



HAL
open science

Déprotéinisation et bioconversion de la chitine d'exuvies d'insectes par *Yarrowia lipolytica*

Catherine Madzak, Idriss Aït-Tahar

► To cite this version:

Catherine Madzak, Idriss Aït-Tahar. Déprotéinisation et bioconversion de la chitine d'exuvies d'insectes par *Yarrowia lipolytica*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-04183210

HAL Id: hal-04183210

<https://hal.inrae.fr/hal-04183210v1>

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.



Université de Technologie de Compiègne
Génie Biologique

Étudiant : AÏT-TAHAR Idriss

Tuteur UTC : MERLIER Franck

Semestre : Printemps 2022

Étude la déprotéinisation et de la bioconversion de la chitine d'exuvies d'insectes par les levures *Yarrowia lipolytica* et caractérisation de ses produits de dégradation

Projet de recherche franco-canadien du programme **Samuel de Champlain**

Organisation : | **INRAE**, UMR SayFood
| **Université Laval**, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de
| l'Alimentation

Lieu : | **Thiverval-Grignon**
| **Québec**

Responsable : **Dre MADZAK Catherine**



Avant-propos

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord l'UTC, INRAE et l'Université Laval pour m'avoir permis de réaliser ce stage technique d'assistant chercheur et pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en acceptant ma candidature. J'ai eu la chance de vivre 24 semaines riches et variées, me conduisant à un enrichissement professionnel et personnel certain.

Ainsi, je remercie sincèrement Mme Catherine MADZAK, ma responsable de stage, de m'avoir encadré, soutenu et guidé durant toute l'intégralité de celui-ci. Je la remercie pour sa patience et sa bienveillance à mon égard et pour m'avoir transmis son goût, sa vision et sa passion pour la recherche scientifique.

Je tiens également à remercier, très chaleureusement, M. Éric DUGAT-BONY, coordinateur du projet, pour m'avoir accueilli très chaleureusement au sein du laboratoire de l'INRAE. Toujours enclin à délivrer de précieux conseils, je le remercie pour son énergie et la façon avec laquelle il s'est rendu disponible pour suivre l'avancée de ce stage et continuer à le faire lorsque j'étais au Canada.

Je remercie grandement M. Alain DOYEN, coordinateur du projet, de m'avoir accueilli au sein de son équipe canadienne et pour m'avoir prodigué de nombreux conseils et avoir su me communiquer une part de sa rigueur scientifique. Merci à lui pour son dynamisme et sa faculté à distiller sa passion pour la recherche aux membres de son équipe, moi y compris.

Je tiens aussi à remercier Mme Lucie BEAULIEU, coordinatrice du projet, pour sa générosité, sa disponibilité et pour le suivi de ce stage. Je la remercie pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a réservé, ainsi que pour ses qualités humaines et scientifiques.

Je remercie également, très chaleureusement, Véronique PERREAULT et Ariane TREMBLAY, toutes deux professionnelles de recherche au sein de l'équipe du Dr Alain DOYEN et de la Dre Lucie BEAULIEU respectivement. Un immense merci pour le réel soutien qu'elles m'ont apporté ainsi que pour leur grande disponibilité. Je les remercie pour toute l'énergie et l'enthousiasme dont elles ont fait preuve pour m'accompagner dans mes expérimentations au Canada.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à tous les membres des deux laboratoires de recherche pour leurs aides ainsi que pour les nombreux partages de connaissances. Plus particulièrement, un grand merci à Anne-Sophie SARTHOU, Christophe MONNET, Gwendoline COEURET, Jérôme DELETTRE, Julia GENDRE, Vincent HERVE, de l'équipe CoMiAl. Un grand merci à Diane GAGNON, Alexia GRAVEL, Geneviève PELLERIN, Yosra BEN-FADHEL, Ugo BERTHELOT, Romuald GAILLARD et Florence DUBOIS-LAURIN de l'équipe du Dr Alain DOYEN. Travailler dans ces équipes respectives était un plaisir de par leur personnalité et l'excellente ambiance qu'il y régnait.

Je remercie également à Thierry FEUGNET, Laurence FRUCHART et Yveline PHILLIPE de m'avoir soutenu et aidé dans mes démarches d'immigration au Canada, me permettant ainsi de partir dans des conditions idéales.

Résumé technique :

Le projet de recherche dans lequel s'inscrit mon stage a pour objectif de réaliser la bioconversion de la chitine présente naturellement dans les exuvies d'insectes par l'utilisation des levures *Yarrowia lipolytica*. En effet, la chitine présente diverses propriétés biologiques d'intérêt¹. De plus, sa valorisation en dérivés chitiniques permet d'obtenir du chitosan et des chito-oligosaccharides, composés d'intérêt dans les secteurs nutraceutiques et pharmaceutiques et à haute valeur ajoutée^{2,3}.

Actuellement, seules des méthodes chimiques⁴ à fort impact environnemental permettent de valoriser la chitine issue de divers organismes vivants (crevette, crabe, homard, etc.) incluant les exuvies d'insectes. Ce projet présente donc un caractère extrêmement novateur, car il propose de développer une voie de conversion biologique de la chitine via l'utilisation de levures. L'ensemble de la méthodologie, des résultats et de la discussion qui y sont associés sont détaillés dans les sections suivantes.

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ TECHNIQUE :	4
SOMMAIRE	5
INTRODUCTION	7
1. PRÉSENTATION DU GROUPE	8
2. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	10
2.1 L'INTÉRÊT DE LA VALORISATION DES EXUVIES D'INSECTES	10
2.2 LES PROCÉDÉS ET MÉTHODES ACTUELS DE VALORISATION DE LA CHITINE D'EXUVIE D'INSECTES.....	10
2.3 ÉTAT DE L'ART SUR <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> :	11
2.3.1 Les sources de carbone.....	11
2.3.2 Conditions physico-chimiques de la croissance	12
2.3.3 Sécrétion extracellulaire	12
PROBLÉMATIQUE	13
OBJECTIFS VISÉS	14
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES :	15
3.1 EXPLORATION DE LA BIODIVERSITÉ DE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> ET SÉLECTION DES SOUCHES LES PLUS EFFICACES	15
3.2 DÉTERMINATION D'UN SUBSTRAT OPTIMAL	18
3.3 LA CROISSANCE DES SOUCHES LES PLUS PERFORMANTES SUR EXUVIES COMPLÈTES.....	21
4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	22
4.1 EXPLORATION DE LA BIODIVERSITÉ DE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> ET SÉLECTION DES SOUCHES LES PLUS EFFICACES	22
4.1.1 <i>Ensemencement des souches sur boîtes de pétri</i>	22
4.1.2 <i>Tests d'activités protéolytiques</i>	24
4.1.3 <i>Influence de l'utilisation du patch</i>	25
4.1.4 <i>Mesures des halos sur l'ensemble des 30 souches</i> :	26
4.1.5 <i>Incertitude sur la souche W29</i>	26
4.1.6 <i>Estimation de la dégradation des lipides</i>	27
4.1.7 <i>Données générales de croissance des 30 souches sur milieu nutritif riche</i>	28
4.1.8 <i>Conclusion</i>	30
4.2 DÉTERMINATION D'UN SUBSTRAT OPTIMAL	31
4.2.1 <i>Maximiser la solubilisation des protéines des exuvies</i>	31
4.2.1.1 <i>Influence du pH et de la sonication</i>	31
4.2.1.2 <i>Étude de l'impact de l'autoclave et de la durée d'hydrolyse</i>	33
4.2.1.3 <i>Conclusion sur l'extraction protéique</i>	34
4.2.2 <i>Un substrat qui permet une croissance optimale</i>	34
4.2.2.1 <i>Croissance sur milieu non ajusté</i>	35
4.2.2.2 <i>Croissance sur milieu ajusté</i>	36

4.2.2.3 Impact de l'autoclavage et de la durée d'extraction :.....	39
4.2.3 Conclusion.....	40
4.3 LA CROISSANCE DES SOUCHES LES PLUS PERFORMANTES SUREXUVIES COMPLÈTES	41
4.3.1 La croissance des souches les plus performantes sur les exuvies complètes.....	41
4.3.2 La caractérisation de leurs produits de dégradation.....	45
4.3.2.1 Analyses protéiques.....	45
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	48
ANNEXES.....	49
BIBLIOGRAPHIE.....	74

Introduction

Le marché des insectes comestibles est en pleine expansion. Il est axé principalement au niveau de la nourriture animale (domestiques et d'élevage) mais il tend à s'ouvrir pour l'alimentation humaine. Plus spécifiquement, les insectes sont consommés par environ deux milliards de personnes dans le monde.⁵ L'entomophagie, en plus de l'apport nutritionnel qu'elle représente, semble répondre à plusieurs des contraintes liées aux enjeux économiques et environnementaux actuels. En effet, en 2014, la FAO (*Food and Agriculture Organisation*) a publié un rapport⁶ confirmant les avantages environnementaux, socio-économiques et nutritionnels inhérents à la consommation d'insectes.

Pour autant, un sous-produit de cet élevage, les exuvies, est aujourd'hui encore relativement peu, voire pas du tout valorisé. Également appelées "cuticules", elles forment l'exosquelette des insectes et sont récupérées lorsque ceux-ci muent. Il est considéré que, pour cent tonnes d'insectes produits par entomoculture⁷, deux tonnes et demie d'exuvies sont générées. Paradoxalement, alors même qu'il s'agit d'un déchet organique, à l'heure actuelle, c'est une voie chimique à fort impact environnemental qui permet de valoriser ces exuvies en composés de type chitosan et chito-oligosaccharides (ou COS) d'intérêt pour les secteurs pharmaceutiques⁸ et nutraceutiques⁹.

Ainsi, ce stage visait à développer une voie biologique permettant de bioconvertir les exuvies d'insectes en tant qu'alternative à la voie chimique traditionnelle ayant un fort impact environnemental. Plus spécifiquement, l'objectif principal était d'utiliser la fermentation de micro-organismes sur un substrat riche en exuvies d'insectes pour les valoriser et potentiellement les bio-convertir en composés d'intérêts.

Le projet de recherche était composé de deux phases principales. La première consistait à étudier, de manière approfondie, les capacités des micro-organismes à l'étude (levures) à se développer sur un milieu concentré en exuvies d'insectes. La 2^{ème} partie visait à améliorer ce procédé par l'utilisation de l'ingénierie génétique pour optimiser la production de composés d'intérêts par les micro-organismes en question.

1. Présentation du groupe

Après la Seconde guerre mondiale, la France a fait face à une pénurie alimentaire. Celle-ci était due, en autres, à un retard de son secteur agricole en comparaison à celui des autres pays développés. C'est dans ce contexte qu'est né, en 1946, l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), sa mission était de mettre la science et la technologie au service du développement agricole. Puis, le 1^{er} janvier 2020, il s'associe à l'Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (INRSTEA) pour former le groupe INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement).

En premier lieu, dans le but "nourrir la France"¹⁰, ses principaux objectifs ont traversé les époques, si bien qu'aujourd'hui INRAE a fait du "développement durable" son principal fer de lance. Ses thématiques actuelles regroupent un large panel de secteurs allant de la sécurité alimentaire jusqu'à la qualité de vie, en passant par des spécifiques aux changements climatiques, à la préservation de la biodiversité et des ressources, etc. ¹¹En ce sens, le projet de recherche, auquel j'ai pu participer par le biais de ce stage, s'inscrit dans une démarche de bioéconomie circulaire et durable.

Au même titre que le CNRS (Centre National de Recherche Scientifique) à l'échelle nationale, INRAE se place comme le leader de la recherche scientifique publique. Bien qu'à vocation nationale, ses thématiques de recherche sont très larges et son rayonnement demeure international.

L'organisation se divise en différentes Unités de Recherche, souvent sous forme d'unités mixtes de recherche (UMRs) associées à d'autres organismes de recherche : Universités, CNRS, écoles d'ingénieurs, etc. La première partie de ce stage (du 7 février 2022 au 30 avril 2022), s'est déroulée à l'UMR SayFood. Une unité partagée entre le campus de l'école AgroParisTech à Grignon et celui de Massy. Les deux seront réunis sur réunies sur le plateau de l'Université Paris-Saclay à compter du mois de septembre 2022. Au sein de cette unité, sous la cotutelle de INRAE, d'AgroParisTech et de l'Université Paris-Saclay, j'ai pu intégrer l'équipe CoMiAl (Commautés Microbiennes Alimentaires). Elle est l'une des cinq équipes de recherche de l'UMR qui regroupe 180 personnes dont 80 chercheurs et enseignants-chercheurs¹². Durant treize semaines, j'ai pu occuper le poste de stagiaire de recherche et accompagner la Dre Catherine MADZAK et le Dr Eric DUGAT-BONY dans leur projet.

La Dre Catherine MADZAK, chercheuse à INRAE est reconnue internationalement pour ses travaux précurseurs en lien avec l'expression hétérologue de protéines chez la levure non conventionnelle *Yarrowia lipolytica*.

Le Dr Eric DUGAT-BONY, chercheur à INRAE, possède une forte expertise sur les fermentations de produits alimentaires. Ses recherches visent à une meilleure compréhension des processus microbiens de biodégradation et au pilotage des écosystèmes microbiens dans les aliments fermentés.

Le projet de recherche en question a remporté un appel d'offre du dans le cadre du programme international Samuel de Champlain qui vise à "contribuer à l'excellence de la coopération universitaire et scientifique franco-québécoise, à son développement et à sa diffusion"¹³. Il est en partie financé par La Commission permanente de coopération franco-québécoise (CPCFQ). Il s'agit donc d'un projet de collaboration internationale entre l'équipe CoMiAL, et les équipes

de recherche du Dr Alain DOYEN et de la Dre Lucie BEAULIEU, tous deux rattachés au Département des sciences des aliments de la Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation de l'Université Laval au Québec. Ainsi, j'ai pu me joindre à eux dès le 1^{er} mai et ce pour les onze semaines suivantes.

Les recherches du Dr Alain DOYEN visent à optimiser l'extraction, la concentration et la purification de biomolécules à partir de coproduits alimentaires, incluant les produits d'insectes, via l'utilisation de procédés membranaires et à hautes pressions. La finalité de ces recherches étant la production de fractions enrichies en biomolécules et la production d'ingrédients alimentaires de nouvelle génération.

La Dre Lucie BEAULIEU est une experte de la valorisation des biomolécules marines à partir de coproduits marins. Plusieurs de ses projets utilisent l'hydrolyse enzymatique des constituants alimentaires pour la production de biomolécules d'intérêt (polysaccharides, peptides, etc.). Ce projet pluridisciplinaire nécessite l'expertise concertée de spécialistes dans des domaines très distincts. C'est dans ce cadre organisationnel que j'ai pu développer mes compétences au cours de ce stage.

2. Contexte scientifique

2.1 L'intérêt de la valorisation des exuvies d'insectes

Les exuvies d'insectes à l'étude proviennent de l'élevage de larves du *Tenebrio molitor*, plus communément appelés vers de farine.

Une étude de la composition des exuvies, réalisé en amont de ce stage, est présentée au sein Tableau n°1.

Tableau n°1 : Composition du lot d'exuvies d'insectes^A

Protéines (%)	Chitine (%)	Lipides (%)	Minéraux (%)
49,8 ± 0,5	19,8 ± 1,0	9,72%. ± 0,7	2,1 ± 0,2

Tel qu'attendu, les exuvies présentaient une teneur importante en chitine ($19,8 \pm 1,0\%$) validant ainsi l'objectif de récupérer ce constituant et obtenir des dérivées chitiques, notamment le chitosan et les COS qui sont des produits de dégradations. En effet, les COS possèdent des propriétés nutraceutiques et pharmaceutiques. Selon plusieurs études et notamment (Ilias Marmouzi, et al 2019),¹⁴ les COS auraient des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antidiabétiques. À cela s'ajoute que "les COS peuvent également être considérés comme des nutraceutiques potentiels en raison de leurs activités biologiques polyvalentes, de leurs propriétés hydrosolubles et de leurs propriétés d'absorption dans l'intestin", (Jae-Young Je, et al 2021)¹⁵. Le chitosan est un polymère très utilisé pour ses propriétés de mucoadhésivité, son pouvoir anti-inflamatoire, antioxydant, antimicrobien, antifongique, antitumoral et pour sa capacité à faciliter la cicatrisation des plaies¹⁶.

2.2 Les procédés et méthodes actuels de valorisation de la chitine d'exuvie d'insectes

Conventionnellement, la voie chimique permet d'effectuer la conversion des exuvies en chitosan et COS. Cependant, l'équipe du Dr. Doyen a généré, à partir d'exuvies de vers de farine, des COS (rendement de production de 56%) par voie enzymatique (pepsine et α -amylase utilisées pour les étapes de déprotéinisation et de conversion de la chitine en COS). Cette voie enzymatique permet de substituer certaines étapes chimiques. En effet, l'étape de désacétylation de la chitine en chitosan (soluble) est actuellement faisable uniquement par voie chimique puisque les enzymes nécessaires à la réalisation de cette étape sont extrêmement coûteuses.

La Figure n°1 présente les étapes successives de valorisation de la chitine des exuvies d'insecte par voie chimique et enzymatique.

^A Résultats non publiés

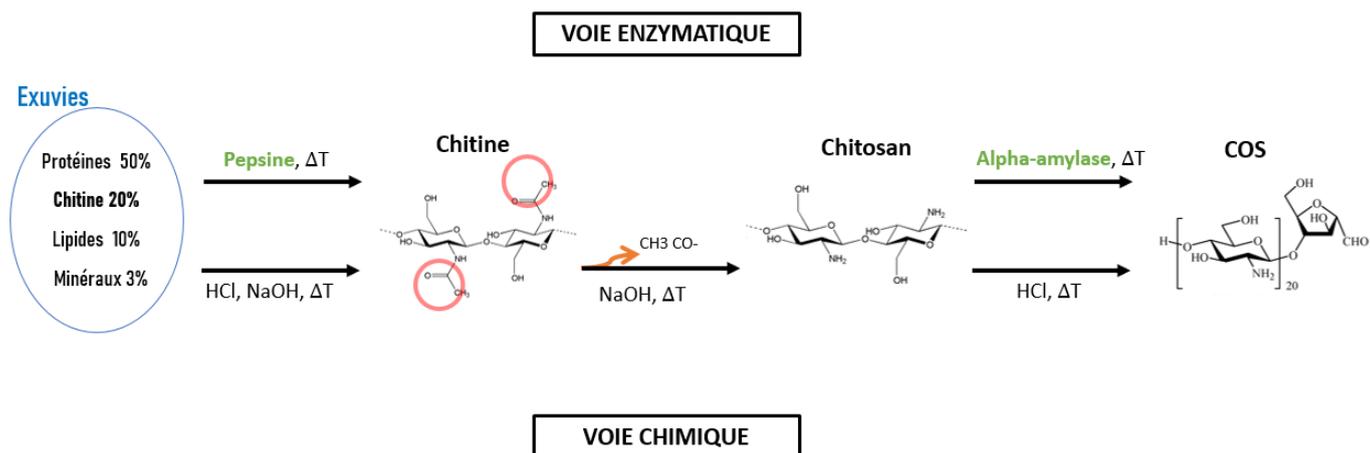


Figure n°1 : Schéma des deux voies de valorisation de la chitine d'exuvies d'insectes.

Les détails des protocoles et des méthodes sont présentés à l'**Annexe n°1**. Le potentiel d'utilisation de levures productrices d'enzymes pour la production de COS à partir de la chitine des exuvies d'insectes n'a jamais été testé. C'est dans cette logique que s'inscrit ce projet de recherche.

2.3 État de l'art sur *Yarrowia Lipolytica* :

Les micro-organismes choisis sont des levures, principalement celles du genre *Yarrowia* et de l'espèce *lipolytica*. Préalablement à la dénomination du genre *Yarrowia* pour cette levure, en 1980¹⁷, elle était attribuée par défaut au genre *Candida*, sa reproduction sexuée étant alors encore inconnue. *Y. lipolytica* est ensuite restée jusqu'en 2013 la seule espèce connue du genre *Yarrowia*. Depuis, 13 nouvelles espèces ont été décrites ou réattribuées à ce genre (NCBI Taxonomy Browser). Les isolats naturels sont dans la plupart des cas haploïdes¹⁸.

Après avoir attiré l'attention de certains industriels dès les années 1950, la levure oléagineuse non conventionnelle *Yarrowia lipolytica* est reconnue depuis plusieurs décennies, comme un hôte intéressant pour l'expression, la sécrétion et l'exposition de surface de protéines hétérologues¹⁹.

2.3.1 Les sources de carbone

Y. lipolytica est capable d'utiliser comme source de carbone un large éventail de substrats de nature hydrophile ou hydrophobe²⁰. Les sources de carbone hydrosolubles ne comprennent que quelques sucres (glucose, fructose, mannose) mais aussi du glycérol et, dans une moindre mesure, des acides organiques et des alcools. Les sources de carbone insolubles dans l'eau comprennent les acides gras, les triglycérides et les alcanes. En

Figure n° 20 : Figure récapitulatif des matériaux et méthodes des voies chimique et enzymatique permettant d'obtenir des COS

Annexe n°2 est présenté les différents substrats métabolisés par *Yarrowia lipolytica*.

Il sera noté que "la polyvalence globale que cette levure dans le choix des substrats possibles représente un atout précieux pour le développement de bioprocédés impliquant *Y. lipolytica*, notamment ceux basés sur la valorisation de sous-produits ou de déchets."²¹

Yarrowia Lipolytica est d'intérêt pour ses fortes capacités lipolytiques et protéolytiques. Ainsi, les isolats de type sauvage de cette levure proviennent généralement d'environnements riches en lipides et/ou en protéines, notamment de la viande et des produits laitiers (surtout ceux fermentés, tels que les saucissons secs et les fromages) et des eaux usées ou polluées par les hydrocarbures.

De plus, la gamme d'écosystèmes à partir desquels les souches ont été isolées s'est élargie pour englober des habitats très divers : les eaux marines²², les marais salants²³ et les sols (en particulier pollués²⁴ par les hydrocarbures) mais également des produits de consommation (les fruits, les légumes ou les fruits de mer) et même les excréments d'insectes ou de vertébrés²⁵. Finalement, *Y. lipolytica* est considérée comme un organisme d'importance écologique²⁶ capable de développer une symbiose avec certains insectes (coléoptères) et végétaux. Elle est également classée comme micro-organisme de niveau de sécurité biologique (BSL) 1²⁷.

2.3.2 Conditions physico-chimiques de la croissance

À l'inverse de beaucoup de levures hémiascomycètes, *Y. lipolytica* est un aérobie obligatoire, pour lequel la concentration en oxygène constitue un facteur limitant de croissance.²⁸ La température de croissance de prédilection est comprise entre 25 et 30 °C²⁹. *Y. lipolytica* est capable de se développer dans une large gamme de pH : la plupart des souches peuvent être cultivées à un pH de 3,5 à 8,0 et quelques-unes peuvent tolérer des pH inférieurs (2,0) ou même très élevés (9,7)³⁰.

