



HAL
open science

Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

Catherine Madzak

► **To cite this version:**

Catherine Madzak. Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*. École d'ingénieur. AgroParisTech, UE FAMi : Fonctionnalités et Activités des Micro-organismes d'intérêt, France. 2022. hal-04183201

HAL Id: hal-04183201

<https://hal.inrae.fr/hal-04183201v1>

Submitted on 18 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

➤ Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

Dr Catherine MADZAK, CRHC, HDR

UMR782 SayFood (Paris-Saclay Food and Bioproduct Engineering research unit)

Equipe de Recherche CoMiAl

Bât E, campus Agro Paris-Saclay, Palaiseau



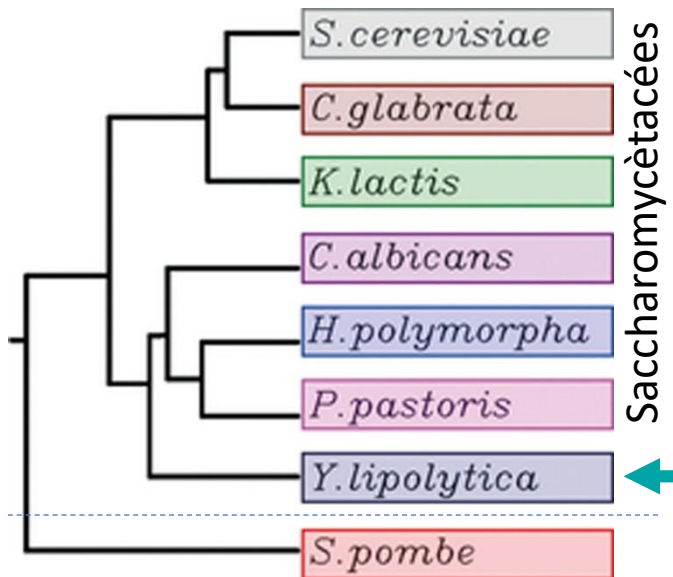
Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

- ▶ Présentation de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*
 - Taxonomie / Séquençage / Caractéristiques génétiques
 - Écologie / Environnements naturels
 - Caractéristiques physiologiques / Métabolisme lipidique
 - Voies de sécrétion des protéines
 - Caract. de la N-glycosylation des protéines / "Humanisation"
 - Historique d'utilisation industrielle (non OGM)
- ▶ Ingénierie génétique de *Yarrowia lipolytica*
- ▶ Potentiel biotechnologique de *Yarrowia lipolytica*

➤ Présentation de *Y. lipolytica*

- Classification taxonomique
- Génomes séquencés
- Caractéristiques génétiques

- Levure (Règne : *Fungi*) **Ascomycète** de la Classe des Saccharomycètes et de l'ordre des **Saccharomycétales**, comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, elle se distingue de la plupart des levures remarquables au niveau de la Famille, les Dipodascacées
- Longtemps classée dans le genre "fourre-tout" *Candida* (en l'absence de stade sexuel connu), *Y. lipolytica* était jusqu'en 2013 la seule espèce du genre *Yarrowia*. 13 nouvelles espèces ont été décrites ou réattribuées à ce genre depuis (NCBI Taxonomy Browser)



Arbre phylogénétique d'après Delic et al. 2013 *FEMS Microbiol Rev* 37(6) 872–914

- **Séquençage et annotation** des gènes d'une souche de référence (Génolevures 2 International Project) puis de plusieurs **souches d'intérêt industriel** (W29 et sa dérivée GM, Po1f)
Dujon et al. 2004 *Nature* 430(6995) 35–44
Liu & Alper 2014 *Genome Announc* 2(4) e00652-14
- Génome composé de 6 chromosomes (A à F) + M (mitoch.)
- Grande taille > 20 Mbp (12 Mbp pour *S. cerevisiae*)
- Encodage > 7000 gènes, plusieurs rétrotransposons
- La plupart des souches sauvages (wt) et toutes les souches de laboratoires sont haploïdes (MatA / MatB)
- Environ 15% des gènes contiennent des introns (exception parmi les Ascomycètes)

➤ Présentation de *Y. lipolytica*

• Écologie / Environnements naturels

- Aérobie stricte, isolée d'environnements naturels et d'aliments variés (Collection CIRM-Levures)



- Aliments : principalement fermentés, d'origine laitière (fromages) ou carnée (saucissons)



INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

- Rôle ambigu : maturation et arômes (fromages) ou conservation (saucissons) versus flore d'altération

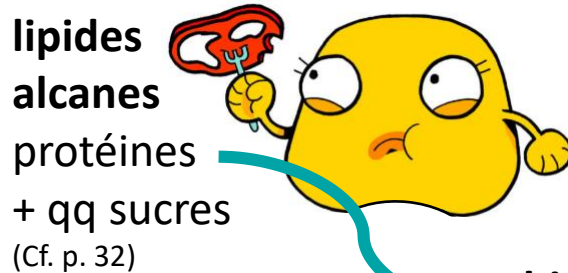
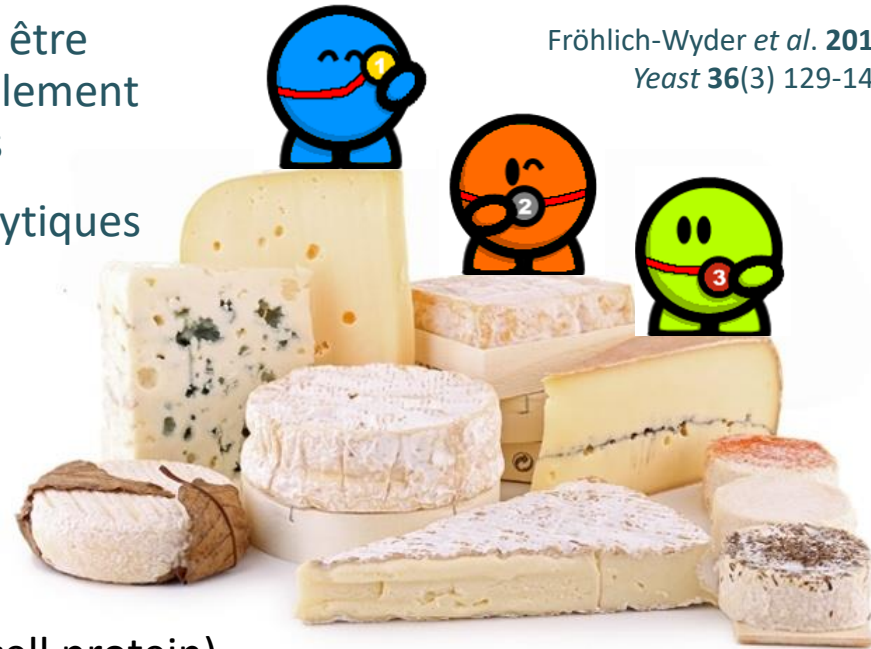
Groenewald *et al.* 2013 *Crit Rev Microbiol* 40(3) 187-206

➤ Présentation de *Y. lipolytica*

• Caractéristiques physiologiques

- Levure robuste (sel, pH) et compétitive : sans être ensemencée dans les starters, elle est généralement dans le **Top 3** des levures isolées de fromages
- Remarquables capacités **lipolytiques**, protéolytiques et de **sécrétion** enzymatique

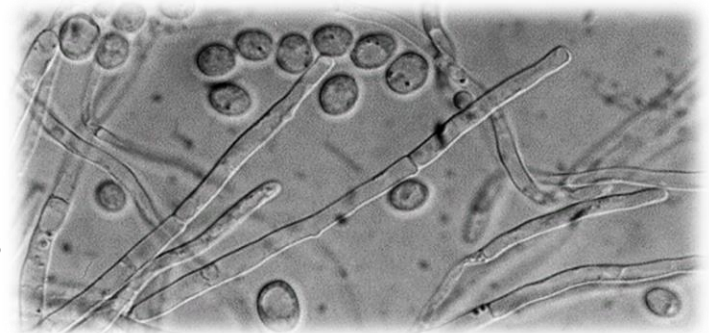
Fröhlich-Wyder *et al.* 2019
Yeast 36(3) 129-141



lipides
alcanes
protéines
+ qq sucres
(Cf. p. 32)

biomasse : SCP (single cell protein)
acides organiques
production de **protéines hétérologues**
lipides microbiens : **SCO** (single cell oil)

- Dimorphisme : cellules de type levure ou hyphes et pseudo-hyphes (transition dimorphique à pH neutre/alcalin ou en carence C/N)



Timoumi *et al.* 2018
Appl Microbiol Biotechnol 102(9) 3831-3848

INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

➤ Présentation de *Y. lipolytica*

- Caractéristiques physiologiques
- Métabolisme lipidique

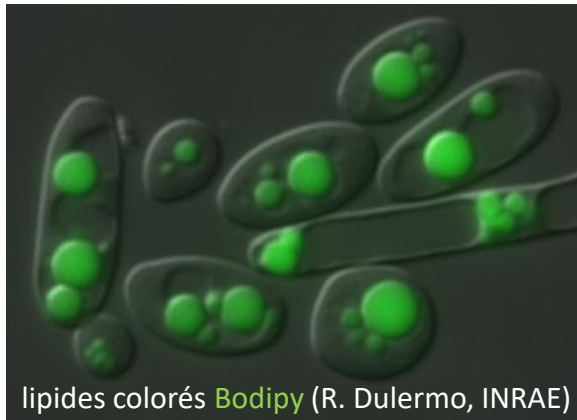
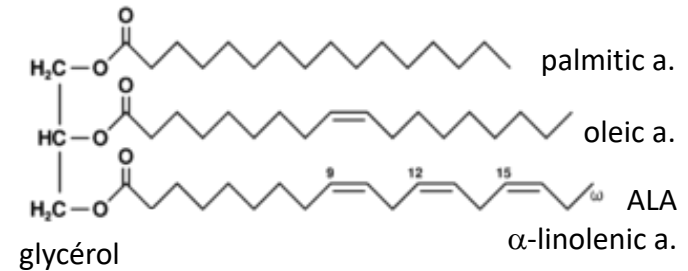
▪ Levure **oléagineuse** (au moins 20% de la biomasse / Dry Cell Weight) : jusqu'à **30% DCW** pour souches wt et jusqu'à **90% DCW** après ingénierie génétique

Ledesma-Amaro & Nicaud 2016
Trends Biotechnol 34 798–809

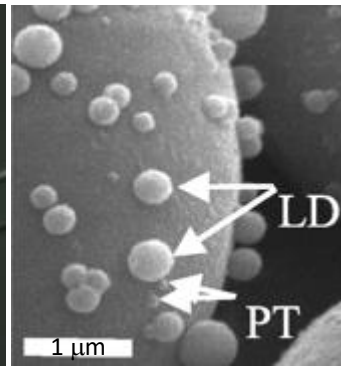
▪ Assimilation et stockage des substrats lipidiques très efficace :

- émulsifiant liposan -> réduction taille gouttelettes
- sécrétion lipase LIP2 -> hydrolyse triglycérides
- protrusions -> internalisation acides gras
- corps lipidique (lipid body) -> stock triglycérides

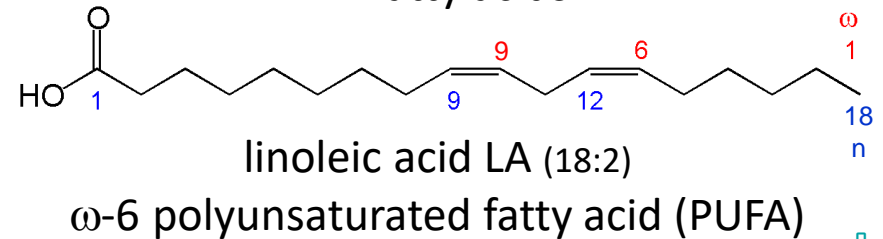
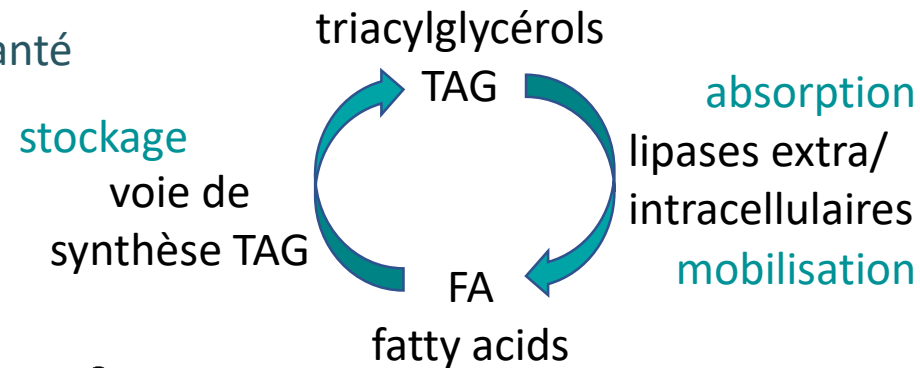
▪ Jusqu'à **80% d'acides gras insaturés** (acides linoléique LA et oléique) -> intérêt santé



lipides colorés Bodipy (R. Dulermo, INRAE)



