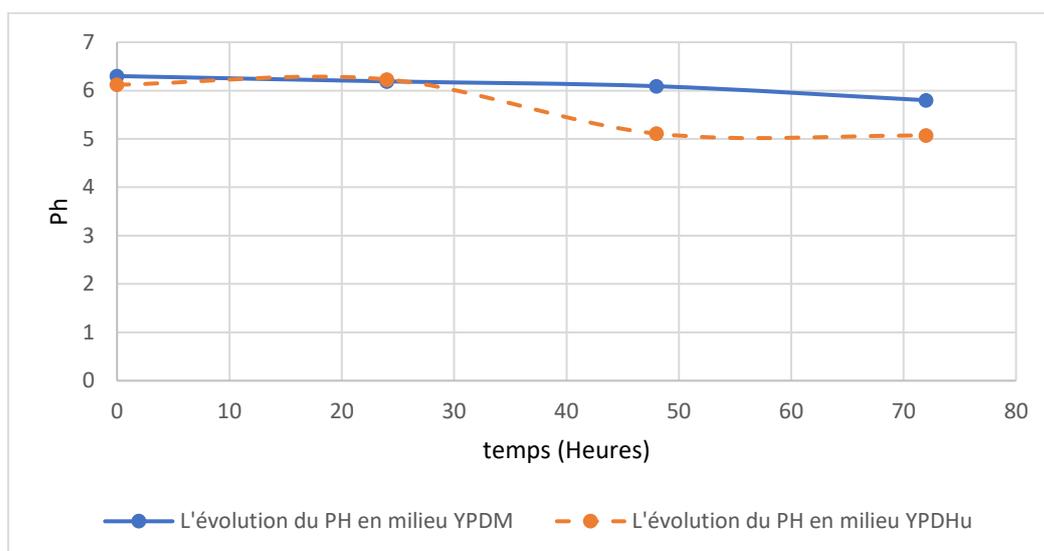
Les résultats montrent que quel que soit le milieu de culture, les cellules semblent avoir une croissance normale. Néanmoins, les vitesses et les taux de croissance semblent différer en fonction des milieux de culture. Ainsi la croissance cellulaire dans le milieu YPDHu est plus rapide que dans le milieu YPDM (figure 11) et le nombre des cellules (concentration cellulaire) dans le milieu YPDHu  $0,9 \times 10^8$  et plus grand que dans le milieu YPDM  $1,44 \times 10^8$ . Quant au taux de croissance il est significativement différent entre les deux milieux. Ces deux derniers subissent une accumulation des acides gras différents (figure 13).

La courbe de croissance permet d'observer deux phases : une phase de latence qui représente le temps nécessaire à la levure pour synthétiser les enzymes adaptés au substrat quel que soit le substrat, soit une source de carbone qui est incorporée directement à la cellule ou des substrats lipidiques forment des émulsions et la taille des gouttelettes est réduite par le liposane sécrété, durant cette phase la croissance diminue légèrement jusqu'après 6h de temps donc c'est une phase d'adaptation avec le substrat. Après une phase exponentielle la croissance atteint une valeur maximale dans les 72 heures  $0,9 \times 10^8$  cellules pour le milieu YPDM et  $1,44 \times 10^8$  pour le milieu YPDHu.

Si on compare ces résultats avec (Beopoulos, 2009) et (Cescute, 2009) qui ont travaillé sur les différents milieux hydrophobes on peut remarquer que le passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire de la croissance dans les recherches précédentes c'est environ 24 heures de culture quelle que soit la source de carbone mais dans notre étude la durée de la phase exponentielle est allongée jusqu'à 72 heures par contre dans les autres milieux la phase exponentielle prend fin dans les 48 heures .

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les composants des milieux de culture ont un rôle principal dans l'augmentation de la durée de vie des cellules et le taux d'accumulation. Que ce soit les concentrations très élevées des antioxydants dans les deux milieux soient naturels comme dans le margine principalement les tocophérols et les composés phénoliques (polyphénol) qui ont une action inhibitrice sur les radicaux libres et l'oxydation rapide des cellules (Aggoun-Arhab, 2016). Cependant dans les huiles usées il existe des antioxydants naturels tels que les alphas tocophérols, les caroténoïdes, les composés phénoliques, et les stérols. Les tocophérols ne sont généralement pas efficaces comme antioxydants à des températures élevées, en plus ils ont des additifs alimentaires y pu être ajoutés avec des antioxydants synthétiques tels que le BHA (Hydroxy anisole butylé), BHT (Hydroxytoluène butylé) et TBHQ (Butylhydroquinone tertiaire). (CHAHBI, 2016).

