



HAL
open science

Étude de 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

Catherine Madzak, Clémence Moret

► To cite this version:

Catherine Madzak, Clémence Moret. Étude de 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. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. hal-04183212

HAL Id: hal-04183212

<https://hal.inrae.fr/hal-04183212v1>

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
Stage Assistant Ingénieur - TN09

Etudiante stagiaire : MORET Clémence
Tutrice UTC : KUBO Mirian
Tutrice INRAE : MADZAK Catherine

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

Projet de recherche franco-canadien du programme Samuel de Champlain

Organisations :

INRAE, UMR SayFood - Palaiseau

Université Laval, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de
l'Alimentation - Québec

Printemps 2023



Remerciements

Je remercie tout d'abord l'UTC, l'INRAE et l'Université Laval pour m'avoir permis de réaliser ce stage d'assistante ingénieure dans les meilleures conditions possibles, et pour la chance de développer mes compétences professionnelles et scientifiques qu'ils m'ont offerte en me confiant ce projet de recherche.

Je tiens à remercier tout particulièrement Catherine Madzak, ma tutrice de stage, pour m'avoir encadrée, accompagnée, et accueillie chaleureusement au sein du laboratoire et de l'équipe CoMiAl. Je la remercie de sa gentillesse et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche scientifique avec tant de passion.

Je remercie chaleureusement Eric Dugat-Bony, encadrant du stage, et coordinateur du projet, pour ses conseils et sa bienveillance. Il a su me guider de manière enthousiaste et efficace tout au long de la première partie du stage en France.

Je remercie grandement Alain Doyen, lui aussi encadrant et coordinateur, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe à Québec. Il a su me transmettre sa rigueur scientifique et sa volonté de toujours trouver une solution. Un grand merci à lui pour sa manière vive et juste de transmettre son expertise.

Je remercie également, tous les membres des deux équipes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui m'ont fait découvrir des techniques diverses et variées avec engouement et pédagogie. Merci donc à Sarah Ghorbal, Jérôme Delettre, Ugo Berthelot, Françoise Nadeau et Véronique Perreault.

Je souhaite souligner ma reconnaissance et mes amitiés à l'ensemble des membres des équipes de l'INRAE et du département des Sciences des Aliments à Québec pour m'avoir partagé leurs parcours et leur bonne humeur au cours des six derniers mois. Un merci tout particulier à Gwendoline Coeuret, Julia Gendre, Claire Saulou-Bérion, Alice Danel, Hélène Gardon, Sybille Tabuteau, Rodrigo Costa, et Morgan Guilbaud dans les équipes SayFood. Merci aussi à Alexia Gravel, Florimond Libbrecht, Juliette Barrot, Florence Dubois-Laurin, Hanane Abed, et Negar Gharbi au sein de l'équipe québécoise.

Je remercie également Thierry Feugnet et Laurence Fruchard de m'avoir aidé dans mes démarches administratives à mon arrivée à l'INRAE et pour mon voyage au Canada, me permettant ainsi de partir dans les meilleures conditions.

Résumé technique

Le projet de recherche dans lequel s'inscrit mon stage a pour objet de réaliser la déprotéinisation et la bioconversion de la chitine et des protéines composants les exuvies d'insectes par l'utilisation de la levure *Yarrowia lipolytica*. L'utilisation de ces exuvies, actuellement considérées comme des déchets dans les élevages d'insectes, est particulièrement intéressante du fait que la chitine présente de nombreuses propriétés biologiques d'intérêt. Ce composé peut, en effet, être valorisé en dérivés chitiniques comme le chitosan et les chito-oligosaccharides (COS), particulièrement intéressants pour les secteurs pharmaceutiques et nutraceutiques.

Au cours de ces quelques mois de contribution au projet j'ai pu approfondir les recherches sur la biodiversité de *Y. lipolytica* concernant son activité lipase ou encore la confirmation d'appartenance à l'espèce de certaines souches. L'objectif principal était de tester la biotransformation des exuvies par la levure, il a fallu ainsi mettre au point un protocole de suivi de croissance par la cytométrie en flux. La souche sauvage W29 a aussi été modifiée génétiquement pour surexprimer sa protéase AEP ou sa chitinase et ainsi peut être améliorer la valorisation du produit d'intérêt. Les surnageants de culture de ces tests ont ensuite été caractérisés et analysés afin de déterminer l'effet des levures sur les protéines et la chitine des exuvies d'insectes.

Il a été remarqué que les modifications génétiques apportées à la levure ont été un succès, les tests d'activité chitinase et les gels polyacrylamides semblent attester de la surexpression de l'AEP et de la chitinase. Les surnageants des cultures en milieu enrichi en exuvies de la souche sauvage et des souches modifiées ne semblent pas présenter de différences quant aux dérivés chitiniques comme le montre l'analyse en HPLC, mais le test BCA permet d'émettre l'hypothèse d'une meilleure métabolisation des protéines par la souche modifiée pour l'AEP.