Lipid Droplets / ProTrusions
Mlíčková et al. 2004 *Appl Environ Microbiol* 70(7) 3918-24

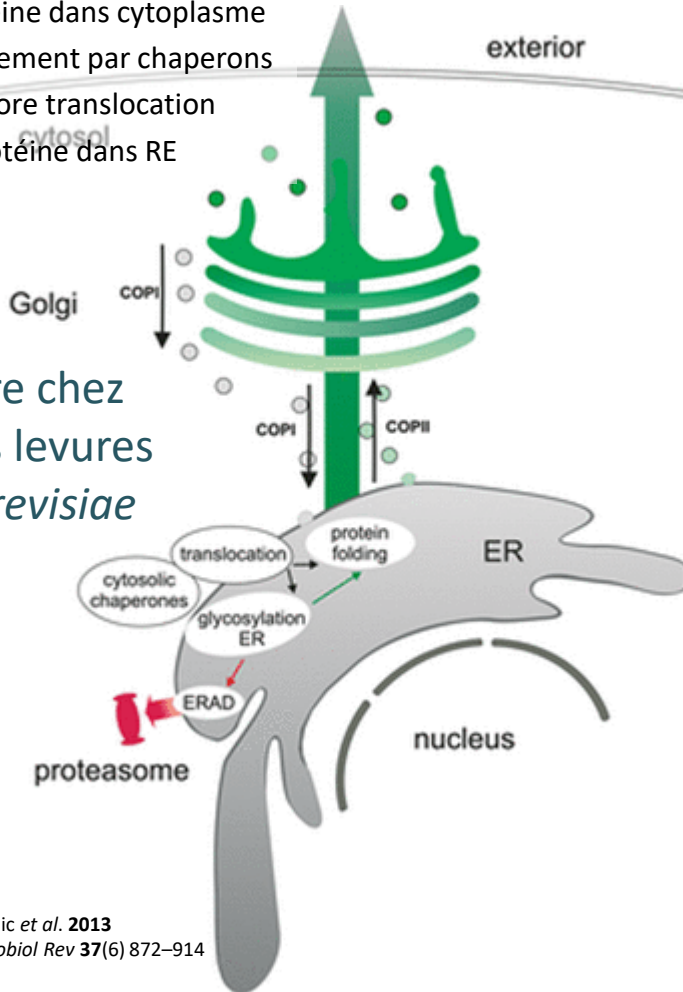


➤ Présentation de *Y. lipolytica*

• Voies de sécrétion des protéines

▪ Voie **post-traductionnelle** de sécrétion *versus* Voie **co-traductionnelle** de sécrétion

- synthèse protéine dans cytoplasme
- maintien déplié par chaperons
- transfert par pore translocation
- repliement protéine dans RE

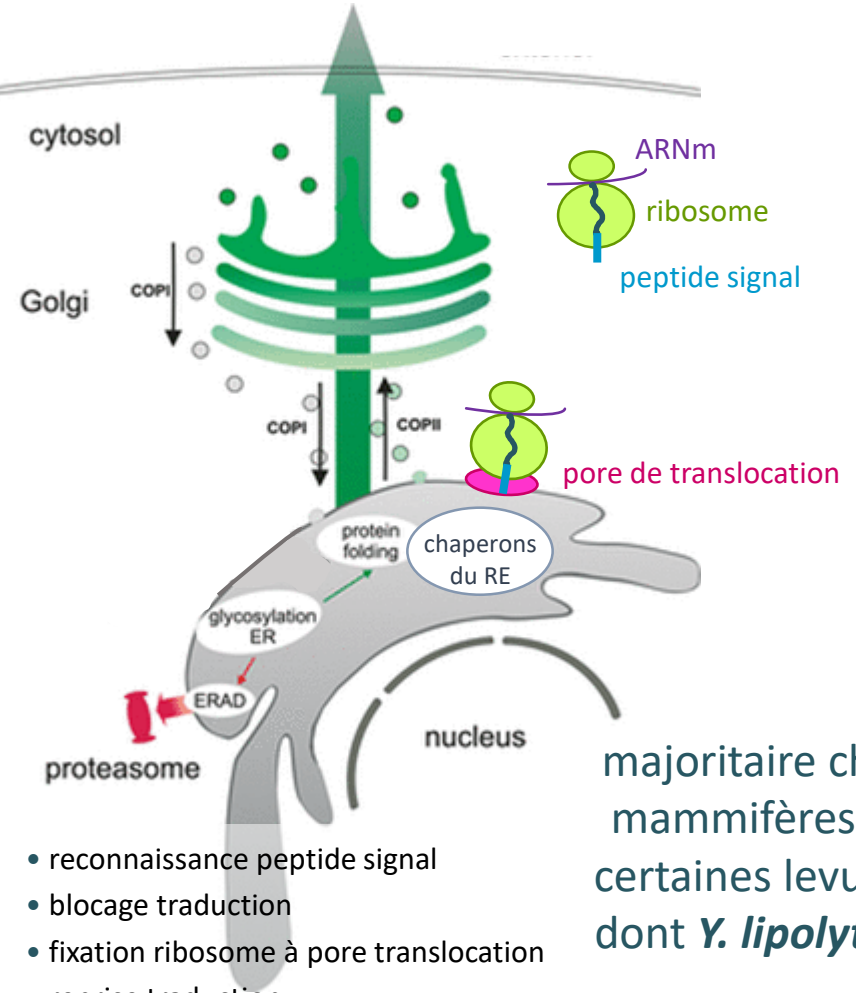


majoritaire chez
plupart des levures
dont *S. cerevisiae*

d'après Delic et al. 2013
FEMS Microbiol Rev 37(6) 872–914

INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak



- reconnaissance peptide signal
- blocage traduction
- fixation ribosome à pore translocation
- reprise traduction
- synthèse/repliement simultanés dans RE (aide chaperons)

majoritaire chez
mammifères et
certaines levures
dont *Y. lipolytica*

production + efficace des protéines complexes

➤ Présentation de *Y. lipolytica*

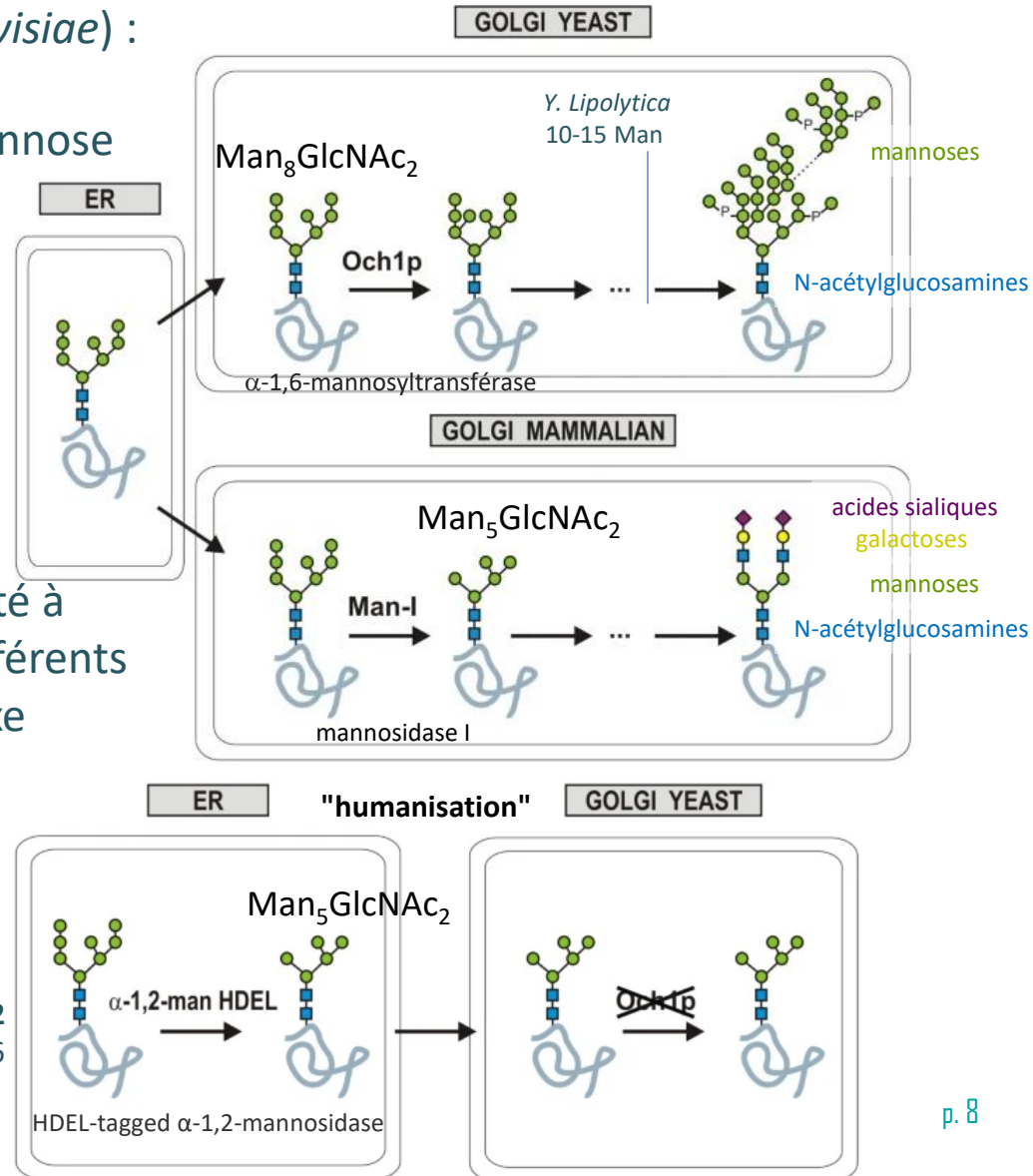
- Ajout de glucides sur N d'Asn dans séquence cible de 3 aa : **Asn** - X(sauf Pro) - Ser/Thr
- Chez plupart des **levures** (dont *S. cerevisiae*) :
 - structure $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ commune à tous Eucaryotes subit un ajout de Mannose allant jusqu'à 50-100 résidus
 - **hypermannosylation** : pb inactivité + *in vivo* : clearance/immunogénicité (70% prot. thérapeutiques N-glyc.)
- Chez *Y. lipolytica* (et *Pichia pastoris*) : absence d' α -1,3-mannosyltransférase limite l'hypermannosylation
- Chez **Mammifères** : ajout de Man limité à structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ et ajout de différents types de glucides -> structure complexe
- **Ingénierie génétique** de *Y. lipolytica* : obtention de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ par expression d'une mannosidase hétérologue et délétion d'une mannosyltransférase

de Pourcq et al. 2012
 PLoS One 7(6) e39976

INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
 C. Madzak

- N-glycolysation des protéines
- "Humanisation"



➤ Présentation de *Y. lipolytica*

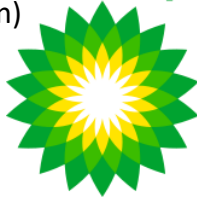
• Historique d'utilisation industrielle

- 50s : intérêt pour la production de protéines (SCP Food/Feed) à partir de substrats peu coûteux, comme le pétrole brut composé de n-alcane (hydrocarbures saturés linéaires)
- Début de l'utilisation industrielle de souches sauvages de *Yarrowia lipolytica*

1957

Usine pilote **British Petroleum Company** (GB) : production de **SCP** sur substrat n-alcane : **Toprina G** (4 ktonnes/an)

bp



Études de sécurité et d'efficacité de **Toprina G** pour **Feed** : jusqu'à 35% du régime alimentaire (bovins, ovins, porcins, volailles, truites)

Generally Recognized As Safe (Food & Drugs Administration, USA)



1971 1978

Joint venture avec **ANIC** (Sardaigne) : **Italproteine** (100 ktonnes/an)

Arrêt pour raisons économiques : crise pétrolière de 1973

1973



Production industrielle d'**acide citrique** par **Pfizer** sur substrat dextrose/glucose : 20 ktonnes/an (CN, USA) puis 50 ktonnes/an (NC, USA)

1990

Rachat et modernisation production par **Archer Daniels Midland** : 90 ktonnes/an