#### 4- Concentration en pH

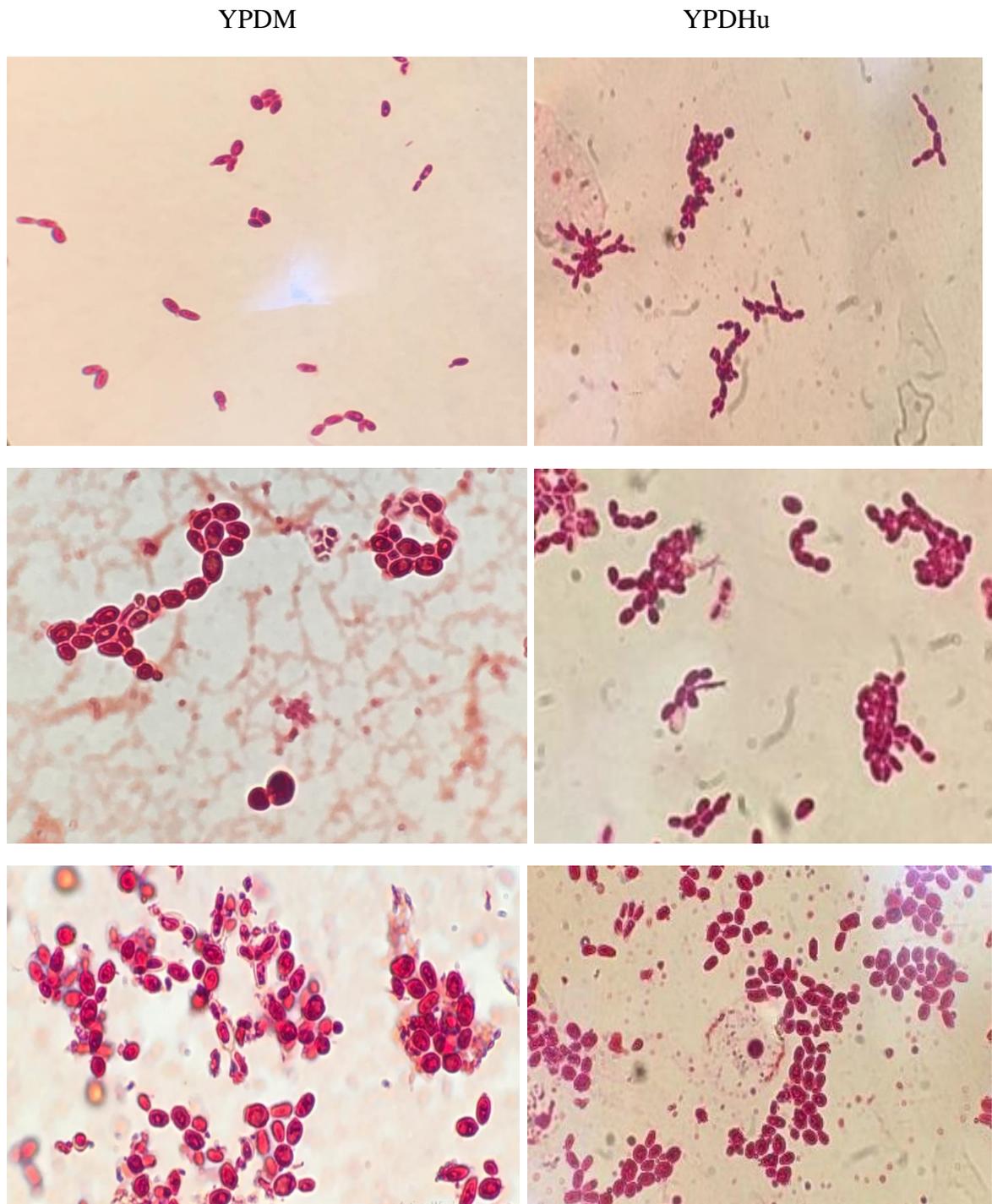


**Figure 12.** variation du pH des milieux de culture (YPDM, YPDHu), lors d'une culture en fiole de la levure *Y. Lipolytica* JMY775 a 30°C.