Sommaire

Introduction	4
1. Présentation des organisations	4
2. Contexte scientifique	5
2.1. Etat de l'art sur la valorisation de la chitine de divers coproduits alimentaires	5
2.2. État de l'art de <i>Yarrowia lipolytica</i>	7
2.2.1. Habitats et morphologies	7
2.2.2. Sources de carbone	7
2.2.3. Conditions physico-chimiques de croissance	8
2.2.4. Sécrétions extracellulaires	8
2.2.5. Ingénierie génétique	8
2.3. Etat de l'art sur le projet	9
2.4. Problématique	9
2.5. Objectifs visés	10
3. Matériels et méthodes	10
3.1. Cultures des microorganismes	10
3.1.1. Origine des souches de <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
3.1.2. Milieux et tampons	11
3.1.3. Cultures liquides ou sur boîte de petri	13
3.2. Ingénierie génétique	13
3.2.1. Provenance des <i>E.coli</i> compétentes, des enzymes de restriction et de modification de l'ADN, des ADN synthétiques	13
3.2.2. Protocoles de construction des différents variants génétiques	14
3.2.2.1. Création d'une plateforme "zeta" intégrée dans le génome d'une souche de <i>Y. lipolytica</i>	14
3.2.2.2. Création de souches génétiquement modifiées de <i>Y. lipolytica</i> Po1z + pINA1312-YICTS1 ou pINA1314-YIXPR2	15
3.3. Caractérisation enzymatique des souches de <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
3.3.1. Activité lipase et activité protéase	16
3.3.2. Activité chitinase	17
3.4. Cultures en milieux exuvies	18
3.4.1. Le milieu exuvies	18
3.4.2. Dosage des protéines solubles par la méthode de Bradford	18
3.4.3. Suivi de culture sur milieu filtré par BioTek	19
3.4.4. Suivi de culture par cytométrie en flux et dénombrement CFU	21
3.5. Identification de souches par PCR et séquençage	21
3.6. Caractérisations et analyse des surnageants de cultures	22
3.6.1. Solide totaux et cendres	22
3.6.2. Dosage des sucres solubles	23
3.6.3. Dosage des lipides	24
3.6.4. Gels d'électrophorèse polyacrylamide	25

3.6.5. Dosage des protéines par test BCA	26
3.6.6. HPLC en gel d'exclusion stérique	26
4. Résultats et discussions	27
4.1. Continuité des travaux sur la biodiversité	27
4.1.1. Activité lipase	27
4.1.2. Séquençages	29
4.2. Mise au point de la cytométrie en flux sur Yarrowia	29
4.3. Choix des transformants génétiques	31
4.2.1. Activité protéase	32
4.2.2. Activité chitinase	33
4.2.3. Suivi BioTek	34
4.4. Test de biotransformation des milieux exuvies par Yarrowia sauvage ou génétiquement modifiée	37
4.5. Caractérisations et analyses des surnageants de cultures	40
4.5.1. Caractérisation des échantillons	40
4.5.2. Analyse des protéines	42
4.5.3. Analyse des dérivés chitiniques	45
Conclusion	46
Bibliographie	47
Annexes	50

Introduction

Les insectes comestibles prennent une place de plus en plus grande dans le marché de l'agro-alimentaire. Ils sont, pour le moment, plus répandus dans l'élaboration de la nourriture des animaux d'élevages ou domestiques mais tendent à s'ouvrir à l'alimentation humaine. L'entomophagie pourrait apporter des solutions à de nombreux enjeux économiques et environnementaux.

On peut cependant encore voir dans les élevages d'insectes des déchets non valorisés, comme les exuvies qui sont les cuticules ou exosquelettes que les insectes perdent après la mue. On considère que pour cent tonnes d'insectes produits par entomoculture, deux tonnes et demi d'exuvies sont créées. La chitine des exuvies peut être dégradée en chitosan ou en chito-oligosaccharides (COS) à des fins nutraceutiques ou pharmaceutiques pour l'Homme. Malheureusement la seule voie de valorisation actuelle est chimique et possède un grand impact environnemental.

Ce projet de recherche vise ainsi à développer une voie de valorisation biologique à faible empreinte écologique en utilisant une la levure *Yarrowia lipolytica* comme outil de fermentation et de bio-conversion.

Le projet de recherche est composé de deux phases principales. La première consiste à étudier, de manière approfondie, les capacités des micro-organismes à l'étude à se développer sur un milieu enrichi en exuvies d'insectes. La seconde partie vise 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 des organisations

Suite à la Seconde Guerre mondiale, la France fait face à un retard de son agriculture qui est alors dans l'incapacité de nourrir la population. L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est ainsi créé dans ce climat, en 1946, afin de mettre la science et la technologie au service de la production agricole. C'est en 2020 qu'a lieu la fusion de l'INRA et de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), afin de créer l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE)¹.

Les premiers objectifs de l'INRAE ont été de « nourrir la France »¹, ils ont ensuite évolué avec les époques et les besoins de la population française. Aujourd'hui, c'est le développement durable qui est la vocation de l'institut. L'INRAE cherche ainsi à répondre aux enjeux sociétaux actuels comme la sécurité alimentaire et nutritionnelle, la transition des agricultures, la gestion des ressources naturelles et des écosystèmes, mais aussi l'anticipation de l'érosion de la biodiversité ou des risques naturels.

Au même titre que le CNRS (Centre National de Recherche Scientifique), l'INRAE se place comme l'un des leaders de la recherche scientifique publique française. Bien que d'échelle nationale en premier lieu, cet institut de recherche rayonne aujourd'hui à l'international.

L'INRAE est organisé en 14 départements scientifiques regroupant 268 unités de recherche, dont la grande majorité sont des Unités Mixtes de Recherches (UMRs), associées à d'autres organismes de recherche (universités, CNRS, écoles d'ingénieurs, etc..)

La première partie de ce stage a été réalisée dans l'UMR SayFood (INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay) et plus précisément dans l'équipe CoMiAl (Communautés Microbiennes Alimentaires). L'unité est située sur le campus de l'école AgroParisTech à Palaiseau sur le plateau Paris-Saclay. L'équipe CoMiAl est l'une des cinq équipes de recherche de l'UMR regroupant 180 personnes dont 80 chercheurs et enseignants-chercheurs. C'est aux côtés de la Dre Catherine MADZAK et du Dr Eric DUGAT-BONY que j'ai pu occuper la fonction de stagiaire assistante ingénieure en recherche pendant une durée de 15 semaines.

La Dre Catherine MADZAK, Chargée de Recherche Hors Classe à l'INRAE titulaire d'une HDR, est reconnue internationalement pour ses travaux précurseurs en lien avec l'expression hétérologue de protéines chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Auteure de nombreuses publications et revues scientifiques, ainsi que de chapitres d'ouvrages, elle est également l'inventrice d'un brevet sur un promoteur recombinant.