GRAS

2003

Baolingbao Biology Co. (Chine) : production d'**érythritol** pour **Food** (édulcorant, exhausteur de goût, stabilisant) avec une souche traditionnellement améliorée

GRAS

- Février 2019 : biomasse sèche de *Y. lip.* reconnue comme aliment (3-6 g/j) par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments, avec usage possible comme complément alimentaire

INRAE

EFSA Journal 17 (2) e05594

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak



Artechno (Belgium) : starter pour dépolluer (**bioremédiation**) les eaux usées composées de cellules (+ lipase extracellulaire) lyophilisées

2009



Production de **biomasse** *Y. lipolytica* sur glycerol, par **Skotan** (Pologne) pour **Feed** : **Equinox** pour chevaux, **Canifloxx** pour animaux de compagnie (600 tonnes/an) + Projets de recherche pour **Food** (complément alimentaire, probiotique)

2010

Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

- › Présentation de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*
- › Ingénierie génétique de *Yarrowia lipolytica*
 - Contexte des débuts
 - Promoteurs recombinants / 1^{er} système d'expression
 - Vecteurs et principaux composants génétiques
 - Surface display / Compartimentalisation cellulaire
 - Nouvelles technologies d'assemblage d'ADN
 - Systèmes d'édition de génome CRISPR
- › Potentiel biotechnologique de *Yarrowia lipolytica*

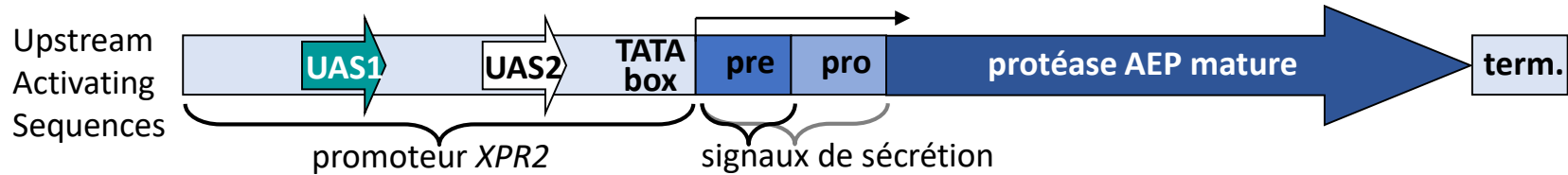
➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica*

- Contexte des débuts

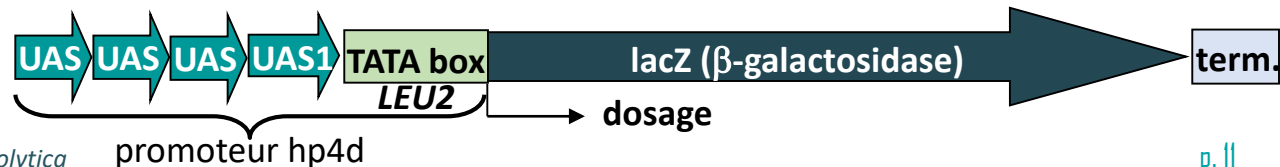
- Outils BM début 80s : enzymes de restriction, ligases, séquençage "manuel" (Sanger)
- Forte sécrétion de *Y. lipolytica* suscite l'intérêt pour production de protéines hétérologues
- Sélection de **souches** mutantes d'auxotrophie pour l'uracile (contre-sélection 5-FOA) ou la leucine -> identification des gènes correspondants **URA3, LEU2** -> **marqueurs** de sélection
- 1^{ers} brevets sur méthodes de **transformation** de *Y. lipolytica* : sélection de transformants prototrophes après correction d'auxotrophie par intégration d'un vecteur dans le génome



- Protéines fortement sécrétées : protéase AEP (Alcaline Extracellulaire Protease : jusqu'à 2 g/L) encodée par **gène XPR2**, lipase extracellulaire LIP2 -> **outils** d'expression / sécrétion



- Outils BM fin 80s : PCR, synthèse "maison" d'oligonucléotides (synthétiseur d'ADN labo)
- 1^{er} exemple d'**ingénierie** de souche pour utilisation nouveau substrat (sucrose : *ScSUC2*)
- Fin 90s : 1^{er} exemple d'ingénierie d'un promoteur -> **promoteur recombinant hp4d**



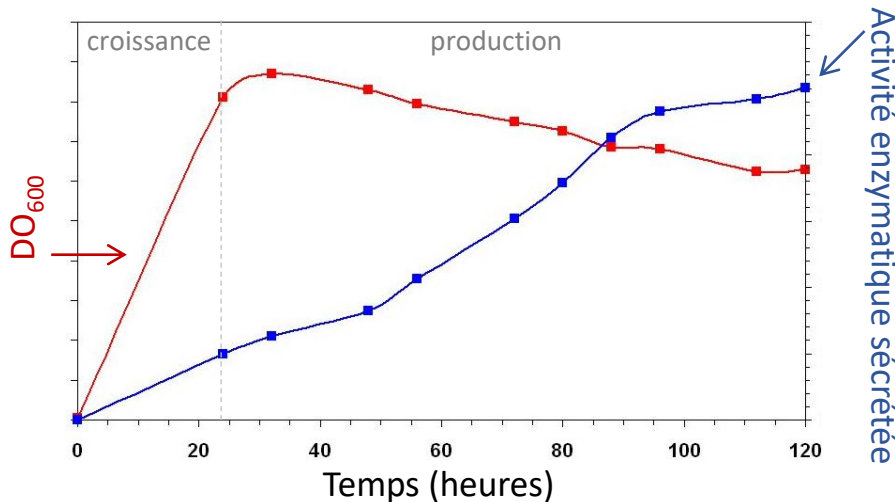
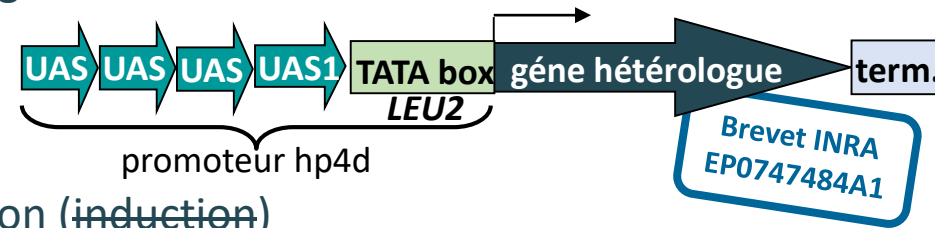
INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

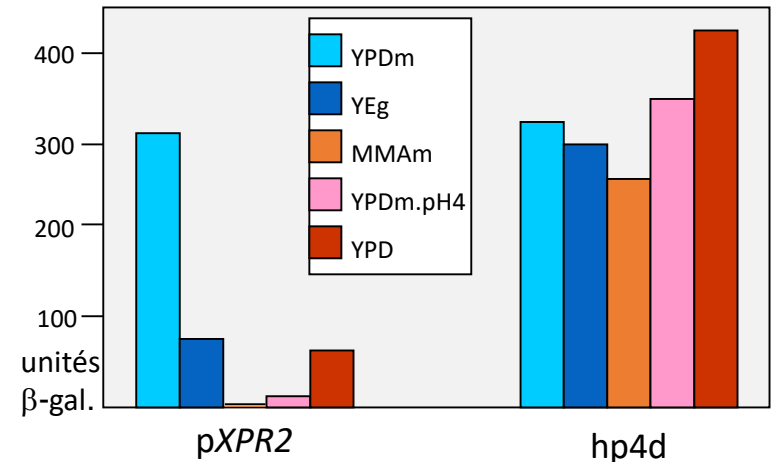
➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica* • Promoteurs recombinants

- Promoteur hp4d (Hybrid Promoter 4UASs Direct) : auto-induction fin phase exponentielle
- Promoteur idéal pour production hétérologue :

- **niveau** d'expression élevé
- **indépendance** conditions (C/N/pH)
- **séparation** phases croissance/expression (induction)



d'après Kopecny et al. 2005 *Biochimie* 87 1011-22



d'après Madzak et al. 2000 *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 207-16

- Promoteur le plus utilisé dans le monde depuis +20 ans pour l'ingénierie de *Y. lipolytica*
- Principe de l'augmentation du **nbre d'UASs** passé au niveau supérieur grâce progrès BM

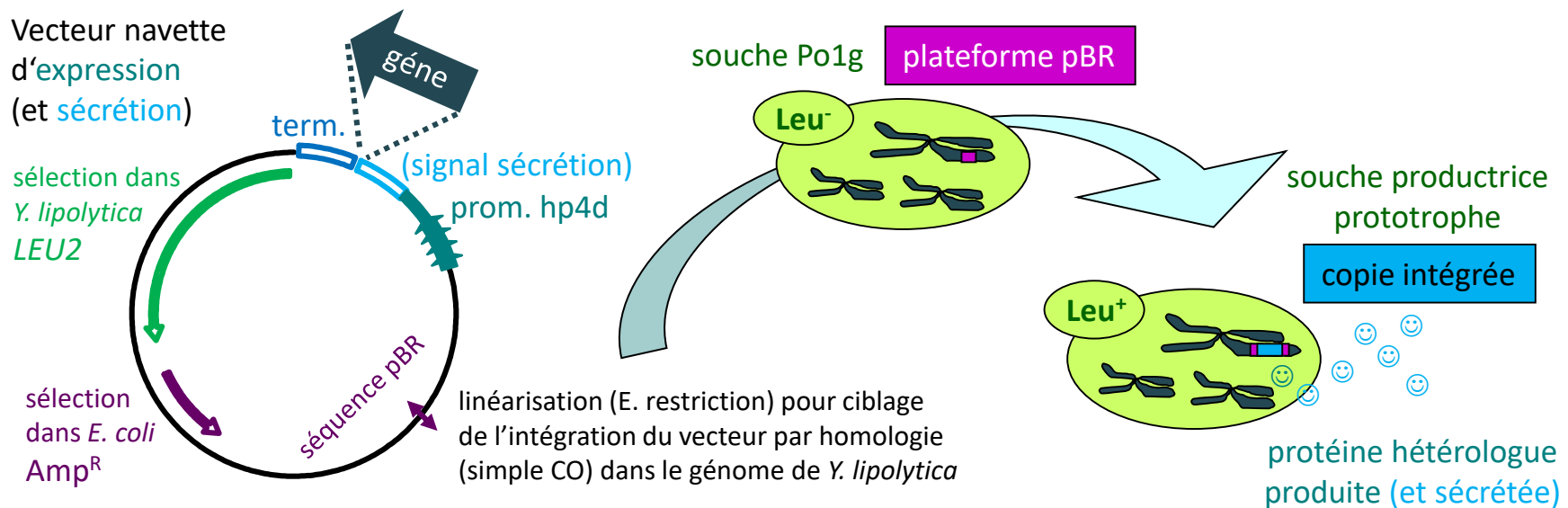
- de 8 à 32 copies d'UASs, issues aussi d'autres promoteurs (pTEF constitutif)
- en amont d'autres promoteurs, min. ou entiers

Blazek et al. 2011

Appl Environ Microbiol 77(22) 7905-14

➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica* • 1^{er} système d'expression

- Développement d'un système d'expression simple basé sur le promoteur hp4d :
 - **vecteurs intégratifs** : stabilité, affranchissement de pression de sélection possible
 - sélection de **souche** sauvage W29 pour robustesse et capacité de sécrétion ->
 - **série Po1** GM -> auxotrophies, substrat sucrose (mélasses), délétion protéases extracell.
 - optimisation transformation : jusqu'à 10^6 transformants/ μ g ADN avec homologies > 1 kb



- 2006 : commercialisation du **kit YLEX**, sous licence INRA, par Yeastern Biotech Co. (Taiwan)



INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak



Yeastern Biotech Co., Ltd.

➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica*

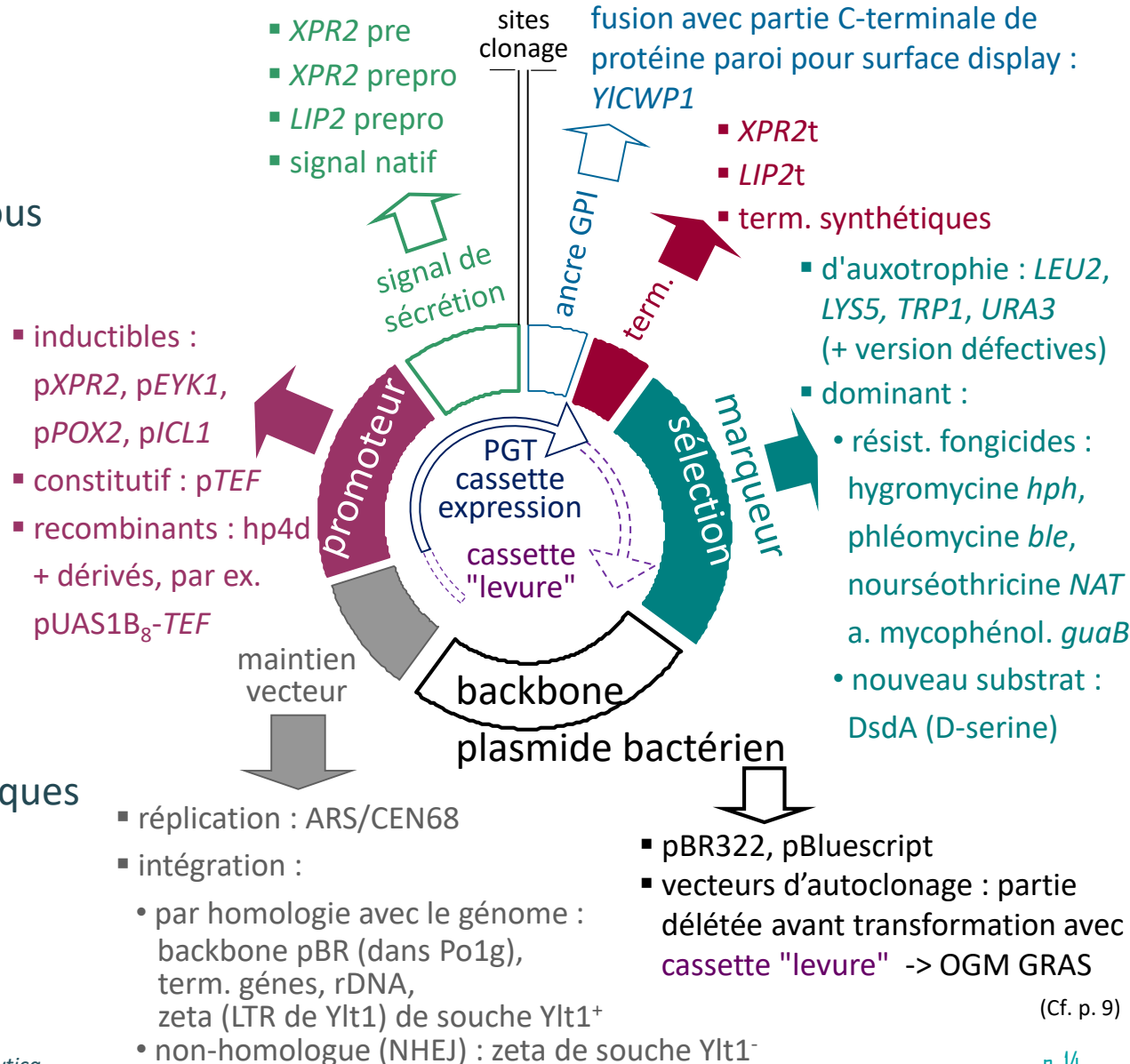
• Vecteurs et composants

▪ Vecteurs **intégratifs** :

- par **homologie** > 500 bp (50 bp chez *S. cerev.*)
- par NHEJ (Non-Homologous End Joining élevé)
- Souches à NHEJ réduit (délétion de *KU70/80*) -> réduction taille homol. requise pour intégration
- **amplification** avec marqueur défectif
- cassettes PGT multiples

▪ Vecteurs **réplicatifs** :

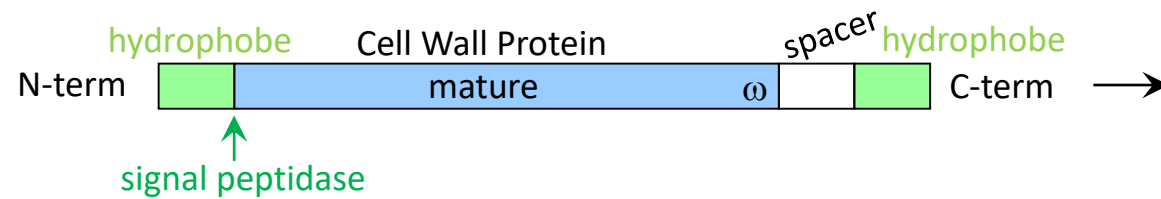
- origines répli. centromériques
- faible nbre copies
- perdus sans sélection



➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica*

- Surface display

- Certaines protéines sécrétées ont une région C-terminale hydrophobe qui peut interagir avec la membrane interne du RE et s'y fixer covalentement par une ancre GPI (glypiation). Après externalisation des vésicules de secretion, ces protéines à ancre GPI se retrouvent donc exposées à la surface de la cellule.
- La fusion d'une **protéine hétérologue** avec la région C-terminale d'une telle protéine (ex: *YICWP1*) permet donc son exposition (surface display)

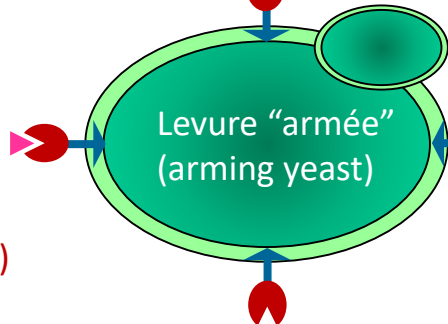


Screening de banques de variants d'enzymes

Biocatalyse
Bioconversion

Usine cellulaire
(cell factory)

Biosenseur
Bioadsorbant
(dépollution
métaux lourds)

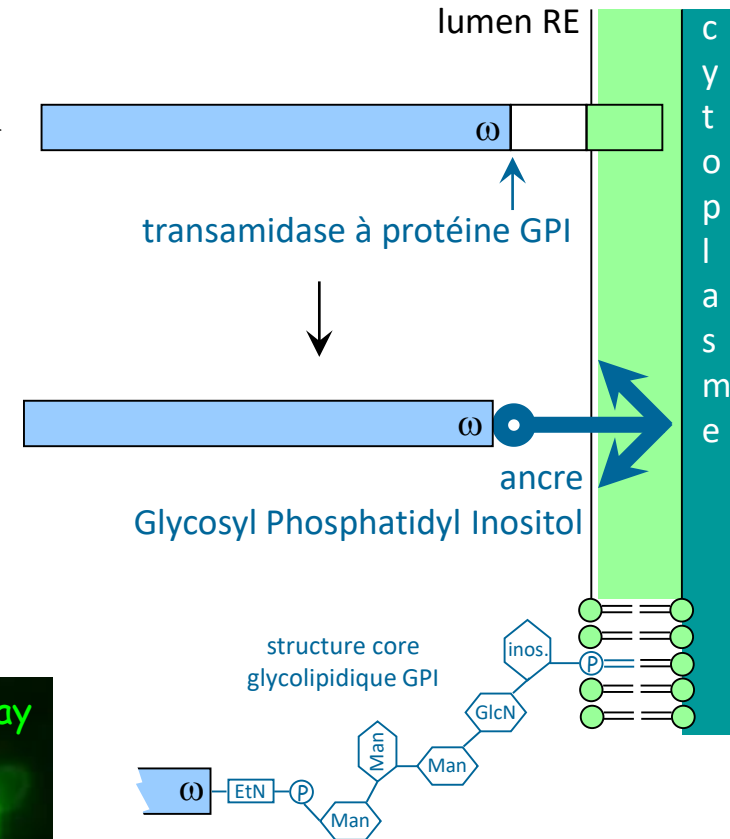
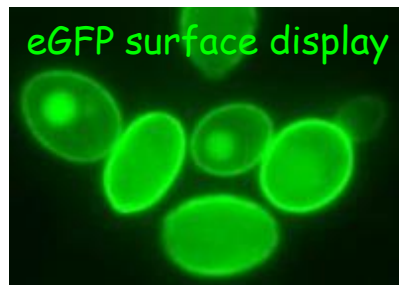


Vaccin oral vivant/inactivé
(production d'anticorps)

INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

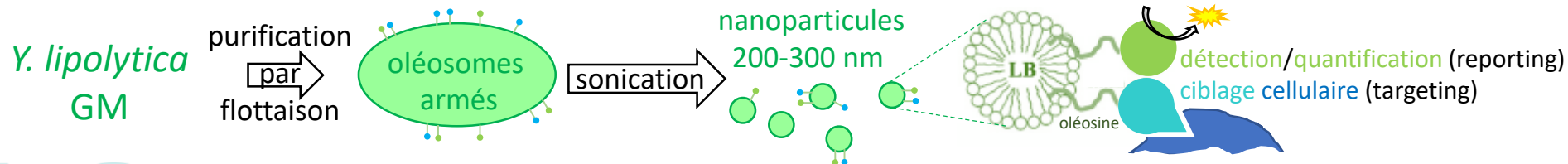
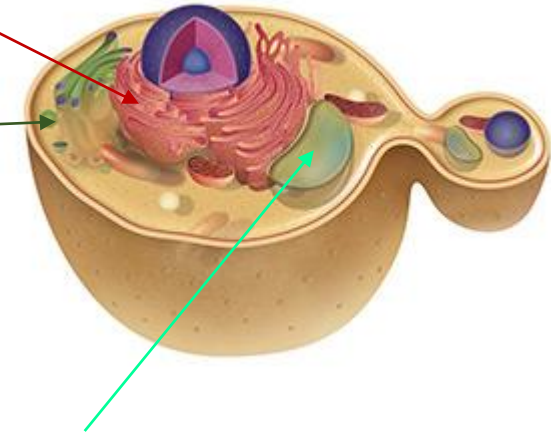
eGFP surface display



➤ Ingénierie génétique de *Y. lipolytica*

• Compartmentalisation

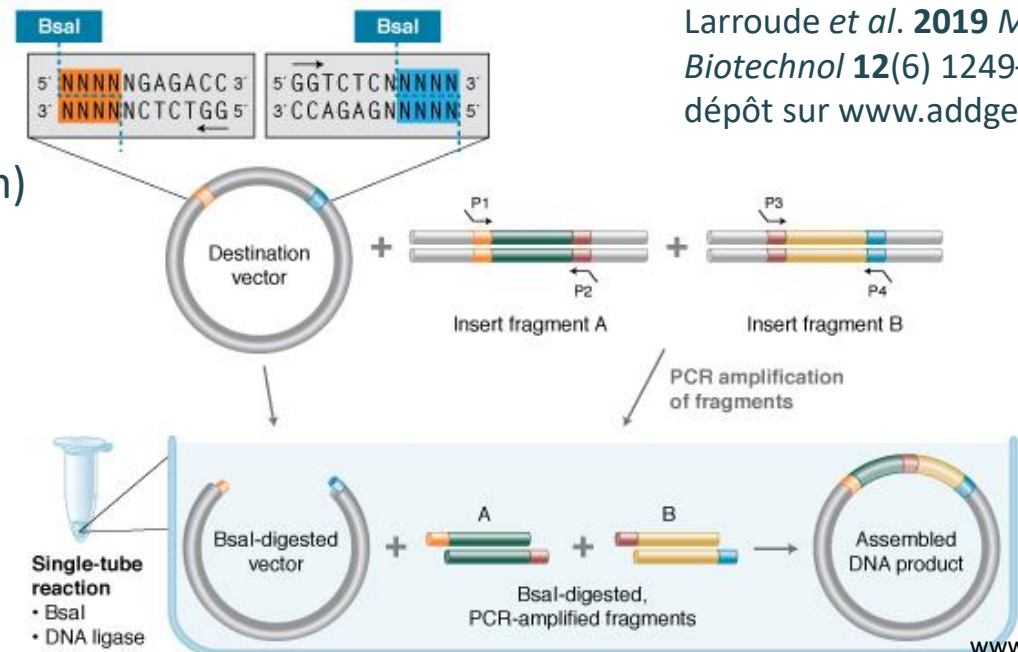
- Des protéines recombinantes, d'origine endogène ou hétérologue, peuvent être dirigées vers différents **organites** de la cellule, pour l'introduction d'une nouvelle fonction (ou sa relocalisation) dans une **voie métabolique compartimentalisée**
- Rétention dans le **Reticulum Endoplasmique (RE)** grâce à l'addition d'une séquence d'acides aminés **KDEL** en C-term. (Lys-Asp-Glu-Leu, cf. ex. p. 8)
- Adressage aux **peroxysomes**, organites contenant des enzymes oxydantes (oxydases, catalase) impliqués dans le catabolisme des acides gras (β -oxydation) et aminés, par un **signal PTS** (peroxisome targeting signal) : chez *Y. lipolytica*, tripeptides **AKI** (Ala-Lys-Ile) ou **SKL** (Ser-Lys-Leu) en C-term.
- Adressage aux **oléosomes** constituent le corps lipidique (**lipid body**) par fusion avec le **domaine C-term. d'oléosines** (protéines structurales des oléosomes des cellules végétales)
- Le ciblage des oléosomes permet également l'obtention de **nanoparticules** de taille contrôlable armées de **fonctionnalités** diverses : nano-oléosomes "armés"