Concernant les résultats de mesure du pH des milieux de culture, nous avons remarqué que le pH des milieux Margine et l'huile usée augmente légèrement dans les premières heures, On peut mettre une hypothèse pour expliquer ces résultats, c'est l'assimilation des acides contenu dans le milieu comme l'acide oléique, linoléique, stéarique, palmitique. L'assimilation des acides et le transport vers l'intérieur des cellules vont augmenter légèrement le pH. (Figure 12).

Après 24 heures le pH diminue continuellement tout au long de la culture mais plus rapidement en milieu des huiles usées. Après 24h et jusque 72h le pH diminue pour atteindre une valeur de 5,07 pour le margine et 6,8 pour l'huile usée, cette diminution est due à l'accumulation des différents acides gras contenu dans le milieu et la sécrétion des métabolites secondaires comme le citrate. À savoir que la diminution du pH est un indicateur important de la production d'acide acétique par la levure.

5- Accumulation des lipides



**Figure 13 .** Observation microscopique ( $\times 100$ ) de l'accumulation lipidique intracellulaire Du milieu YPDM, YPDHu après 24H (A),48H(B),72h(C) de mise en culture avec une coloration avec le noir soudan

Les images de la figure 13 montrant une présence remarquable des lipides à l'intérieur des cellules (couleur violet foncé), pendant les trois prélèvements 24H, 48H et 72H. La diminution du pH confirme le transport des acides à l'intérieur des cellules et la sécrétion de citrate, ce qui explique qu'on est dans le cas d'une accumulation de type *ex novo* lors de la culture dans ces deux milieux.

L'accumulation des lipides dépend principalement de la physiologie du micro-organisme, de la limitation en nutriments et des conditions environnementales ou de culture contre la température et le pH. Elle est également effectuée par la production de métabolisme secondaire tel que le citrate et l'éthanol. Le passage de l'état de croissance à celui de l'accumulation de lipides se produit généralement lorsque l'excès de carbone sous forme des substrats hydrophobes dans le milieu est associé à une limitation en nutriments avec la production de biomasse.

Dans des conditions d'accès de carbone et de limitation en élément nutritif *Y. lipolytica* produit de grandes quantités de produits intermédiaires du cycle TCA. Comme l'acide citrique, l'acide iso-citrique, l'acide 2-cetoglutarique et de l'acide pyruvique (Fickers *et al.*, 2005).

Pour les substrats osidiques et l'éthanol, l'influence de la source de carbone sur le profil des acides gras est minime. Cependant, lors de l'utilisation de substrats tels que les n-alcanes ou un mélange d'acides gras ou d'esters d'acides gras (Annex 1 composition de margine), le spectre des acides gras peut être totalement modifié. (Cescut, 2009).

Les substrats composés d'acides gras influent sur les longueurs des chaînes aliphatiques accumulées. Il existe une sélectivité de consommation de *Y. lipolytica* vis-à-vis des acides gras présents dans le milieu. Ainsi, en présence d'un mélange d'acides gras (Cescut, 2009), les premiers acides consommés sont dans l'ordre : l'acide myristique, l'acide laurique puis l'acide palmitique et finalement l'acide stéarique.

Sur ce mélange de substrats, le profil en acides gras accumulés s'enrichit en acide stéarique. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les bisphénols des margines exercent des activités à fort potentiel biologique, incluant mais n'ont pas limitées à des actions antioxydantes et piègeurs de radicaux libres.

### 6- Pouvoir antibactérien des milieux de culture

En plus nous remarquons que dans toutes les cultures effectuées (plus de 20 cultures) on n'a eu aucune contamination ceci est à cause de pouvoir antimicrobien des margines qui est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns catéchol-mélaninique (Hamdi et Ellouz, 1993) annexe 2. Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli, 1991).



# CONCLUSION ET PRESPECTIVES

Ce mémoire avait pour ambition d'étudier la levure *Yarrowia lipolytica* comme un modèle d'accumulation, transformation et production de biodiesel à partir des huiles usées et margine.