2.3.3 Sécrétion extracellulaire

L'une des caractéristiques les plus intéressantes de ces levures est qu'elles secrètent naturellement une lipase, deux protéases et une chitinase. Pour purifier ces exuvies et extraire la chitine il est nécessaire de les déminéraliser, de les déprotéiniser ainsi que de métaboliser les lipides présents naturellement dans l'enveloppe externe des vers de farine.

En effet, les levures *Yarrowia lipolytica* :

1. Sécrète deux protéases³¹ : une protéase exprimée à des pH neutres/alcalins qu'on appelle protéase extracellulaire alcaline (AEP), elle est codée par le gène *XPR2*. Elle secrète également une protéase à des pH acides qui est la protéase extracellulaire acide (AXP)³².
2. Elle secrète également une lipase extracellulaire (LIP2) qui n'a pas de pH spécifique d'expression décelé à ce jour dans la littérature. Pour autant, il est attendu que cette lipase dégrade les lipides présents dans les exuvies d'insectes pour isoler la chitine. La sécrétion très efficace de la lipase extracellulaire LIP 2 contribue à l'absorption et à la métabolisation performantes des lipides par cette levure.³³
Puisque les exuvies possèdent près de 10% de lipides, cette aptitude pourrait se révéler intéressante dans un objectif de purification de la chitine des cuticules d'insectes.
3. Enfin, *Yarrowia lipolytica* sécrète naturellement une chitinase³⁴ extracellulaire (reconnue comme GRAS (*Generally Recognized as Safe*)³⁵), l'objectif principal aurait été de caractériser sa capacité à dégrader la chitine présente dans les exuvies pour produire des dérivés chitiniques d'intérêts (notamment les COS).

Remarque : La diversité génétique des souches de *Yarrowia lipolytica* conduit nécessairement à des différences dans l'expression des protéases extracellulaires. Ces différences seront étudiées dans le projet de recherche, elles pourront se révéler être un critère de choix dans la sélection des souches.

Cet objectif initial a dû être reconduit puisque dans la littérature, il a été montré que cette chitinase joue un rôle particulier dans le développement cellulaire. En effet, selon (Jeong-Nam Park, et al. 2014)³⁶ de la chitine est présente dans les parois de la cellule de *Yarrowia lipolytica*. Or, cette dernière secrèterait sa chitinase uniquement lors de la phase de séparation entre la cellule fille et la cellule mère. Elle servirait donc à dégrader la chitine présente dans la paroi de la levure pour permettre l'ouverture de la membrane. Ainsi, une éventuelle surexpression de la chitinase risquerait de perturber la structure des parois cellulaires et n'est donc pas envisagée. Cette chitinase semble donc ne pas être exprimée pour dégrader de la chitine présente dans le milieu de culture mais bien de la chitine intra-membranaire. Il n'est cependant pas exclu que l'activité de la chitinase présente ait un impact positif sur la dégradation de la chitine des exuvies.

En ce sens, cette découverte fragilise l'espoir de développer une activité chitinase suffisante pour bio-converter la chitine en COS. En effet, l'expression de la chitinase extracellulaire est conditionnée par la phase cellulaire dans laquelle se trouve les levures. Il y a donc de fortes chances que la chitinase ne soit pas exprimée par les levures en grande quantité. C'est pourquoi, une certaine réserve sera mise sur la réussite de cette partie du projet de recherche.

Pour conclure, l'étude bibliographique a permis de mettre en lumière plusieurs manquements ou problématiques liés à la valorisation des exosquelettes d'insectes. Premièrement, il apparaît clairement que la voie de valorisation principale n'est pas compatible avec une approche de développement durable. Les enjeux environnementaux nécessitent de trouver un substitut à l'utilisation de produits chimiques polluants, tant du point de vue de leur production que de leur récupération post-utilisation. Il semble donc primordial de trouver une nouvelle voie de valorisation des exuvies (cuticules) d'insectes.

Ainsi, les levures *Yarrowia lipolytica* semblent être des candidates prometteuses, étant donné leurs caractéristiques qu'elles présentent et leurs diversités génomiques. Aussi, il semble y avoir un manque de connaissance du comportement des *Yarrowia lipolytica* et de leur capacité à se développer sur un milieu riche en exuvies d'insectes.

Problématique

De cette étude du contexte scientifique de ce projet de recherche, les problématiques suivantes ont pu être dégagées :

Sous quelles conditions et dans quelles mesures les souches de *Yarrowia lipolytica* sont-elles capables de déprotéiniser et de purifier la chitine des exuvies d'insectes ?

Ces levures sont-elles aptes à bioconverter la chitine présente dans les larves de *Tenebrio molitor* en dérivés chitiniques d'intérêts (COS ou chitosan) ? En d'autres termes, un micro-organisme présent naturellement dans un écosystème (non OGM) est-il en mesure de substituer une partie, ou l'entièreté d'une voie chimique à fort impact environnemental ?

Objectifs visés

Ainsi, il sera question, dans un premier temps, d'explorer la biodiversité de *Y. lipolytica* en testant 30 souches sauvages de cette levure, isolées d'écosystèmes variés et de sélectionner celles qui sont les plus performantes au regard des critères explicités ci-après :

1. Les performances de leurs protéases
2. Leur capacité de croissance sur milieu nutritif riche
3. Leur capacité de croissance sur milieu avec exuvies
4. Leur résistance aux différents pH

Dans le but de caractériser leurs performances, il faudra, dans un second temps, composer un milieu de culture riche en composés d'exuvies. Ainsi, le choix d'un milieu de culture optimal sera effectué au regard de son pH, de sa concentration en exuvies d'insectes et de sa teneur protéique.

Finalement, il sera nécessaire de caractériser le produit des fermentations sur les milieux riches en exuvies d'insectes.

3. Matériels et méthodes :

3.1 Exploration de la biodiversité de *Yarrowia lipolytica* et sélection des souches les plus efficaces

Ensemencement des souches sur boîtes de pétri

Le milieu nutritif riche appelé "YPD-agar", se compose de 1,6% (rapport masse/volume^B) d'agar, d'1% (m/v) de glucose, de bactopeptone et d'extrait de levures, le reste du volume étant de l'eau. La solution liquide est ensuite autoclavée (115°C pendant 15min). Puis, 40 mL sont déposés, de manière stérile, dans chaque boîte de pétri. Les souches sont ensemencées par striage sur la boîte, par la méthode des quadrants³⁷ qui permet d'isoler les colonies et ainsi pouvoir observer leur aspects ou la présence d'éventuelles contaminations. Des photographies des colonies ont été prises dans des conditions d'éclairage et de distance standardisées à l'aide PentaxMx1, format carré, 1003-4 pixels par côté.

Tests d'activité protéolytiques

Une préculture a été réalisée dans 2 mL de milieu nutritif riche liquide (YPDliquide), les souches sont ainsi ensemencées "overnight" (16h). Ce milieu nutritif riche est composé de 1% de glucose, de bactopeptone et yeast extract. Par la suite, il est autoclavé à 115°C pendant 15 min. Par une mesure d'absorbance à 600nm il est possible de calculer^C la dilution permettant le dépôt d'un même nombre de cellules sur la boîte de pétri quel que soit la souche.

D'autre part, 8% (m/v) de lait écrémé en poudre est ajouté à 3,4% (m/v) de la base azotée de levure (yeast nitrogen base), 2% (m/v) de glucose, 2%(m/v) d'agar ainsi que 5% (m/v) de tampon phosphate de potassium (pH 6,8) ou citrate (pH4) 1M. Le tampon potassium-phosphate à pH 6.8, nécessite une proportion de "49,7% de K_2HPO_4 (1M) et 50,3% de KH_2PO_4 (1M). Pour réaliser le tampon citrate à pH 4, il faut une proportion de "59% d'acide citrique (0.1M) et de 41% de trisodium citrate (0.1M)". Enfin, le milieu est coulé dans les boîtes de pétri, les souches sont ensuite ensemencées sur boîte à une densité optique initiale de 0,1.

Deux dépôts différents par souches ont été réalisés, l'un via l'utilisation patch stérile (**Annexe n°4**). D'autre part, dépôt sans patch est également réalisé. Finalement, les boîtes de pétri ensemencées sont déposées à l'étuve à 28°C. Des relevés de la taille des halos d'éclaircissements ont été réalisés à des intervalles temporels réguliers (24h). La mesure des halos d'éclaircissement s'effectue du centre de la colonie à l'extrême bord du halo d'éclaircissement (**Annexe n°4**).

Caractérisation de la dégradation des lipides

Pour réaliser cette expérience, plusieurs méthodes ont été testées :

Méthode n°1³⁸ : 0,5% d'extrait de levure, de l'agar (2% m/v) et du bleu d'alcool (0,02% m/v), ainsi que 22% de substrat à lipase contenant de la tributyrine, du polysorbate 80 et des triglycérides.

Méthode n°2³⁹ : elle consiste à mélanger 2,5% (m/v)^D d'agar, 2% (m/v) de substrat Tween 80 et un colorant bleu à 0,01%. Le Tween 80 est un acide oléique, c'est lui qui est métabolisé par les levures et qui entraîne un halo d'éclaircissement. Le volume d'eau équivalent est ajouté et

^B Le "rapport masse/volume" sera, par la suite, remplacé par l'abréviation "m/v".

^C Par l'utilisation de la formule suivantes : $DO_{initiale} \times V_{initial} = DO_{finale} \times V_{finale}$

^D 1% correspond à 1g/100mL

la solution est autoclavée à 115°C durant 15min. Enfin, le milieu est coulé dans les boîtes de pétri, les souches sont ensuite déposées à une DO initiale de 0,1 sur patch. Finalement, les boîtes de pétri ensemencées sont déposées à l'étuve à 28°C et les estimations de leurs halos d'éclaircissement seront effectuées à intervalles temporels réguliers (toute les 24h). Cette dernière se déroule de la même manière que pour les boîtes riches en protéines de lait.

Mesure de la turbidité à l'aide du Biotek H1

Une préculture a été réalisée en amont de l'expérimentation, ainsi les souches sont ensemencées dans 2 mL de milieu nutritif riche liquide durant 16h. Elles sont ensuite ensemencées à une DO de 0,01 dans ce même milieu nutritif riche liquide. Pour finir, un volume de 200 μL^E est déposé dans chaque puit de la plaque 96 puits à fond plat. Cette dernière est placée dans l'appareil de mesure de DO en temps réel (Biotek H1). Les conditions de l'expérience étaient les suivantes : température, 28°C ; agitation continue (731 battements par minute), lecture à 600 nm durant 72 h. La température est de 28°C pendant toute la durée de l'expérience). L'agitation est continue et est réglée sur 731 battements par minute. La longueur d'onde d'émission est de 600nm, elle correspond au maximum d'absorption des levures. La mesure s'effectue sur une plage horaire de 72h, plage qui permet aux levures de croître jusqu'à atteindre leur turbidité maximale dans les conditions de départ explicitées précédemment.

Avant de présenter les résultats, il est nécessaire de revenir sur les paramètres qui vont être extraits de cette mesure de turbidité par le Biotek H1. Ils sont présentés en figure n°3.

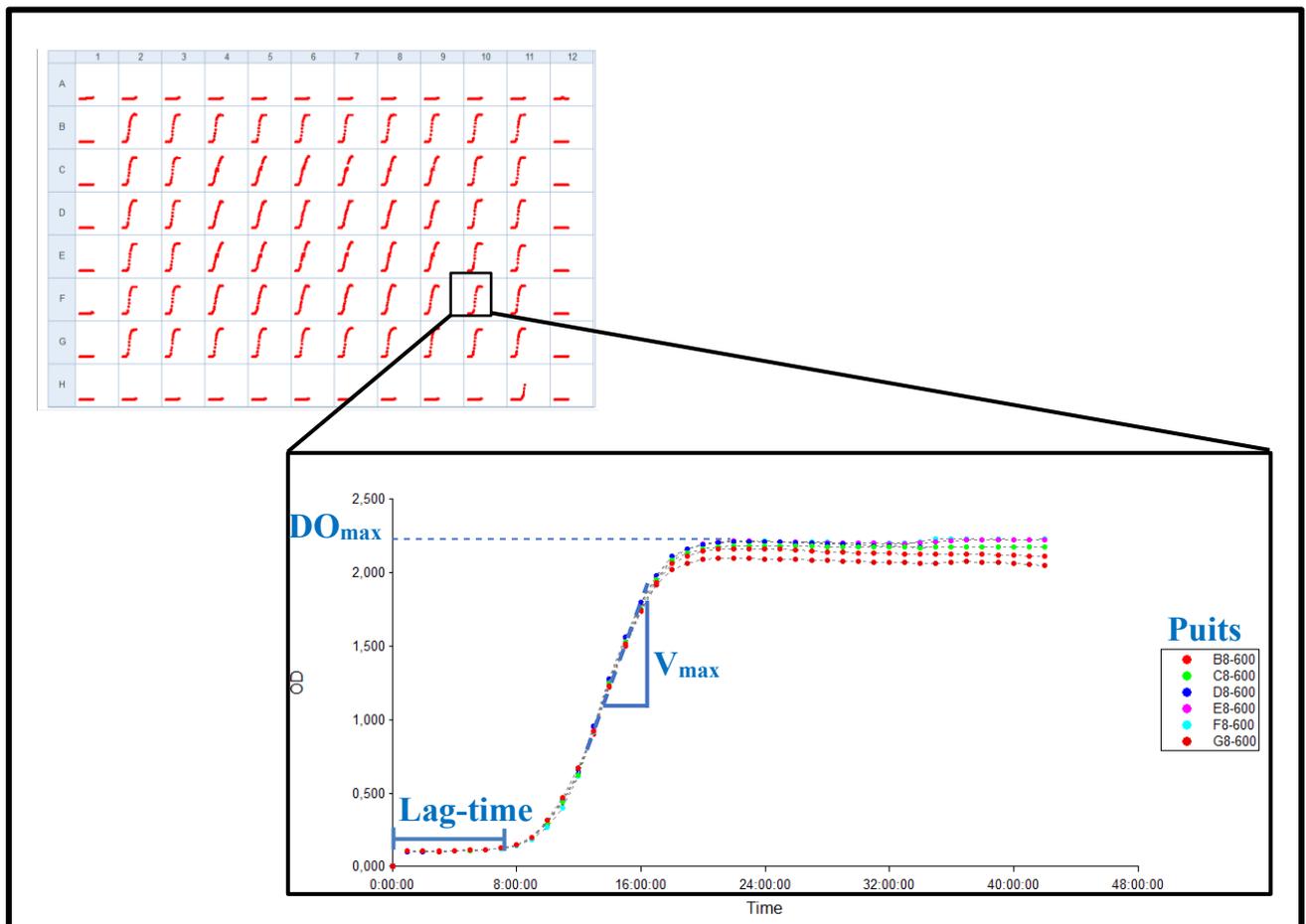


Figure n°2 : Représentation schématique du logiciel Gen5 (version 2.06)

^E Volume permettant le remplissage au $\frac{1}{4}$ du puits pour éviter les débordements lors de l'agitation et garantissant une meilleure oxygénation

- *Le Lag-time (heures)* : il s'agit du temps de latence, c'est la durée de la phase de latence où le taux de croissance est nul. La durée de cette phase dépend essentiellement de l'âge des levures et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat⁴⁰. Elle précède la phase de croissance exponentielle.
- *La V_{max} (sans unité)* : c'est ce qu'on appelle également le μ_{max} ou taux de croissance maximal. Il est atteint dans la phase de croissance exponentielle lorsque la vitesse de multiplication des levures est à son apogée.
- *La DO_{max} (sans unité)* : le taux de croissance redevient nul ($\mu = 0$), c'est la phase stationnaire. Les levures qui se multiplient compensent celles qui meurent.

Parfois, il pourra être également pris en compte, la **phase de déclin** : elle correspond à la période finale où toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes.

Incertitude sur la souche W29

Ces mesures ont été effectuées à la règle, on peut donc conclure qu'il y a là une incertitude due à l'appareillage que l'on appelle aussi erreur incertitude systématique. L'incertitude de lecture associée à un instrument de mesure analogique correspond à la moitié de la plus petite graduation de l'instrument. Ainsi, l'incertitude absolue d'une règle graduée en millimètres est de 0,5mm.

De plus, il peut y avoir une erreur liée à l'appréciation du halo, il est vrai que la limite de ce dernier est parfois relativement complexe à évaluer. En ce sens, une incertitude de jugement peut donc être justifiée. Dans ces cas, l'incertitude reliée à la mesure est égale à la somme des incertitudes sur chaque lecture. Lorsqu'on utilise une règle, il faut considérer l'incertitude à l'endroit où la mesure est prise sur la règle, mais également celle au zéro. Ainsi, l'incertitude due à l'observateur est ici de 1 mm.

De plus, il existe également une erreur de mesure aléatoire qui résulte de la répétition des mesures sur une même souche. L'incertitude de type A résultante est le fruit d'une étude statistique. Ici, la souche W29 a étéensemencée à trois reprises dans les mêmes conditions d'expérimentation, dans le but d'en extraire une erreur incertitude de type A. L'objectif est de l'extrapoler aux autres souches, la limite du raisonnement se situe ici.

De plus, dans la réalité, on ne peut prendre qu'un nombre limité de mesures, c'est pourquoi un calcul de l'incertitude élargie sera effectué.

Ainsi, le calcul de l'incertitude de type A élargie est :

$$U_A = k \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Où σ_{n-1} est l'écart-type à la moyenne, autrement, l'écart-type standard ⁴¹ sur Excel. "n" étant le nombre de mesure (ici égale à 3) et k le coefficient d'élargissement.

Lors d'un mesurage, la détermination de l'erreur de mesure nécessite de prendre en compte les deux composantes précédentes (type A et B).

Ainsi, $U_{Totale} = 2\sqrt{U_A^2 + U_B^2}$

Soit, à pH 4, l'incertitude totale est de 3 mm (un seul chiffre significatif) au niveau de confiance de 95%.

À pH 6.8, l'incertitude totale est de 4 mm au niveau de confiance de 95%.

3.2 Détermination d'un substrat optimal

Maximiser la solubilisation des protéines des exuvies – Influence du pH et de la sonication

Les exuvies à 2,5 % (25 g/L) sont ajoutées à un milieu minimum YNB liquide⁴², le reste du volume étant de l'eau stérile. Chaque solution est ajustée à un pH précis, soit par acidification via l'utilisation de HCl (1M), pour les pHs de 2, de 2,5, de 3 et de 4, soit par ajout de NaOH (1M) pour les pHs de 6, de 6,8 et de 8. Les différents milieux sont ensuite autoclavés (115°C/15min). Ainsi l'extraction protéique qui est une hydrolyse, dure ici **15min**. Deux duplicatas pour chaque pH ont été réalisés et l'un d'entre eux subit un cycle de sonication de 60 min à 40 kHz milieux et centrifugés à 5000g pendant 10min. Le surnageant est récupéré pour être filtré stérilement (0.22 µm) à l'aide d'une seringue ou d'une unité de filtration sous-vide. Les **filtrats d'exuvies** extraits aux différents pH précédemment mentionnés ont ensuite été utilisés pour caractérisation de leur teneur protéique.

Étude de l'impact de l'autoclave et de la durée d'hydrolyse

Les exuvies⁴³ à 2,5 % (25 g/L) ont été ajoutées à un milieu minimum YNB liquide^F, le reste du volume étant de l'eau stérile. La solution a, par la suite, été séparée en deux volumes égaux. Le premier volume a également été séparé en deux, l'un est ajusté à pH 2 par acidification via l'utilisation de HCl (1M), l'autre est ajusté à pH 10 par l'utilisation de NaOH (1M). Les deux milieux ont ensuite autoclavés (121°C/15min), puis agités à 45°C sur plaque chauffante durant 45min. Une fois la durée d'extraction (60 min) écoulée, les milieux à pH 2 et pH 10 ont été centrifugés à 5000 g⁴⁴ pendant 10min. Le surnageant a été récupéré pour être filtré stérilement (0.22 micron) à l'aide d'une seringue.

Le second volume (YNB liquide, exuvies, eau stérile) a été séparé en deux et ajusté à pH 2 et pH 10 comme précédemment. Cette fois, l'extraction des protéines est effectuée uniquement par une agitation sur plaque chauffante (45°C) durant 60 min. La solution est ensuite centrifugée (5000g pendant 10min), le surnageant est récupéré pour une filtration stérile (0,22 µm (Figure 14).

Chacune de ces 4 solutions est répliquée trois fois pour évaluer la reproductibilité de l'expérience. Ainsi douze solutions sont obtenues :

- Trois solutions à pH 2 et trois solutions pH 10 avec cycle d'autoclavage
- Trois solutions à pH 2 et trois solutions à pH 10 et sans cycle d'autoclavage

Des témoins négatifs (sans exuvies) ont été réalisés de la même manière, il y a donc un témoin négatif pour chaque condition.