➤ Ingénierie génétique

• Nouvelles technologies assemblage ADN

- Projets d'ingénierie métabolique complexe :
 - introduction de **nouvelles voies de synthèse** (étapes multiples) -> **assemblage** d'ADN
 - modification des voies natives par **surexpression ou deletion de gènes** -> **édition** génome
- 2000s : nouvelles technologies d'assemblage de fragments d'ADN
 - *in vitro* : Biobricks (banques d'éléments d'intérêt), **Golden Gate Assembly** (GG Cloning)
 - *in vivo* : laisser le microorganisme faire l'assemblage ! (cf. p. suivantes)
- Développement à l'INRA d'un **Yarrowia Golden Gate toolkit** : collection de plasmides porteurs de fragments d'ADN d'intérêt, "GG-compatibles" (bordés sites *Bsa*I, type IIS) -> assemblage directionnel d'une dizaine de fragments
 - 9 promoteurs
 - 6 marqueurs de sélection
 - term/loci/gènes rapporteurs

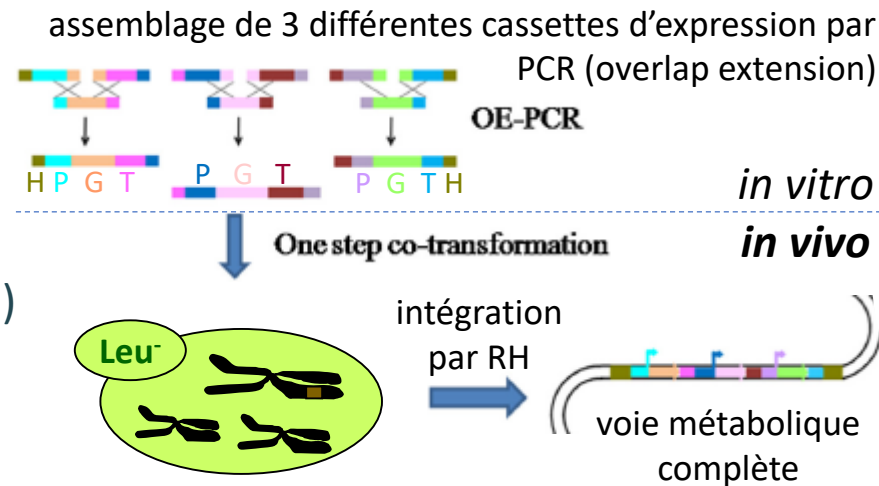


Larroude *et al.* 2019 *Microb Biotechnol* **12**(6) 1249–1259
dépôt sur www.addgene.org

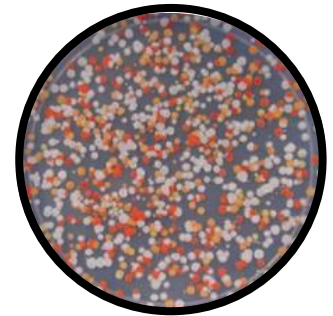
➤ Ingénierie génétique

• Nouvelles technol. assemblage ADN *in vivo*

- Assemblage *in vitro* de nouvelles voies de synthèse : temps, labeur, limite taille vecteurs
- Laisser le microorganisme faire l'assemblage *in vivo* ? (cf. Gibson assembly chez *E. coli*)
- Chez *Y. lipolytica* : pb du niveau élevé de NHEJ prp recombinaison homologue (RH)
- **Assemblage *in vivo*** de 2 nouvelles voies de synthèse de **3 gènes** (+ marqueur) : **10-11 kb**
 - β-carotène
 - acide arachidonique
- Efficacité proportionnée à la taille des régions de recouvrement (homologie)
- Max (**20-25%**) pour 500 bp entre cassettes et 1 kb avec génome
- Possible (qq %) dès 50 bp entre cassettes et 300 bp d'homologie avec le génome
- Augmentation de l'efficacité d'assemblage dans souche mutante **ku70/ku80** (délétion gènes responsables NHEJ) : **60%** (comparable à *S. cerevisiae*)



clones positifs :
sélection visuelle
ou PCR sur ADNg

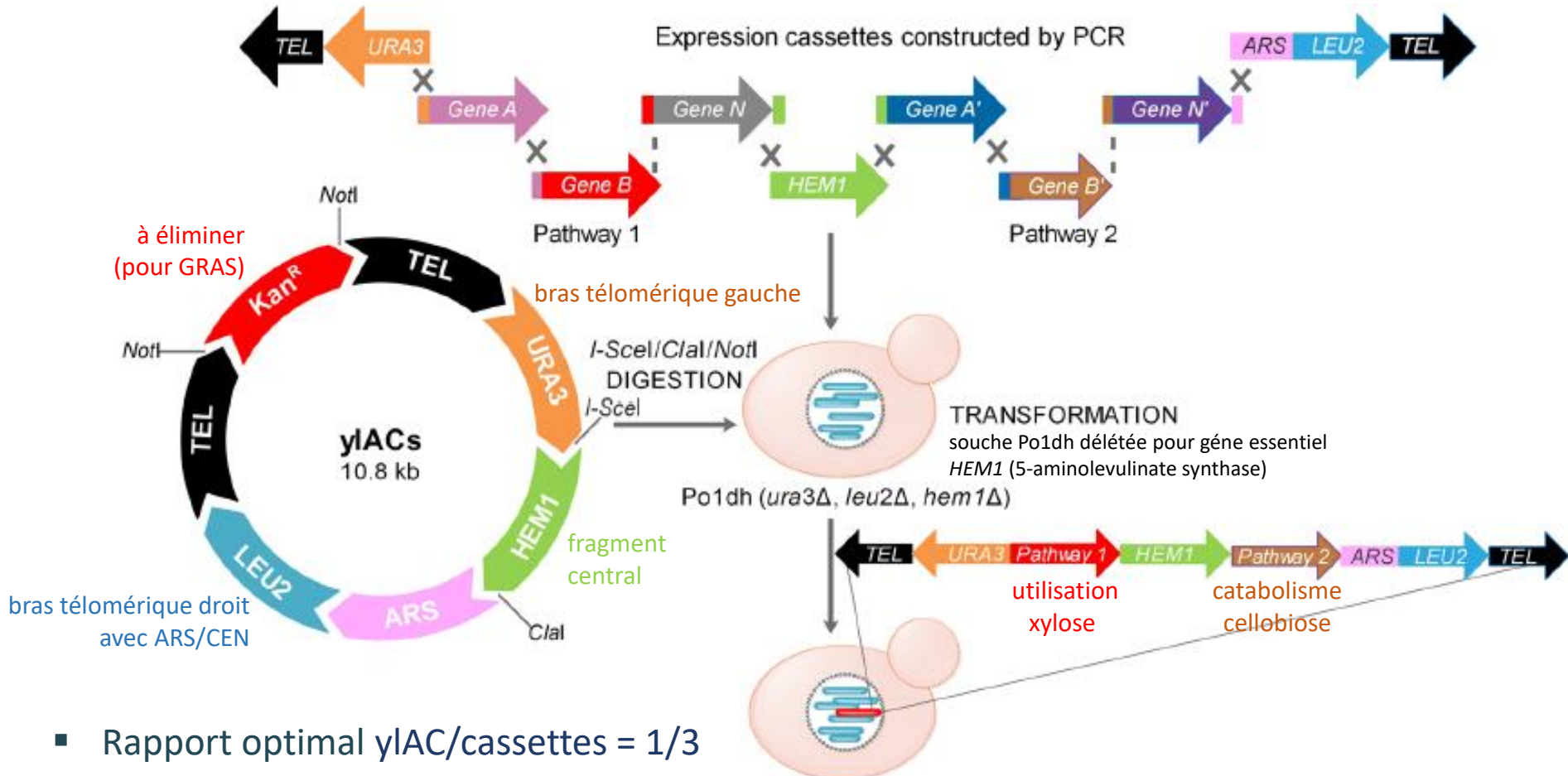


détection caroténoïdes
sur colonies *Y. lipolytica*
(photo M. Mayorga, DSM)

➤ Ingénierie génétique

- Nouvelles technol. assemblage ADN *in vivo*

- Assemblage *in vivo* d'un **chromosome artificiel** (Toulouse Biotechnology Institute, INSA)

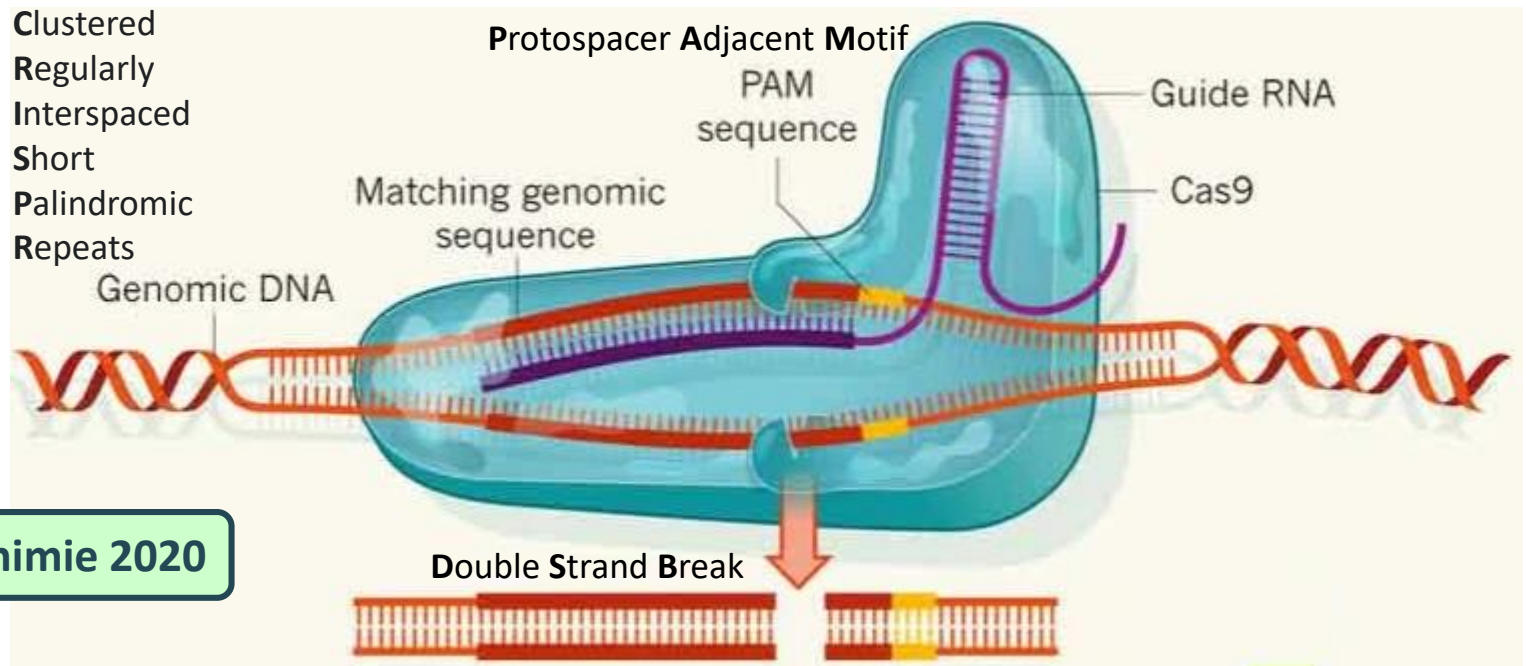


- Rapport optimal yIAC/cassettes = 1/3
- Assemblage en une semaine (wet lab) de **2 voies métaboliques** (3 gènes chacune) en un chromosome artificiel stable de **23 kb** (RH entre recouvrements de 50 bp) : **95%** efficacité

➤ Ingénierie génétique

• Systèmes d'édition de génome CRISPR

- Mécanisme bactérien d'immunité cellulaire coupe séq. **CRISPR** exogènes (présence **PAM**)
- Utilisation en **ingénierie génétique** requiert expression hétérologue dans hôte cible :
 - unique ARN guide (**sgRNA**) pour liaison nucléase Cas (CRISPR associée) / hybrid. ADN cible (20 b)
 - nucléase Cas (**Cas9** *Streptococcus pyogenes*) -> **DSB** dans ADN en 5' **PAM** (2-6 bp : NGG)