Cette étude se résume dans les points qui suivent :

- étude de la croissance cellulaire.
- étude de l'accumulation.
- l'extraction des métabolites produits à savoir lipides accumulés

Le travail dans le laboratoire au niveau des fioles a permis d'étudier plusieurs aspects de la levure, dont on cite :

- L'étude de dimorphisme qui nous a permis de démontrer que cette propriété confère à la souche la capacité de s'adapter en changeant la surface cellulaire intentionnellement donc sa forme afin d'améliorer l'adhésion cellule substrat ce qui lui permet d'utiliser une panoplie de composants hydrophobes et s'adapter aux conditions de cultures.
- L'observation de la croissance de la souche qui nous indique que cette dernière a une croissance normale dans les deux milieux de cultures YPDM et YPDHu contenant des substrats hydrophobes comme source principale de carbone.
- Et l'étude de la croissance qui démontre que la souche possède un remarquable potentiel d'accumulation de lipides dans des milieux hydrophobes du type *ex novo* intracellulaire.

Ainsi ses résultats d'études et observations qualifient la souche *Yarrowia Lipolytica* JMY 755 comme une très bonne souche accumulatrice des lipides qui est un critère très important pour la transformation et la valorisation à partir des milieux hydrophobes.

Ce travail de mémoire se voulait principalement à l'étude du processus de valorisation des substrats hydrophobes contenu dans les margines et huile usée selon la méthode de travail déjà établi.

Mais malheureusement certain de ces taches qui nous permette d'atteindre l'objectif final du travail n'ont pas été achevé vu la pandémie qu'a subie le monde, cependant les études au niveau fiole en démontrer des résultats prometteurs sur la possibilité d'utiliser *Yarrowia Lipolytica* comme un microorganisme de valorisation des déchets et production de métabolites à valeurs.

Il serait pertinent de procéder à des études plus profondes pour l'extraction des métabolites produits et l'identification de ses derniers afin de confirmer et optimiser la production de biodiesel à partir de l'accumulation des lipides des milieux de margine et huile usée dans de prochaines études, vu l'importance de ce produit de valeur qui a un impact économique et environnementale important dans notre vie quotidienne.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

### A

- Aggoun-Arhab, M. (2016). Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière (Doctoral dissertation, Doctorate thesis. Institut National de l'Alimentation et des Technologies AgroAlimentaire (INATAA), Constantine, Algeria).
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., & Belin, J. M. (2003). Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 258-265.
- Alvarez, H. M., O.H. Pucci, O.H., Steinbüchel, A. (1997). "Lipid storage compounds in marine bacteria." *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 132–139.

### B

- Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, et al. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol*, Vol:173; P: 2250–5.
- Barth, G.; Gaillardin, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbio/. Rev.* 1997,19,219-237
- Beopoulos.A, (2009). INGENIERIE GENETIQUE DE LA LEVURE OLEAGINEUSE *YARROWIA LIPOLYTICA* POUR LA PRODUCTION DE LIPIDES ; P :29-30-154.
- Beopoulos, A. (2009). Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides (Doctoral dissertation).
- Bigey F, Tuery K, Bougard D, et al. (2003). Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast* 20 ; P:233–48.
- Brown, A. C., Knights, B. A., & Conway, E. (1969). Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 8(3), 543-547.
- Bouchedja, D. N., Danthine, S., Kar, T., Fickers, P., Boudjellal, A., & Delvigne, F. (2017). Online flow cytometry, an interesting investigation process for monitoring lipid accumulation, dimorphism, and cells' growth in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* JMY 775. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 3.
- Boulton, C. A. and C. Ratledge (1981). "Correlation Of Lipid-Accumulation In Yeasts With Possession Of Atp-Citrate Lyase." *Journal Of General Microbiology* 127(NOV): 169-176,

### C

- Cadoret, J. P., & Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, 202(3) ; P : 01.