Le schéma représentatif de cette expérience est présenté en **Figure n°3**

^F 0,17% de yeast nitrogen base, 0,1% de glucose et le volume d'eau correspondant

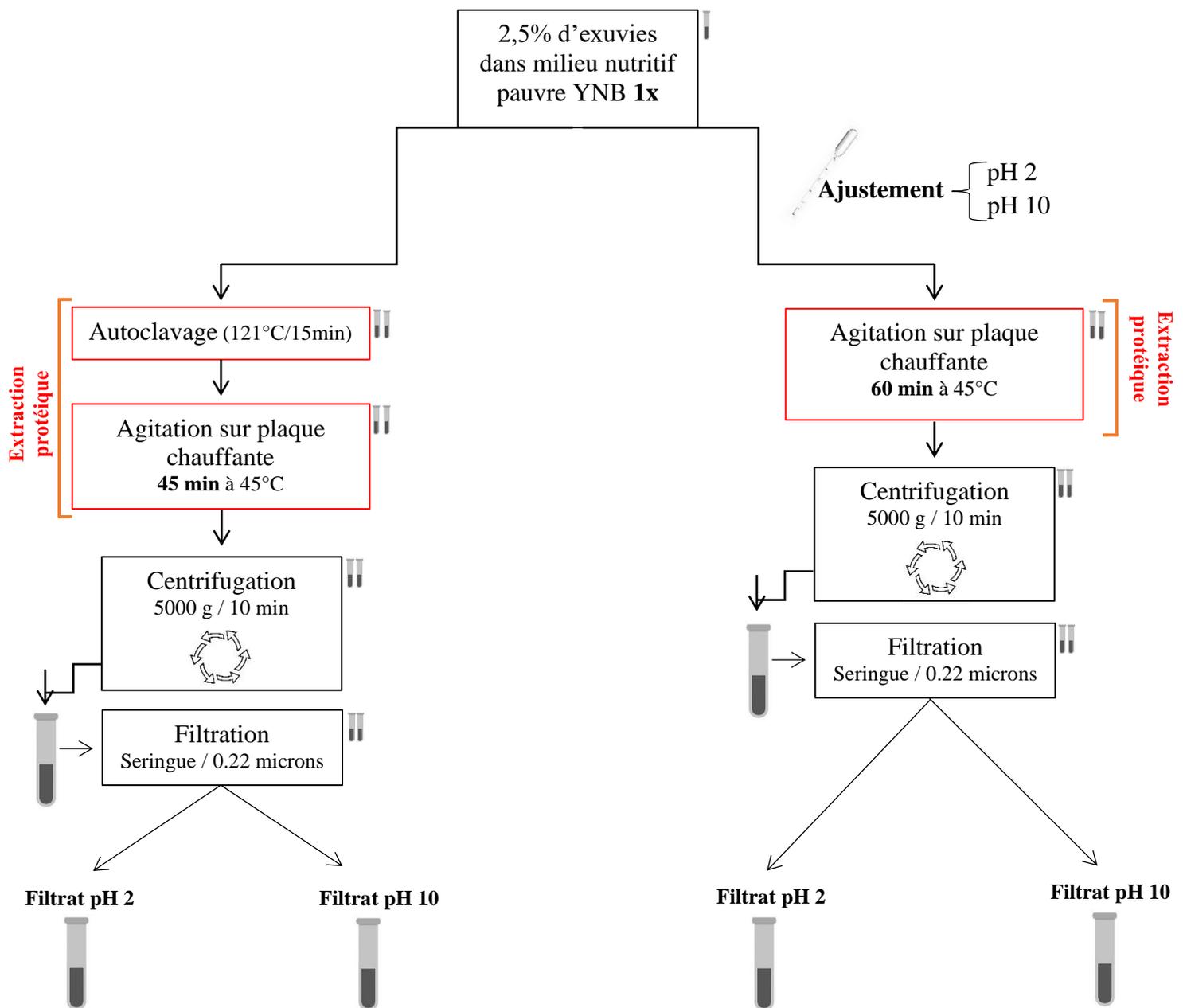


Figure n°3 : *Schéma représentatif du protocole de l'étude de l'impact de l'autoclave et de la durée d'hydrolyse sur la teneur protéique des filtrats d'exuvies d'insectes*

Ces solutions sont ensuite lyophilisées et la quantification des protéines extraites par l'hydrolyse va être mesurée par la méthode de Dumas. Ce procédé⁴⁵ consiste à faire la combustion complète de l'échantillon organique dans un four à haute température en présence d'oxygène pur à environ 1000°C. Puis, Les gaz de combustion traversent du cuivre pour éliminer l'oxygène et convertir les oxydes d'azote en azote moléculaire, de plus, des "pièges" dédiés éliminent l'eau et le dioxyde de carbone. La teneur totale en azote est mesurée par un détecteur de conductivité thermique. Le facteur de conversion de 6,25 a été utilisé pour convertir l'azote en protéines⁴⁶.

Un substrat qui permet une croissance optimale - Croissance sur milieu non ajusté

Préparation des précultures : environ 16 h avant, il est nécessaire de mettre en place des précultures des souches d'intérêts. Une quantité approximative de levure (une oese environ) est

ensemencée 2ml de milieu YPD liquide (milieu nutritif ^Griche). Les cultures sont agitées 16 h environ à 160 rpm à 28 °C. Un témoin positif est réalisé, il s'agit d'un milieu riche à base de protéose peptone (2,5% m/v), mélangé au milieu minimum YNB liquide. Les solutions précédentes contenant les levures sont ensemencées à une DO initiale de 0,01 dans les filtrats d'exuvies correspondants ainsi que dans la solution à base de protéose peptone et dans le milieu minimum YNB liquide.

L'évolution de la DO est mesurée grâce au Biotek H1, après dépôt de 200 µL dans chaque puits. Une plaque 96 puits à fond plat est utilisée, ainsi qu'une agitation de 731 rpm, une longueur d'onde d'absorption de 600nm et durant 72h à 28°C.

Un substrat qui permet une croissance optimale - Croissance sur milieu ajusté

De la même manière que précédemment, les filtrats d'extraction protéique à pH 2 à base d'exuvies d'insectes sont obtenus :

Pour les extractions protéiques effectuées en France avec une durée d'extraction de 15min se référer à "**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**". Pour celles d'une durée hydrolyse de 60min se référer au protocole précédent "**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**".

Ces derniers sont ajustés au pH souhaité à l'aide de NaOH (1M). L'ajustement nécessitant un pH-mètre et ce dernier n'étant pas stérile, la solution obtenue est filtrée.

Dans le cas du Canada, s'agissant d'un ajustement de pH 10 vers pH 4 par l'ajout de HCl (1M), le point isoélectrique est dépassé. Ainsi, certaines protéines forment des agrégats. Cependant, pour éviter le biais engendré par une seconde filtration (0.22 micron) et un filtrat appauvri des protéines agrégées, il été décidé d'ajuster le pH de manière stérile pour ne pas effectuer de seconde filtration.

Ainsi ont été obtenus les filtrats d'exuvies suivants selon les deux temps d'extraction protéique et les pH d'ajustement :

- pH 2 non ajusté
 - pH2 ajusté à 2,5
 - pH 2 ajusté à 3
 - pH 2 ajusté à 3,5
 - pH 2 ajusté à 4
 - pH 2 ajusté à 6
- 15 min d'extraction protéique
-
- Extraction à pH10 (sans autoclave) ajusté à pH 4
 - Extraction à pH10 (avec autoclave) ajusté à pH 4
 - Extraction à pH2 (sans autoclave) ajusté à pH 4
 - Extraction à pH2 (sans autoclave) ajusté à pH 4
- 60 min d'extraction protéique

^G Milieu réalisé avec 1% de glucose, 1% bactopeptone, 1% yeast extract, le volume correspondant d'eau distillée et autoclavé (121°C/15min).

3.3 La croissance des souches les plus performantes sur exuvies complètes

La croissance des souches les plus performantes sur les exuvies complètes

Les solutions vont être préparées dans un volume total correspondant à 1/8 d'ermeneyer, cette proportion permet l'oxygénation^H maximale pour les levures *Yarrowia lipolytica*.

Ainsi, 2,5% (m/v) de poudre d'exuvies est mélangée au milieu minimum YNB liquide et ajusté à pH 2 pour l'extraction protéique, il est finalement autoclavé (121°C/15min). Chaque solution est répliquée trois fois. Le milieu est ensuite ajusté à pH 4 par l'ajout de HCl (1 M) avant mise en contact avec les souches. Les levures sont ensuiteensemencées à une DO initiale de 0,01^I. Comme auparavant, une préculture est nécessaire. Celle-ci elle se déroule exactement de la même manière que celle détaillée à l'étape II. Les erlenmeyers sont agités de manière continue à 160 rpm, à l'étuve (28°C). Puis, de manière successive, des volumes de 1 mL sont prélevés pour mesure du pH, ainsi que pour le dépôt sur des boîtes de pétri (milieu riche YPD-agar^J). Les heures de prélèvements sont les suivantes : 5h, 23h, 28h, 48h, 72h, 144h et 168h.

Il est important de noter qu'un témoin négatif est réalisé à chaque fois, il s'agit de la souche SWJ-1-b en présence du milieu sans les exuvies d'insectes. Ce témoin est utilisé pour mesurer la turbidité de la culture aux intervalles temporelles stipulées ci-dessus. En effet, sachant que 1 DO correspond à $3,10^7$ cellules^K chez *Yarrowia lipolytica*, des dilutions successives au sein du milieu minimum liquide permettent de réaliser des dépôts finaux d'environ 50 souches sur boîtes. Pour chacune des souches, les boîtes de pétri sont déposés à l'étuve durant 24 h à 28 °C. Un comptage des colonies est réalisé, en fonction de celui-ci et de la dilution opérée, il est possible de remonter à la quantité de cellules initialement présente dans la solution. De plus, au temps 0h, 48h et 168h un volume de 1 mL est prélevé puis centrifugé (5000g/15min), le surnageant est conservé pour étude des produits de dégradation (protéines et dérivés chitiniques) des levures sur le substrat d'exuvies complètes.

La croissance des souches les plus performantes sur les exuvies complètes (avec tampon pH 6.8)

Le protocole précédent reprend exactement ce qui a été fait ici, à la différence près qu'ici, dès lors qu'une solution se rapproche de pH 6.8, cette dernière est tamponnée de manière stérile à ce pH 6,8 à l'aide d'un tampon phosphate non métabolisable par les cellules. Ce tampon phosphate de potassium⁴⁷

La caractérisation de leurs produits de dégradation - Analyses protéiques

Ne connaissant pas la teneur protéique des surnageants de culture, pour chaque solution il a été déposé le même volume d'échantillon (20 µL). Il est ajouté un volume de tampon de charge natif (20 µL) Puis, le tampon de migration dilué au 10^e (Tris/Glycine/SDS) est versé après avoir déposé le gel de polyacrylamide dans son support. Finalement, 5 µL de standard de poids moléculaire sont déposés dans le premier et dernier puit du gel. Puis, 10 µL de chaque échantillons sont déposés dans chacun des puits. La migration a été effectuée à 15mA/gel puis celui-ci a été coloré dans une solution de bleu de Coomassie et décoloré dans une solution 10% acide acétique/10% méthanol/80% eau.

^H C. Madzak, résultats non publiés

^I $DO_{initiale} \times V_{initiale} = DO_{finale} \times V_{finale}$, de manière générale V_f est 2mL de filtrats d'exuvies, DO_f est 0,01 et DO_i celle qu'on vient de mesurer.

^J Milieu YPD-agar : 1% glucose, 1% yeast-extract, 1% bactopeptone, 1,6% agar

^K C.Madzak résultats non publiés

4. Résultats et discussions

4.1 Exploration de la biodiversité de *Yarrowia lipolytica* et sélection des souches les plus efficaces

Les souches sélectionnées en amont de ce stage sont répertoriées à l'**Annexe n°3**. Il s'agit de 30 souches d'origines diverses et d'environnements différents. Ces 30 souches proviennent d'environnements pollués, non pollués, d'animaux, de l'industrie agro-alimentaire, de produits laitiers (lait, fromage), et d'autres aliments. Il est important de noter que les souches nommées ME-37 et ME-54 n'ont pas encore été attribués à une espèce précise du genre *Yarrowia* : on dit, on dit alors qu'elles sont ***Yarrowia sp*** (abréviation de species). Celles-ci ont été sélectionnées car elles proviennent d'insectes et plus particulièrement du scarabée *Hoplia coerulea* (un insecte de la famille des coléoptères, connu pour sa couleur bleu métallique chez le mâle). Bien que n'appartenant peut-être pas à l'espèce *lipolytica* (auquel cas leurs caractéristiques attendues seraient de ce fait mal connues), elles ont été sélectionnées pour ce projet de recherche dans l'espoir d'avoir des capacités spécifiques à un substrat riche en exuvies d'insectes.



Figure n°4 : Illustration de *Hoplia coerulea*⁴⁸

4.1.1 Ensemencement des souches sur boîtes de pétri

A la réception des souches en provenance du CIRM-Levures (Centre Internationale de Ressources Microbiennes INRAE dédié aux levures) de Montpellier⁴⁹, la première étape a été d'observer l'aspect sur l'aspect macroscopique des différentes souches en les ensemençant sur des boîtes de pétri en milieu nutritif riche. L'objectif était double : détecter des potentielles traces de contamination et observer l'aspect des colonies afin de détecter de possibles similitudes entre les souches entre-celles provenant d'un même milieu, ou d'environnements proches.

À la loupe binoculaire aucune contamination n'a été détectée pour les souches en provenance du CIRM levures de Montpellier, des similitudes ont pu être cependant observées entre celles-ci. Dans le cas des souches laitières et fromagères, ces souches ont un aspect lisse et très peu filamenteux. L'apport, par le milieu, en nutriments, semble être suffisant pour leur croissance et que même après un temps de croissance relativement long (72h) elles ne sont pas en carence.

Souches fromagères

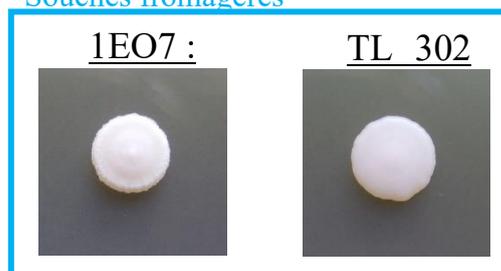


Figure n°5 : Photographies de deux souches, PentaxMx1, format carré, 1003-4 pixels par côté

Cependant, au sein d'un environnement proche les caractéristiques morphologiques des levures diffèrent. Ci-dessous, il est présenté des souches qui proviennent toutes du sol, pourtant, leur apparence est bien différente.

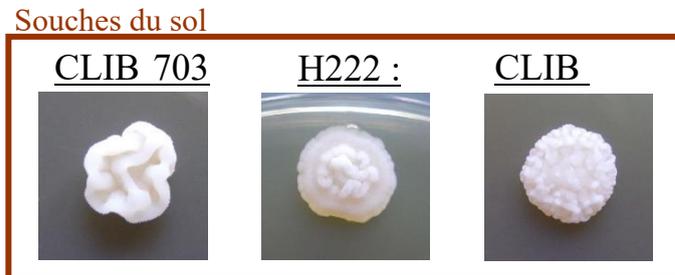


Figure n°6 : photographies de trois souches, PentaxMx1, format carré, 1003-4 pixels par côté

Les différentes souches de cette levure présentent une grande variété d'aspect des colonies à cause de la filamentation. Elles montrent toutes une forte filamentation mais leurs différences résident dans le degré de filamentation et la façon dont il modifie la forme de la colonie. Le dimorphisme (cellules de forme ronde ou hyphes/pseudo-hyphes) est variable d'une souche à l'autre selon les conditions de culture. De manière générale, l'hypothèse la plus probable provient des profils génétique différent, le mécanisme de transition dimorphique étant complexe.

Aussi, cela peut s'expliquer par le fait que des structures microscopiques filamenteuses ont un impact sur l'aspect macroscopique de la colonie. En effet, en observant microscopiquement les souches filamenteuses il a été possible de se rendre compte des différences microscopiques sur la structure des hyphes et des pseudo-hyphes.

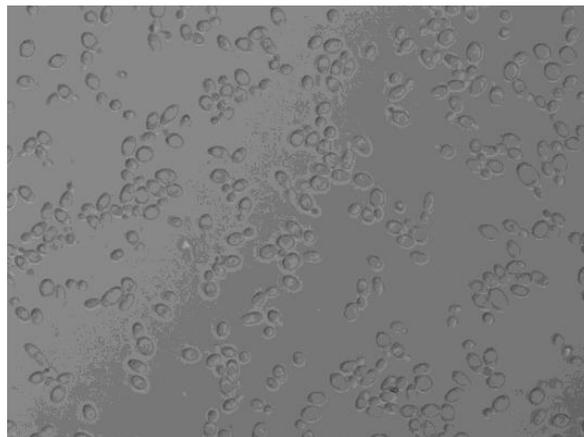


Figure n°7 : Photographie microscopique de la souche A-101, x40, 24h d'incubation sur milieu nutritif riche à 28°C

Après 24h d'incubation, les cellules sont arrondies et ne présentent pas de structure incluant des hyphes ou des pseudo-hyphes. IL est possible de déduire qu'à ce stade les cellules ne sont pas en carence et qu'il reste encore des composants métabolisables dans leur environnement. D'un point de vue macroscopique, l'absence de filamentation se caractérise par un aspect lisse.

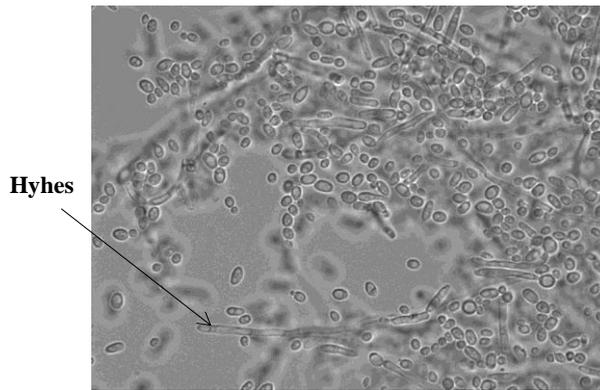


Figure n°8 : Photographie microscopique de la souche A101, x40, 72h d'incubation sur milieu nutritif riche à 28°C

Après 72h d'incubation à 28°C, la souche A101 voit ses cellules s'allonger et former des hyphes et pseudo-hyphes (ramification sans noyau). On peut en déduire qu'à ce stade une partie des cellules sont en carence. Ainsi, elles doivent s'allonger pour augmenter leur surface de contact avec le milieu. Leur objectif étant de métaboliser les éléments du milieu nutritif riche encore disponibles. D'un point de vue macroscopique, cette filamentation se caractérise par un aspect rugueux.

Pour conclure, on a pu remarquer qu'au sein d'une même espèce, l'environnement de développement des souches les conduit à adopter des caractéristiques morphologiques différentes. Ce sont ces mêmes mécanismes d'adaptation, propres à tous les êtres vivants, qui ont conduits ces 30 souches à développer un aspect macroscopique et microscopique différent et en adéquation avec leurs environnements.

Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que ces différences ne s'arrêtent pas uniquement à leurs aspects mais que leurs caractéristiques intrinsèques diffèrent également d'une souche à l'autre.

4.1.2 Tests d'activités protéolytiques

La capacité des levures à métaboliser les protéines est l'un des critères pour sélectionner les souches les plus efficaces à envoyer au laboratoire canadien. Pour se faire, il a été question de mettre au point un test permettant de mesurer cette activité. (Asha Bhakthavalsalam, et al 2018)⁵⁰ présente un test utilisant du lait écrémé en poudre (*skim milk powder* en anglais). Ce dernier permet de visualiser, directement sur la boîte de pétri, des halos d'éclaircissement autour des colonies ayant métabolisé les protéines contenues dans le skim milk. Pour chacune des souches un dépôt avec ou sans patch a été effectué, l'idée était de noter une potentielle différence de comportement cellulaire entre les deux méthodes de dépôts.

Chacune des souches a été ensemencée sur deux boîtes de pétris distinctes :

- le milieu riche en protéines laitières à pH 4
- le milieu riche en protéines laitières à pH 6,8

Ce choix visait à maximiser l'activité de l'une ou l'autre des deux protéases sécrétées par les levures *Yarrowia lipolytica*. En effet, les deux pH maximums d'expression des protéases sont le pH 4 (AXP, protéase acide) et le pH 6.8 (AEP, protéase neutre/alcaline)⁵¹.

Ainsi, l'activité protéolytique de chacune des deux protéases a pu être observée par selon leurs conditions d'expression respectives. Autrement dit, chacune est réprimée dans les conditions de pH maximisant l'expression de l'autre.

4.1.3 Influence de l'utilisation du patch

Dans un premier temps il a été question de chercher à savoir si l'utilisation du patch, présenté ci-dessus, avait un impact sur l'activité protéolytique des levures.

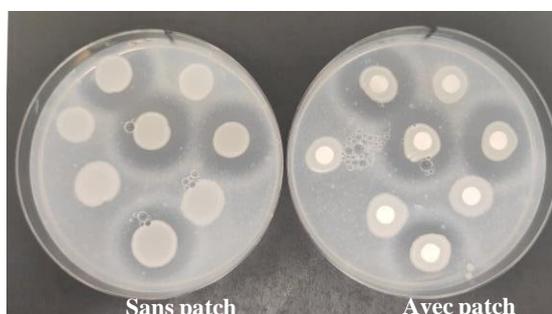


Figure n°9 : *Dépôt avec et sans patch 8 souches (20uL, DO = 0,1)*

Pour cela, la variation des mesures selon que l'on effectuait un dépôt sur patch ou un dépôt sans le patch a été calculée. Cette étude a été effectuée sur les 8 premières souches en possession du laboratoire de INRAE. Les résultats de l'étude de l'influence du patch sur l'activité protéolytique des levures sont présentés en sur le **tableau n°2** :

Tableau n°2 : *Tableau de l'étude de la variabilité des mesures de halos avec sans patch sur 8 souches de Yarrowia lipolytica*

Souches	t = 48h			t = 72h			t = 48h			t = 72h		
	pH 4 (AXP)		Ecart relatif	pH 6.8 (AEP)		Ecart relatif	pH 4 (AXP)		Ecart relatif	pH 6.8 (AEP)		Ecart relatif
	Avec patch	Sans patch		Avec patch	Sans patch		Avec patch	Sans patch		Avec patch	Sans patch	
W29	14,40	14,20	0,01	16,92	16,80	0,01	24,00	23,80	0,01	28,20	28,10	0,00
Po1t-témoin négatif	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00	
H222	22,20	22,00	0,01	0,00	0,00		37,00	36,80	0,01	0,00	0,00	
A101	18,60	18,90	0,02	16,98	17,20	0,01	31,00	31,40	0,01	28,30	28,50	0,01
CLIB 79	15,06	14,90	0,01	16,38	16,30	0,00	25,10	24,90	0,01	27,30	27,00	0,01
EL13-B1-2-1	18,72	18,80	0,00	0,00	0,00		31,20	31,00	0,01	0,00	0,00	
TL 301	13,86	13,70	0,01	17,04	17,30	0,02	23,10	22,90	0,01	28,40	28,50	0,00
CLIB 200	12,12	11,90	0,02	13,92	14,10	0,01	20,20	19,90	0,01	23,20	23,40	0,01
Variabilité moyenne			1,20%			1,06%			0,92%			0,67%

Il est important de noter que l'écart relatif mesure l'écart d'une valeur à une valeur théorique. Pour chacune des mesures, des duplicatas ont été effectués, en ce sens, il n'y a pas de valeur théorique à laquelle comparer l'une et l'autre des valeurs. C'est pourquoi la formule de l'écart relatif a été adaptée en :

$$\text{Ecart relatif} = \frac{\text{Mesure n°1} - \text{Mesure n°2}}{\text{Moyenne (Mesure n°1 ; Mesure n°2)}}$$

L'intérêt de cette formule est qu'elle permet de caractériser la dispersion des valeurs par rapport à la moyenne des deux valeurs. En ce sens, elle permet de palier au manquement d'une valeur théorique de référence.

La moyenne des écarts relatifs condition par condition a été effectuée. Une moyenne totale appelée "Variabilité moyenne totale" a été calculée sur la base de tous les écarts relatifs moyens, elle est de 0.96%.

Au regard de cette valeur, on peut conclure que l'utilisation du patch ou sa non-utilisation n'influence pas significativement la mesure des halos d'éclaircissement et donc par extension l'activité protéolytique des levures sur milieu riche en protéines de lait.

Le choix a été fait pour la suite des expérimentations de déposer ce patch pour plusieurs raisons. Premièrement, le dépôt des souches étant sous forme liquide, il permet de limiter les projections de gouttes. Deuxièmement, il garantit une meilleure régularité des halos d'éclaircissement (en conservant la forme circulaire du patch). Dernièrement, le diamètre du patch étant harmonisé à 6mm, il permet facilement d'avoir une échelle de conversion sur toutes les photos.

