

LES LEVURES INDUSTRIELLES AMELIORATION PAR FUSION DE PROTOPLASTES

Chez les levures, Les caractères recherchés en industrie sont:

- L'osmotolérance
 - L'alcool tolérance
 - L'acidotolérance
 - La gazogénie
 - La floculation
 - La croissance sur lactose
 - La production d'éthanol
-
- La résistance à la pression ou osmotolérance permet de réduire la quantité d'eau de dilution de la mélasse qui contient environ 50 % de saccharose . Permet d'éviter la contamination du mout par les bactéries acidophiles plus particulièrement les bactéries lactiques qu'on retrouve souvent dans les fermentations alcooliques .
 - L'acidotolérance permet le prolongement de la durée de croissance et la limitation des contaminations bactériennes
 - L'alcoolotolérance: Ce caractère est d'une grande importance dans les industries de fermentation .La croissance n'étant pas limitée par l'alcool, il en résulte une forte production de ce métabolite dans les mouts de distillation

LA FLOCCULATION

C'est l'une des propriétés importantes des levures exploitée industriellement. Dans les fermentations en batch, les levures floculentes sédimentent facilement au fond des cuves, réduisant considérablement le coût de la séparation entre les cellules et le produit.

Dans les fermentations en continue, les cellules hautement floculentes permettent l'utilisation de fortes concentrations cellulaires ce qui favorise une bonne productivité.

DEFINITIONS

La floculation est un phénomène biologique qui affecte des cellules vivantes.

Elle se manifeste par la formation d'amas cellulaires et peut concerner l'agrégation de cellules d'une même espèce (auto floculation), ou de différentes souches de levures ou autres espèces de micro-organismes (co floculation). La floculation des levures est un phénomène complexe qui est soumis à l'influence de nombreux paramètres dont ceux liés aux.

- Facteurs génétiques
- Facteurs physiologiques
- Facteurs nutritionnels
- Facteurs de l'environnement cellulaire

En outre le phénomène de floculation est observé dans plusieurs systèmes biologiques très différents qui sont en fait des réactions d'agrégation, d'adhésion ou de floculation tel que:

- Réaction anticorps, antigène
- Agrégation des bactéries
- Formation de biofilms
- Production de mycélium chez les champignons
- Agrégation cellulaire des moisissures dans les boues

Floculation des levures

Au départ 2 subdivisions, les souches sont :

Non Floculantes, Floculantes

Puis 4 classes ont été proposées notamment pour les levures de brasserie:

Classe I: Les levures restent dispersées pendant toute la fermentation, elles ne sont pas floculantes, elles forment des agrégats de moins de 10 cellules

Classe II: Les levures restent dispersées pendant la plus grande partie de la fermentation la elles forment des flocons peu compacts d'environ 1000 cellules à la fin de la fermentation.

Classe III: Les levures flocculent vers la fin de la fermentation en formant des masses solides qui sédimentent au fond de la cuve

Classe IV : Les levures flocculent fortement des les premiers stades de la par suite de la non séparation des cellules filles formées par les cellules mères

Mesure de la floculation

Les diverses techniques décrites sont classées en trois catégories.

Technique de sédimentation

Ces techniques ont été développées par Burns. Et Helm puis modifiées par Patel et Ingledew.(1975)

Un volume connu d'une suspension de levures est centrifugé pendant 10 minutes à 2000g dans un tube conique de 15ml gradué et calibré.

Le culot de centrifugation est lavé avec une solution d'EDTA 10mM, pH 4.5, puis 3 fois avec de l'eau distillée.

Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 10ml de tampon acétate de Helm dont la composition est la suivante :

CaSO ₄ -----	0.51g
CH ₃ COONa-----	6.80g
CH ₃ COOH (glacial)-----	4.05ml
Eau distillée qsp-----	100ml

Le pH est de 4.5 .

La concentration cellulaire doit être ajustée à 0,1 g /l

Après agitation énergique, les tubes sont laissés à température ambiante 10 à 60 mn, le volume du culot de sédimentation ou le volume du surnageant est mesuré au cours du temps.