Prix Nobel Chimie 2020

- **Réparation** DSB soit par **NHEJ** -> mutations indel (Insertion/Délétion), soit par **RH** (donor)



INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

Jinek *et al.* **2012** *Science* **337**(6096) 816-21

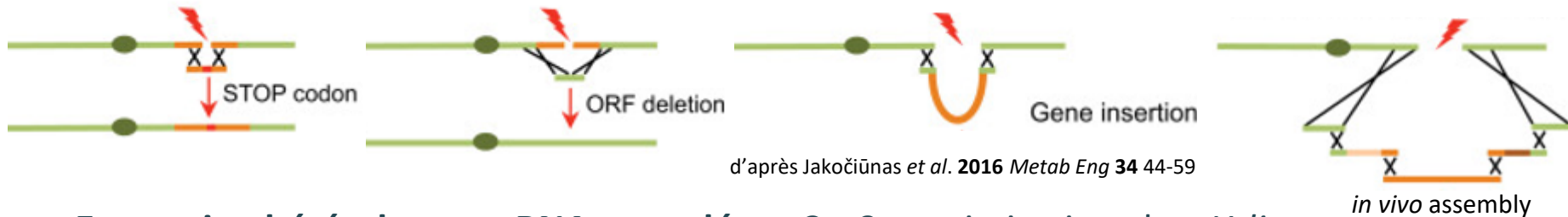
Doudna & Charpentier **2014** *Science* **346**(6213) 1258096

Lander **2016** *Cell* **164** 18-28 : The Heroes of CRISPR

➤ Ingénierie génétique

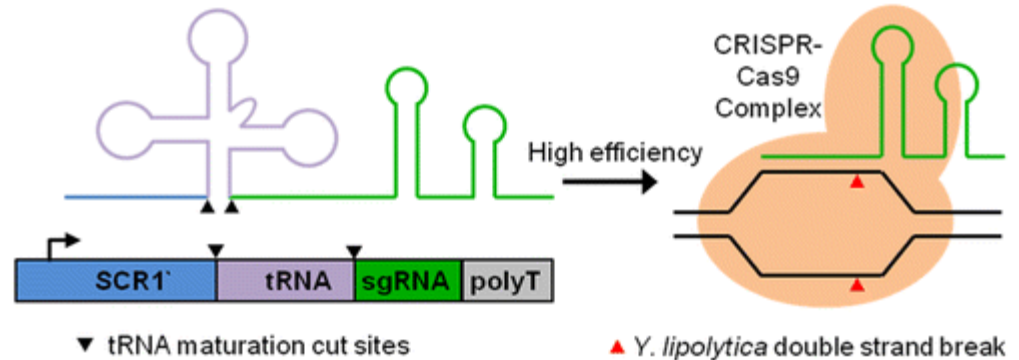
• Systèmes d'édition de génome CRISPR

- La réparation du DSB induit, par **RH**, en présence d'un ADN donneur (**donor**) permet :
 - knock-out / mutation / délétion de gène / insertion de gène ou de voie métabolique



- **Expression hétérologue sgRNA et nucléase Cas9** : optimisation chez *Y. lip.*
- *SpCas9* : promoteur recombinant pUAS1B_g-TEF + optimisation du biais de codon
- sgRNA : prom. PolIII combiné à seq. encodant tRNA_{Gly} (maturation tRNA libre sgRNA)

- 2 cassettes portées par unique **plasmide répliatif pCRISPRyl**
Schwartz et al. 2016 *ACS Synth Biol* 5(4) 356-9
dépôt sur www.addgene.org
- Intégration "**markerless**" d'une cassette "donor DNA" :
efficacité **64%** dans Po1f,
100% dans $\Delta Ku70$ (suppression NHEJ)

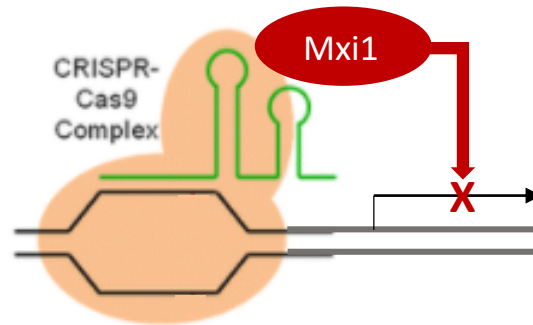
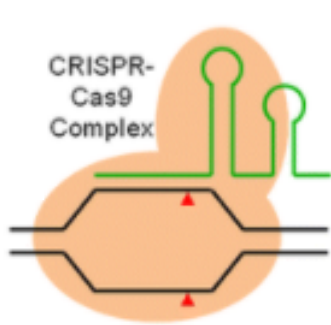


- Collection de vecteurs pCRISPRyl avec sgRNA ciblant **5 loci** sélectionnés du génome de *Y. lip.*
Schwartz et al. 2017 *ACS Synth Biol* 6(3) 402-409
dépôt sur www.addgene.org

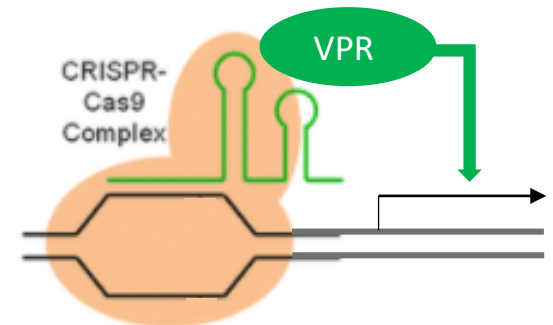
➤ Ingénierie génétique

• Systèmes d'édition de génome CRISPR

- Utilisation du système CRISPR-Cas9 pour des applications de régulation de l'expression :
 - nucléase Cas9 défective (dCas9) couplée à un **répresseur de transcription Mxi1** : **CRISPRi**
 - dCas9 couplée à un **activateur de transcription VPR** : **CRISPRa**



CRISPR interference :
répression (temporaire) d'expression
Schwartz *et al.* 2017
Biotechnol Bioeng **114**(12) 2896–2906
dépôt pCRISPRi_Mxi1_y1 +/- sgRNAs *Ku70/Ku80*
sur www.addgene.org



CRISPR activation :
expression de (pseudo)gènes muets
Schwartz *et al.* 2018
Biotechnol. J., **13**(9) e1700584
dépôt pCRISPRa_VPR_y1
sur www.addgene.org

- Système CRISPRi utilisé pour **inactiver temporairement** (vecteur répliatif) *Ku70* et *Ku80* par ciblage de leurs promoteurs (sgRNA multiplexes) -> souche où **NHEJ** réprimé
- Système CRISPRa utilisé pour activer la transcription de 2 **gènes β -glucosidase inactifs** chez *Y. lipolytica* -> utilisation du **cellobiose** comme **nouveau substrat**

Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

- › Présentation de la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*
- › Ingénierie génétique de *Yarrowia lipolytica*
- › Potentiel biotechnologique de *Yarrowia lipolytica*
 - Bioéconomie
 - Utilisations Santé de *Y. lipolytica* génétiquement modifiées
 - *Y. lipolytica* GM source de protéines recombinantes
 - Applications Food / Feed de *Y. lipolytica* GM
 - Exemple d'ingénierie complexe : synthèse d'EPA (ω -3)
 - Apports de la compartimentalisation
 - Utilisation de nouveaux substrats renouvelables

► Potentiel biotechnologique de *Y. lipolytica*

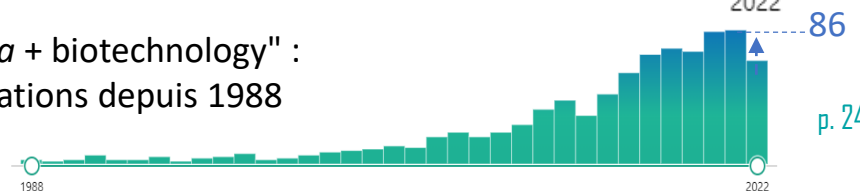
• Bioéconomie

- Définie depuis années 20s comme l'ensemble des activités utilisant les bioressources (produits d'origine animale, végétale, fongique, bactérienne, etc)
- Actuellement, notion d'**économie circulaire** basée sur des **ressources renouvelables**, avec procédés de transformation prenant en compte la valorisation des co-produits / déchets
- Depuis 2017, la France s'engage dans une **Stratégie Bioéconomie**, pour passer d'une économie dépendant de ressources fossiles à une **économie basée sur la biomasse** (Stratégie Nationale de Mobilisation de la Biomasse, Ministère de l'Environnement, 2017), tout en restant capable de respecter ses autres usages, en particulier alimentaires
- Les biotechnologies ont déjà une grande importance dans le secteur de la **santé** et sont émergentes dans les secteurs de l'**agroalimentaire**, de l'**agriculture** et de l'**environnement**, ainsi que pour le remplacement de **procédés industriels** par des processus plus écologiques. D'actuellement environ **1% du PIB** des pays de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), elles devraient atteindre **3% d'ici 2030**
- Un rôle à jouer pour *Y. lipolytica*...

Recherche sur "*Y. lipolytica*" dans PubMed : 2522 publications



"*Y. lipolytica* + biotechnology" :
716 publications depuis 1988



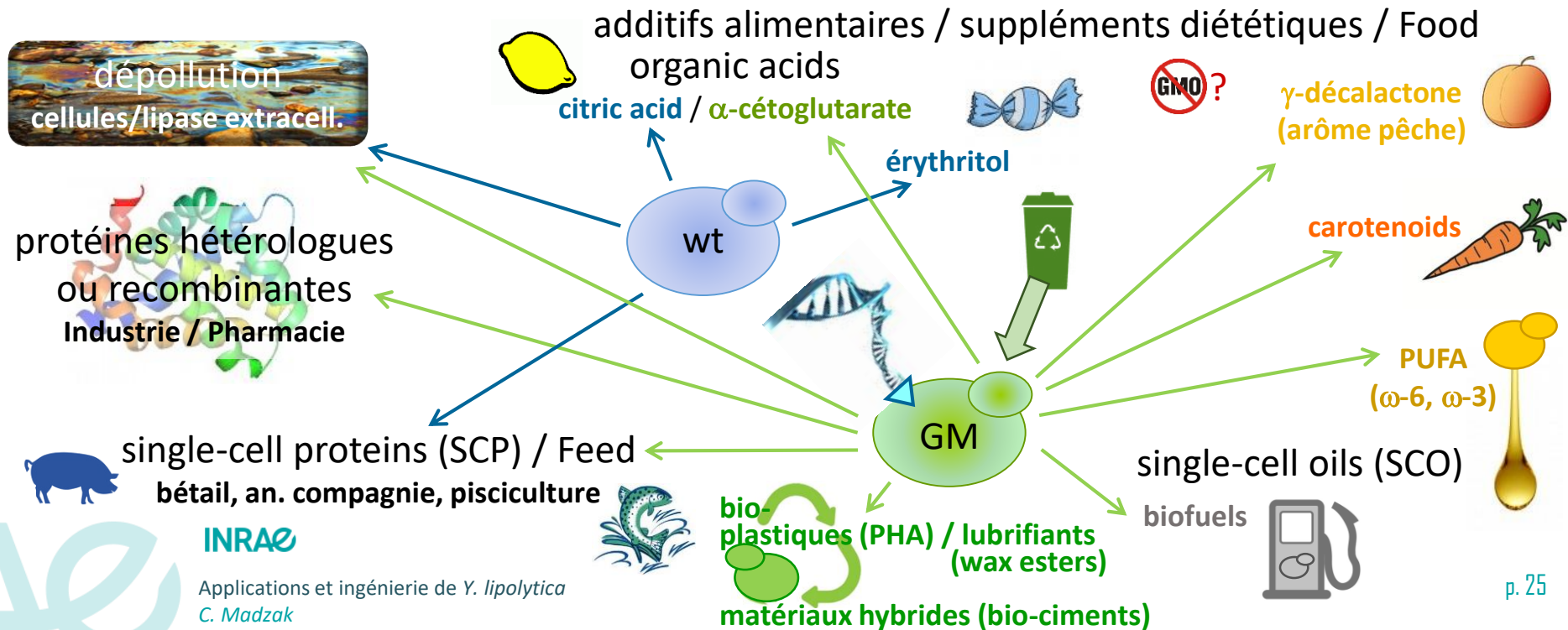
INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

► Potentiel biotechnologique de *Y. lipolytica*

• Bioéconomie

- En dehors des utilisations biotech. de souches sauvages ou tradit. modifiée (cf. p. 9), le développement du potentiel biotech. de *Y. lipolytica* par ingénierie génétique se heurte parfois à des problèmes sociétaux d'**acceptation des OGMs** (mieux tolérés pour **Santé**)
- Développement de l'ingénierie appliquée de *Y. lipolytica* plus récent que pour autres espèces utilisées industriellement (*S. cerev.*, *P. pastoris*, *Aspergillus niger*) : retard à rattraper en développement procédés, même si publication de meilleures performances
- Succès de *Y. lipolytica* GMs dans des **niches biotechnologiques** tirant parti de ses caractér. remarquables (oléagineuse, **composition SCO**, sécrétion, GRAS, **utilisation déchets**)



► Potentiel biotechnol.