4.1.4 Mesures des halos sur l'ensemble des 30 souches :

Les résultats de la mesure de l'activité protéolytiques des 30 souches sont présentés en **Annexe n°5**. Il s'agit des valeurs des halos d'éclaircissement mesurés après 72h d'ensemencement d'une DO de 0,1 à 28°C. A noter que dans le cas de certaines souches, une deuxième valeur de mesure du halo est visible. En effet, il s'agit de souches dont le halo n'était pas visible à 72h mais le devenait à 120h.

Une nouvelle fois, la souche témoin – Po1t – a été ensemencée de manière à pouvoir palier à d'éventuels problèmes d'interprétation des résultats. Il s'avère que là aussi, elle n'a produit aucun halo d'éclaircissement, pour autant, ce résultat n'est pas présenté dans l'**Annexe n°5** puisque Po1t n'est pas une souche sélectionnable pour notre étude. En effet, elle est génétiquement modifiée et ne sera en aucun cas choisie pour être envoyée au Canada. Dans le but de gagner en précision dans l'interprétation des résultats, il convient d'ajouter une incertitude sur la mesure des halos d'éclaircissement.

4.1.5 Incertitude sur la souche W29

Les calculs d'incertitude sur les mesures des halos d'éclaircissement de la souche ont été réalisées. En effet, pour être parfaitement rigoureux, il aurait fallu répéter cette étape pour toutes les souches, mais compte tenu du fait qu'il y a 30 souches à étudier, par manque de temps et au regard du résultat obtenu, il a été décidé que le résultat du calcul de l'erreur de mesure aléatoire sur W29 allait être extrapolé aux autres souches

Ainsi, les valeurs des incertitudes de type A, B et de l'incertitude composée sont visibles ci-après :

Tableau n°3 : Tableau des incertitudes de type A, B et de l'incertitude composée sur les mesures des halos d'éclaircissement de W29 sur un milieu riche en protéines de lait

	pH 4 (72h)	pH 6,8 (72h)
Moyenne (mm)	24,03	28,17
Incertitude de type A (mm) ^A	0,52	1,03
Incertitude de type B (mm) ^A	1,00	1,00
Incertitude composée (mm)^A	2,25	2,87

^A Le niveau de confiance étant de 95%.

Au regard des mesures de halo d'éclaircissement, il semblerait que ces deux incertitudes soient relativement élevées. Cela est principalement dû au matériel utilisé pour la mesure (mesure avec une règle), un logiciel de mesure électronique aurait permis de diminuer l'incertitude de type B. Un nombre plus important de répétition aurait éventuellement pu permettre à l'incertitude de type A d'être moins élevée.

Cependant, on cherche seulement, avec les mêmes conditions, à établir un classement de l'efficacité protéolytique entre les souches. La marge d'erreur étant similaire pour toutes les mesures, leur comparaison est donc possible. Il est vrai que la caractérisation de leurs activités protéolytiques seule ne peut être à l'origine de la sélection des souches les plus prometteuses. C'est pourquoi, il convient d'étudier d'autres aspects des levures *Yarrowia lipolytica* et ainsi d'explorer plus en profondeur la biodiversité de ces souches.

4.1.6 Estimation de la dégradation des lipides

Les lipides étant présents à hauteur de 10% dans les exuvies d'insectes, il convient de comparer l'activité des lipases extracellulaires des différentes souches.

Contrairement au milieu composé de protéines de lait, le milieu n'a pas été tamponné puisque la lipase extracellulaire des souches *Yarrowia lipolytica* n'a pas de pH d'expression particulier. Au regard des résultats obtenus plus tôt sur l'influence des patchs dans la mesure de leur activité protéolytique, il a été décidé d'utiliser des patchs pour les raisons précédemment présentées.

Cette analyse qualitative de l'activité de la lipase extracellulaire a soulevé certains problèmes. Plusieurs méthodes ont été testées car la difficulté suivante a été rencontrée : le caractère hydrophobe de la solution lipidique a entraîné la création de sphères oléique entre le moment où la solution liquide est déposée sur la boîte de pétri et le moment où l'agar se solidifie. Il a été question d'accélérer cette solidification par le dépôt de blocs glacés sur la surface de la hotte mais, là encore, le problème a persisté.

Il semblerait qu'il s'agisse, en réalité d'un problème d'accessibilité de la solution oléique aux lipases extracellulaires. En effet, avec la première méthode aucun halo d'éclaircissement n'était visible. Pourtant, les souches semblaient avoir s'être développées sur ce substrat. Nécessairement elles avaient dû métaboliser du substrat (la tributyrine en l'occurrence) mais les halos restaient invisibles, probablement à cause de la séparation en micelles lipidiques tombant au fond de la boîte.

Cependant, la deuxième méthode et l'hydrophobicité moins prononcée du Tween a permis d'estimer la taille de halo faiblement visibles. Pour autant, la visualisation des halos reste subjective et à l'appréciation de l'observateur. C'est pourquoi, aucune mesure n'a été effectuée. Une évaluation qualitative a été effectuée, elle se base sur une échelle allant d'"activité lipase très faible" à "activité lipase forte". Les détails des résultats de cette partie sont visibles en **Annexe n°6**.

Il est tout de même possible de remarquer que la souche qui semble se démarquer du point de vue de son activité à métaboliser les lipides par le biais de sa lipase (lip2) est W29. Cette souche a été isolée des égouts de Paris, en ce sens, il ne paraît pas étonnant d'y constater une activité forte de sa lipase. En effet, les égouts sont, en général, un milieu riche en composés lipidiques, il est tout à fait cohérent de voir que cette souche de *Yarrowia lipolytica* s'y soit adaptée et y ait développé une forte capacité à sécréter une lipase extracellulaire efficace.

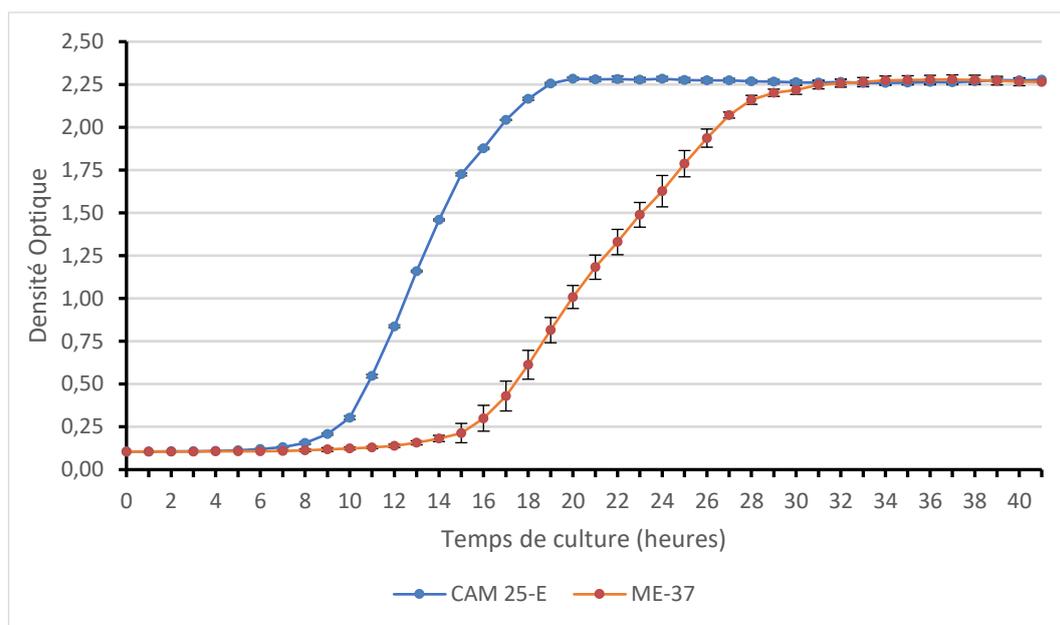
A l'inverse, il n'est pas non plus incohérent que les souches laitières ou fromagères n'aient une activité lipase que "faible" qui témoigne d'un halo d'éclaircissement à peine visible. En effet, *Yarrowia lipolytica* n'est pas ensemencée volontairement au début du processus de création des fromages, elle doit s'implanter en concurrence (ou en symbiose) avec de nombreux autres microorganismes (bactéries, levures, champignons). Certains peuvent avoir des activités lipolytiques dont elle profite sans avoir à sécréter elle-même de lipase. Il est possible que les souches fromagères aient été naturellement sélectionnées pour leur activité protéolytique afin de tirer parti de ressources moins exploitées par les autres microorganismes fromagers. Il est vrai que ces levures sont connues pour participer à la maturation de certains fromages grâce à son activité protéolytique.⁵²

Ainsi, il est nécessaire de garder toute mesure quant à la pertinence de ces résultats puisque l'estimation de l'activité lipolytique n'est pas quantitative.

4.1.7 Données générales de croissance des 30 souches sur milieu nutritif riche

Jusqu'à maintenant, le processus de sélection des souches les plus efficaces n'était basé que sur des analyses purement qualitatives (pour les activités lipases) et quantitatives mais influencées par l'observateur (pour l'activité protéolytiques). Désormais, il s'agit de présenter des résultats purement quantitatifs, ces derniers venant enrichir les résultats précédents dans l'objectif de caractériser les performances des souches sur un milieu de croissance nutritivement riche.

Premièrement pour avoir une meilleure idée de la comparaison que l'on peut faire entre les croissances des souches, il semble nécessaire de prendre un exemple. Ainsi, ci-dessous on peut prendre pour illustration deux souches ensemencées dans les mêmes conditions mais qui croissent assez différemment, les données correspondantes sont présentes en **Annexe n°7**



Paramètres	CAM 25-E	ME 37
V_{max}	5,368	3,477
Lagtime	09:42:54	15:33:42
DO_{max}	2,315	2,31

Figure n°10 : Graphique et tableau des données de croissance cellulaire de deux souches sur milieu riche (YPD), réalisé à partir de 5 répliquas par souches.

Les "barres d'erreur" sont présentes sur le graphique elles correspondent aux écarts-types de Pearson calculés à partir des cinq répliquas. On remarque que ces dernières sont plus élevées pour la souche ME-37, ainsi l'échantillon en question à une croissance moins reproductible que pour celui de la souche CAM 25-E.

On peut observer que la souche CAM 25-E débute plus rapidement sa phase de croissance exponentielle (lag-time plus court), de plus sa V_{max} sur ce substrat est plus importante. On peut déjà en déduire qu'en milieu liquide riche (possède les nutriments essentiels à leur développement), la souche laitière CAM 25-E a des capacités de croissance plus intéressantes que son homologue ME-37. En effet, cette dernière semble ne pas être en mesure d'extraire de son environnement les composés qui lui permettent de croître efficacement, sa croissance s'en voit alors ralentie.

On peut voir que la DO_{max} est atteinte plus tardivement pour ME-37. Toutefois, les deux souches atteignent la même densité optique finale. Cette dernière constatation s'explique par le fait que les levures ont atteint leur concentration maximale au sein du volume qui leur permet d'avoir un équilibre entre les cellules qui naissent et celles qui meurent. Cette stabilité est mise en place pour garantir un apport en composés métabolisables (provenant du milieu ou des cellules mortes) continu et stable pour les cellules naissantes.

Il semblerait que certaines souches présentent des caractéristiques de croissance moins intéressantes du point de vue du projet recherche. En effet, les souches qui se développent relativement plus faiblement sur un milieu nutritif riche auront plus de difficultés à se développer sur un milieu encore plus pauvre nutritivement (en l'occurrence un milieu riche en exuvies d'insectes).

Remarque n°1 : Chacun des trois paramètres présentés a été extrait grâce au logiciel du Gen5 associé à l'appareil de mesure de turbidité : le Biotek H1. De plus, la mesure n'est soumise à aucun biais de subjectivité, puisqu'elle est obtenue sans intervention.

De plus, on peut remarquer que les deux souches dont l'espèce n'a pas été officiellement reconnue (ME-37 et ME-54) ont des performances de croissance bien inférieures à celle des autres souches. Leur appartenance à une autre espèce que *lipolytica* pourrait expliquer ces différences, cela nécessitera une étude plus complète par séquençage de région génomiques clés, qui devra être effectuée ultérieurement par le CIRM-Levures.

L'**Annexe n°8** présente un tableau récapitulatif complet de cette étude de la biodiversité des 30 souches du genre *Yarrowia* et dont 28 sont avérées de l'espèce *lipolytica*. Au vu de la littérature scientifique actuelle, il s'agit de la première étude fine des caractéristiques de croissance levures *Yarrowia lipolytica* à une échelle aussi importante (30 souches).

4.1.8 Conclusion

Ce tableau et les caractéristiques qu'il présente ont conduit à sélectionner 7 souches qui ont été qualifiées de "**plus performantes**". Ces 7 souches ont été envoyées au Canada au sein de l'équipe du Dr Alain Doyen pour que les produits de dégradation soient caractérisés plus spécifiquement sur un milieu riche en exuvies. Ainsi, les 7 souches sélectionnées sur les critères précédemment explicités sont les suivantes :



Figure n°11 : Photographie des 7 souches sélectionnées (PentaxMx1, format carré, 1003-4 pixels par côté)

On pourra noter que la souche W29 a été sélectionnée en raison de ses performances mais également car il existe déjà des outils de manipulation génétique chez cette souche (notamment mutants d'auxotrophies), mis au point dans l'UMR SayFood, qui permettront d'effectuer plus facilement des surexpressions ou inhibitions de gènes d'intérêt. C'est aussi le cas pour H222 A-101 et SWJ-1b, dans d'autres laboratoires à travers le monde. En effet, dans la seconde partie du projet de recherche, il sera question de modifier le génome des levures pour les rendre plus performantes sur le substrat exuvies.

En plus de leurs performances sur la base des critères précédemment explicités, elles ont l'avantage de provenir de milieux différents. Le fait de faire un choix hétéroclite comme celui-ci, garantit nécessairement le maintien, dans ce panel de souches, des caractéristiques qui leurs sont propres et qui proviennent de leur adaptation à leur environnement respectif.

4.2 Détermination d'un substrat optimal

Cette deuxième partie visait à générer une solution liquide à base d'exuvies d'insectes pour y faire croître les souches sélectionnées et ainsi pouvoir étudier leurs performances sur un substrat riche en exuvies d'insectes.

L'objectif était de déterminer la capacité des levures à déprotéiniser les exuvies d'insectes comme il a été vu dans la littérature. En effet, il a été vu qu'il est nécessaire de retirer les protéines des exuvies pour en extraire une chitine purifiée. L'idée générale de cette partie est de créer un substrat riche en protéines d'exuvies et de caractériser la croissance des souches sur celui-ci de manière à cerner leurs capacités protéolytiques.

Il est important de mentionner que les exuvies d'insectes sont insolubles dans l'eau. Ainsi, pour étudier le comportement des levures sur un substrat riche en exuvies, il a fallu développer un procédé qui permette d'obtenir un milieu de culture représentatif des exuvies. Deux objectifs majeurs ont été identifiés, le premier étant de réunir les conditions optimales d'extraction de protéines. Le second étant d'avoir une croissance cellulaire optimale sur ce même substrat (température, conditions pH, agitation...).

Dans un premier temps, le détail de l'obtention du substrat riche en exuvies sera présenté ; par la suite, les résultats de la croissance des souches sur ce substrat seront explicités.

4.2.1 Maximiser la solubilisation des protéines des exuvies

Les exuvies d'insectes étant insolubles, un procédé d'extraction des composés métabolisables associés à la chitine (protéines, lipides) a été mis en place. La mise au point de ce procédé a été commencée en France au sein du laboratoire de INRAE. L'objectif était de comparer l'influence du pH et/ou de la sonication sur la solubilisation des protéines des exuvies d'insectes.

Puis, au sein de l'Université Laval, le procédé précédent a été amélioré, l'idée étant de déterminer l'impact de l'autoclavage et de la durée d'extraction protéique sur la solubilisation des protéines.

4.2.1.1 Influence du pH et de la sonication

Les teneurs protéiques des échantillons ont été obtenues par la méthode de dosage Bradford qui est une méthode d'analyse spectroscopique. Elle consiste à générer une courbe d'étalonnage à partir d'un sérum d'albumine bovine (SAB) de concentration protéique connue. L'objectif étant de comparer la colorimétrie à 595nm des solutions après l'ajout de bleu de Coomassie G-250. En effet, ce qui est physiquement mesuré est un changement d'absorbance due à la modification de la couleur du bleu de Coomassie lorsque celui-ci se fixe (complexation) aux acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et aux résidus hydrophobes des acides aminés présents. Ainsi, le graphique suivant a été obtenu à partir des résultats de **l'Annexe n°9**.

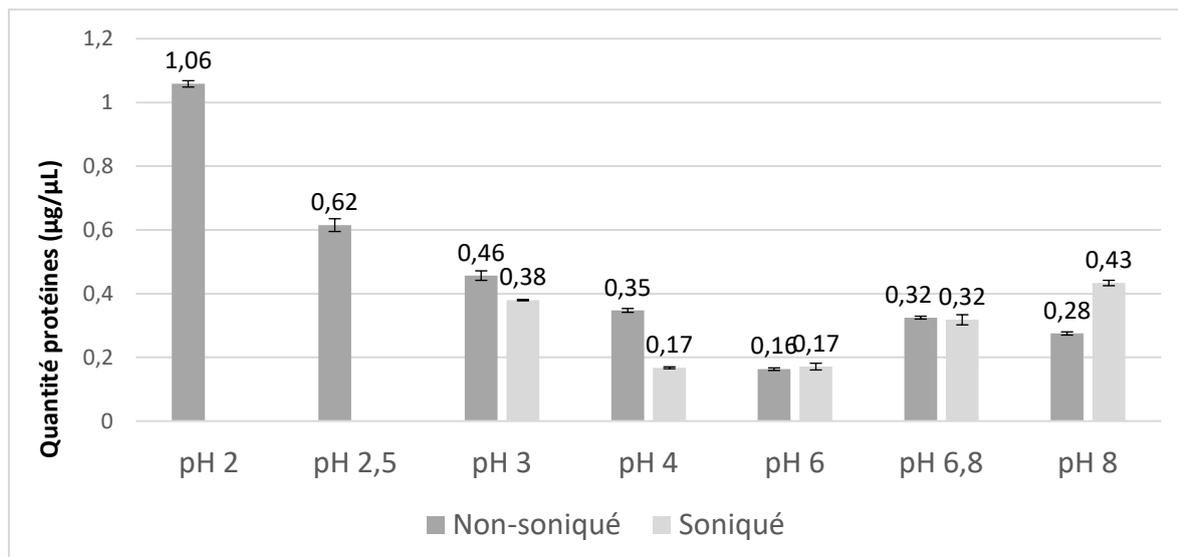


Figure n°12 : Concentration de protéines solubilisées en fonction du pH d'extraction et de la sonication

Tout d'abord, de part les valeurs relativement faibles des écarts-types (en moyenne 2,53 %), on peut souligner le caractère reproductible de cette méthode (trois mesures ont été effectués par filtrats).

Cependant, des inconvénients à cette méthode de quantification par test Bradford peuvent être soulevés :

Premièrement, cette méthode est linéaire et sur un intervalle étroit, (de 2 µg/ml à 120 µg/ml), ce qui implique nécessairement des dilutions préliminaires de l'échantillon avant analyse. Or, les dilutions d'un échantillon à l'autre peuvent être la cause de la dispersion des résultats.

Deuxièmement, Les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire <3000Da ne sont pas détectés par cette méthode. En effet, le bleu de Coomassie se fixe sur les liaisons peptidiques, or les mono-peptides ne sont donc pas détectés. Ainsi, il est possible que la sonication ait par exemple amplifié la solubilisation des protéines mais dans le même temps augmenté la présence de mono-peptide. Ainsi, l'apport de la sonication ne sera pas visible par test Bradford.

En effet, la sonication peut être utilisée pour accélérer la dissolution, en brisant les interactions intermoléculaires. Dans les applications biologiques, la sonication peut être suffisante pour perturber ou désactiver un matériau biologique⁵³. Elle devrait donc, en théorie, permettre une meilleure solubilisation des exuvies d'insectes et donc une meilleure extraction protéique. Pour autant, au regard des résultats présentés ci-dessus, la sonication ne semble pas augmenter significativement la teneur protéique des filtrats d'exuvies (excepté à pH 8). Au vu des résultats présentés, il ne semble pas rigoureux de tirer des conclusions quant à l'impact de de la sonication sur la teneur protéique du filtrat d'exuvies. Cette technique sera donc exclue dans la suite de notre étude.

D'autre part, on peut voir très nettement que l'hydrolyse acide à pH 2 classique et sans sonication extrait le plus de protéines (1,058 µg/µL) des exuvies d'insectes.

4.2.1.2 Étude de l'impact de l'autoclave et de la durée d'hydrolyse

Il a été décidé d'augmenter la durée de l'hydrolyse, ce qui a contribué à améliorer la méthode. De plus, il a été question de tester un pH basique pour le comparer à l'extraction protéique à pH 2 qui s'est révélée être la plus efficace en termes d'extraction protéique. Finalement, une étude autour en lien avec de l'impact de l'autoclave et sur la durée de l'extraction protéique a été effectuée.

Un nouveau protocole a été réalisé. Le temps d'extraction est passé de 15 min à 60 min, ainsi, l'hypothèse d'une teneur protéique plus élevée est posée. Ainsi, les résultats présentés dans le tableau n°4 :

Tableau n°4 : *Concentration de protéines solubilisées en fonction du pH d'extraction et de la de l'ajout éventuel d'un cycle d'autoclavage ou non*

pH	Sans autoclavage	Avec autoclavage
	Concentration protéique moyenne ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentration protéique moyenne ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
2	2,28 \pm 0,25	4,76 \pm 0,95
10	1,58 \pm 0,12	1,93 \pm 0,37

Les résultats de la méthode de Dumas ne sont pas comparables à ceux présentées au -dessus (méthode de Bradford). La méthode de Dumas mesure l'azote total provenant des protéines et de la chitine, ainsi de Dumas permet de détecter la solubilisation des composés azotés, protéines et chitine mélangés, ce qui reste tout à fait cohérent avec ce qu'on veut faire dans le procédé.

De plus, ce procédé est influencé par de l'homogénéité de l'échantillon, c'est pourquoi un nombre important de répétition sont nécessaires éviter ce biais. Malgré cela, on peut voir que les incertitudes restent relativement élevées.