Le degré de floculation des levures est alors donné par la valeur de ce volume au temps 10 minutes.

Cette technique évalue surtout la taille des agrégats et convient aux levures très flocculantes.

- **Technique Spectroscopique**

Ces techniques évaluent essentiellement le nombre des agrégats et consistent à suivre l'évolution de la densité optique d'une suspension de levure de concentration donnée, dans un tampon approprié (le plus souvent, tampon acétate de Helm) au cours d'un laps de temps défini.

Ces techniques exigent une faible concentration de levure, cependant elles n'ont qu'une portée qualitative et sont mal appropriées pour juger les levures très floculantes.

La technique visuelle peut être associée à des mesures spectroscopiques. Selon le protocole préconisé par Artel et Ingledew. (1975) : 10 ml d'une suspension de levure (milieu de culture ou tampon acétate de Helm) sont placés dans un tube calibré de colorimètre ou dans la tubulure latérale des fioles d'ermeneyer, après agitation énergique, on note l'absorbance à 620 nm (DO1).

La suspension de levure est ensuite laissée au repos pendant un laps de temps à la température ambiante et l'absorbance est notée (DO2).

Le degré de floculation peut être exprimé de deux manières :

Par le rapport $(DO2/DO1) \times 100$

qui représente le pourcentage des cellules restées en suspension après le temps optimal de repos. La valeur du rapport peut être rapportée à l'échelle

le degré de floculation est exprimé quantitativement à l'aide d'une échelle de graduation subjective

Types de levures	DF	$(DO2/DO1) \times 100$
• Levures extrêmement floculantes	5	0
• Levures très floculantes	4	0 à 10
• Levures modérément floculantes	3	10 à 30
• Levures faiblement floculantes	2	30 à 60
• Levures très faiblement floculantes	1	60 à 90
• Levures non floculantes	0	100

Implication de la paroi

La paroi constitue le siège des contacts intercellulaires au moment de la floculation.

De nombreuses études ont tenté de clarifier son rôle et sa participation dans ce phénomène.

En effet des parois isolées de levures floculantes reproduisent les mêmes caractères **de floculation que les cellules mères dont elle sont issues.**

Les mannanes sont des macromolécules de longues chaînes d' α (1-6) D-mannose renfermant de courtes chaînes d' α (1-2) et d' α (1-3) D-

mannose. Liées à la protéine par l'intermédiaire de 2 molécules NAG pour constituer les Mannoprotéines.

Fortement antigénique comportant de nombreux épitopes dont certains sont responsables du sérotype de *C. albicans*.

Localisés dans la couche la plus externe de la paroi des champignons et des levures en particulier.

Facilement relégués dans les tissus environnants et dans l'organisme qu'ils parasitent.

Les résultats de l'ensemble de ces travaux ont conduit à des hypothèses variées :

Interaction par diverses liaisons entre autres, hydrophobes, hydrophiles, électrostatique,

La formation d'agrégats serait due à l'interaction entre les différents groupements ioniques parmi lesquels les groupements anioniques seraient dominants. Cependant les types d'anions impliqués sont très discutés.

Ainsi pour certains auteurs, ce sont les groupements carboxyliques des protéines de surface qui sont impliqués dans la formation de ponts salins ; pour d'autres auteurs) ce sont les groupements phosphates des phosphopeptidomannanes qui sont impliqués.

les liaisons seraient stabilisées par des ponts hydrogènes impliquant les groupements hydroxyles des structures glucidiques de la surface cellulaire, mais ce sont les groupements carboxyliques de la partie peptidique qui seraient responsables de la formation de ces ponts entre les cellules..

Théorie des ponts calciques

La formation de ponts soit calciques, soit avec d'autres ions entre:

les groupements carboxyliques ou phosphates des phosphopeptidomannanes composants la couche externe de la paroi.

Hydrophobicité

Récemment il a été trouvé une relation directe entre l'hydrophobicité des surfaces cellulaires et l'apparition de la floculation chez les levures.

L'hydrophobicité est la tendance qu'ont certaines substances non polaires à adhérer entre elles dans un environnement aqueux.