- Utilisations Santé de *Y. lipolytica* GM

- 90s : intérêt pour applications **lipase** extracell. -> souches GM surproductrices de Y/LIP2
- Objectif : **ERTs** (Enzyme Replacement Therapy) de maladies de **malabsorption des graisses**



1997



partenariats

Partenariat compagnie pharmaceutique **Mayoly Spindler** (France) / **INRA** pour la surexpression de la **lipase extracellulaire LIP2** de *Y. lipolytica*
 Pignède et al. **2000 Appl Environ Microbiol** **66**(8) 3283-9



Lipase MS1819 pour traitement d'insuffisance pancréatique exocrine (EPI)
 Essais cliniques Phase 2 pour fibrose kystique et pancréatite chronique

- 2000s : *Y. lipolytica* utilisée comme plateforme de production d'époxide hydrolases, enzymes permettant la **synthèse d'énantiomères purs** de composés pharmaceutiques
- **Nouvel objectif : ERTs de maladies du stockage lysosomal** (40aine maladies rares)
 - ingénierie de la **N-glycosylation** -> souches *Y. lipolytica* GM pour la production d'enzymes lysosomales humaines recombinantes à haut niveau de **Man-6-Ph** : permet à ces protéines thérapeutiques de **cibler les lysosomes** dans les cellules des patients



Collaboration **Univ. of the Free State** (Bloemfontein, ZA) / **INRA** pour l'expression d'époxide hydrolases dans *Y. lipolytica*

2002



Glucosidase α Acide humaine recombinante (+Man6Ph) OXY2810



Start-up Oxyrane (ZA) puis Oxyrane (GB, USA, Belgique) : **niveau de production industriel** (réacteurs de 35000 L)

ERT de la **Maladie de Pompe** (surcharge lysosomiale en glycogène par déficience en GAA (α -1,4-glucosidase acide))

Essais cliniques **GCCase** (glucocerebrosidase) pour **Maladie de Parkinson** et **GCCase+Man6Ph** pour **Maladie de Gaucher**



Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
 C. Madzak

Tiels et al. **2012 Nat Biotechnol** **30**(12) 1225-31

► Potentiel biotechnol. • *Y. lip.* GM source de protéines recombinantes

- 2000s : développement du 1^{er} système d'expression/sécrétion chez *Y. lipolytica* (cf. p. 13)
- Commercialisation d'un **kit** : atout considérable pour "démocratisation" de *Y. lipolytica*

Partenariat
compagnie
biotechnologie



2002



2006

2011

Yeastern (Taïwan) / INRA pour le développement du kit YLEX



Commercialisation **kit YLOS** (one-step transformation of *Y. lipolytica*) et **kit YLEX** (expression/secretion of heterologous proteins in *Y. lipolytica*)



Revendeur (Belgique) produits **Yeastern** pour Europe, USA et Canada

- *Y. lipolytica* utilisée comme **plateforme de production** de protéines hétérologues par une compagnie de biotech. (France) spécialisée dans l'ingénierie de protéines pour l'industrie

Découverte, optimisation par ingénierie et production d'enzymes recombinantes
Développement de procédés innovants pour applications biotechnologiques industrielles



2001



filiale de

filiale de

Capacités de production "multi-scale" : échelles du laboratoire / pilote / industrielle



Fournisseur de grands groupes mondiaux Pharmacie / Chimie
Fabricant de produits propriétaires

Activités : Chimie fine pharmaceutique (65 % chiffre d'affaires 2013)
Chimie fine de performance (17 %)
Nouvelles technologies / Biotechnologies (11 %)
Parfumerie, arômes et cosmétiques (7 %)

Approche Cleantech : utilisation ressources naturelles, réduction toxicité et déchets / **Eco-technologies**

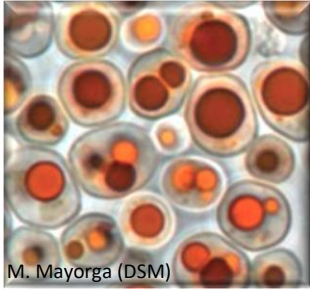
INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

► Potentiel biotechnol. de *Y. lipolytica*

• Applications Food / Feed

- Ingénierie voies métaboliques de *Y. lipolytica* pour production de **caroténoïdes** (cf. p. 18)



2005

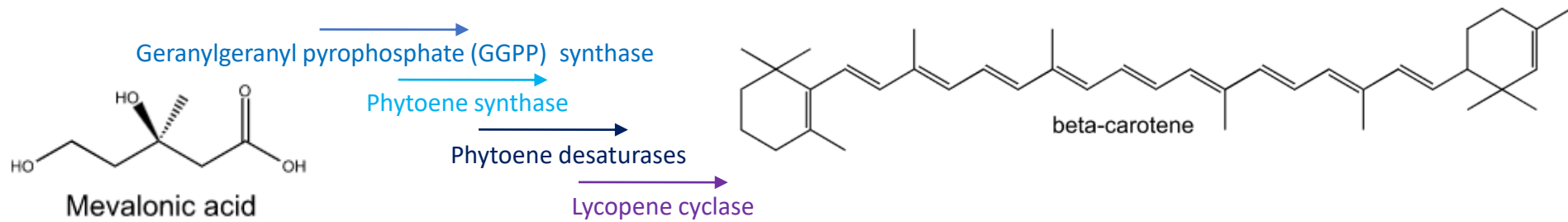


filiale de



2 compagnies (USA) concurrentes pour développer plateformes de production de caroténoïdes (β -carotène) par *Y. lipolytica* GM (colorant/antioxydant Food/Feed)

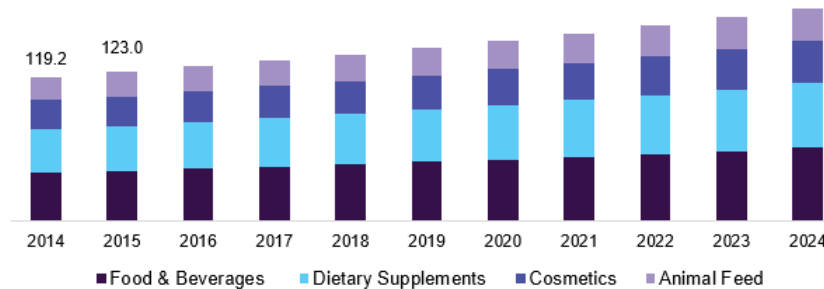
Microbia : auto-affirmation GRAS pour β -carotène produit par *Y. lipolytica*



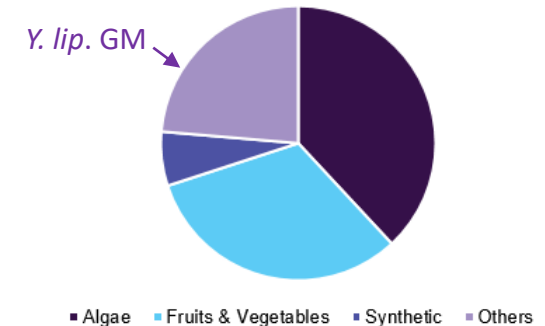
Leaders marché mondial β -carotène :



U.S. beta-carotene market by application, 2014 - 2024 (USD Million)



Global beta-carotene market share by product, 2016 (%)



► Potentiel biotechnol. de *Y. lipolytica* • Applications Food / Feed

- Forte demande de **sources alternatives** aux huiles de poisson pour les **PUFA ω -3**
- Ingénierie des voies métaboliques de *Y. lip.* pour la production d'acides gras ω -3 (cf. p. 6)
- **A. linoléique LA (ω -6)** principal PUFA de *Y. lipolytica* -> **a. eicosapentaénoïque EPA (ω -3)**
- 2007 : brevet **Dupont (USA) biomasse *Y. lipolytica* et SCO enrichies en EPA**
 - EPA biomasse -> **Feed pisciculture** : supplémentation alimentation saumons en ω -3
 - démarche Ecologie/Bioéconomie : alternative biomasse poissons sauvage (surpêche)
 - “harmoniously raised salmon Verlasso™” en joint venture avec AquaChile (Chili) :



- EPA SCO -> **Food complément alimentaire riche ω -3 Newharvest™**, bénéfiques Santé
 - démarche Ecologie/Bioéconomie : alternative végétarienne aux huiles de poisson
 - mais pas publicité en tant qu'OGM : “sélection souches levures” / blogs discutant OGM
 - réponse de Dupont sur aspect pb OGM : “no comment”



INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

newharvest™

2010

GRAS

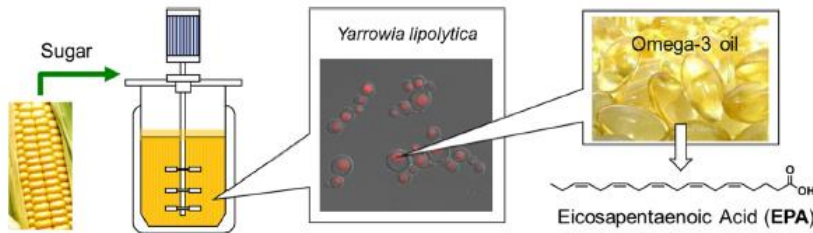
Stop
2013



► Potentiel biotechnol. de *Y. lipolytica*

• Ingénierie synthèse d'EPA

- Ingénierie "BM traditionnelle" de *Y. lipolytica* pour la production d'acides gras ω -3
- Plateforme de production de différents ω -3 (EPA, DHA) et/ou ω -6 (ARA, GLA) :



Xue et al. 2013 Nat biotech 31 734–740

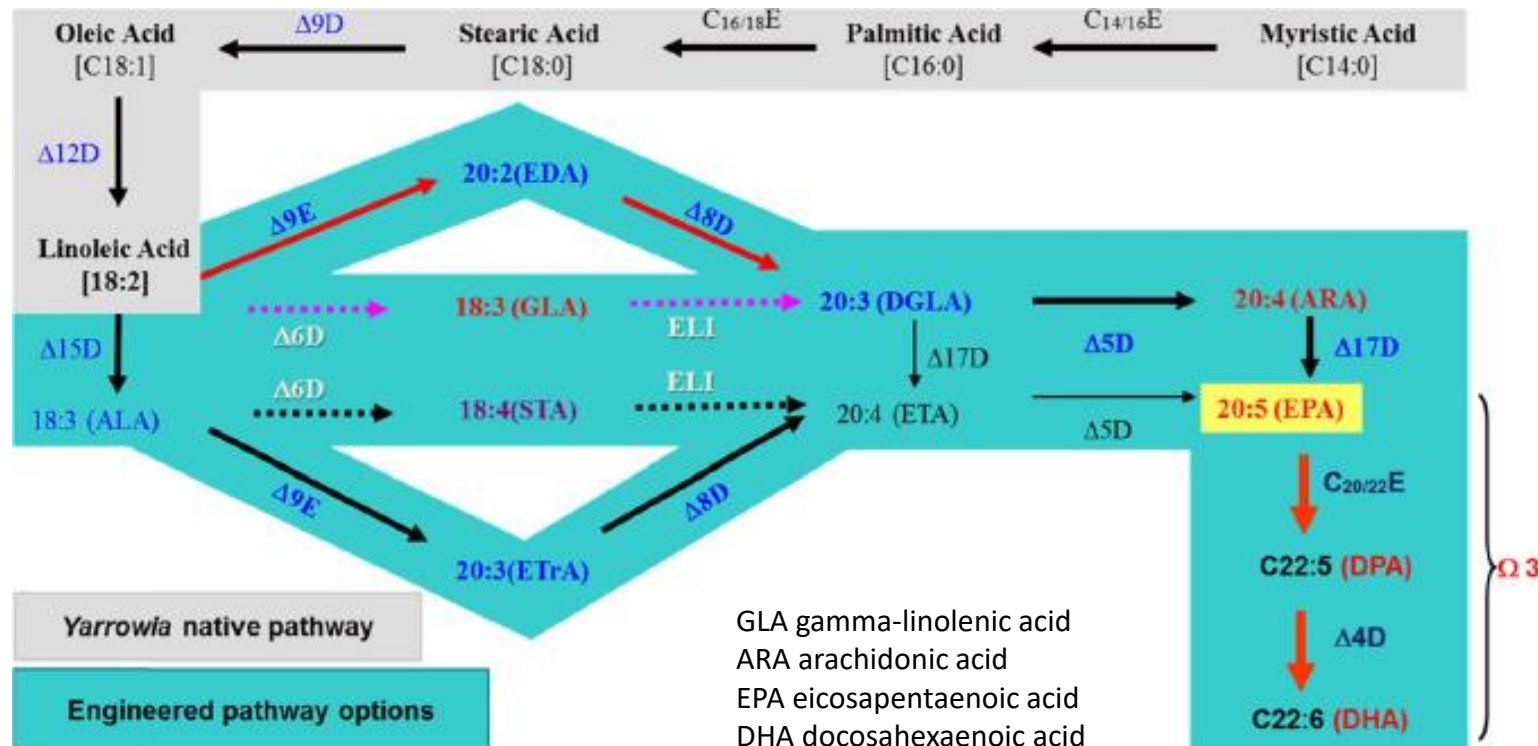
Xie et al. 2015 Appl Microbiol Biotechnol 99 1599–1610
Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered Yarrowia lipolytica: from fundamental research to commercial production

- overexpression d'une combinaison d'enzymes pour la synthèse d'EPA
- ajustement des niveaux d'expression des enzymes (choix promoteurs)
- modification du métabolisme des lipides
- disruption d'un gène de biogénèse des peroxisomes

-> souche optimisée :
EPA 25% DCW et
50% des lipides

- optimisation du procédé
- scale-up de fermentation

-> meilleure source EPA



GLA gamma-linolenic acid
ARA arachidonic acid
EPA eicosapentaenoic acid
DHA docosahexaenoic acid

INRAE

► Potentiel biotechnol.