Le Dr Eric DUGAT-BONY, est lui un Chargé de recherche à l'INRAE possédant une grande expertise sur les fermentations des 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 dans lequel s'inclut mon stage a remporté un appel d'offre dans le cadre du programme international Samuel de Champlain, visant « à contribuer à l'excellence de la coopération universitaire et scientifique franco-québécoise, à son développement et à sa diffusion ». Ce projet est en partie financé par la Commission Permanente de Coopération Franco-Québécoise (CPCFQ). Il matérialise une collaboration entre l'équipe CoMiAl de l'INRAE, et les équipes de recherche du Dr Alain DOYEN, attaché au Département des Sciences des

Aliments de la Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval à Québec.

Le Prof. Alain DOYEN travaille au sein du département Sciences des Aliments de l'Université Laval de Québec. Il dirige des recherches visant à optimiser l'extraction, la concentration et la purification des biomolécules à partir de produits et coproduits alimentaires, incluant les matrices d'insectes comestibles, via l'utilisation de procédés membranaires et à hautes pressions. L'objectif principal étant de produire des fractions enrichies en biomolécules et des ingrédients alimentaires de nouvelle génération.

La deuxième partie de mon stage a donc été effectuée aux côtés de cette équipe, au Canada, durant 9 semaines.

2. Contexte scientifique

2.1. Etat de l'art sur la valorisation de la chitine de divers coproduits alimentaires

Les exuvies d'insectes utilisées tout au cours du projet d'étude proviennent de l'élevage de larves de vers de farine, *Tenebrio molitor*. La composition des exuvies présentée au Tableau 1 a été déterminée en amont du stage.

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

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

Les teneurs élevées en protéines et chitine des exuvies de vers de farine justifient l'intérêt de développer des stratégies pour leur valorisation. Plus spécifiquement, une récupération de la chitine permettrait notamment de générer des dérivés chitiniques tels que le chitosan et les chito-oligosaccharides (COS), composés d'intérêt dans les secteurs alimentaires et pharmaceutiques. Plus spécifiquement, il a été démontré que les COS possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-diabétiques (Ilias Marmouzi et al.,2019). Ces composés présentent également des capacités antihypertensives, antitumorales et antimicrobiennes. Finalement, ces composés sont généralement bien absorbés au niveau de l'intestin, démontrant ainsi leur potentiel d'action bénéfique dans l'organisme².

Actuellement la valorisation de la chitine d'exuvies a été majoritairement réalisée à l'échelle laboratoire et via une voie chimique (utilisation d'acides et de bases fortes), non environnementalement durable. Certaines voies enzymatiques ont pu être testées, notamment dans l'équipe du Dr. Doyen. En effet à partir des exuvies un rendement de 56% de production de COS, en utilisant des enzymes (pepsine puis α -amylase⁹) a été obtenu*. Cette étape a permis de remplacer les étapes de déprotéinisation de la chitine et de conversion du chitosan en COS réalisées habituellement par voie chimique. La désacétylation reste possible uniquement chimiquement, puisque les enzymes nécessaires seraient beaucoup trop coûteuses.

La Figure n°1 présente les étapes de la valorisation de la chitine d'exuvies par voie chimique ou enzymatique. Les protocoles détaillés sont présentés dans l'Annexe n°1.

*Résultats non publiés

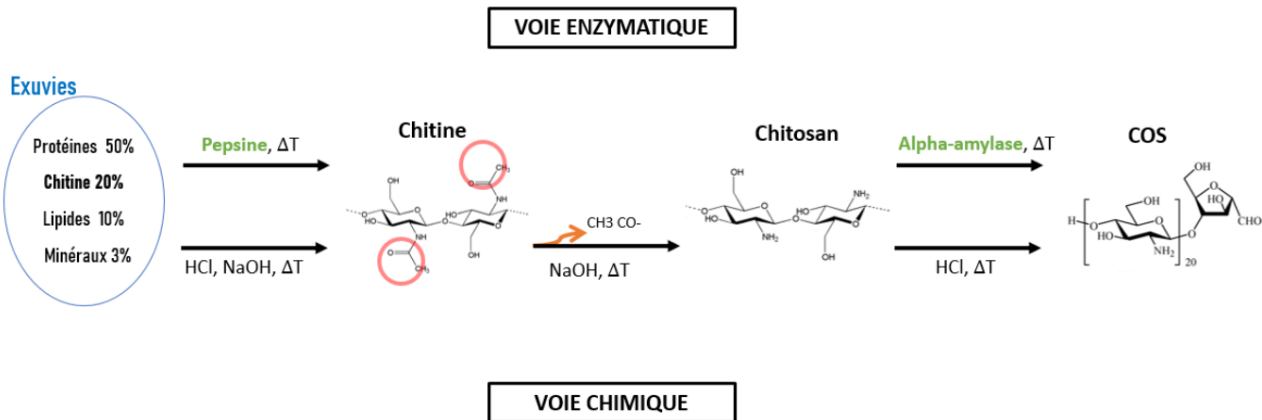


Figure n°1 : Schéma des différentes voies de valorisations des exuvies d'insectes

2.2. État de l'art de *Yarrowia lipolytica*

Certains micro-organismes sont déjà utilisés dans des procédés de fermentation ou de synthèse de molécules d'intérêt. Cependant, l'utilisation de micro-organismes produisant des enzymes intervenant dans les étapes de valorisation de la chitine des exuvies d'insectes serait complètement novatrice et permettrait d'obtenir des COS de manière plus durable que par la voie chimique actuellement disponible.