- Cescut, J. (2009). Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés (Doctoral dissertation, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse).
- CESCUT.J, (2009), Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés ; P :07.
- CHAHBI Meryeme (2016) Formulation d'une huile spéciale friture à base d'un mélange de trois huiles à l'aide des plans de mélange
- Choi, S. Y.; Ryu, D.Y.; Rhee, J.S. Production of microbial lipid. effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotec/uw/. Bioeng.* 1982,14, 1165-1172

### D

- Daâssi, D., Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Belbahri, L., Woodward, S., Zouari-Mechichi, H., ... & Segura-Carretero, A. (2014). Olive oil mill wastewaters: phenolic content characterization during degradation by *Corioloropsis gallica*. *Chemosphere*, 113, 62-70.
- Daum, G., N. D. Lees, M. Bard and R. Dickson (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1471-510.
- Davies, J.; Holdsworth, J. Synthesis of lipids in yeasts, biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res.* 1992, 1, 119-159.
- Davies, R. J. (1988). Single cell oil Moreton RS; P: 99-143.
- Davies, R. J., J. E. Holdsworth, et al. (1990). The Effect of Low Oxygen-Uptake Rate on The Fatty-Acid Profile of The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 33; P: 569-573.

### E

- Evans, C.T.; Ratledge, C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 1984, 130, 1693-1704

### F

- Feofilova, E. P., Y. E. Sergeeva and A. A. Ivashechkin (2010) Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review), *Applied Biochemistry And Microbiology* 46 (4), 369-378
- Fickers.P, P.-H. Benetti, Y. Waché, A. Marty, S. Mauersberger, M.S. Smit, J.-M. Nicaud, (2005), Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications, *FEMS Yeast Research*, Vol: 05; P: 528-535.

- Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5(6-7), 527-543.

### G

- Granger, L. M., P. Perlot, G. Goma and A. Pareilleux (1993) Effect of Various Nutrient Limitations On Fatty-Acid Production By *Rhodotorula-Glutinis*, *Applied Microbiology And Biotechnology* 38 (6), 784-789.
- Guiraud. J, P. (1998). *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques.* Ed. DUNOD. Paris : 163 -505. Noir Soudan

### H

- Hamdi M. & Ellouz P. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environ. Technol.*, 14, 183-188
- Hansson, L. and M. Dostalek (1986) Effect Of Culture Conditions On Fatty-Acid Composition In Lipids Produced By The Yeast *Cryptococcus-Albidus* Var *Albidus*, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 63 (9), 1179-1184.
- Hansson, L.; Dostalek, M.; Sorenby, B. Production of  $\gamma$ -linolenic acid dy the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous cultureAppt. *Microbiol. Biotechnol.* 1989,31, 223-227
- Holzschu DL, Chandler FW, Ajello L, Ahearn, DG (1979) Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia* 17: 71-78

### K

- Kar, S & Koley, R. (2005). Scalar kinks and fermion localization in warped spacetimes. *Classical and Quantum Gravity*, 22(4), 753.
- Knutsen AK, Robert V, Poot GA, et al. (2007). Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol: 57; P :2426–2435.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. (1994). Orders and families of ascosporogenous yeasts and yeast-like taxa compared from ribosomal RNA sequence similarities. In: Hawksworth DL, ed. *Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties.* New York: Plenum Press; P:249–58.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. (1995). Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeastlike taxa. *Can J Bot*, Vol: 73; P: S824–S830.

- Kurtzman CP, Robnett CJ. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol: 73; P: 331–371.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

### L

- Li, Q., W. Du and D. H. Liu (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (5), 749-756

### M

- Meyer, K.H.; Schweizer E. Control of fatty acid synthetase levels by exogenous longchain fatty acids in the yeasts *Candida lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 1976, 65, 317-324
- Mlickova, K., E. Roux, K. Athenstaedt, S. d'Andrea, G. Daum, T. Chardot and J. M. Nicaud (2004). Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3918-24.
- Montet, D.; Ratomahenina, R.; Galzy, P.; Pina, M.; Graille, J. A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in *Candida lipolytica* DIDDENS and LODDER. *Biotechnol. lett.* 1985, 7, 733-736

### N

- Najar.A, (2010), Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive ; P : 07.

### O

- Ochoa Estopier.A , (2012), Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel ; P :03,04.
- Ochoa Estopier, A. (2012). Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel : application aux bascules du métabolisme lipidique chez *Yarrowia lipolytica* (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).
- Osiewacz.H.D, (2002), *Molecular Biology of Fungal Development*, CRC Press, Vol:15 Mycology series ; P:01

### P

- PAPANIKOLAOU.S, ETUDE DU COMPORTEMENT PHYSIOLOGIQUE D'UNE SOUCHE DE *Yarrowia lipolytica* EN CROISSANCE SUR DES CO-PRODUITS INDUSTRIELS : PRODUCTION ORIENTEE DES LIPIDES CELLULAIRES, (1998) ; P :4.