- Apports de la compartimentalisation

■ Certaines voies métaboliques naturellement compartimentalisées dans les organites : intérêt de compartimentaliser les modifs du métabolisme pour efficacité max. (cf. p. 15-16)

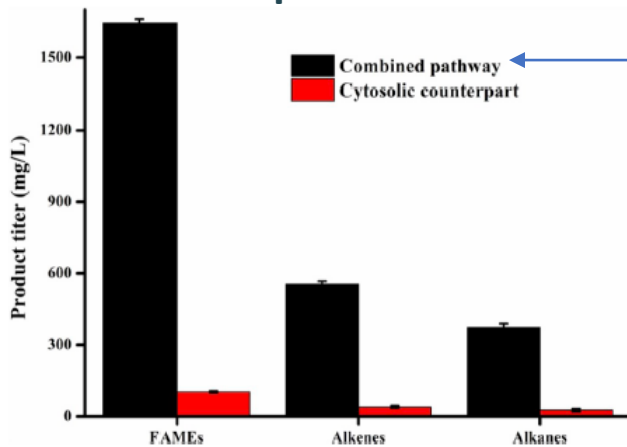
■ Ex. de production biocarburant "biofuel" (FAMES, alcanes, alcènes) par *Y. lipolytica* GM

FAMES : fatty acids methyl esters (esters méthyliques d'acide gras), utilisés comme biocarburants (gazole)

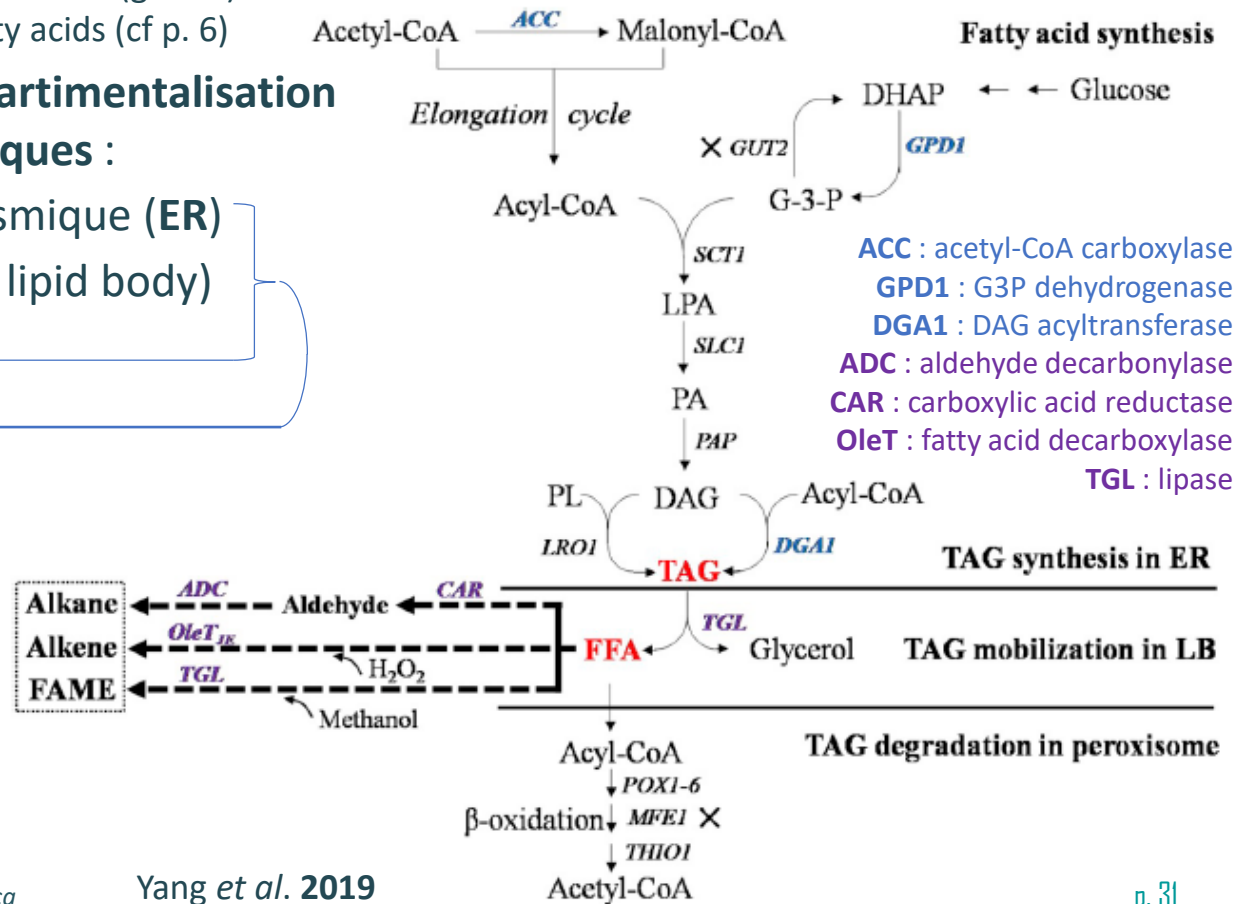
TAG : triacylglycérols / FFA : free fatty acids (cf p. 6)

■ Effet très positif de la **compartimentalisation des modifications métaboliques** :

- dans le Reticulum Endoplasmique (ER)
- dans le corps lipidique (LB, lipid body)
- dans le **peroxisome**



Enzymes : **surexprimés** ou **hétérologues**, X = délétés



INRAE

Applications et ingénierie de *Y. lipolytica*
C. Madzak

Yang et al. 2019
Metab Eng 55 231-238

► Potentiel biotechnol. de *Y. lipolytica*

• Nouveaux substrats

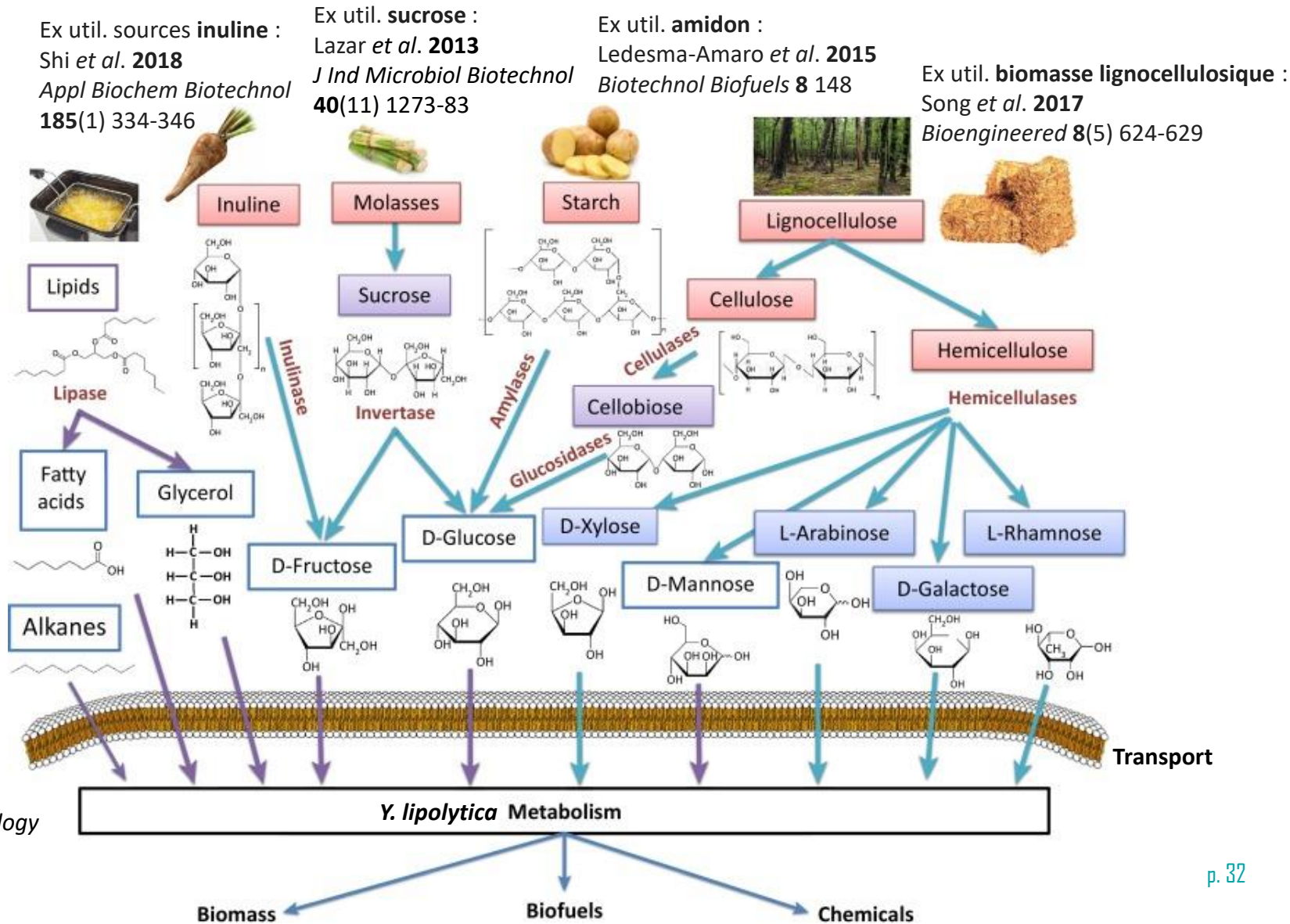
▪ Aspect fondamental de **Bioéconomie** : utilisation de **sources C renouvelables / déchets**

Voies métaboliques :

natives
ingénierie génétique

Substrats :
naturels (wt)
nouveaux (GM)
monomères
oligomères
polymères

d'après Ledesma-Amaro & Nicaud 2016
Trends in Biotechnology
34(10) 798-809



Applications et ingénierie de la levure *Yarrowia lipolytica*

› Quelques revues supplémentaires sur le sujet :

- Integrating **Cellular and Bioprocess Engineering** in the Non-Conventional Yeast *Y. lipolytica* for **Biodiesel Production**: A Review. Xie **2017** *Front Bioeng Biotechnol* **5** 65
- Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in **Biotechnological Applications**: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. Madzak **2018** *Mol Biotechnol* **60**(8) 621-635
- **Alternative Substrate** Metabolism in *Y. lipolytica*. Spagnuolo *et al.* **2018** *Front Microbiol* **9** 1077
- ***Yarrowia lipolytica*: more than an oleaginous workhorse**. Miller & Alper **2019** *Appl Microbiol Biotechnol* **103**(23-24) 9251-9262
- Advances and opportunities in **gene editing and gene regulation** technology for *Yarrowia lipolytica*. Ganesan *et al.* **2019** *Microb Cell Fact* **18**(1) 208
- Bioreactor-Scale Strategies for the **Production of Recombinant Protein** in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. Vandermies *et al.* **2019** *Microorganisms* **7**(2) 40
- ***Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications**: How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. Madzak **2021** *J Fungi* **7**(7) 548