La levure *Yarrowia lipolytica* est un Ascomycète (généralement haploïde) de la classe des Saccharomycètes et de l'ordre des Saccharomycetales (tout comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Elle a longtemps été classée dans le genre *Candida* en l'absence d'un stade sexuel connu. *Y. lipolytica* est restée la seule espèce de son genre *Yarrowia* jusqu'en 2013, mais 13 autres espèces ont depuis été décrites au sein de ce genre³. Elle se fait remarquer par ses capacités lipolytiques et protéolytiques. C'est ainsi que ce sujet d'étude visait l'utilisation des levures de l'espèce *Yarrowia lipolytica* afin de déprotéiniser les exuvies d'insectes. Cette levure, déjà utilisée dans des bio-procédés pour la production de nombreuses enzymes comme des lipases, ou encore de l'acide citrique, présente un intérêt industriel qui ne cesse de grandir. Elle est encore aujourd'hui un hôte de choix dans l'expression et la sécrétion de protéines hétérologues.

2.2.1. Habitats et morphologies

Y. lipolytica est notamment étudiée pour son dimorphisme et sa grande capacité à métaboliser et stocker les lipides. Les cellules sont soit de type levure (rondes) soit des hyphes, on peut aussi voir des pseudo-hyphes pendant les transitions dimorphiques à pH neutre/alcalin ou lors de carences³.

Cette levure oléagineuse, connue pour survivre même dans des environnements à forte teneur en sel, est capable de stocker jusqu'à 30% de lipides / Dry Cell Weight (DCW) et jusqu'à 90% du DCW après ingénierie génétique. Cette efficacité d'assimilation des lipides se traduit par ses habitats souvent riches en lipides et en protéines. En effet, la levure est généralement retrouvée sur les viandes ou d'autres produits alimentaires fermentés comme le fromage, mais aussi dans les eaux polluées par des hydrocarbures et autres matières organiques. De ce fait, certaines souches

ont été isolées à partir d'eaux marines, ou d'égouts, ainsi qu'à la surface de plusieurs matrices alimentaires ou d'insectes.

Yarrowia lipolytica a été utilisée dans des procédés reconnus GRAS (Generally Recognized As Safe) depuis les années 50, et est classifiée à un Biosafety Level (BSL) de 1 ainsi que comme « un micro-organisme avec un usage documenté en alimentaire ». Récemment, en 2019, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments a approuvé son utilisation comme complément alimentaire⁴.

2.2.2. Sources de carbone

En lien avec ses différents environnements de croissance, *Y.lipolytica* est capable d'assimiler des sources de carbone très variées à partir de substrats de nature hydrophile et hydrophobe. À titre d'exemple, la levure est capable d'utiliser plusieurs sucres, comme le glucose, le fructose et le mannose, mais également des acides organiques et des alcools, notamment le glycérol. Les sources de carbone non hydrosolubles regroupent notamment les acides gras, les triglycérides et les alcanes³.

Il a été remarqué que « l'ingénierie du métabolisme de *Yarrowia lipolytica* pour l'utilisation de substrats alternatifs a été initiée très tôt dans son histoire de manipulation génétique [...] et les isolats de *Y. lipolytica* de type sauvage présentent un potentiel élevé pour la valorisation des déchets liquides ou solides d'origine agricole et industrielle »⁵.

2.2.3. Conditions physico-chimiques de croissance

Y. lipolytica est une levure aérobique obligatoire pour laquelle la concentration en oxygène est un facteur limitant pour son développement. La température idéale pour sa croissance est comprise entre 25 et 30°C, bien que certaines souches puissent croître jusqu'à 37°C. Cette levure possède une tolérance à des valeurs de pH comprises entre 3,5 à 8, certaines pouvant supporter des valeurs de pH de 2 ou 9,7. De plus, *Y. lipolytica* tolère de très fortes concentrations en sel comprises entre 7,5 à 15% pour certaines. Pour finir elle est capable d'adsorber des métaux lourds tels que Cr, Fe, Ni, Cu, Zn ou Cd⁵.

Ses conditions de croissance spécifiques ainsi que sa faculté à métaboliser diverses sources de carbone en font une levure pouvant s'adapter à un grand nombre de milieux de croissance plus ou moins extrêmes.

2.2.4. Sécrétions extracellulaires

Y. lipolytica sécrète naturellement une lipase, une chitinase et deux protéases. La valorisation des exuvies afin d'en extraire la chitine nécessite une déminéralisation, une déprotéinisation, ainsi qu'une métabolisation des lipides. De ce fait, l'utilisation de cette levure est particulièrement intéressante.

La lipase extracellulaire sécrétée (LIP2) permettra de dégrader les lipides contenus dans les exuvies de vers de farine afin de purifier la chitine. Cette lipase permet aussi l'absorption et la métabolisation intracellulaire des lipides par la levure⁵.

Les deux protéases produites par la levure sont dépendantes du pH. La protéase extracellulaire alcaline (AEP) s'exprime à des pH neutre/alcalins (7 à 14), elle est codée par le gène *XPR2*. À l'inverse, la protéase extracellulaire acide (AXP) est, elle, sécrétée à des pH acides (0 à 6)⁶. On s'attend à ce qu'elles jouent un rôle important dans le procédé de déprotéinisation de la chitine.

Y. lipolytica secrète aussi une chitinase, jusque là peu connue, qui pourrait avoir un intérêt dans ce projet, elle est codée par le gène *CTS1*⁷. La chitinase est initialement impliquée dans le maintien de la plasticité de la paroi cellulaire et dans la séparation des cellules mères-filles pendant la croissance végétative de la levure. Cette enzyme peut éventuellement contribuer à l'hydrolyse de la chitine des exuvies d'insectes en dérivés chitiniques.

2.2.5. Ingénierie génétique

Après avoir été utilisée pour la sécrétion de protéases ou de ligases au début des années 80, *Y. lipolytica* suscite depuis les années 90 un intérêt pour la production de protéines hétérologues⁸. Des souches mutantes d'autotrophie, notamment pour l'uracile ou la leucine (*URA3* ou *LEU2*), ont été créées. Cette méthode de sélection par correction de l'auxotrophie après intégration d'un vecteur portant le marqueur de sélection correspondant dans le génome sera un des premiers brevets sur la transformation de *Y. lipolytica*. Des variants génétiques auxotrophes de la souche W9 sont maintenant largement utilisés comme Po1a et Po1f (Leu-, Ura-), ou encore Po1g (Leu-, pBR) qui possède une plateforme pBR permettant intégration ciblée efficace de vecteurs basés sur le plasmide bactérien pBR322⁵.