Au regard des résultats présentés, le cycle d'autoclavage permet d'augmenter significativement la concentration protéiques de nos filtrats d'exuvies d'insectes. Ainsi, on peut en déduire que l'autoclave à pour effet de permettre une meilleure solubilisation des protéines. De plus, en comparaison avec la condition d'extraction à pH10, il est clair, une fois encore, que qu'un hydrolyse acide à pH 2 permet d'obtenir une concentration protéique plus importante (4,76 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ contre 1,93 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

4.2.1.3 Conclusion sur l'extraction protéique

Ainsi, en repartant à la quantité initiale d'exuvies d'insectes en début d'extraction (2,5% m/v) il a pu être calculé le pourcentage massique de protéines extraites par rapport à la masse initiale des exuvies. Rappelons que le pourcentage de protéines dans les exuvies d'insectes complètes est de 49,8% (voir **figure n°1**). Les résultats en question sont visibles au sein du **Tableau n°4**

Tableau n°5 : Tableau récapitulatif du pourcentage de protéines extraites des exuvies complètes (rendement) en fonction des techniques de calcul utilisées et des protocoles

Durée d'extraction	pH	Méthode Bradford		Méthode Dumas	
		Pourcentage d'extraction (%) (Soniqué)	Pourcentage d'extraction (%) (Non soniqué)	Pourcentage d'extraction (%) (Sans autoclave)	Pourcentage d'extraction (%) (Avec autoclave)
15 min	2		8,3 ± 0,1		
	2,5		4,8 ± 0,6		
	3	3,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2		
	4	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1		
	6	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4		
	6,8	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,4		
	8	3,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3		
60min	2			0,9 ± 0,14	1,8 ± 0,3
	10			0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1

A ce stade, il est assez net que la meilleure voie d'obtention d'un substrat riche en protéines extraites des exuvies d'insectes est d'utiliser une extraction acide à pH 2, dans les deux protocoles c'est ce pH qui permet d'obtenir la meilleure extraction protéique (8,3% et 1,8% respectivement). La méthode quantification diffère entre la France et le Canada, ainsi les résultats obtenus par la méthode de Dumas et ceux obtenus par celle de Bradford ne sont pas comparables.

Pour autant, la durée d'extraction a augmenté, passant de 15 min à 60 min. Ainsi, on peut rigoureusement supposer que cette dernière a conduit à une teneur protéique finale plus importante que celle que l'on a pu obtenir en France. Néanmoins, la teneur maximale en protéines qui a été extraite des exuvies reste relativement faible (8,3% de rendement), il semblerait que le problème de la solubilité des exuvies soit une difficulté technique assez préoccupante.

Cependant, qu'en est-il de la croissance des souches sur ce substrat, une teneur protéique élevée est-elle synonyme de meilleure croissance cellulaire ?

4.2.2 Un substrat qui permet une croissance optimale

Il est important de noter que le milieu YNB liquide utilisé est milieu dilué nutritif pauvre de façon à ce qu'il ne permette que le démarrage des cultures mais soit rapidement carencé. Contrairement au milieu YNB classique (3,4%(m/v) de la base azotée de levure, 2% (m/v) de glucose), qui soutient parfaitement la croissance sur plusieurs jours, avec ce YNB classique la

levure n'aurait eu aucun besoin de métaboliser les exuvies. Ainsi, caractériser la croissance des levures sur ce milieu permet de tirer des conclusions sur leur capacité à métaboliser les autres composants (lipides et protéines) du milieu.

4.2.2.1 Croissance sur milieu non ajusté

Une première idée a été celle de comparer la croissance cellulaire des souches sur les filtrats d'exuvies qui ont été précédemment créés. Il s'agit de comparer la croissance des souches sur un milieu nutritif riche à base de protéose peptone (peptides et protéines du lait.), de milieu nutritif pauvre (YNB-liquide) et des différents milieux réalisés précédemment :

- Milieu d'extraction à pH2
- Milieu d'extraction à pH2,5
- Milieu d'extraction à pH3
- Milieu d'extraction à pH6

Ainsi, le résultat suivant de cette manipulation a été obtenu en ensemençant des triplicatas de chacune des conditions.

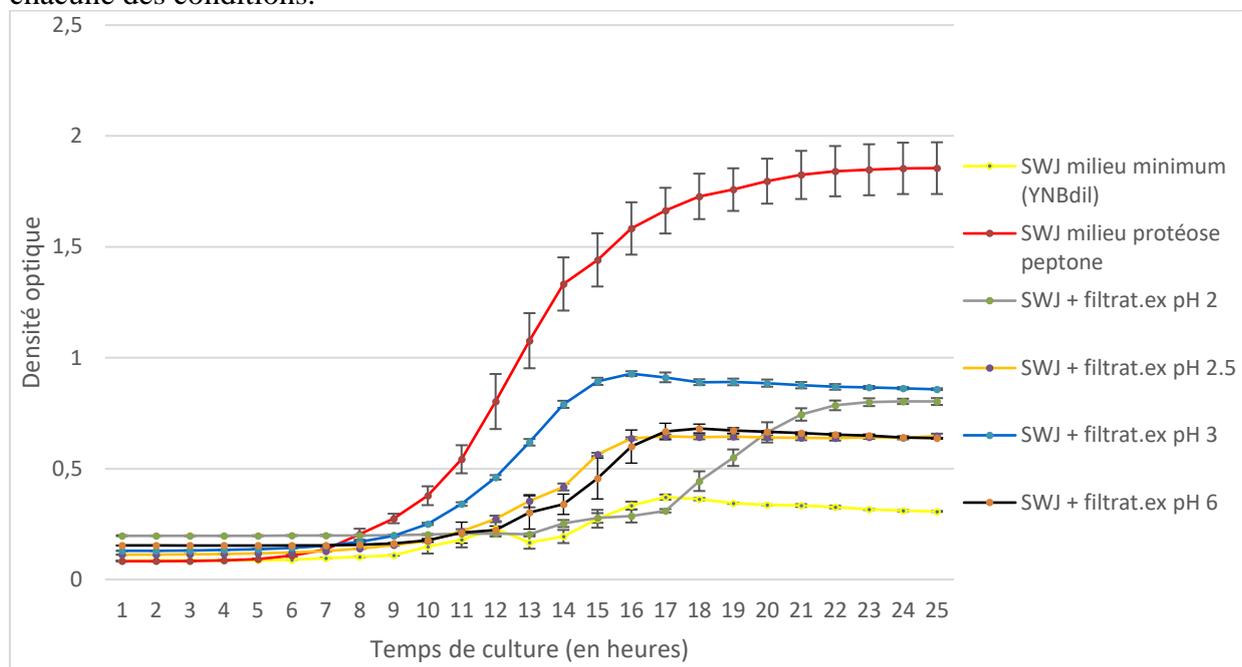


Figure n° 13 : Mesure de la densité optique de la souche SWJ-1-b en fonction de son temps de culture sur différents substrats

Le tableau récapitulatif des données d'intérêts correspondantes est visible en **Annexe n°10**

En premier lieu, on peut remarquer que la dispersion des résultats entre triplicatas est plus importante dans le cas du milieu riche en protéose peptone. En effet, ces incertitudes sont plus élevées que pour les autres milieux. Cela peut provenir de plusieurs facteurs comme les imprécisions liées au volume de dépôt dans les puits, à la quantité de cellules déposée ou encore à l'homogénéité du milieu liquide. Quoi qu'il en soit, les résultats restent entièrement exploitables du fait de leur nette différence avec ceux des autres milieux

On peut voir assez nettement que les milieux générés à base d'exuvies ne permettent pas une croissance aussi importante comparativement au milieu riche à base de protéose peptone (protéines et peptides du lait). Cette observation est logique puisque le milieu à base de protéoses-peptone à une teneur protéique (2,5g/100mL) bien plus élevée que les filtrats d'exuvies (0,1058 g/100mL au maximum, voir **tableau n°3**).

Cependant, la croissance sur milieu minimum est bien moins importante que celle sur les filtrats d'exuvies. En effet, la quantité de cellules en phase stationnaire (DO_{max}) est plus élevée, la pente de la phase exponentielle (V_{max}) est plus importante et le temps nécessaire à l'entrée en phase exponentielle est moindre. On peut en déduire, respectivement, que les nutriments (protéines, lipides et dérivés chitiniques) sont présents en plus grand nombre alors qu'ils sont absents dans le milieu minimum (exclusivement composé d'un sucre et d'une source d'azote). Cela vient confirmer le fait que les souches sont capables de métaboliser les composés extraits des exuvies d'insectes.

Par ailleurs, on remarque que le lien entre teneur protéique des échantillons et la croissance cellulaire n'est ici pas vérifié. En excluant le cas du milieu avec protéose peptone, il semblerait que les souches croissent de manière plus importante sur le milieu à pH 3 qui a pourtant une teneur protéique plus faible. Le filtrat d'exuvies extrait à pH 2 est celui qui a la teneur protéique la plus élevée, ici, on peut voir que c'est lui qui est à l'origine du lag-time (temps nécessaire à l'entrée en phase exponentielle de croissance cellulaire) le plus élevé (cf fig n°20). Notons que ce démarrage tardif est surtout imputable aux composés du YNBdil, immédiatement disponibles, alors que l'utilisation des filtrats d'exuvies nécessite l'expression de gènes et la production d'enzymes, ce qui prend nécessairement du temps.

Pour autant, le lag-time à pH 2 est dû à une mauvaise tolérance d'un pH aussi acide par *Yarrowia lipolytica*. Il est également connu que ces levures ont tendance à augmenter le pH lorsqu'elles se développent⁵⁴. Cela explique la présence du rebond que fait la culture à pH 2 vers 17h : le début de croissance lente a permis une augmentation du pH, d'où croissance, à posteriori, plus efficace. Autrement dit, cette différence de croissance ne serait pas due à la teneur protéique des échantillons mais au pH de la culture.

Seule une souche (SWJ-1-b) est présentée ici, pour autant, les observations sont extrapolables à l'ensemble des 7 souches sélectionnées. Autrement dit, on observe les mêmes phénomènes quelque soit la souche.

4.2.2.2 Croissance sur milieu ajusté

Pour s'extraire de ce biais, il a été question de chercher une méthode qui permettrait d'améliorer la croissance cellulaire sur le filtrat qui a la teneur protéique la plus élevée. Ainsi, au lieu d'étudier directement la croissance sur le milieu à pH 2, il a été proposé de basifier la solution pour en étudier l'impact sur la croissance des 7 souches sélectionnées.

Ainsi, dans cette expérience plusieurs critères de comparaison sont mis en jeu : le pH d'ajustement, le temps d'extraction et l'utilisation du cycle d'autoclavage. Pour rappel, l'influence de la sonication a été exclue, l'idée générale étant de trouver l'ajustement qui permet une croissance cellulaire maximale.

Dans un premier temps, pour discuter de l'effet de l'ajustement suivi d'une seconde filtration sur la teneur protéique du filtrat, une étude de sa teneur protéique a été réalisée. En effet, à la suite d'un ajustement à pH 4 et à pH 6, la question a été posée de savoir si des protéines avaient pu s'agréger et se retrouver dans le rétentat. Cette hypothèse aurait signifié que la quantité finale de protéines aurait diminuée dans le filtrat nouvellement ajusté.

Ainsi, les résultats sont présentés ci-après :

Tableau n°6 : *Tableau de la concentration protéique mesuré par la méthode de Dumas selon trois conditions d'ajustements et de filtration*

Conditions	Concentration protéique moyenne ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Extraction à pH 2 non ajusté	$1,064 \pm 0,005^A$
Extraction à pH 2 ajusté 4 & filtration	$1,030 \pm 0,004$
Extraction à pH 2 ajusté 6 & filtration	$0,377 \pm 0,004$

^A Incertitudes calculées au seuil de 95% grâce à l'écart-type sur la moyenne de Pearson

Au regard des écart-types calculés, il peut être conclu quant à la répétabilité de la méthode de quantification des protéines. Les données sont ainsi exploitables.

On peut voir que pour l'ajustement à pH 4 la concentration protéique de l'échantillon n'a pas significativement varié après la seconde filtration (0,22 μm). En effet, l'écart relatif n'était que de **3,102%**. Ce résultat signifie que pratiquement aucune protéine n'a été retenue par le filtre 0.22microns et donc qu'aucun agrégat protéique ne s'est formé suite à cet ajustement. En effet, le point isoélectrique n'a pas été dépassé.

En revanche, les résultats de l'ajustement à pH 6 montrent que la quantité protéique par rapport au milieu non ajusté a diminué de près de **65%**. Ainsi, on peut en déduire qu'à ce niveau d'ajustement, le point isoélectrique a été dépassé et donc une fraction non négligeable de protéines agrégées se retrouve dans le rétentat.

Finalement, il sera nécessaire de discuter des résultats suivants à la lumière de ceux qui viennent d'être présentés ci-dessus. Il explique également notre choix d'avoir ajusté stérilement le pH 10 d'extraction à un pH 4. L'idée étant de ne pas avoir besoin de filtration post-ajustement et ainsi de s'affranchir du biais relatif aux protéines agrégées piégées dans le rétentat.

Ainsi, pour chacune des 7 souches sélectionnées, les résultats de la croissance de celles-ci sur les filtrats obtenus à 15min d'extraction et ajustés sont présentés ci-après.

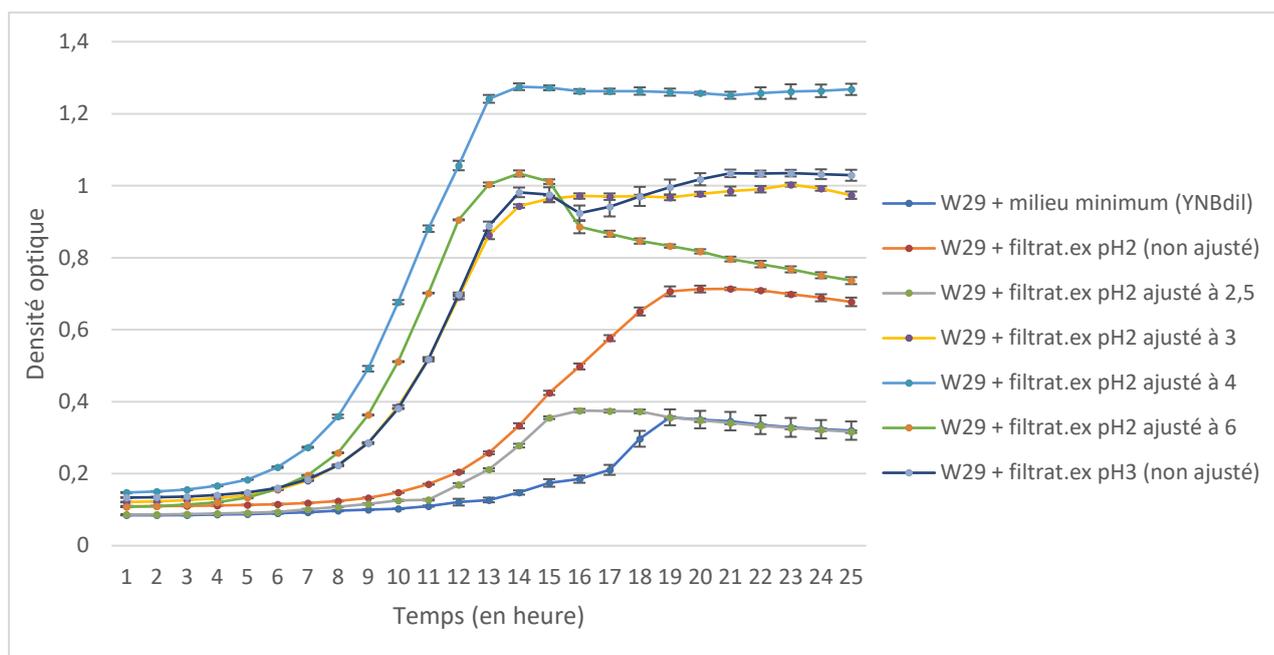


Figure n°14 : Graphique des courbes de croissance de la souche W29 au sein des différents milieux (dépôt en triplicatas)

Tout d'abord, les faibles incertitudes témoignent de la reproductibilité de l'expérience ainsi que du caractère exploitable des données.

Dans un premier temps, on peut remarquer que le choix a été effectué de conserver deux milieux non ajustés, soit le filtrat d'exuvie d'extraction à pH 2 (non ajusté), il s'agit de celui qui a la teneur protéique la plus élevée. Soit le filtrat d'exuvie d'extraction à pH 3 (non ajusté) a également été choisi, il s'agit de celui qui permettait la meilleure croissance cellulaire.

En comparant les milieux ajustés à ceux non ajustés, on remarque que la croissance de la souche W29 sur le milieu d'extraction à pH 2 non ajusté est bien moindre que pour les milieux ajustés (DO_{max} et V_{max} plus faibles, lag-time plus important). Il en est déduit qu'à teneur protéique égale, le pH de culture joue un rôle prépondérant dans la croissance cellulaire des levures *Yarrowia lipolytica*.

Il est observé que la croissance cellulaire de cette levure dans un milieu ajusté à pH6 est elle aussi très faible. Cette observation provient de deux facteurs. Premièrement, la filtration post-ajustement a diminué la teneur protéique du perméat, rendant ainsi la quantité de protéines accessible aux souches moins importante. Deuxièmement, il faut savoir que les levures *Yarrowia lipolytica* ont tendance à basifier leur environnement lorsqu'elles se développent (la preuve de cela sera détaillée en fin de ce rapport). Ainsi, un début de croissance à pH 6 implique que les pHs d'activité de la protéase acide AXP sont rapidement dépassés⁵⁵.

Cependant, on peut s'étonner que la croissance soit aussi bonne dans ce milieu (comparativement à ceux ajustés à 3 ou 4) car la quantité de protéines est réduite de moitié dans ce milieu. On peut observer à pH 6 l'effet précoce de la production d'AEP (protéase neutre/alcaline) qui pourrait être à l'origine de cette meilleure croissance, dans le cas où elle est nettement plus performante que l'AXP, ce qui semble être ici le cas. Par ailleurs, à cause de la perte de la majeure partie des protéines, ce milieu est très rapidement épuisé, d'où la chute brutale qui suit, avec apparemment une mort cellulaire importante (au lieu d'une phase stationnaire).

Il a été question de comparer les milieux ajustés au filtrat non ajusté qui entraînait la meilleure croissance cellulaire. Ainsi, on remarque que seul le filtrat d'exuvies obtenu à pH 2 et ajusté à pH 4 permet d'avoir une croissance cellulaire significativement améliorée. En effet, l'ensemble des caractéristiques d'intérêts (DO_{max} , lag-time et V_{max}) sont meilleures.

Lorsque l'on s'intéresse aux statistiques complètes (**Annexe n°11**), sur les 7 souches sélectionnées, on peut affirmer que c'est un ajustement à pH 4 qui permet de maximiser ces critères de comparaison (DO_{max} , V_{max} , lag-time).

Finalement, le milieu qui permet la meilleure croissance cellulaire est issu d'une étape d'extraction à **pH 2** (qui permet d'avoir la teneur protéique la plus importante) suivi d'un **ajustement à pH 4** (pH qui permet une croissance cellulaire optimale).

4.2.2.3 Impact de l'autoclavage et de la durée d'extraction :

Précédemment il a été observé avons pu observer que le meilleur rendement protéique avait été obtenu pour une extraction protéique avec autoclave d'une durée de 60min. Pour autant, cette dernière information implique-t-elle nécessairement une meilleure croissance des souches ?

Au regard des résultats obtenus en France, il a été prouvé que c'est un ajustement à pH 4 qui garantissait la meilleure croissance. C'est donc un ajustement à pH 4 qui a été effectué pour comparer l'effet de la durée d'extraction et de l'autoclavage sur le développement cellulaire.

Ainsi, de la même manière que précédemment, les résultats des suivis de croissance suivants ont été obtenus :

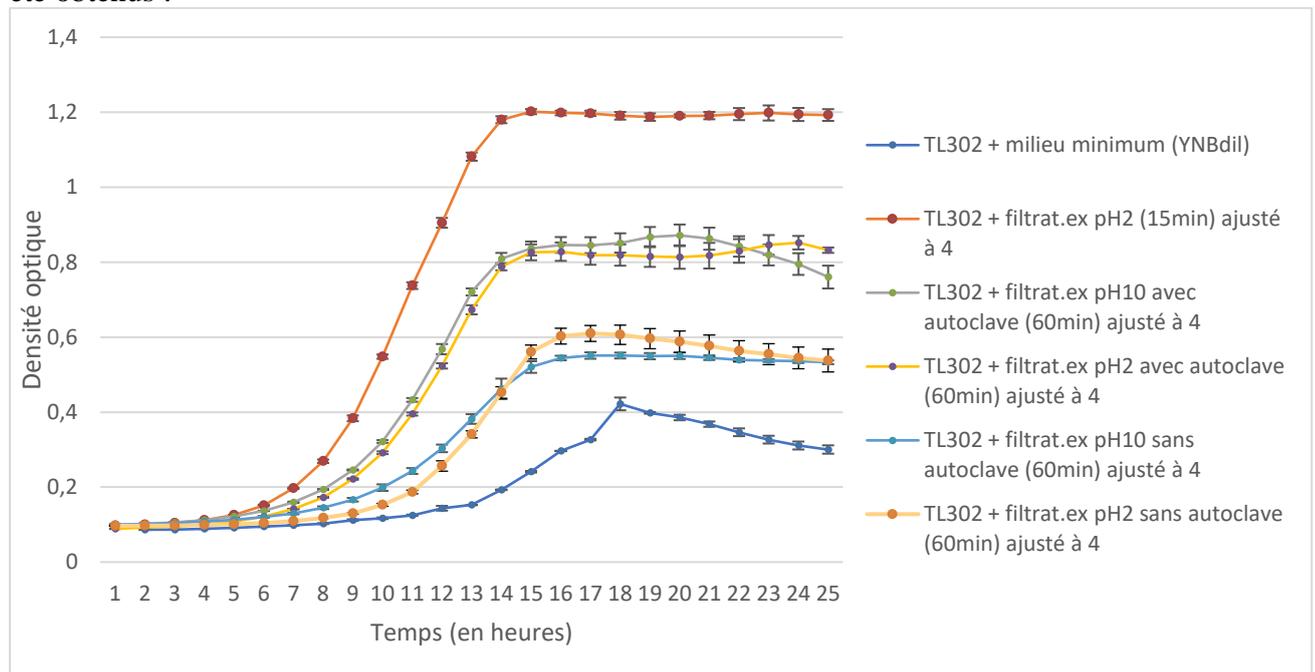


Figure n°15 : Turbidité moyenne de TL302 sur différents milieux de culture riches en exuvies d'insectes (analyses effectuées en triplicata).

Pour comparer les différentes conditions, la condition optimale (extraction protéique de 15min à pH 2 et ajustement pH4) de la précédente expérience a été superposée à ce graphique. Il s'avère que les conditions de mesure de turbidité ainsi que la turbidité initiale sont identiques, c'est pourquoi, il est rigoureux de superposer les résultats.