L'hydrophobicité a été également étudiée chez les champignons pathogènes, il se trouve qu'elle influence les propriétés d'adhésion des cellules et qu'elle contribue à la virulence chez ces Champignons.

Protéines de surface

Ce sont des protéines des surfaces cellulaires qui sont impliquées dans des propriétés d'hydrophobicité et de l'adhésion

Des facteurs de types protéiniques ont été identifiés dans ce sens .

L'initiation de la floculation de cellules de *Saccharomyces* est observé à l'arrêt de la division suite à la limitation en oxygène or l'hydrophobicité de cellule et maximale à ce moment.

Le présence de polycations dans le milieu augmente à la fois l'hydrophobicité et ces propriétés de floculation des surfaces cellulaires .

PROTOPLASTISATION

On utilise des méthodes enzymatiques non brutales et qui préservent l'intégralité structurale de la membrane. Et qui consiste à digérer la paroi avec les enzymes appropriées

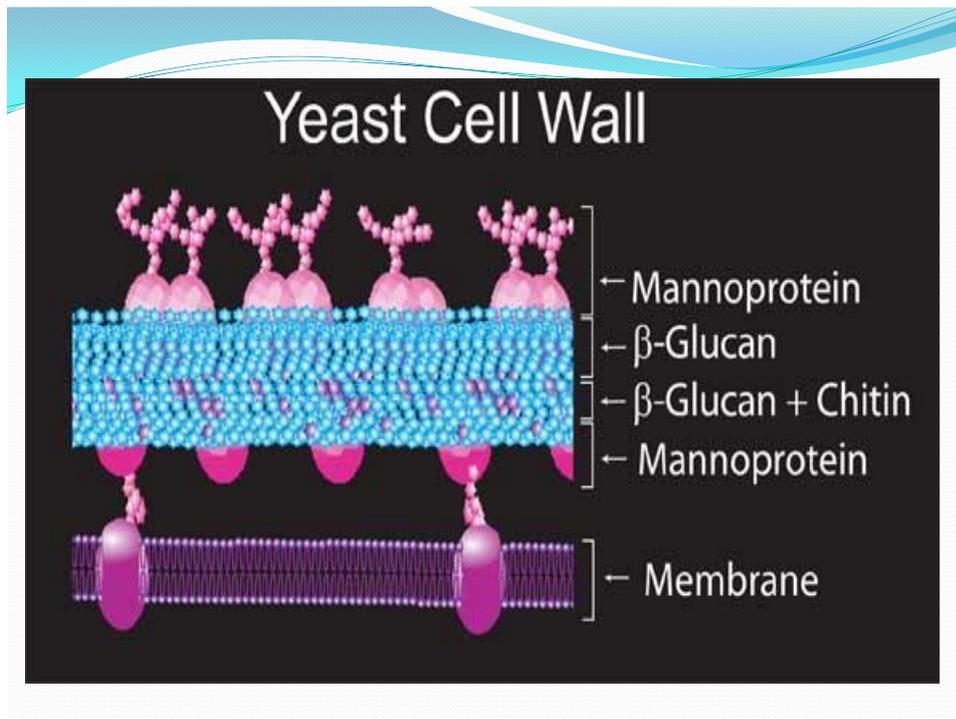
Les principaux rôles de la paroi est le maintien de la forme et de l'intégrité cellulaire, c'est une structure dynamique puisqu'elle est remodelée au cours de la division cellulaire, elle protège aussi la cellule contre les agressions environnementales

• **Les parois fongiques sont de nature polysaccharidique, on y trouve selon les groupes des homo et des hétéro polymères**

- **β 1.4 glucane (cellulose) chez les phycomycètes**
- **β 1.3 et β 1.6 glucanes (ascomycètes et basidiomycètes)**
- **β 1.4 glucosamines ou chitosane-(phycomycètes)**
- **β 1.4 N acétyl glucosamine ou chitine (ascomycètes et basidiomycètes)**

Chez les levures on rencontre des:

- **-Hétéro polymères dont l'hydrolyse libère du mannose, galactose, glucose , N acétyl glucosamine, des peptides ,minéraux**



Les glucanases sont nécessaires pour la conversion des cellules en sphéroplastes. Un grand nombre de préparations enzymatiques commerciales ont été utilisées avec des résultats variables, la préparation la plus utilisée est un produit extrait du tube digestif *d'Hélix pomatia* .