Plus tard, à la fin des années 90 l'INRAE dépose un brevet pour un promoteur recombinant « hp4d ». Ce promoteur permet d'exprimer des gènes fortement, dans des conditions de culture variées, pour produire les protéines correspondantes en plus grande quantité, il se base sur l'augmentation du nombre de séquences UASs, naturellement présentes dans le promoteur du gène *XPR2* codant la protéine AEP.

2.3. Etat de l'art sur le projet

Ce projet visant à utiliser la levure *Yarrowia lipolytica* dans la valorisation des exuvies d'insectes a débuté en 2022 avec un stagiaire, étudiant de l'Université de Technologies de Compiègne (UTC), Idriss Aït Tahar. Les objectifs de ce premier stage étaient d'explorer la biodiversité de *Y. lipolytica* et ainsi de déterminer la souche la plus performante suivant différents critères : l'activité de leurs protéases, leur capacité de croissance sur milieu nutritif riche, mais aussi sur milieu avec exuvies, ainsi que leur résistance à différents pH. Un autre objectif était de mettre au point un protocole de préparation d'un milieu enrichi en exuvies.

Ainsi les tests suivants ont été réalisés :

- Suivi de l'activité protéase (AEP et AXP) sur boîtes Skim Milk
- Suivi de l'activité lipase (LIP2) sur boîtes tributyrates
- Suivi de croissance en BioTek (DO)
- Test de solubilisation des protéines dans milieu riche en exuvies
- Premiers suivi de croissance avec souches et milieux bruts sélectionnés

À la suite de ces analyses il a été choisi de continuer le projet avec la souche W29 de *Y. lipolytica* provenant des eaux usées de France. Elle possède déjà des outils de manipulation génétique mis

au point par l'UMR SayFood ce qui est un avantage pour la suite du projet. Les résultats concernant l'exploration de la biodiversité de *Y. lipolytica* sont présentés en Annexe n°2.

En ce qui concerne la mise au point d'un milieu enrichi en exuvies il a été montré que le milieu le plus propice à la croissance de la levure et possédant la plus grande concentration protéique est celui dont l'extraction protéique est réalisée à pH 2 et ajusté à pH 4 après autoclave. L'utilisation d'un tampon phosphate à pH 6,8 pendant la culture a été testée, cela réduit un peu le maximum de croissance de la levure mais évite une baisse ultérieure de viabilité liée à une trop forte alcalinisation du milieu.

2.4. Problématique

D'après l'étude bibliographique réalisée pour établir ce contexte scientifique, et au regard des dernières avancées du projet, une problématique globale peut être énoncée :

Dans quelles mesures la souche W29 de *Y. lipolytica* et ses dérivés génétiquement modifiés sont-ils capables de valoriser les exuvies de vers de farine et ainsi offrir une alternative de purification et de bioconversion de la chitine plus durable comparativement aux méthodes chimiques ?

2.5. Objectifs visés

De cette manière, la première partie du stage a consisté à la poursuite de l'analyse de la biodiversité avec la mise en place de nouveaux tests lipases ou encore du séquençage de la région D1D2 du gène codant pour l'ARN ribosomique 26S de certaines souches afin de valider leur identification. Nous avons également testé l'efficacité d'un nouveau milieu enrichi en exuvies mis au point par l'équipe d'Alain Doyen

La deuxième partie du stage a porté sur l'élaboration de variants génétiques de la souche W29 sélectionnée, ainsi que la sélection des plus performants sur la base de certains critères, afin de suivre leur culture dans le milieu d'intérêt :

- leur capacité de croissance dans le milieu enrichi en exuvies et en milieu minimum
- l'activité de leurs protéases
- l'activité de leur chitinase

La dernière partie du stage se déroulant à l'Université Laval de Québec a visé, elle, à caractériser les différents produits issus de la culture en milieu enrichi en exuvies de la souche sauvage et des variants génétiques. Les surnageants de ces cultures ont été caractérisés en déterminant la proportion de lipides, minéraux, sucres solubles, et analysés afin d'identifier leur composants, potentiellement des dérivés des protéines et de la chitine des exuvies.

3. Matériels et méthodes

3.1. Cultures des microorganismes

3.1.1. Origine des souches de *Yarrowia lipolytica*

Les souches de *Yarrowia lipolytica* utilisées au cours de ce projet ont été en grande partie obtenues par la collection de levure interne de SayFood et par le CIRM-Levures¹⁰ qui est une collection nationale localisée dans l'UMR SPO de Montpellier. On y retrouve plus de 4000 isolats de levures en grande majorité d'origine naturelle mais aussi certaines souches intéressantes en biotechnologie comme des dérivés génétiquement modifiés de *Y. lipolytica*.

3.1.2. Milieux et tampons

Au cours de ce projet différents milieux de culture ont été utilisés, que ce soit pour les levures ou les bactéries. Les cultures d'*Escherichia coli* qui est une bactérie ont été réalisées dans un milieu LB (Luria-Bertani broth). Pour *Yarrowia lipolytica* les milieux utilisés sont le YPD (yeast extract peptone-dextrose) dit milieu riche et le YNB (yeast nitrogen base) dit milieu minimum.

Certaines analyses ont demandé des milieux de cultures spéciaux, comme les tests d'activités lipases et protéases.

Les différentes compositions de ces milieux sont présentées dans le Tableau n°2. Tous les milieux sont complétés avec de l'eau milliQ. Si les milieux doivent être coulés sur boîte de petri on ajoute de l'agar bactériologique de type E à une concentration de 16 g/L.