Comparativement au cas de 15 min d'extraction protéique, une durée de 60 min génère une

DO_{max} moins importante, un V_{max} moins élevée et un lag-time plus long (voir **Annexe n°12**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la teneur protéique des échantillons obtenus par une hydrolyse acide plus longue est moins importante. Cependant, on ne peut être confirmer cette hypothèse puisque les méthodes de quantification de protéines (Dumas et Bradford) ne sont pas les mêmes.

Paradoxalement, il semblerait que le temps d'extraction soit inversement proportionnel aux performances de croissance cellulaire. Autrement dit, dans notre cas plus ce temps d'hydrolyse est court et plus les souches croissent efficacement.

On voit également que sans autoclavage, le pH 2 permet une croissance légèrement améliorée comparativement à celui à pH 10. En effet, comme exposé plus haut, le pH 10 ajusté stérilement à 4 entraîne la formation d'agrégats protéiques (dépassement du point isoélectrique). Le choix de ne pas filtrer après ajustement permettait d'éviter ce biais, pour autant, les protéines agrégées sont, de fait, moins accessibles (à cause des agrégats). En ce sens, il est logique que la croissance cellulaire dans ces conditions ne soit pas optimale.

Pour autant, il semble étonnant qu'une extraction à pH 2 plus longue, ajustée à pH 4 ne donne pas des résultats similaires à la condition précédente lorsque la durée d'hydrolyse était plus courte.

Finalement, l'influence du cycle d'autoclavage est observable en comparant deux à deux les croissances cellulaires sur les milieux ayant subi ce cycle ou non. Il semblerait qu'au regard des résultats présentés sur la figure et ceux présents en **Annexe n°12** que les milieux sans autoclave entraînent une croissance cellulaire moindre. Cette dernière, à pH 10 et à pH 2 conduit à une croissance cellulaire tout de même meilleur que le milieu minimum (YNB liquide). Cela semble cohérent puisque qu'il y a des protéines et des peptides des exuvies dans ces filtrats.

4.2.3 Conclusion

Il a été démontré que plusieurs facteurs sont déterminants dans le choix du substrat optimal pour la caractérisation de la croissance des sept souches de *Yarrowia lipolytica*. Il semblerait que le meilleur procédé d'extraction des protéines des exuvies d'insectes soit celui qui réunisse une extraction à pH 2 dont 15 min d'autoclavage, suivi d'un ajustement à pH 4.

Finalement, au cours de cette partie, un procédé optimisant l'extraction protéique des exuvies d'insectes a été développé. La teneur protéique finale maximale est d'environ de 0,125% pour 2,5% d'exuvies au départ, ce résultat semble en apparence assez faible. Pour autant, il est important de se remémorer que les exuvies d'insectes sont insolubles et que cette caractéristique rend d'autant plus complexe l'extraction de ses protéines.

D'autre part, après culture des sept souches *Yarrowia lipolytica*, il a été remarqué, pour la première fois, qu'elles étaient capables de métaboliser les composés présents dans les filtrats: les protéines extraites des exuvies ainsi que, probablement, les lipides. En ce sens, l'hypothèse selon laquelle les levures *Yarrowia lipolytica* sont capables de dégrader les protéines des exuvies d'insectes est vérifiée. En effet, l'un des enjeux majeurs de cette étude est d'utiliser les levures pour déprotéiniser les exuvies d'insectes. En outre, si une méthode permettait d'augmenter la solubilité des exuvies et d'extraire plus de protéines, au regard des résultats précédents, il serait envisageable que les levures soient en mesure d'en métaboliser une grande partie.

Alors qu'il s'agissait d'un filtrat, en substance relativement proche de celui des exuvies, il est

légitime de se demander si une telle croissance est possible sur un milieu non filtré. Autrement dit, il est désormais question de mettre les cellules en contact direct avec les exuvies.

4.3 La croissance des souches les plus performantes sur exuvies complètes

Cette dernière partie prend place dans la continuité des deux précédentes. En effet, là où la partie I et II ont permis de sélectionner les souches les plus efficaces et de confirmer leur capacité à métaboliser les protéines des exuvies, cette troisième partie s'intéresse à la croissance des souches sur les exuvies complètes.

Dans un premier temps, il sera question de caractériser leur croissance sur ce milieu formé de particules solides (les exuvies étant insolubles) et du milieu d'extraction optimal (liquide). Puis, il sera question de quantifier et de caractériser les produits de dégradation des levures sur les exuvies complètes.

4.3.1 La croissance des souches les plus performantes sur les exuvies complètes

À la lumière des résultats précédents, le milieu qui permet une extraction protéique la plus importante est celui où les exuvies subissent une hydrolyse acide de 15 min à l'autoclave puis un ajustement à pH 4 avant d'ensemencer les souches. C'est donc cette même logique qui a été répétée ici. Cette fois les exuvies complètes sont présentes, ainsi le milieu n'est pas filtré. Autrement dit, les levures seront directement mises en contact avec les cuticules d'insectes.

Le choix a été fait de présenter les résultats en équivalent de turbidité, correspondant à la croissance cellulaire. C'est de cette manière que les précédents résultats avaient été présentés. De plus, il semble plus commun de parler en termes de densité optique plutôt que de nombre de cellules. Néanmoins, Il faut comprendre que les densités optiques suivantes sont tirées du nombre de cellules par boîtes et que c'est en connaissant le facteur de dilution que l'on a pu remonter au nombre de cellules par mL. C'est effectivement à partir de cette concentration cellulaire qu'en a été déduit la densité optique correspondante.

Ainsi, le graphique suivant représente les résultats de cette première manipulation de dénombrement réalisée.

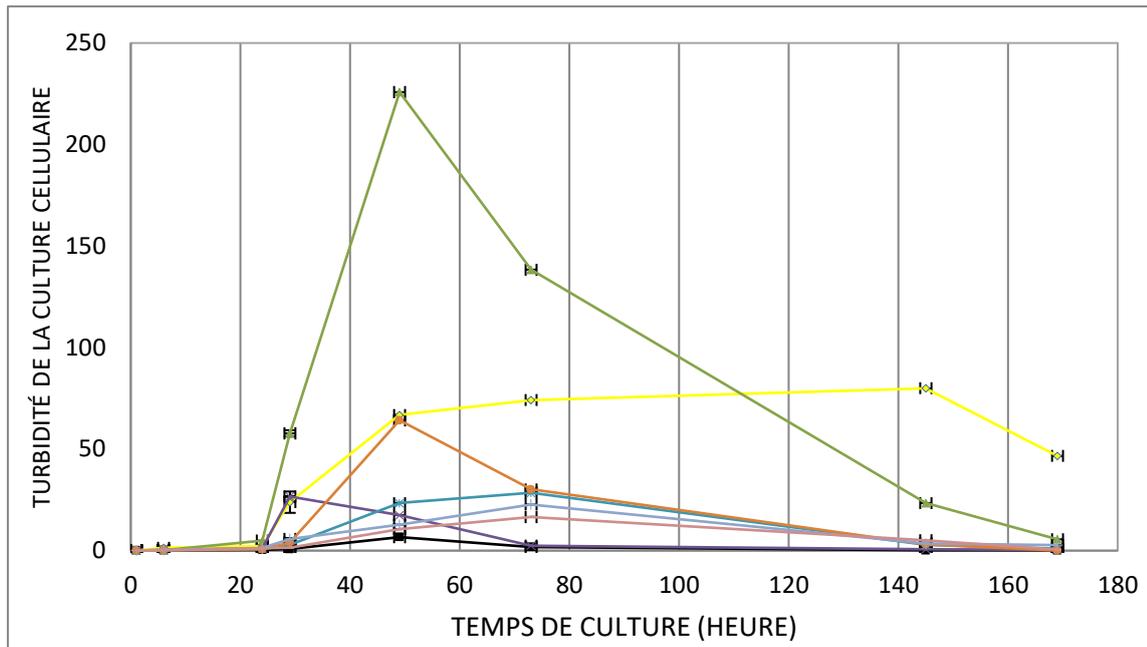


Figure n° 16 : Courbe de la DO600 (estimée par dénombrement sur boîtes YPD-agar) de cultures en milieu YNBdil + exuvies "pH2HCl ajusté à pH4" et diagramme des pH correspondants

■	SWJ-1b	max 48h : 6,67 ($2,00 \times 10^8$ cellules/ml)
◆	SWJ-1b	max 72h : 74,17 ($2,33 \times 10^9$ cellules/ml)
▲	W29	max 48h : 225,83 ($6,79 \times 10^9$ cellules/ml)
×	CLIB 703	max 48h : 17,50 ($5,25 \times 10^8$ cellules/ml)
✱	CLIB 205	max 72h : 28,50 ($8,55 \times 10^8$ cellules/ml)
●	A-101	max 48h : 74,17 ($1,39 \times 10^9$ cellules/ml)
+	H222	max 72h : 22,75 ($6,83 \times 10^8$ cellules/ml)
—	TL302	max 72h : 16,58 ($4,98 \times 10^8$ cellules/ml)

Compte tenu des faibles incertitudes (barres d'erreur) observables sur cette figure, on peut raisonnablement supposer que les résultats sont exploitables et que la manipulation est répétable.

Bien que les souches se comportaient, sur un même filtrat d'exuvies, de manière similaire (comme il a été vu dans la partie II), ici leur comportement diffère. En effet, alors que leur turbidité initiale est la même, au regard des résultats visible sur ce graphique, il paraît évident que la souche W29 a une faculté toute particulière à se développer sur ce substrat.

À une concentration en exuvies égale pour toutes les solutions présentées ici (hormis le témoin négatif sans en exuvies), la souche W29 possède une densité optique maximale au minimum 2,8 fois plus élevée que pour les autres souches (DO = 225,5 pour W29 contre 80 pour SWJ-1-b).

Finalement, certaines souches, telles que CLIB 703, CLIB 205, H222 et TL302 semblent guère se développer efficacement sur ce substrat. En effet, comme on peut le voir ci-dessus, elles ont une turbidité maximale 2 fois supérieure au milieu minimum.

Ces résultats indiquent que les souches étudiées sont plus ou moins aptes à métaboliser les composés présents directement au sein des exuvies d'insectes.

Une corrélation entre le pH des cultures (relevé en même temps que le nombre de souches) et la croissance cellulaire semble exister. La **figure n°18** met en perspective ces deux variables.

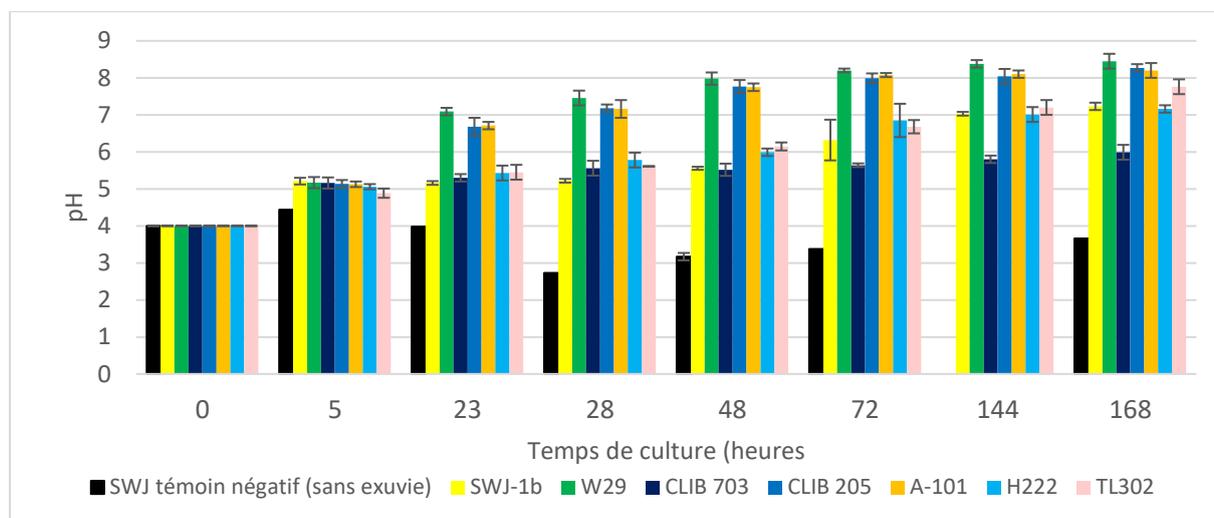


Figure n°17 : pH moyen des cultures dans un milieu YNB liquide + 2,5% exuvies

Pour le cas de W29 et A101, on observe un lien entre la décroissance cellulaire, pour les souches se développant de fortement sur ce substrat, et le pH de la culture. En effet, lorsque celui-ci dépasse pH 7,5 on observe une diminution conséquente de la turbidité : synonyme de décroissance cellulaire. L'hypothèse la plus probable est qu'à ce pH neutre, l'activité protéolytique des levures est fortement diminuée. En effet, on sait qu'à pH 7, la protéase acide (AXP)⁵⁶ n'est plus fonctionnelle.

Pour W29, il est peut-être possible que le milieu ait été épuisé : cela serait à vérifier par exemple par dosage Bradford du surnageant. Pour A-101, qui a une AXP un peu plus efficace et une AEP similaire à W29 (cf. **Annexe n°8**) à, cela reste plus difficile à expliquer. Elle a apparemment une lipase moins efficace, mais avec la faible teneur en lipides des exuvies d'insectes, ça ne semble pas pouvoir expliquer cette différence.

La particularité de W29 réside dans la DO très élevée qu'elle atteint, synonyme d'une forte croissance cellulaire sur ce substrat d'exuvies d'insectes. Il y a sans doute une caractéristique de cette souche qui la rend très efficace en comparaison avec les autres. L'une des hypothèses est qu'elle pourrait avoir une meilleure activité chitinase, cela serait cohérent et surtout très important pour le projet. En effet, cela signifierait que W29 est capable de métaboliser la chitine elle-même et d'utiliser même les composés qui y étaient liés au départ, lesquels semblent rester inaccessibles aux autres souches.

On sait également que les protéines représentent la source principale d'énergie présente dans les exuvies et qui est directement accessible aux levures. En ce sens, une diminution de l'activité protéolytique des levures entraîne nécessairement une diminution de leur croissance.

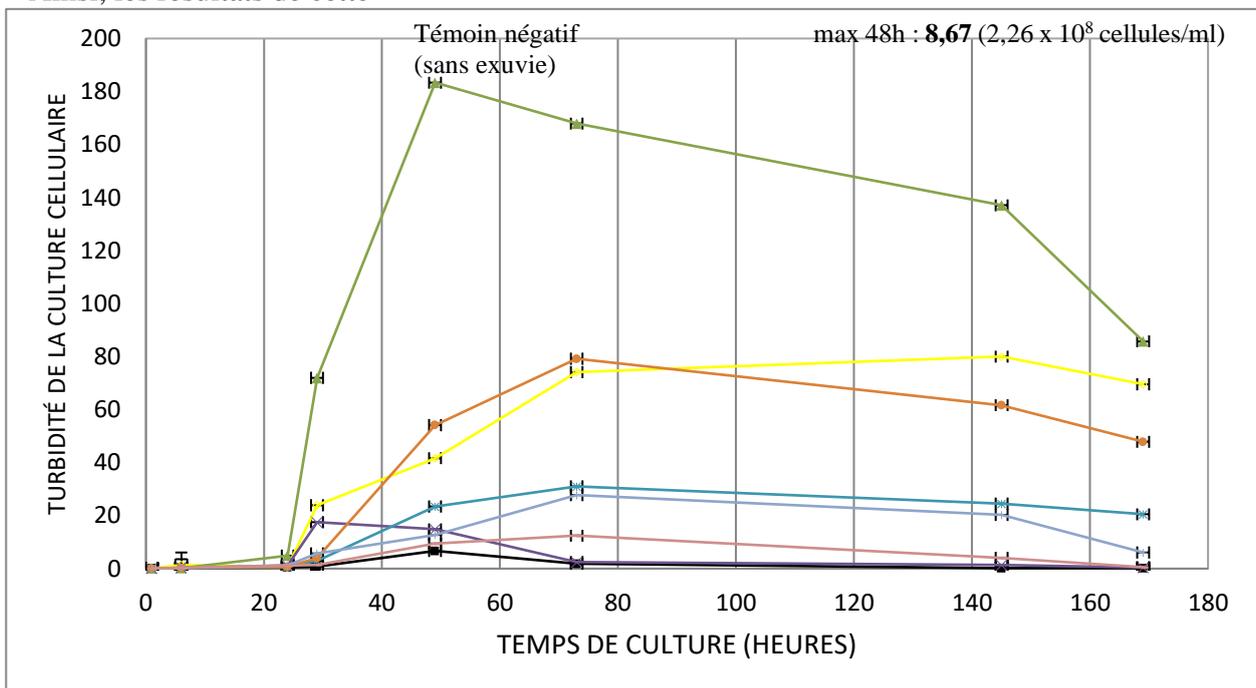
Dans le cas de SWJ-1-b cette décroissance cellulaire est observable plus tardivement puisque le pH de la culture ne dépasse pH 7 qu'à partir de 144h. SWJ-1b se maintient bien en phase stationnaire, ce qui témoigne de sa robustesse.

Pour ce qui est des souches restantes (CLIB 703, H222 et TL302), le pH de leur culture

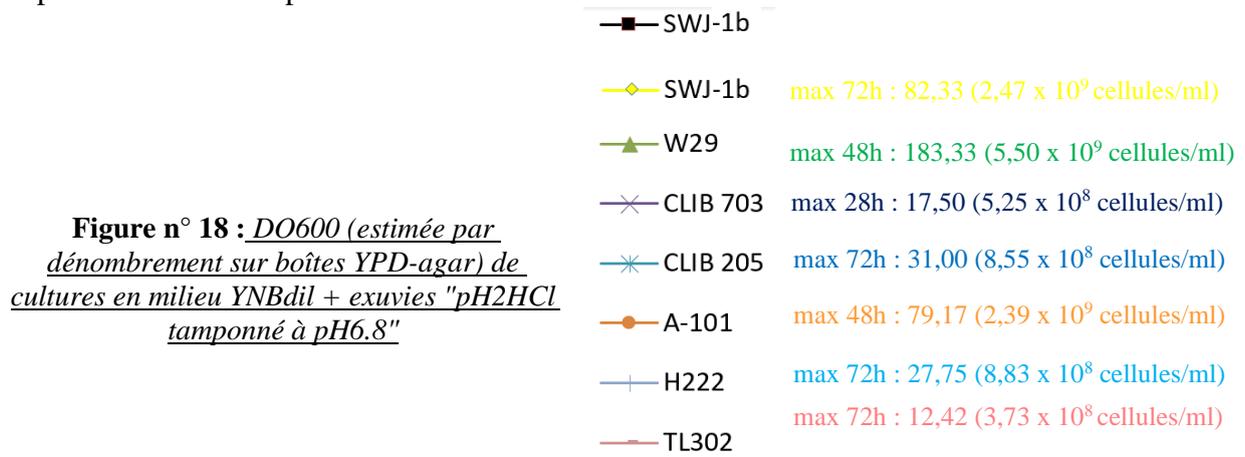
n'augmente que très lentement. En effet, on peut voir que leur turbidité reste relativement faible tout au long de l'expérience, autrement dit, ces souches ont une croissance qui reste faible sur ce substrat d'exuvies d'insectes. Sachant que les souches de *Yarrowia lipolytica* ont tendance à basifier leur environnement en se développant, en corrélation avec le graphique, ce pH stagnant indique alors une mauvaise croissance cellulaire.

Au regard des résultats précédents, il a été proposé d'améliorer ce protocole en utilisant un tampon potassium-phosphate non métabolisable. L'idée étant de conserver un pH optimal d'activité protéolytique, la décroissance cellulaire ayant été observée après un dépassement du pH 7, il a été décidé tamponner notre milieu au pH 6,8. Ce pH est, en outre, le pH d'expression maximale de la protéase neutre/alcaline AEP.

Ainsi, les résultats de cette



expérimentation sont présentés ci-dessous



L'évolution du pH de chacune des cultures est présentée en **Annexe n°13**.

Par ailleurs, la DO_{max} atteinte par la souche W29 avec tampon phosphate est seulement de 183,33, au lieu de plus de 225,83 sans ce tampon. Cet écart pourrait représenter l'effet de l'AXP (protéase acide), qui n'est ni produite ni active à ce pH de 6,8. Cela indique que l'AXP contribue

bien à l'efficacité globale. Cependant, le tampon à 6,8 est bénéfique pour le maintien de croissance à long terme. En ce sens, il serait intéressant de savoir si les 2 protéases dégradent les mêmes protéines pour expliquer cette influence du tampon sur la densité optique maximale atteinte.

On peut également remarquer l'effet du tampon sur les souches s'étant le moins développées (H222 et CLIB 205). Cela indique que ces souches sont capables de métaboliser une partie de composés des exuvies d'insectes et que l'utilisation d'un tampon leur permet de maintenir une stabilité cellulaire.

Finalement, le tampon phosphate ne semble pas affecter les cultures des souches CLIB 703 et TL302. En effet, leur croissance cellulaire et notamment la stabilité de la turbidité dans le temps n'est pas vérifiée. En ce sens, on peut considérer que ces deux souches sont relativement inefficaces sur le substrat composé presque exclusivement des exuvies complètes. En outre, l'utilisation d'un tampon à un pH plus acide aurait pu être testé, de manière à avoir l'activité protéolytique de l'AEP associé à celle de l'AXP. Cependant, il n'a pas été trouvé dans la littérature de tampon acide non-métabolisable^L par ces levures.

Finalement, les souches A101, W29 et SWJ-1-b sont capables de se développer sur un milieu concentré en exuvies d'insectes. Au regard de ces résultats, elles métabolisent d'autant plus de composés présents dans les exuvies d'insectes que leur pH est maintenu à un pH optimal d'activité protéolytique. Une importance toute particulière sera portée à W29 qui possède des capacités de croissance remarquables sur ce milieu en comparaison aux autres souches. Alors que la concentration en exuvies est égale, que les souches sontensemencées à la même turbidité et que les conditions expérimentales sont les mêmes, on observe chez W29 cette différence. Peut-être que cette différence de croissance pourrait avoir pour origine un apport énergétique différent par rapport à celui des autres souches. En effet, il se pourrait qu'en plus de dégrader les protéines et les lipides contenues dans les exuvies d'insectes, elle soit la seule à être capable de métaboliser la chitine présente.

En ce sens, une caractérisation plus précise des produits de dégradation des souches sur ce substrat semble nécessaire. L'objectif plus global étant de savoir si ces différences d'un point de vue de la croissance cellulaire sont toujours observables à l'échelle moléculaire (les produits de dégradation).

4.3.2 La caractérisation de leurs produits de dégradation

Précédemment, il a été démontré que les sept souches de *Yarrowia lipolytica* sélectionnées pour leurs performances ont été capables de croître sur le milieu contenant les exuvies d'insectes. Ainsi, les souches ont nécessairement puisé leurs ressources dans les composés des exuvies qu'elles sont en mesure de métaboliser. Ces composés sont essentiellement des protéines, des lipides et de la chitine.