- Papanikolaou, S. (1998). Étude du comportement physiologique d'une souche de *Yarrowia lipolytica* en croissance sur des co-produits industriels : production orientée de lipides cellulaires (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine)

### R

- Ranalli A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 39, 26-40.
  - Ratledge, C. (1982). "Single Cell Oil." *Enzyme And Microbial Technology* 4(1): 58-60,
  - Ratledge, C. (1987). "Lipid Biotechnology – A Wonderland For The Microbial Physiologist." *Journal Of The American Oil Chemists Society* 64(12); P: 1652-1647
  - Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. Technological advances in improved and alternative sources of lipids. S. Kamel, Kakuda, Y. London, Blackie academic and professional; P: 239.
  - Rattray, J.; Schibeci, A.; IGdby, D. Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews* 1975,39, 197-231
  - Ravikumar, K., Dakshayini, J., Girisha, S.T. (2012). Biodiesel production from oleaginous fungi. *international journal of life sciences*. Volume 6, Issue 1. Noir soudan
  - Roux, M.P.; Kock, J.L.F.; du Preez, J.C.; Botha, A. The influence of dissolved oxygen tension on the production of cocoa butter equivalents and gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides*. *System. Appt. Microbiol.* 1995, 18, 329-334
- Rolph, C. E., Moreton, R. S., Harwood, J. L. (1989). "Acyl Lipid-Metabolism In The Oleaginous Yeast *Rhodotorula-Gracilis* (Cbs-3043)." *Lipids* 24(8): 715-720

### S

- Saxena, V.; Sharma, C.D.; Bhagat, S.D.; Saini, V.S.; Adhikari, D.K. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. 1. *Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 501-505
- Steinbuchel, A. et B. Fuchtenbusch (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trends In Biotechnology* 16 (10), 419-427
- Suzuki M, Suh SO, Sugita T, Nakase T. (1999). A phylogenetic study on galactose-containing *Candida* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *J Gen Appl Microbiol*, Vol: 45; P:229–38

### T

- Thorpe, R.F.; Ratledge, C. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose and n-alkanes. *J. Gen. Microbiol.* 1972, 75, 151-163

### W

- Wickerha.Lj, C. P. Kurtzman and A. I. Herman (1970) SEXUAL REPRODUCTION IN CANDIDA LIPOLYTICA
- Wolf.K, (2012), Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Springer Science & Business Media; P: 313-314-316-318.

### Y

- Yamada Y, Nojiri M, Matsuyama M, Kondo K. (1976). Coenzyme Q systems in the classification of the ascosporegenous yeast genera Debaryomyces, Saccharomyces, Kluyveromyces and Endomycopsis. J Gen Appl Microbiol 22; P:325–37.
- Yarrow, D. (1972) 4 New Combinations in Yeasts, Antonie Van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology And Serology
  - Yoon, S.H.; Rhee, J.S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of Rhodotorula glutinis. J. Am. Oil Chem. Soc.1983,60,1281-1286.



# ANNEXES

## Annex 1 : composition de margine

Les margines sont des sous-produits de la production d'huile d'olives obtenus lors de leur Trituration au cours des procédés de centrifugation à 3 phases ou de presse. Cet effluent liquide, Caractérisé par une intense couleur brun-violet ou brun-rouge à noir et une odeur de l'huile D'olive (Daassi et *al.*, 2014) est composé des eaux de végétation du fruit de l'olivier, des eaux du process (lavage et traitement) et une portion de la pulpe et de l'huile résiduelle (Lanciotti et *al.*,2005).