Milieu	Composition (g/L ou mL/L)
LB	10 g/L tryptone (peptone)
	5 g/L yeast extract
	0,5 g/L NaCl
YPD	10 g/L yeast extract
	10 g/L bacto peptone
	10 g/L glucose
YNB	6,7 g/L yeast nitrogen base without amino acids
	10 g/L glucose
Tributyryne	YNB ou YP (<i>sans glucose</i>)
	10 mL/L tributyrine
Skim Milk	20 g/L Skim Milk
	100 mL/L YNB
	50 mL/L tampon 1M (Phosphate à pH 6,8 ou Citrate à pH 4)
	10 g/L agar bactériologique type E

Tableau n°2 : Composition des milieux de culture classiques

De la même manière, les différentes expériences réalisées ont parfois demandé l'utilisation de solutions tampons, que ce soit pour la migration sur gel d'électrophorèse ou bien pour tamponner un milieu à un pH fixe par exemple.

Tampon ou gel d'électrophorèse	Composition (g/L ou mL/L)
Tampons phosphate à pH 6,8 à 0,1M	49,7 mL/L de K ₂ HPO ₄ à 175,1 g/mol 50,3 mL/L de KH ₂ PO ₄ à 136,09 g/mol
Tampon TE (pour gel d'agarose)	10 mL/L de Tris EDTA eau distillée
Tampon natif ou dénaturé (pour gel polyacrylamide)	100 mL/L du tampon adapté 900 mL/L d'eau distillé
Tampon citrate pH 4 à 1M	124 g/L acide citrique monohydrate 121 g/L citrate trisodium dihydrate
Gel d'agarose	8 g/L d'agarose 20 mL/L de TAE 50X 100 µL/L de Cyber Safe qsp 1L d'eau distillé
Gel polyacrylamide	Utilisation des Gel 4-20%, puits 15 µL

Tableau n°3 : Composition des tampons et gels d'électrophorèse

3.1.3. Cultures liquides ou sur boîte de petri

Les cultures de microorganismes peuvent être réalisés en milieu liquide ou en milieu gélosés sur boîte de Pétri.

Dans le cadre du projet les cultures liquides ont été utilisées pour faire des pré-cultures ou des suivis de croissance, généralement en YPD, YNB ou LB. Les inoculations ont été faites soit à partir d'une colonie sur boîte avec une oese, soit à partir d'une autre culture liquide à une DO (le plus souvent 0,1 ou 0,2) précise afin de connaître la concentration initiale inoculée.

Pour ce qui est des cultures sur boîtes, elles ont été utilisées lors de tests sur l'activité lipase et protéase (sur milieu tributyrine et Skim Milk) afin de voir se former des halos autour des colonies, mais aussi lors de dénombrement UFC (YNB et YPD) ou encore pour sélectionner des transformants portant une auxotrophie ou une résistance à un antibiotique (LB+Kanamycine, YNB+Leu/Ura). Les ensemencements se font à partir de cultures liquides ou sur boîte. Il existe différentes techniques : le striage, le patch, l'utilisation de billes ou encore le dépôt de gouttes.

3.2. Ingénierie génétique

3.2.1. Provenance des *E.coli* compétentes, des enzymes de restriction et de modification de l'ADN, des ADN synthétiques

Au cours des manipulations d'ingénierie génétique nous avons utilisé des souches d'*Escherichia coli* dites compétentes, c'est-à-dire dont la paroi et la membrane ont été fragilisées par des traitements chimiques afin de permettre l'entrée de molécules d'ADN libres (vecteurs) de leur

environnement (transformation), ainsi que des enzymes de restriction et de modification de l'ADN, utilisés dans les procédés de constructions de vecteurs.

Ces souches et ces enzymes proviennent de l'entreprise New England Biolabs (NEB) :

- NEB 5-alpha Competent *E. coli*¹¹
- Apa I
- Cla I
- XmnI
- Aat II
- Bgl I
- Nar I
- Not I
- CutSmart Buffer¹²
- NEBuffer r3.1¹³
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)¹⁴
- T4 DNA ligase (NEB et Fermentas)¹⁵

Les ADNs synthétiques intégrés aux différentes souches de *E. coli* et de *Y. lipolytica*, sont des constructions génétiques produites par l'entreprise Thermo Fisher Scientific GeneArt¹⁶ :

- puc57-cassLEU2tzeta
- pINA1312-YICTS1
- pINA1314-YIXPR2

3.2.2. Protocoles de construction des différents variants génétiques

3.2.2.1. Création d'une plateforme "zeta" intégrée dans le génome d'une souche de *Y. lipolytica*

- La première étape fut le transfert de la cassette "cassLEU2tzeta" de puc57 à un vecteur du laboratoire, pINA1296. Le plasmide puc57 est un vecteur de clonage utilisé chez *E. coli* avec une résistance à l'ampicilline, dans le cadre de ce projet il contient une cassette d'expression nommée "cassLEU2tzeta" placée entre deux sites Cla I du plasmide. Le plasmide pINA1296 est lui un vecteur de SayFood capable de s'intégrer dans le génome de *Y. lipolytica*, où il peut être sélectionné grâce à la présence du marqueur LEU2. Le fragment "cassLEU2tzeta" doit être isolé de puc57 pour être inséré entre les sites (uniques) NarI et ClaI de pINA1296.