4.3.2.1 Analyses protéiques

En ce qui concerne les analyses protéiques, comme il a été détaillé dans le matériel et méthodes précédents : des aliquotes de culture au temps 0h, 48h et 150h ont été prélevés dans le but de caractériser le surnageant de ces derniers.

^L Les tampons citrate et acétate sont, en effet, métabolisable par les levures *Yarrowia lipolytica*.

Dans le but de connaître l'évolution des protéines contenues dans les surnageants au cours de l'expérience, des gels d'électrophorèse dénaturés ont été réalisés. Ce choix permet, par l'utilisation d'un dénaturant chimique, le SDS, d'éliminer la structure tertiaire et quaternaire des protéines.

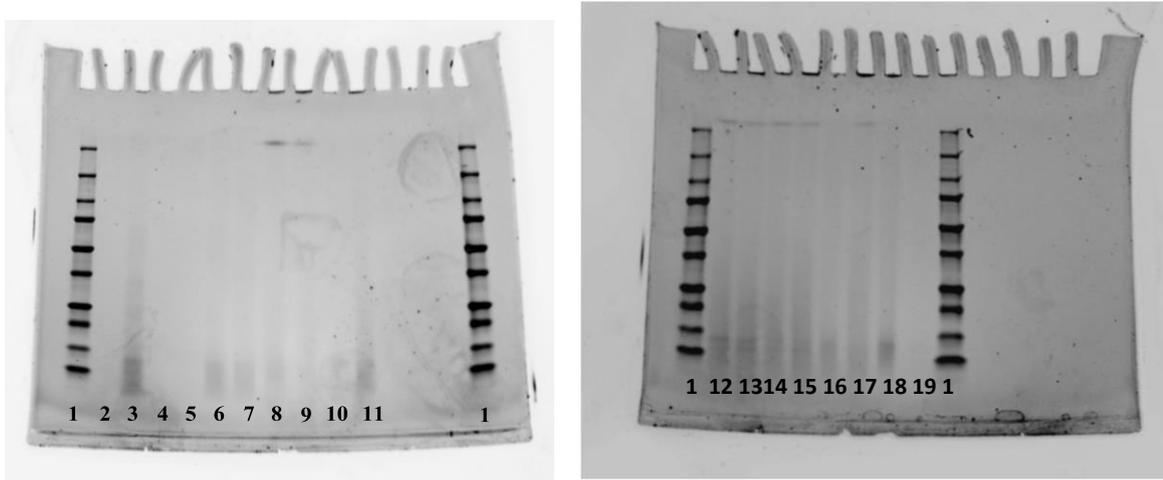


Figure n°19 : Gel d'électrophorèse dénaturé, Mini-Protean TGX / stain-free gels (4-20%) d'acrylamide

1) Standard	10) Surnageant CLIB 703 (48h de fermentation)
2) Surnageant Témoin négatif sans exuvie (T=0h de fermentation) & sans levure	11) Surnageant CLIB 703(150h de fermentation)
3) Surnageant Témoin négatif avec exuvie (T=0h de fermentation) & sans levure	12) Surnageant CLIB 205 (48h de fermentation)
4) Surnageant Témoin négatif sans exuvie (T=48h de fermentation)	13) Surnageant CLIB 205 (150h de fermentation)
5) Surnageant Témoin négatif sans exuvie (T=180h de fermentation)	14) Surnageant A101 (48h de fermentation)
6) Surnageant SWJ (48h de fermentation)	15) Surnageant A101 (150h de fermentation)
7) Surnageant SWJ (150h de fermentation)	16) Surnageant H222 (48h de fermentation)
8) Surnageant W29 (48h de fermentation)	17) Surnageant H222 (150h de fermentation)
9) Surnageant W29 (150h de fermentation)	18) Surnageant TL302 (48h de fermentation)
	19) Surnageant TL302 (150h de fermentation)

On peut voir que les témoins négatifs sans exuvies (2,4 et 5) ne présentent aucune bande de migration et rien ne semble être resté dans les puits de dépôts. À l'inverse, des protéines ont migrées pour le témoin négatif avec exuvies (3), en effet, une bande relativement sombre et localisée entre en fin de gel (protéines de faible poids moléculaire). De plus une faible quantité de protéines est restée dans le puits de dépôt. Elles sont nécessairement de poids moléculaire très important et ne sont pas capables de migrer dans ces conditions d'expérimentation. Ainsi, une partie des protéines restantes dans les puits est imputable aux protéines des exuvies d'insectes solubilisés dans le surnageant.

Concernant les surnageants post-fermentation, on réalise que la bande correspondant aux protéines des exuvies est moins sombre. Cela indique qu'à volume égal de surnageant, la quantité de protéines des exuvies d'insectes est moins importante. Sachant que les protéines sont, dans l'ensemble, directement métabolisables par les levures, ce résultat est cohérent.

De manière générale, on peut voir également que la quantité de protéines restante dans les puits de dépôt est plus importante que pour le témoin négatif sans levures. Ainsi, cela indique que des protéines de poids moléculaire important sont secrétées par les levures durant leur phase de croissance sur ce substrat.

Dernièrement, le profil de migration de W29, A-101 et H222 présente une bande relativement nette à fort poids moléculaire début de gel, elle est visible à 48h de culture comme à 160h. Elle est absente des autres profils de migration. N'étant pas présentes dans le témoin négatif, il s'agit nécessairement d'une protéine obtenue par le biais des levures, soit par sécrétion, ou par métabolisation du substrat.

En raison de la quantité de protéines restantes dans les puits de dépôt, il semble nécessaire d'améliorer cette méthode de manière à pouvoir caractériser les produits de dégradation protéiques des levures sur le substrat d'exuvies d'insectes.

4. Conclusion et perspectives

Ainsi, comme il a été présenté au cours de ce stage, la biodiversité de 30 souches de *Yarrowia lipolytica* a pu être approfondie. Le développement de différentes méthodes et expériences a permis de sélectionner sept souches pour leurs performances à la fois protéolytiques, lipolytiques, mais également sur leurs capacités de croissance.

La constitution d'un milieu de référence, riche en exuvies a été effectuée pour caractériser plus spécifiquement les caractéristiques de ces sept souches. Ce milieu (pH 2 d'extraction ajusté à pH 4) a été choisi en raison de sa teneur protéique élevée et du pH garantissant une croissance optimale des levures. Il a été montré que les *Yarrowia lipolytica* avait la faculté de se développer sur ce substrat et ainsi de métaboliser les éléments (protéines et lipides) des exuvies solubilisées dans les filtrats.

Fort de ces premiers résultats, les levures ont été mises directement au contact des exuvies, sans aucune filtration dans le milieu optimal (pH 2 d'extraction, ajusté à pH 4 pour la culture). Ainsi, des différences de croissance sur ce substrat ont pu être remarquées entre les 7 souches. Il s'avère que W29, SWJ-1-b et A101 ont les meilleures capacités de croissance. En ce sens, la robustesse des souches et leurs capacités à poursuivre la métabolisation de ce substrat dans le temps a été étudié grâce à l'utilisation d'un tampon phosphate au pH 6,8 d'expression maximal de la protéase neutre/alcaline AEP.

Finalement, il semblerait que la souche W29 soit capable de se développer de manière plus importante que les autres souches sur un substrat d'exuvies d'insectes. Cette différence pourrait provenir de sa capacité à métaboliser la chitine ou les composés directement liés à celle-ci, ce qui ne serait pas le cas des autres souches. C'est dans l'idée d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse que des analyses spécifiques des produits de dégradations ont été réalisées en fin de ce stage. Ainsi, il est question de caractériser les protéines avant et après fermentation, mais également la chitine et ses dérivés. Les résultats de ces analyses n'ayant pas été obtenus et discutés avant la date butoir du rendu de ce rapport de stage, ils ne seront pas présentés ici. Pour autant, les derniers résultats éventuels seront explicités lors de la soutenance de ce rapport.

Dans le cas où il y aurait effectivement une bioconversion de la chitine par les levures *Yarrowia lipolytica*, elle génèrera des composés peptidiques et chitiniques qui pourront être fractionnés de manière sélective par l'application de procédés baromembranaires spécifiques. Le développement de ces procédés à cette fin devra être effectuée et fera l'objet d'une perspective de poursuite de ce projet.

De plus, compte tenu de la nécessité de dégrader les lipides présent dans les exuvies pour purifier la chitine. Il semble nécessaire de développer une méthode d'analyse quantitative de l'activité de la lipase LIP2.

Finalement, les modifications génomiques des levures *Yarrowia lipolytica* sélectionnées pourrait permettre de maximiser la métabolisation des exuvies d'insectes. La perspective de l'utilisation de l'ingénierie génétique pour optimiser la bioconversion de chitine par ces levures fera l'objet de la seconde partie de ce projet de recherche.

Annexes

Annexe n°1

Voie Chimique	Voie enzymatique
<p>Déminéralisation et déprotéinisation⁵⁷</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deminéralisation dans du HCl (2N), durant 3h • Deprotéinisation à 5% de NaOH (m/m) pendant 3.5 h à 70°C • Décoloration à 3% de H₂O₂ pendant 1h30 à 80°C). 	<p>Déprotéinisation des exuvies par la pepsine⁵⁸</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les conditions : E/S ratio de 0,25% m/m, à pH 2,0 et 40 °C pendant 240 min. • Traitement de la suspension à 380MPa pendant 1 min
<p style="text-align: center;">Désacétylation de la chitine (voie chimique)⁵⁹</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les particules de chitine sont chauffées à 90°C avec une solution NaOH 40% (m/v) sous agitation (500 rpm) • Après 8h la solution est filtrée et lavée à l'eau distillée. La suspension est amenée à pH 7,0 et filtrée encore • Le chitosane obtenu est séché par un four à air circulant à 50°C "overnight" • Puis broyage dans un moulin à couteau 	
<p>Conversion du chitosane en COS⁶⁰</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hydrolyse acide (con. HCl 100 mL pendant 4 h à 40°C) • Purification 	<p>Conversion du chitosane en COS par l'alpha amylase⁶¹</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les conditions : 60°C, pH 6,0, le ratio slide liquide étant de 5:1 • Le DP (degré de polymérisation) moyen du COS était de 5,4 en utilisant un dosage enzymatique de 20 U/g durant 1h30.

Figure n° 20 : Figure récapitulatif des matériaux et méthodes des voies chimique et enzymatique permettant d'obtenir des COS

Annexe n°2

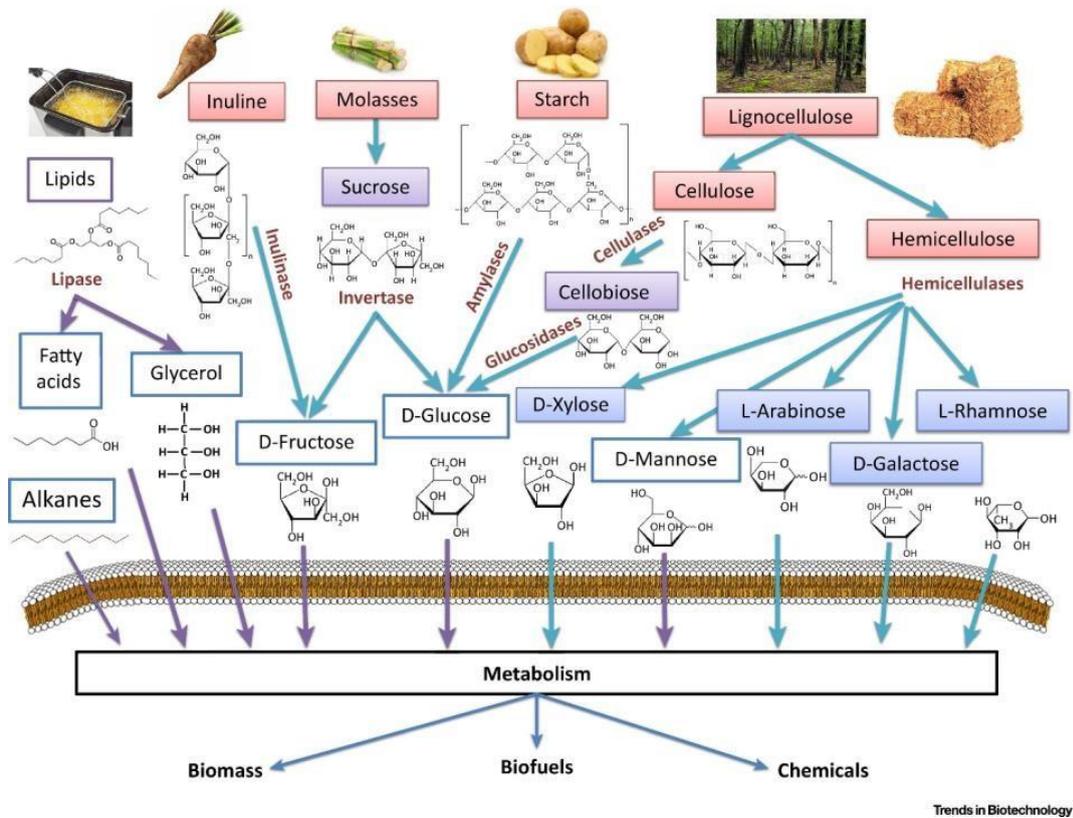


Figure n°21 : *schéma représentatif des différents substrats métabolisés par Yarrowia lipolytica*

Les cadres colorés correspondent aux nouveaux substrats utilisables grâce à des modifications du métabolisme obtenues par ingénierie génétique.

Annexe n°3

Tableau n°7 : Les 30 souches de *Yarrowia lipolytica* (ou *Yarrowia* sp. Pour ME-37 et ME-54) utilisées dans le projet

Ref Collection (SayFood ou CIRM)	Nom	Ecosystème	Pays	Date
labo 7466	1E07 (+ possib. GM)	Livarot	France (MILA U. Caen)	2002
labo 7421	CAM-43-C	Camembert	France	2019
labo 7459	CAM-28-E	filière lait	France	2019
labo 7460	CAM-25-E			
Labo 4320	Ex-fcom-LP	Epoisses	France	2012
labo 3197 (CLIB 183) + 7129 + 7469	CBS 6124 diploïde type	usine maïs	USA	1972
labo 4193 (CLIB 89) + 7468	W29	égouts	France (Paris)	< 1997
labo 7467 (CLIB 883)	Po1t (GM Δprotéases)			
CLIB ---	SWJ-1b (+ possib. GM)	intestin poisson (mer)	Chine	2007
CLIB 80	H222	sol	Allemagne	< 1992
CLIB 202	CLIB 202	sol	Pays-bas	< 1994
CLIB 205	CLIB 205	sol	Russie	1973
CLIB 206	CLIB 206	sol	Japon	< 1994
CLIB 703	CLIB 703	sol	Japon	1963
CLIB 82	A-101	effluent lavage voiture	Pologne	< 1992
CLIB 79	CLIB 79	usine maïs	USA	< 1992
CLIB 3040	EL13-B1-2-1	usine légumes réfrigérés	France	2006
CLIB 791	TL301	chevrotin des Aravis	France (Haute-Savoie)	1987
CLIB 632	TL302			
CLIB 879	141	fromage de Navarre	Espagne	< 2002
CLIB 880	296			
CLIB 200	CLIB 200	margarine rance	Pays-bas	1921
CLIB 201	CLIB 201	olives	Italie	< 1994
CLIB 3073	ADR3H21	boisson fermentée	Côte d'Ivoire	2016
CLIB 3088	RE2-31	traditionnelle		
CLIB3560	ME-37	Yarrowia sp. d'insectes	France (Occitanie)	2019
CLIB3561	ME-54	(scarabée <i>Hoplia coerulea</i>)		
CLIB ---	ME-674	Levain de panification	France (Grand-Est)	2021
CLIB ---	R18-455	Fromage de chèvre	France (Réunion)	2018
CLIB ---	R18-457	Takamaka		

9 souches proviennent du laboratoire SayFood (INRAE, Grignon) et 21 du CIRM-Levures (INRAE, SPO, Montpellier).

Code couleur Écosystèmes : souches environnementales (5) / environnement pollués (2 + GM) / animaux (3) / industrie agro-alimentaire (3) / lait ou fromage (10) / autres aliments (5)

Annexe n°4



Figure n°22 : Photographie d'un patch de papier canson, stérile, $\varnothing = 6\text{mm}$

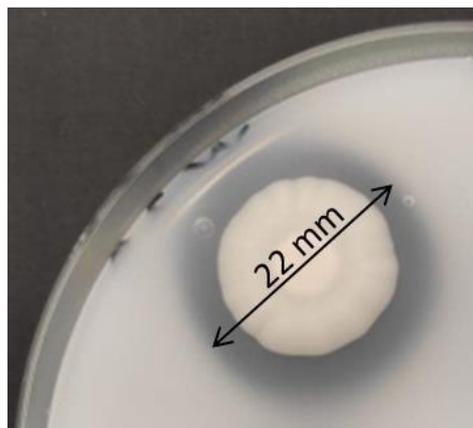


Figure n°23 : Schéma de la méthode de mesure du halo d'éclaircissement

Annexe n°5

Tableau n°8 : Tableau récapitulatif de la mesure des halos d'éclaircissement des 30 souches de *Yarrowia lipolytica* après 72h de cultures à 28°C

souche <i>Y. lipolytica</i> (pays)		halo AXP pH 4	halo AEP pH 6,8	Légende	
				pH 4	pH 6.8
H222	sol (DE)	37 mm	<detect	> 31 mm	> 27 mm
CLIB 202	sol (NL)	25 mm	25,6 mm	27 < x ≤ 31 mm	24 < x ≤ 27 mm
CLIB 205	sol (RU)	36 mm	28,6 mm	20 < x ≤ 27 mm	20 < x ≤ 24 mm
CLIB 206	sol (JP)	28 mm	27,2 mm	≤ 20 mm	≤ 20 mm
CLIB 703	sol (JP)	38 mm	<detect	Pas de halo	
W29	égouts (FR)	24 mm	28,2 mm		
A-101	lav. voiture (PL)	31 mm	28,3 mm		
SWJ-1b	poisson mer (CN)	37 mm	29 mm		
ME-37	insecte (FR) (sp.)	<detect 11 mm (144h)	24 mm		
ME-54	insecte (FR) (sp.)	<detect 13 mm (144h)	24,8 mm		
CLIB 183	maïs (US) diploïde	19 mm	25,2 mm		
CLIB 79	maïs (US)	25 mm	27,4 mm		
EL13-B1-2-1	légumes (FR)	31 mm	<detect		
CLIB 200	margarine (NL)	20/31 mm	23,2 mm		
CLIB 201	olives (IT)	15 mm	26,4 mm		
ADR3H21	vin palme (CI)	<detect <detect	27,2 mm		
RE2-31	vin palme (CI)	29 mm	<detect		
ME-674	levain pain (FR)	15 mm	26,4 mm		
CAM-25-E	lait (FR)	24 mm	24,8 mm		
CAM-28-E	lait (FR)	35 mm	24 mm		
CAM-43-C	Camembert (FR)	22 mm	26,4 mm		
1EO7	Livarot (FR)	27 mm	27,6 mm		
Ex-fcom-LP	Epoisses (FR)	21 mm	25,6 mm		
TL301	Chevrotin (FR)	21 mm	<detect		
TL302	Chevrotin (FR)	23 mm	28 mm		
R18-455	Chèvre (FR, RE)	<detect 14 mm (144h)	22,4 mm		
R18-456	Chèvre (FR, RE)	<detect 12 mm (144h)	26 mm		
R18-457	Chèvre (FR, RE)	<detect 14 mm (144h)	24 mm		
141	Tome Brebis (ES)	15 mm	16,8 mm		
296	Tome Brebis (ES)	13 mm	<detect		

Annexe n°6

Tableau n°9 : Présentation des résultats de l'activité de la lipase extracellulaire (lip2) par la méthode des halos d'éclaircissement

souche <i>Y. lipolytica</i> (pays)		halo LIP 2
H222	sol (DE)	++
CLIB 202	sol (NL)	++
CLIB 205	sol (RU)	++
CLIB 206	sol (JP)	++
CLIB 703	sol (JP)	++
W29	égouts (FR)	+++
A-101	lav. voiture (PL)	+
SWJ-1b	poisson mer (CN)	+
ME-37	insecte (FR) (sp.)	+
ME-54	insecte (FR) (sp.)	+/-
CLIB 183	maïs (US) diploïde	++
CLIB 79	maïs (US)	++
EL13-B1-2-1	légumes (FR)	+
CLIB 200	margarine (NL)	+
CLIB 201	olives (IT)	+/-
ADR3H21	vin palme (CI)	+/-

souche <i>Y. lipolytica</i> (pays)		halo LIP 2
RE2-31	vin palme (CI)	+/-
ME-674	levain pain (FR)	++
CAM-25-E	lait (FR)	+/-
CAM-28-E	lait (FR)	+
CAM-43-C	Camembert (FR)	+
1EO7	Livarot (FR)	+/-
Ex-fcom-LP	Epoisses (FR)	+
TL301	Chevrotin (FR)	+
TL302	Chevrotin (FR)	+
R18-455	Chèvre (FR, RE)	++
R18-456	Chèvre (FR, RE)	++
R18-457	Chèvre (FR, RE)	++
141	Tome Brebis (ES)	+
296	Tome Brebis (ES)	++

Légende	
+++	Activité lipase forte
++	Activité lipase modérée
+	Activité lipase faible
+/-	Activité lipase très faible

Annexe n°7

Tableau n°10 : Tableau de la comparaison de la croissance des souches CAM 28-E et ME-37 sur un milieu riche (YPD) liquide

		CAM 25-E				ME-37			
Temps (heure)		Moyenne		Ecart-type		Moyenne		Ecart-type	
0	21	0,11	2,28	0,00	0,01	0,11	1,33	0,00	0,07
1	22	0,11	2,28	0,00	0,01	0,11	1,49	0,00	0,07
2	23	0,11	2,28	0,00	0,02	0,11	1,63	0,00	0,07
3	24	0,11	2,28	0,00	0,01	0,11	1,79	0,00	0,09
4	25	0,11	2,28	0,00	0,01	0,11	1,94	0,00	0,08
5	26	0,11	2,27	0,00	0,01	0,11	2,07	0,00	0,05
6	27	0,12	2,27	0,00	0,01	0,11	2,16	0,00	0,02
7	28	0,13	2,27	0,00	0,01	0,11	2,20	0,00	0,03
8	29	0,16	2,27	0,00	0,01	0,11	2,22	0,01	0,02
9	30	0,21	2,26	0,01	0,01	0,12	2,25	0,01	0,03
10	31	0,30	2,26	0,01	0,01	0,12	2,26	0,01	0,02
11	32	0,55	2,26	0,01	0,01	0,13	2,26	0,01	0,02
12	33	0,84	2,26	0,01	0,02	0,14	2,27	0,01	0,03
13	34	1,16	2,26	0,01	0,01	0,16	2,28	0,01	0,03
14	35	1,46	2,26	0,00	0,01	0,18	2,28	0,02	0,03
15	36	1,73	2,26	0,00	0,01	0,21	2,28	0,06	0,03
16	37	1,88	2,26	0,01	0,01	0,30	2,28	0,08	0,03
17	38	2,04	2,27	0,01	0,01	0,43	2,27	0,09	0,03
18	39	2,17	2,28	0,00	0,01	0,61	2,27	0,08	0,03
19	40	2,25	2,27	0,01	0,01	0,82	2,26	0,07	0,02
20	41	2,28	2,28	0,01	0,01	1,01	1,18	0,07	0,02