**Tableaux 1** . Composition chimique typique générale des margines algérien

Paramètres/ Unités	Valeurs		
	Moyennes ± écarts types	Minimales	Maximales
Ni (mg/l)	21,05 ± 74,83	0,1	184
P (mg/l)	253,13 ± 301,59	30	940
Pb (mg/l)	2,01 ± 3,65	0	7,8
Se (µg/l)	< 0,16	-	-
Phosphates (mg/l)	664 ± 455,12	320	1330
Sulphates (mg/l)	877,24 ± 937,28	174,48	1500
Sulfures (mg/l)	Absent	-	-
Zn (mg/l)	6,76 ± 7,58	24	2,01
Phénols totaux (mg/l)	5528,17 ± 2334,24	6650	215
Flavonoïdes (mg/l), dont	6670	-	-
Flavonols (mg/l)	70	-	-
<i>o</i> -diphénols (mg/l)	5070 ± 3442,83	1200	9200
Sucres totaux (mg/l)	12714 ± 11824	370	41650
Sucres réducteurs (mg/l)	22400 ± 11798	120	36300
Arabinose (mg/l)	62,5 ± 63,64	30	130
Glucose (mg/l)	2880 ± 5210	765	12000
Mannitol (mg/l)	40 ± 28,28	30	70
Xylose (mg/l)	550 ± 113	510	670
Protéines totales (g/l)	1,62 ± 0,52	0,99	2,6
MG (g/l)	6,02 ± 5,73	0,0015	21
Azote totale (mg/l)	1018 ± 620	25,4	2900
Ammoniaque (mg/l)	2356 ± 3740	170	7950
Nitrates (mg/l)	96 ± 145	0,4	332,47
Nitrites (mg/l)	5457 ± 9434	4	16350

## Annex 2 : composés phénoliques de margine

**Tableau 2** . Principales classes de composés phénoliques de margine

Squelette carboné	Classe	Exemple
C <sub>6</sub>	Phénols simples	hydroquinone
C <sub>6</sub> .C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque
C <sub>6</sub> .C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques,	acide p-coumarique
	Coumarines	Ombelliférone
C <sub>6</sub> .C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglon
C <sub>6</sub> .C <sub>2</sub> .C <sub>6</sub>	Stilbènes	trans-resvératrol
C <sub>6</sub> .C <sub>3</sub> .C <sub>6</sub>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanones</li> </ul>	Kaempférol
	Isoflavonoïdes	Daidzéine
(C <sub>6</sub> .C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Entérodiol
C <sub>6</sub> .C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines	
C <sub>6</sub> .C <sub>3</sub> .C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins	Procyanidol

## Annexe 3 : Préparation de noir soudan

Noir de soudan (Guiraud, 1998)

Noir de soudan B .....1g.

Éthanol à 70° .....100 ml.

## Annexe 4 : contre coloration de noir soudan

Fuchsine (Guiraud, 1998)

Fuchsine basique .....1g

Phénol.....5g

Alcool éthylique a 90° .....10ml

Eau distillée.....1000ml

## Résumé

---

La capacité de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* à produire des composés d'intérêt industriel à partir des substrats hydrophobes ou de dégrader des déchets industriels qui polluent l'environnement est un sujet qui conduit plusieurs groupes de recherche à étudier le métabolisme des lipides chez *Yarrowia Lipolytica*.

Notre travail porte essentiellement sur l'étude et l'observation de la croissance cellulaire, évaluer l'évolution de pH et l'accumulation de type *ex novo* des lipides à l'intérieur des cellules, sur deux milieux de cultures différents, le premier YPDM contient les déchets de récolte d'olive « le margine », et le deuxième milieu YPDHu contient l'huile de friture usée d'un restaurant.

Les résultats de l'étude montrent que la souche *Yarrowia lipolytica* JMY775 :

- A la capacité de croître et valoriser des milieux hydrophobes polluants. Néanmoins les vitesses et les taux de croissance semblent différer en fonction de composition de milieux de culture
- La souche possède un remarquable potentiel d'accumulation de lipides du type *ex novo* intracellulaire dans les milieux hydrophobes.
- La souche est dimorphique ce qui lui confère la capacité de s'adapter aux substrats en changeant la surface cellulaire .

**Mots clés :** Levure oléagineuse, *Yarrowia lipolytica* JMY775, Croissance Cellulaire, Accumulation des lipides, Voie *ex novo*, Margine, Huile usée ,valorisation .

# Abstract

---

The ability of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce compounds of industrial interest from hydrophobic substrates or to degrade industrial wastes that pollute the environment is a subject that has led several research groups to study lipid metabolism in *Yarrowia lipolytica*.