- a) la digestion enzymatique de pINA1296 par les enzymes de restriction ClaI et NarI et la déphosphorylation des extrémités par la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), pour éviter une future recircularisation du vecteur :

77 µL pINA1296
+ 0,5 µL ClaI
+ 0,5 µL NarI
+ 1,3 µL CutSmart Buffer
+ 0,5 µL SAP
+ qsp 90* µL avec tampon TE

*quantité suffisante pour

réaction au bain-marie à 37°C pendant 4 heures

b) la digestion enzymatique de puc57 pour libération de cassLEU2tzeta, accompagnée d'une restriction par d'autres enzymes afin de dégrader le reste du plasmide (2 méthodes) :

i) 29 μ L puc57
+ 1,5 μ L Clal
+ 0,5 μ L XmnI
+ 0,5 μ L AatII
+ 3,5 μ L CutSmart

ii) 29 μ L puc57
+ 2 μ L Clal
+ 0,5 BglI
+ 3,5 NEB 3.1

réaction au bain-marie à 37°C pendant 4 heures

Les digestions avec le tampon CutSmart seront notées "CS" et celles avec le tampon NEB 3.1 seront notées "3.1".

c) l'inactivation des enzymes est réalisée pendant 20 minutes à 80°C pour les CS et à 65°C pour les 3.1 et les pINA1296.

d) la ligation entre les cassLEU2tzeta et pINA1296 a été réalisée avec deux ligases différentes, une venant de NEB et une autre de Fermentas :

10 μ L pINA1296 coupé par NarI et Clal
+ 3 μ L CS ou 3.1 (cassLEU2tzeta)
+ 5 μ L ligase buffer
+ 2 μ L ligase NEB ou Fermentas
+ 30 μ L d'eau

Les constructions issues de de la ligase NEB seront notées "N" et celles de Fermentas "F".

e) la transformation d'*E.coli* compétentes avec les nouvelles constructions p96-cassLEU2tzeta par le protocole décrit en Annexe n°3, puis la culture des bactéries modifiées sur milieu LB avec ampicilline.

f) le choix des constructions après préparations d'ADN des colonies *E.coli* et dépôts sur gel d'agarose, dans un 1er temps des plasmides entiers (taille totale) puis, dans un 2nd temps, d'une digestion par Apal (libération de la cassette "zeta" qui sera utilisée pour transformer *Yarrowia*).

A chaque étape de restriction ou de ligation on réalise des dépôts sur gels d'agarose pour ainsi contrôler la taille attendue des fragments. Après une transformation de *E. coli* avec les produits de ligation, on sélectionne une douzaine de transformants et on réalise une purification de leur ADN plasmidique à l'aide du kit mini-prepADN-Biolabs Monarch Plasmid¹⁷, afin de faire des dépôts sur gels d'agarose et ainsi contrôler la taille attendue des constructions génétiques.

- La deuxième étape a consisté à utiliser la cassette Apal-zeta-Apal du nouveau vecteur construit, p96-cassLEU2tzeta, pour transformer la souche Po1a de *Y.lipolytica* en une nouvelle souche Po1z, porteuse d'une plateforme "zeta" permettant l'intégration ultérieure facile et ciblée de vecteurs basés sur des séquences zeta. Le protocole de cette transformation est décrit en Annexe n°4.

3.2.2.2. Création de souches génétiquement modifiées de *Y. lipolytica* Po1z + pINA1312-YICTS1 ou pINA1314-YIXPR2

- La première étape a été de digérer les ADNs construits par GeneArt, pINA1312-YICTS1 et pINA1314-YIXPR2 par l'enzyme de restriction NotI, afin d'obtenir un fragment linéaire bordé par des séquences zeta, capable de s'intégrer dans le génome de *Yarrowia*. Ces deux vecteurs possèdent un promoteur recombinant "hp4d". Dans pINA1312 il est placé avant le gène CTS1 codant pour la chitinase et pour pINA1314 il est placé avant le gène XPR2 codant pour la protéase AEP :

10 µL pINA1312-YICTS1 ou pINA1314-YIXPR2
 + 1,5 µL NEB 3.1
 + 1,2 µL NotI
 + 2,3 µL tampon TE

réaction à 37°C pendant 2h30.

- La deuxième étape fut l'intégration des fragments bordés de séquences zeta obtenus soit de manière non-homologue (au hasard), par "NHEJ" (non-homologous end-joining) dans la souche Po1a de *Y.lipolytica*, soit par homologie avec le génome (ciblée) dans la souche Po1z de *Y.lipolytica*. Ce protocole de transformation (identique dans les 2 cas) est décrit dans l'Annexe n°4.

La finalité était de créer deux souches W29 de *Y.lipolytica* génétiquement modifiée pour surexprimer la chitinase (Po1z-pINA1312-YICTS1) ou la protéase AEP (Po1z-pINA1314-YIXPR2). Par la suite nous noterons ces souches modifiées pour la chitinase "C+" et celles modifiées pour l'AEP "P+". Le fait de pouvoir comparer les efficacités de transformation obtenues par le procédé "au hasard" (plus basse) et le procédé par homologie ciblant la plateforme zeta (plus élevé) a permis une vérification rapide de la réussite du ciblage des intégrations. Des vérifications ultérieures plus complètes, par PCR notamment (impossibles à mettre en œuvre pendant la durée du stage), pourront être effectuées par la suite.

3.3. Caractérisation enzymatique des souches de *Yarrowia lipolytica*

3.3.1. Activité lipase et activité protéase

L'activité lipase des différentes souches de *Y.lipolytica* a été déterminée au cours de ce projet par la mesure de halos sur boîte YNB ou YP avec ajout de tributyrine et sans glucose. Voici le protocole suivi :

- Lors du coulage des boîtes tributyrines on utilise un Ultra-Turrax afin de bien homogénéiser le milieu (aqueux et lipidique).

- b) Préparation de 2 mL de culture liquide YPD de chaque souche à 28°C, 150 rpm pendant 1 nuit
- c) Dilutions des cultures à 1/20 (100 µL de cultures + qsp 2000 µL de milieu)
- d) Lecture de la DO à 600 nm puis dilutions pour pouvoir déposer une quantité de cellules de référence correspondant à 10 µL avec une DO de 0,3

$$\frac{10 \mu\text{L} \times 0,3}{DO_{réelle}} = \text{Volume culture diluée qsp } 10 \mu\text{L de milieu}$$

- e) Dépôt d'une goutte de 10 µL à la pipette sur les boîtes puis incubation à 28°C
- f) Photographie et mesure sur ordinateur des halos avec le logiciel ImageJ, tous les jours pendant 4 jours (pour échelle, taille réelle d'une boîte = 9,1 cm).