Annexe n°8

Tableau n°11 : Tableau comparatif complet des 30 souches *Yarrowia lipolytica*

souche <i>Y. lipolytica</i> (pays)		Vmax BioTek	DOmax	lagtime BioTek	halo AXP pH 4	halo AEP pH 6.8	halo Lip 2
H222	sol (DE)	4,54 +/- 0,14	2,21	557 +/- 5 min	37 mm	<detect	++
CLIB 202	sol (NL)	4,40 +/- 0,05	2,3	543 +/- 7 min	25 mm	25,6 mm	++
CLIB 205	sol (RU)	4,42 +/- 0,33	2,34	573 +/- 24 min	36 mm	28,6 mm	++
CLIB 206	sol (JP)	4,62 +/- 0,24	2,35	576 +/- 12 min	28 mm	27,2 mm	++
CLIB 703	sol (JP)	4,84 +/- 0,12	2,38	652 +/- 12 min	38 mm	<detect	++
W29	égouts (FR)	4,2 +/- 0,2	2,3	590 +/- 50 min	24 mm	28,2 mm	+++
A-101	lav. voiture (PL)	4,64 +/- 0,09	2,4	525 +/- 12 min	31 mm	28,3 mm	+
SWJ-1b	poisson mer (CN)	5,40 +/- 0,08	2,3	554 +/- 2min	37 mm	29 mm	+
ME-37	insecte (FR) (sp.)	3,48 +/- 0,05	2,28	933 +/- 29 min	<detect 11 mm (144h)	24 mm	+
ME-54	insecte (FR) (sp.)	3,43 +/- 0,12	2,29	923 +/- 20 min	<detect 13 mm (144h)	24,8 mm	+/-
CLIB 183	maïs (US) diploïde	4,96 +/- 0,15	2,32	579,5 +/- 7 min	19 mm	25,2 mm	++
CLIB 79	maïs (US)	2,88 +/- 0,13	1,8	549 +/- 5 min	25 mm	27,4 mm	++
EL13-B1-2-1	légumes (FR)	5,26 +/- 0,09	2,41	593 +/- 2 min	31 mm	<detect	+
CLIB 200	margarine (NL)	3,86 +/- 0,10	2,31	662 +/- 6 min	31 mm	23,2 mm	+
CLIB 201	olives (IT)	4,84 +/- 0,19	2,35	568 +/- 2 min	15 mm	26,4 mm	+/-
ADR3H21	vin palme (CI)	4,91 +/- 0,11	2,32	597 +/- 29 min	<detect <detect	27,2 mm	+/-
RE2-31	vin palme (CI)	5,04 +/- 0,22	2,33	573 +/- 12 min	29 mm	<detect	+/-
ME-674	levain pain (FR)	4,64 +/- 0,20	2,4	626 +/- 27 min	15 mm	26,4 mm	++
CAM-25-E	lait (FR)	5,17 +/- 0,12	2,28	579 +/- 6 min	24 mm	24,8 mm	+/-
CAM-28-E	lait (FR)	5,03 +/- 0,23	2,26	588 +/- 23 min	35 mm	24 mm	+
CAM-43-C	Camembert (FR)	5,07 +/- 0,20	2,29	570 +/- 5 min	22 mm	26,4 mm	+
1EO7	Livarot (FR)	5,53 +/- 0,58	2,32	602 +/- 36 min	27 mm	27,6 mm	+/-
Ex-fcom-LP	Epoisses (FR)	5,51 +/- 0,23	2,3	625 +/- 30 min	21 mm	25,6 mm	+
TL301	Chevroton (FR)	5,31 +/- 0,07	2,39	585 +/- 2 min	21 mm	<detect	+
TL302	Chevroton (FR)	5,44 +/- 0,14	2,4	598 +/- 4 min	23 mm	28 mm	+
R18-455	Chèvre (FR, RE)	5,47 +/- 0,26	2,32	601 +/- 11 min	<detect 14 mm (144h)	22,4 mm	++
R18-456	Chèvre (FR, RE)	5,41 +/- 0,18	2,29	595 +/- 15 min	<detect 12 mm (144h)	26 mm	++
R18-457	Chèvre (FR, RE)	5,51 +/- 0,12	2,3	612 +/- 30 min	<detect 14 mm (144h)	24 mm	++
141	Tome Brebis (ES)	5,37 +/- 0,08	2,31	573 +/- 1 min	15 mm	16,8 mm	+

Annexe n°9

Tableau n°12 : *Tableau des résultats du test Bradford de quantification des protéines :*

	Non soniqué	Soniqué
pH	Concentration protéique moyenne ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentration protéique moyenne ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
2	1,058 \pm 0,01	NA
2,5	0,615 \pm 0,020	NA
3	0,456 \pm 0,015	0,380 \pm 0,002
4	0,347 \pm 0,006	0,168 \pm 0,003
6	0,163 \pm 0,004	0,171 \pm 0,011
6,8	0,324 \pm 0,005	0,318 \pm 0,016
8	0,275 \pm 0,005	0,433 \pm 0,009

Les incertitude ont été calculées au seuil de 95% grâce à l'écart-type sur la moyenne de Pearson

NA : signifie la mesure n'a pas été effectué dans ces conditions d'expérimentations.

Annexe n°10

Tableau n°13 : Caractéristiques de croissance de la souche SWJ-1-b sur différents filtrats d'exuvies d'insectes

Conditions	V _{Max}	Lag-time (heures)	DO _{max}
SWJ milieu minimum (YNBdil)	0,50	12:30:06	0,37
SWJ milieu protéose peptone	5,08	09:38:19	1,86
SWJ + filtrat.ex pH 2	2,32	16:11:38	0,81
SWJ + filtrat.ex pH 2,5	2,45	11:53:10	0,65
SWJ + filtrat.ex pH 3	2,85	10:07:07	0,93
SWJ + filtrat.ex pH 6	2,78	13:12:14	0,69

Annexe n°11

Tableau n°14 : Tableau des caractéristiques de croissance de triplicatas de la souche W29 sur différents milieux de cultures liquides.

Conditions	V _{max}	Lagtime (heures)	DO _{max}	
	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Ecart-type
W29 + milieu minimum (YNBdil)	1,435 ± 0,142	15:31:11 ± 00:01:55	0,357 ± 0,022	
W29 + filtrat.ex pH2 (non ajusté)	1,526 ± 0,051	11:32:06 ± 00:08:11	0,716 ± 0,007	
W29 + filtrat.ex pH2 ajusté à 2,5	1,299 ± 0,041	11:31:39 ± 00:07:48	0,376 ± 0,004	
W29 + filtrat.ex pH2 ajusté à 3	2,881 ± 0,082	08:41:26 ± 00:03:42	1,004 ± 0,004	
W29 + filtrat.ex pH2 ajusté à 4	3,414 ± 0,013	07:16:47 ± 00:01:32	1,284 ± 0,004	
W29 + filtrat.ex pH2 ajusté à 6	1,505 ± 0,098	09:35:48 ± 00:08:55	1,034 ± 0,009	
W29 + filtrat.ex pH3 (non ajusté)	2,987 ± 0,130	09:01:10 ± 00:07:43	1,034 ± 0,010	

Les Incertitude ont été calculées au seuil de 95% grâce à l'écart-type sur la moyenne de Pearson

Annexe n°12

Tableau n°15 : Tableau des caractéristiques de croissance de triplicatas de la souche TL302 sur différents milieux de cultures liquides (impact de l'autoclave et de la durée d'extraction)

Conditions	V _{max}	Lagtime	DO _{max}
TL302 + milieu minimum (YNBdil)	1,60 ± 0,26	14:23:44 ± 00:27:45	0,42 ± 0,02
TL302 + filtrat.ex pH2 (15min) ajusté à 4	3,22 ± 0,01	07:03:39 ± 00:02:28	1,22 ± 0,02
TL302 + filtrat.ex pH10 avec autoclave (60min) ajusté à 4	2,55 ± 0,12	08:54:18 ± 00:02:28	0,87 ± 0,02
TL302 + filtrat.ex pH2 avec autoclave (60min) ajusté à 4	2,50 ± 0,09	09:04:59 ± 00:08:15	0,85 ± 0,02
TL302 + filtrat.ex pH10 sans autoclave (60min) ajusté à 4	1,41 ± 0,19	09:37:04 ± 00:16:44	0,55 ± 0,01
TL302 + filtrat.ex pH2 sans autoclave (60min) ajusté à 4	1,92 ± 0,12	10:53:37 ± 00:09:53	0,61 ± 0,02

Les Incertitudes ont été calculées au seuil de 95% grâce à l'écart-type sur la moyenne de Pearson

Annexe n°13

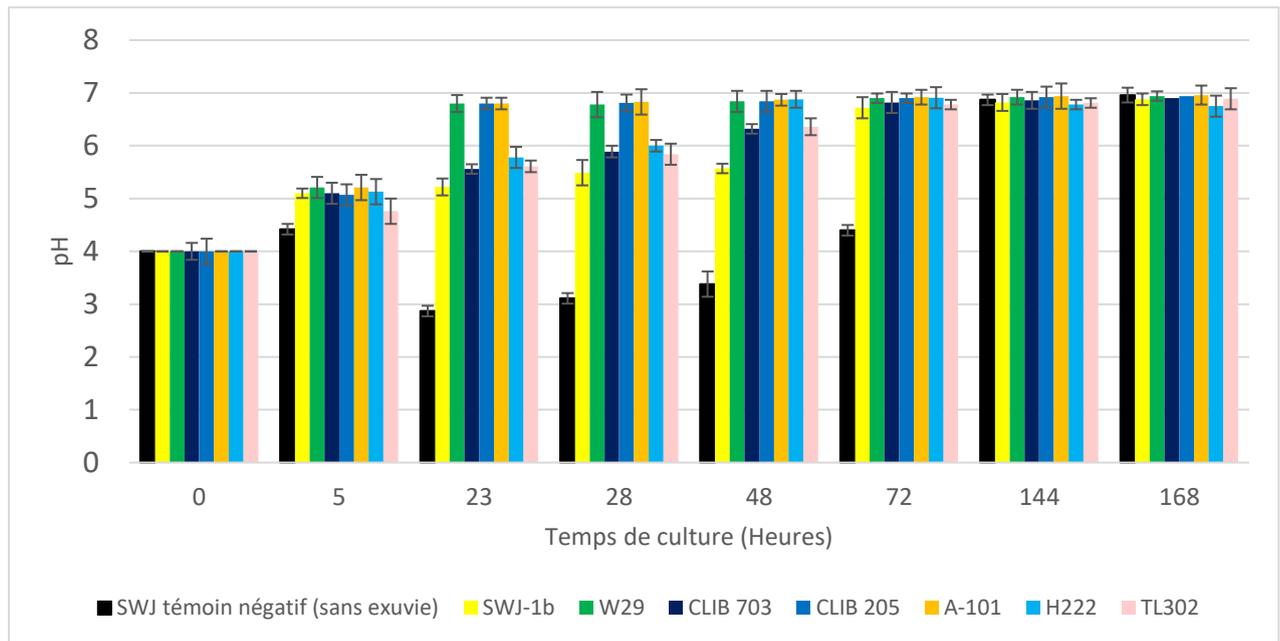


Figure n°24 : pH moyen des cultures dans un milieu YNB liquide + 2,5% exuvies

Bibliographie

¹ Kwon, G. T., Yuk, H. G., Lee, S. J., Chung, Y. H., Jang, H. S., Yoo, J. S., Cho, K. H., Kong, H., & Shin, D. (2019). Mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) exuviae as a novel prebiotic material for BALB/c mouse gut microbiota. *Food Science and Biotechnology*, 29(4), 531-537. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00699-1>

² Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan : An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>

³ *Journal of Oncology*. (2021). Hindawi. <https://www.hindawi.com/journals/jo/>

Je, J. Y., & Kim, S. K. (2012). Chitooligosaccharides as Potential Nutraceuticals. *Marine Medicinal Foods - Implications and Applications - Animals and Microbes*, 321-336. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416003-3.00021-4>

⁴ Song, Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., & Jung, W. (2022). Production of chitin- and chitosan-oligosaccharide using the edible insect, *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*, 52(4), 207-213. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12581>

Jantzen Da Silva Lucas, A., Quadro Oreste, E., Leão Gouveia Costa, H., Martín López, H., Dias Medeiros Saad, C., & Prentice, C. (2021). Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry*, 343, 128550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128550>

⁵ Agro Média. (2021). Les insectes comestibles, un marché d'avenir [DOSSIER]. *Agro Media*. <https://www.agromedia.fr/dossier/process/insecte-comestible>

⁶ ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. (2014). *Insectes comestibles Perspectives pour la sécurité alimentaire et l'alimentation animale*. <https://www.fao.org/3/i3253f/i3253f.pdf>

⁷ Rédaction, L. (2021, 24 mars). *Entomoculture*. Les Horizons. <https://leshorizons.net/entomoculture/#:%7E:text=L'entomoculture%2C%20c'est,%2C%20ou%20d'%C3%A9tu des%20scientifiques>.

⁸ *Journal of Oncology*. (2021). Hindawi. <https://www.hindawi.com/journals/jo/>

⁹ Je, J. Y., & Kim, S. K. (2012b). Chitooligosaccharides as Potential Nutraceuticals. *Marine Medicinal Foods - Implications and Applications - Animals and Microbes*, 321-336. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416003-3.00021-4>

¹⁰ Comité d'Histoire INRAE - Histoire des Instituts. (2022). inra.com. <https://www6.inrae.fr/comitedhistoire/Organisations-amies/Histoire-des-Instituts>

¹¹ *Apprendre et comprendre*. (2022). INRAE Institutionnel. https://www.inrae.fr/apprendre-comprendre#anchor1_1

¹² *site internet UMR 0782 SayFood - Accueil*. (2022). inra.com. <https://www6.versailles-grignon.inrae.fr/umr-sayfood>

¹³ *Programme Samuel-De-Champlain 2022–2023 - Fonds de recherche du Québec - FRQ*. (2022, 14 avril). Fonds de recherche du Québec. <https://frq.gouv.qc.ca/programme/programme-samuel-de-champlain-2022-2023/>

¹⁴ Marmouzi, I., Ezzat, S. M., Salama, M. M., Merghany, R. M., Attar, A. M., EL-Desoky, A. M., & Mohamed, S. O. (2019). Recent Updates in Pharmacological Properties of Chitooligosaccharides. *BioMed Research International*, 2019, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2019/4568039>

-
- ¹⁵ Je, J. Y., & Kim, S. K. (2012c). Chitoooligosaccharides as Potential Nutraceuticals. *Marine Medicinal Foods - Implications and Applications - Animals and Microbes*, 321-336. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416003-3.00021-4>
- ¹⁶ Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021b). Chitosan : An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- ¹⁷ van der Walt, J. P., & von Arx, J. A. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46(6), 517-521. <https://doi.org/10.1007/bf00394008>
- ¹⁸ Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>
- ¹⁹ Wang, W., & Blenner, M. A. (2022). Engineering heterologous enzyme secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01863-9>
- ²⁰ Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>
- ²¹ Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>
- ²² Butinar, L., Santos, S.N., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS microbiology letters*, 244 2, 229-34 .
- ²³ Worland, A. M., Czajka, J. J., Xing, Y., Harper, W. F., Moore, A., Xiao, Z., Han, Z., Wang, Y., Su, W. W., & Tang, Y. J. (2020). Analysis of *Yarrowia lipolytica* growth, catabolism, and terpenoid biosynthesis during utilization of lipid-derived feedstock. *Metabolic Engineering Communications*, 11, e00130. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00130>
- ²⁴ Sibanda, T.; Selvarajan, R.; Tekere, M.; Nyoni, H.; Meddows-Taylor, S. Potential biotechnological capabilities of cultivable mycobiota from carwash effluents. *Microbiologyopen* **2017**, 6, e00498.
- ²⁵ Shukla, SP; Plata, C.; Reichelt, M.; Steiger, S.; Heckel, DG ; Kaltenpoth, M.; Vilcinskis, A.; Vogel, H. La préservation des charognes assistée par le microbiome favorise le développement larvaire chez un coléoptère. *Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis* **2018** , 115 , 11274–11279.
- ²⁶ Madzak, C. (2021b). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>
- ²⁷ Santos, E. O. D., Michelon, M., Furlong, E. B., Burkert, J. F. D. M., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2012). Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 432-440. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000200002>
- ²⁸ Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>
- ²⁹ Sutherland, JB; Cornelison, C.; Crow, SA CANDIDA | *Yarrowia Lipolytica* (Candida Lipolytica). Dans *Encyclopedia of Food Microbiology* , 2e éd.; Batt, CA, Tortorello, ML, Eds. ; Academic Press : Cambridge, MA, États-Unis, 2014 ; p. 374–378.
- ³⁰ Sutherland, JB; Cornelison, C.; Crow, SA CANDIDA | *Yarrowia Lipolytica* (Candida Lipolytica). Dans

Encyclopedia of Food Microbiology, 2e éd.; Batt, CA, Tortorello, ML, Eds. ; Academic Press : Cambridge, MA, États-Unis, 2014 ; p. 374–378.

³¹ Madzak, C. (2021c). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>

³² Young, T. W., Wadeson, A., Glover, D. J., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. A. (1996). The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica* : sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142(10), 2913-2921. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2913>

³³ Park, J. N., Han, C. P., Lee, D. J., Cheon, S. A., & Kang, H. A. (2014). Functional characterization of extracellular chitinase encoded by the YICTS1 gene in a dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiology*, 52(4), 284-291. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4070-8>

³⁴ Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W. M., & Wyss, M. (2013). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(3), 187-206. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.770386>

³⁵ Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W. M., & Wyss, M. (2013). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(3), 187-206. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.770386>

³⁶ Park, J. N., Han, C. P., Lee, D. J., Cheon, S. A., & Kang, H. A. (2014b). Functional characterization of extracellular chitinase encoded by the YICTS1 gene in a dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiology*, 52(4), 284-291. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4070-8>

³⁷ *Ensemencement et isolement des bactéries.* (2022). Techniques d'ensemencement et d'isolement des bactéries. Consulté le 2022, à l'adresse <https://microbiologie-clinique.com/Ensemencement-isolement-bacteries.html>

³⁸ Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>

³⁹ Samad, M. Y. A., Razak, C. A., Salleh, A. B., Zin Wan Yunus, W., Ampon, K., & Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)

⁴¹ Microsoft. (2022). *Ecart.type.standard(ecart.type.standard, fonction)*. <https://support.microsoft.com/fr-fr/office/ecartype-standard-ecartype-standard-fonction-7d69cf97-0c1f-4acf-be27-f3e83904cc23>

⁴⁴ Hahn, T., Tafi, E., von Seggern, N., Falabella, P., Salvia, R., Thomä, J., Febel, E., Fijalkowska, M., Schmitt, E., Stegbauer, L., & Zibek, S. (2021). Purification of Chitin from Pupal Exuviae of the Black Soldier Fly. *Waste and Biomass Valorization*, 13(4), 1993-2008. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01645-1>

⁴⁵ VELP Scientifica Srl. (2020, 4 février). *Analyse élémentaire, la méthode Dumas*. Methode de dumas. <https://www.velp.com/fr-ww/analyse-elementaire-la-methode-dumas-1.aspx>

⁴⁶ Janssen, R. H., Vincken, J. P., van den Broek, L. A. M., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. M. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects : *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2275-2278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>

⁴⁷ *Phosphate buffer.* (2007, janvier). <https://www.unl.edu/cahoonlab/phosphate%20buffer.pdf>

⁴⁸ *Hoplia coerulea.* (2000). [Photographie]. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/95/Hoplia_coerulea_by_Frank_Vassen_%28cropped

[%29.jpg/290px-Hoplia coerulea by Frank Vassen %28cropped%29.jpg](#)

⁴⁹ Home page - CIRM-Levures. (2022). Inra.Com. https://www6.inrae.fr/cirm_eng/BRC-collection-and-catalogue/CIRM-Levures

⁵⁰ Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. (2018). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/japs.2018.8219>

⁵¹ Young, T. W., Wadeson, A., Glover, D. J., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. A. (1996b). The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica* : sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142(10), 2913-2921. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2913>

⁵² Mansour, S., Beckerich, J. M., & Bonnarme, P. (2008). Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6505-6512. <https://doi.org/10.1128/aem.01519-08>

⁵³ Chung, D. D. (2017). Cement-Matrix Composites. *Carbon Composites*, 333-386. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804459-9.00006-3>

⁵⁴ Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* Strains and Their Biotechnological Applications : How Natural Biodiversity and Metabolic Engineering Could Contribute to Cell Factories Improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>

⁵⁵ Young, T. W., Wadeson, A., Glover, D. J., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. A. (1996c). The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica* : sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142(10), 2913-2921. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2913>

⁵⁶ *Amino Acid Biosynthesis*. (s. d.). Volker F. Wendisch. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-540-48596-4.pdf>

⁵⁶ Young, T. W., Wadeson, A., Glover, D. J., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. A. (1996d). The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica* : sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142(10), 2913-2921. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2913>

⁵⁷ Song, Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., & Jung, W. (2022c). Production of chitin- and chitosan-oligosaccharide using the edible insect, *Tenebrio molitor* . *Entomological Research*, 52(4), 207-213. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12581>

⁵⁸ Boukil, A., Marciniak, A., Mezdour, S., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2022). Effect of High Hydrostatic Pressure Intensity on Structural Modifications in Mealworm (*Tenebrio molitor*) Proteins. *Foods*, 11(7), 956. <https://doi.org/10.3390/foods11070956>

⁵⁹ Jantzen Da Silva Lucas, A., Quadro Oreste, E., Leão Gouveia Costa, H., Martín López, H., Dias Medeiros Saad, C., & Prentice, C. (2021b). Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry*, 343, 128550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128550>

⁶⁰ . Song, Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., & Jung, W. (2022d). Production of chitin- and chitosan-oligosaccharide using the edible insect, *Tenebrio molitor* . *Entomological Research*, 52(4), 207-213. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12581>

⁶¹ Qian, J., Shi, B., Mo, L., Shu, D., & Guo, H. (2021). Preparation of chitoooligosaccharides by α -amylase from chitosan with oxidative pretreatment. *Journal of Chemical Technology & ; Biotechnology*, 96(12), 3408-3413. <https://doi.org/10.1002/jctb.6901>

⁶² Ledesma-Amaro, R., & Nicaud, J. M. (2016). Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology*, 34(10), 798-809. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>