Préparation des Escargots

Les escargots sont mis à jeuner pendant une semaine pour vider leur estomac puis ils sont plongés dans un bac rempli d'eau de robinet pendant 48h.

Suite à ce traitement, les escargots meurent, gonflent et deviennent faciles à disséquer

- Après élimination des coquilles, l'escargot est fixé sur une plaque de liège, puis disséqué pour mettre en évidence l'estomac. Le suc digestif est ensuite aspiré à l'aide d'une seringue puis centrifugé à 2000 trm pendant 10 mn.
- Afin d'éliminer tous débris gastrique accompagnant le suc au moment de l'extraction.
- Le surnageant est lyophilisé ou utilisé immédiatement
- On retire environ 0,5 ml de suc digestif par escargot et équivalent à 4 mg de suc lyophilisé
- Ces volumes sont repartis dans des tubes à hémolyses puis lyophilisés.

Stérilité et conservation du suc digestif

L' Analyse du suc digestif par étalement sur une boîte de Pétri révèle une flore microbienne variée , l'addition de 3mg/ml d'ampicilline suffit à l' éliminer
Le suc digestif à l' état brut conservé à 4 °C garde son activité
Intacte durant une dizaine de jours.

cytohelicase

- Prés de 30 activités ont été détectées dans le suc **d'Helix pomatia** dont la principale activité est l'activité glucanase .
- Une préparation enrichie en glucanase est fabriquée sous le nom de **cytohelicase** par IBF(France) et **glusulase** par Endolaboratory(USA).

Zymolase

Une deuxième source de glucanases est utilisée, elle contient moins de contaminants enzymatiques ,c'est la **zymolase** ,une préparation obtenue à partir des surnageants de culture **d'Arthrobacter luteis**

La zymolase contient également quelques activités **protéases** en plus de l'activité (**β 1,3**) **glucanase**, mais ces deux activités sont nécessaires à la dégradation totale de la paroi.

D'autres préparations sont également utilisées pour transformer des cellules en protoplastes ,ce sont les enzymes lytiques obtenus à partir de **cytophaga sp.**

Des associations **d'helicase et de chitinase sont souvent nécessaires** notamment pour les protoplastisation de champignons filamenteux

Technique de protoplastisation

Les levures sont récoltées par centrifugation , elle subissent d'abord un **prétraitement** en présence de :

Dithiotréitol ou de mercaptoethanol dans un tampon EDTA 0.025 m à pH7 à 30°c pendant une trentaine de minutes .

Traitement enzymatique

Pour le **traitement enzymatique** proprement dit ,

Les cellules sont lavées puis remises en suspension dans un tampon protégé isotonique (Na₂ HPO₄ 0.15 M, acide citrique 0.05M et KcL 0.6 m Ph 5.8)

- - La suspension est incubée à 37° pendant 1 à 3 heures en présence de 4mg de cytohelicase et homogénéisée par agitation douce.
- La cinétique d'obtention de protoplastes est suivie à l'aide de comptage à la cellule de Malassez des cellules non lysées dans l'eau distillée.

- Les parois sont éliminées par centrifugation .Les protoplastes doivent être conservés en milieu isotonique.

Rendements

Le rendement de la formation des protoplastes est lié à plusieurs facteurs dont :

- La nature des enzymes utilisées et leur spécificité
- La souche de levure et la structure de la paroi
- L'action préalable des thiols
- L'âge des cellules utilisées.....etc

La FUSION

Objectifs en microbiologie industrielle:

- Amélioration des souches industrielles
- Screening des caractères intéressants en industrie
 - Fusion inter génériques (*Klactis et S.cerevisiae*)
 - Fusion interspécifiques (*S.cerevisiae et S.uvarum*)
 - Fusion intraspécifiques (entre 2 souches de *S.cerevisiae*)
- Bien que les protoplastes aient été obtenus chez *Saccharomyces cerevisiae* des 1955,
- la fusion n'a pu être réalisée chez cette espèce qu'après la découverte par Kao et wallace en 1974 du polyéthylène glycol qui est considéré actuellement comme un agent fusogène universel.
- L'amélioration génétique ne peut être réalisée que par le transfert en bloc du pool de gènes qui le contrôle. Ceci est aujourd'hui possible grâce à la technique de fusion des protoplastes.
- Le polyéthylène glycol agit par déshydratation de l'espace intercellulaire
- En provoquant la déshydratation. le PEG tend à éliminer l'une des 2 forces qui maintiennent en permanence une distance intercellulaire de 20 nm:
- la force d'hydratation et la force due aux charges négatives de surface.
- Après rapprochement, il ya agglutination des protoplastes, formation d'agrégats de différentes tailles et gonflement des membranes mises en contact, les protéines se transloquent et s'agrègent, laissant libre les lipides à réaliser des interactions.
- De courts ponts cytoplasmiques se forment, s'élargissent et les cellules fusionnent.

- La nouvelle souche issue de la fusion renferme alors un patrimoine génétique qui correspond aux 2 parents pouvant ainsi augmenter la productivité par effet synergique de gènes recombinés
- Grâce à la fusion des protoplastes on a pu lever les barrières naturelles qui limitent ou empêchent l'échange de gènes entre les microorganismes d'espèces ou de genres différents
Cependant la fréquence des recombinants obtenus est de l'ordre de 10⁻³
- Le seul inconvénient des produits de fusion obtenus est leur instabilité et celle-ci augmente avec l'éloignement phylogénique des souches à hybrider
- Cette technique a joué un rôle déterminant dans l'amélioration de la production d'un grand nombre de substances chez la levure si bien qu'actuellement les levures sont économiquement et quantitativement le plus important groupe de MO exploités industriellement

Technique

- Un ml de la suspension de protoplastes de chaque souche est centrifugé à 2000 trm pendant 10 mn. Le culot est resuspendu dans 4 ml dans KCL 300 mM puis centrifugé de nouveau à 2000 trm . Enfin le culot le culot est resuspendu dans un tampon cacl₂ 400 mM
- pour réaliser la fusion :
- 1ml de chaque suspension de protoplastes sont mélangés dans un tube à hémolyse puis centrifugé à 2000 trm pendant 20mn
- Le culot est ensuite resuspendu dans 1ml de tampon polyéthylène glycol tris cacl₂ puis incubé 30 mn à 30 °c.

Régénération

- La régénération des parois en milieu liquide agité est plus au moins complète ,et ne permet probablement pas l'insertion complète des molécules.
- la régénération complète de la paroi est favorisée par **une viscosité élevée** du milieu.
- Le gel favorise très probablement l'achèvement de la synthèse pariétale en empêchant la diffusion des précurseurs de la matrice pariétale dans le milieu environnant.
- La régénération des protoplastes dans un milieu liquide contenant du polyéthylène glycol (PEG) est nettement améliorée

En pratique courante, on considère que la paroi est régénérée lorsque les cellules redeviennent **stables dans le milieu dépourvu de protecteur osmotique et leur aptitude à se multiplier**

- A partir de la dernière suspension qui contient les produits de fusion, on effectue une dilution de 10^{-3} dans KCL 600 mM.
- A 0,1 ml de cette dilution on ajoute 2,5 ml de Ca Cl₂ 800 mM et 2,5 ml de milieu sélectif à 3% d'agar maintenu en surfusion à 45 °C
- L'ensemble est agité puis étalé sur milieu sélectif à 2 % d'agar. La régénération dure 2 à 3 jours à 30 ° C.
- D'autres méthodes associent 12 % de gélatine à 0,4 % d'agar.
- Pour cela, à 15 ml de milieu YPD gélatiné maintenu à 35 °c sont ajoutés à 0,2 ml de la dilution 10^{-3} précédemment préparée.
- L'ensemble est incubé à 25 °c pendant 4 jours
- Les étapes suivantes concernent le criblage des produits de fusion intéressants sur la base des propriétés recherchées