Our work focuses on the study and observation of cell growth, assess the evolution of pH and the *ex-novo* type accumulation of lipids inside cells, on two different culture media, the first YPDM contains the olive harvest waste “the margines”, and the second medium YPDHu contains the used frying oil from a restaurant

The results of the study show that the *Yarrowia lipolytica* JMY775 strain:

- Has the capacity to grow and enhance polluting hydrophobic environments. However, the speeds and growth rates seem to differ depending on the composition of the culture media.
- The strain has a remarkable potential for the accumulation by the intracellular *ex novo* pathway for lipids in hydrophobic media.
- The strain is dimorphic which gives it the ability to adapt to substrates by intentionally changing its cell surface.

**Keywords:** Oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica* JMY775, Cell growth, Lipid accumulation, *ex novo* pathway, Margines, Waste oil, enhance.

## ملخص

إن قدرة الخميرة *Yarrowia lipolytica* على إنتاج مركبات ذات أهمية صناعية من ركائز كارهة للماء أو تحليل النفايات الصناعية التي تلوث البيئة هي موضوع دفع العديد من الباحثين لدراسة الأيض الغذائي للدهون عند *Yarrowia lipolytica*.

يركز عملنا على دراسة ومراقبة نمو الخلايا، وتقييم تطور pH و التراكم للدهون عن طريق *ex novo* ، على الوسطين، الأول YPDM يحتوي على بقايا حصاد الزيتون ، و الثاني YPDHu يحتوي على زيت القلي المستخدم من مطعم تظهر نتائج الدراسة أن سلالة *Yarrowia lipolytica* JMY775 لديها القدرة على:

• القدرة على النمو وتحسين الأوساط الملوثة التي تحتوي على ركائز كارهة للماء. ومع ذلك، يبدو أن السرعات ومعدلات النمو تختلف اعتمادًا على تكوين الوسط.

• للسلالة إمكانيات ملحوظة لإجراء التراكم عن طريق المسار *ex novo* للدهون في الأوساط الكارهة للماء.

• السلالة ثنائية الشكل مما يمنحها القدرة على التكيف مع الركائز عن طريق تغيير سطحها.

**الكلمات المفتاحية:** الخميرة الزيتية، *Yarrowia lipolytica* JMY775، نمو الخلايا، تراكم الدهون، *Ex Novo*، زيت، النفايات، تحسين.

Année universitaire : 2019/2020

Présenté par :GHORABE Fares DIA Eddine  
BADAoui Charaf Eddine

## Valorisation des margines et des huiles usées par la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Bioindustrie Analyse et Contrôle  
(B.A.C)

La capacité de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* à produire des composés d'intérêt industriel à partir des substrats hydrophobes ou de dégrader des déchets industriels qui polluent l'environnement est un sujet qui conduit plusieurs groupes de recherche à étudier le métabolisme des lipides chez *Yarrowia lipolytica*.

Notre travail porte essentiellement sur l'étude et l'observation de la croissance cellulaire, évaluer l'évolution de pH et l'accumulation de type ex novo des lipides à l'intérieur des cellules, sur deux milieux de cultures différents, le premier YPDM contient les déchets de récolte d'olive « le margine », et le deuxième milieu YPDHu contient l'huile de friture usée d'un restaurant.

Les résultats de l'étude montrent que la souche *Yarrowia lipolytica* JMY775 :

- A la capacité de croître et valoriser des milieux hydrophobes polluant. Néanmoins les vitesses et les taux de croissance semblent différer en fonction de composition de milieux de culture.
- La souche possède un remarquable potentiel d'accumulation de lipides du type ex novo intracellulaire dans les milieux hydrophobes.
- La souche est dimorphique ce qui lui confère la capacité de s'adapter aux substrats en changeant la surface cellulaire .

**Mots clés :** Levure oléagineuse, *Yarrowia lipolytica* JMY775, Croissance Cellulaire, Accumulation des lipides, Voie ex novo, Margine, Huile usée ,valorisation

**Laboratoire de recherche :** Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaire (INATAA) au sein du laboratoire de biotechnologies et qualités des aliments (BIOQUAL).

Jury d'évaluation :

Président : KACEM CHAOUICHE N.	Professeur	UFM Constantine1
Encadrante : BOUCHEDJA.D. N	Maitre de conférences A	UFM Constantine1
Examinatrice : BELLIL I.	Maitre de conférences A	UFM Constantine1
Tuteur : AL MUALIDE Wadie Doctorant	UFM Constantine1	

**Date de soutenance :** 22/09/2020