L'activité protéase des variants génétiquement modifiés P+ de *Y. lipolytica* a aussi été déterminée par cette méthode de mesure des halos mais cette fois-ci sur des boîtes à 2% de Skim Milk à deux pH différents, pH 4 et pH 6,8.

3.3.2. Activité chitinase

Nous avons utilisé un kit de Sigma-Aldrich spécialement conçu pour mesurer l'activité chitinase d'échantillons par fluorimétrie. Le test se base sur l'hydrolyse enzymatique des substrats de la chitinase. L'hydrolyse relâche du 4-méthylumbellifère (4MU), qui dans un pH basique peut être mesuré par fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et d'émission de 450 nm. L'utilisation de substrats fluorimétriques fournit un système de détection très sensible. Voici les principales étapes du protocole à suivre :

- a) Équilibrer la ou les working solutions du substrat ainsi que les solutions étalons à 37 °C en les incubant pendant quelques minutes dans un bain marie.
- b) Ajouter les composants de la réaction aux puits de la plaque de 96 puits selon le Tableau n° , puis mélanger. Préparer d'abord les échantillons étalons. Ensuite, préparer les échantillons enzymatiques : ajouter d'abord la solution de substrat aux puits appropriés, puis ajouter l'enzyme (contrôle positif ou échantillon à tester).
- c) Incuber la plaque pendant 30 minutes à 37 °C.
- d) Arrêter les réactions en ajoutant 200 µl de solution stop dans chaque puits.
- e) Mesurer la fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 450 nm au plus tard 30 minutes après la fin de la réaction.

Nom de l'échantillon	Working solution	Échantillon ou solution standard	Solution tampon
Blanc	100 µL	–	–
Contrôle positif	90–99 µL	1–10 µL du contrôle de l'enzyme chitinase	–
Echantillon	90–99 µL	1–10 µL d'échantillon	–
Blanc du standard	–	–	100 µL
10 ng/assay standard	–	2 µL du 5 µg/ml	98 µl
100 ng/assay standard	–	2 µL du 50 µg/ml	90 µl
500 ng/assay standard	–	10 µL du 50 µg/ml	98 µl
1000 ng/assay standard	–	2 µL du 500 µg/ml	98 µl

Tableau n°4 : Schéma de réaction pour les dosages en plaque de 96 puits.

3.4. Cultures en milieux exuvies

3.4.1. Le milieu exuvies

Au cours du projet nous avons utilisé deux milieux exuvies, celui élaboré par le précédent stagiaire (milieu FR) et celui mis au point par l'équipe d'Alain Doyen (milieu CA). La composition reste la même à compléter avec de l'eau milli Q :

Milieu	Composition (g/L ou mL/L)
Exuvies (FR et CA)	25 g/L exuvies
	0,67 g/L YNB
	1 g/L glucose

Tableau n°5 : Composition des milieux exuvies

Ce sont les protocoles de production qui diffèrent :

Milieu FR	Milieu CA
Ajustement à pH 2	Agitation au bain marie à 45°C pendant 4h, à pH 10 (ou 2)
Autoclave	Re ajustement à pH 7 (ou 4)
Ajustement à pH 4 stérilement	Autoclave

Tableau n° 6: Protocoles de production des milieux exuvies

Les ajustements du pH sont faits avec du NaOH ou du HCl.

Le milieu CA a été élaboré dans le but de solubiliser plus de protéines des exuvies, ce que nous avons pu remarquer par la méthode de Bradford. Il a cependant été remarqué au cours du stage que ce milieu empêche la bonne croissance des levures. Il a donc été utilisé seulement afin de mettre au point le suivi de culture par cytométrie en flux.

Lors de la production du milieu FR plusieurs bouteilles ont été faites séparément, ces différents milieux serviront de réplica biologiques, et seront notés Ex1, Ex2, Ex3, Ex4

3.4.2. Dosage des protéines solubles par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance mesuré à 595 nm, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après complexation avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines de l'échantillon.

Elle a été utilisée au cours du stage afin de vérifier si les ajustements du pH à 10 puis à 7 permettaient de mieux solubiliser les protéines d'exuvies dans le milieu CA que ceux à pH 4 puis 2 :

- La première étape est de réaliser une gamme étalon avec de la sérum-albumine bovine (SAB) à une concentration en protéines connue de 0,2 mg/mL, ayant réagi avec le réactif de Bradford
- La deuxième étape consiste à lire les absorbances des échantillons après la réaction. Les échantillons sont des prélèvements à différentes étapes du protocole CA, avant le bain marie (t=0), après les 4h de bain marie à pH 2 ou 10, et après l'autoclave.

N° standard	Volume de SAB à 0,2 mg/ml (µl)	Volume d'eau milliQ (µl)	Volume de réactif de Bradford (µl)
1	0	800	200
2	10	790	200
3	20	780	200
4	30	770	200
5	40	760	200
6	50	750	200

Tableau n°7 : Gamme étalon du dosage par la méthode Bradford

Echantillons	Dilution	Volume d'eau milliQ (μl)	Volume d'échantillon brut (μL)	Volume de réactif de Bradford (μl)
pH2 t=0	1/50	784	16	200
pH10 t=0	1/50	784	16	200
pH2 t=4	1/50	784	16	200
pH10 t=4	1/50	784	16	200
pH2 t=A	1/50	784	16	200
pH10 t=A	1/50	784	16	200

Tableau n°8 : Plan des dilutions des échantillons

Les résultats de cette analyse sont présentés dans l'Annexe n°5.

3.4.3. Suivi de culture sur milieu filtré par BioTek

Le BioTek est un appareil spectrophotométrique qui peut mesurer la DO d'échantillons sur une plaque de 96 puits. Elle permet un suivi de la croissance d'une culture à une agitation, une température et pendant une durée prédéfinie. Au cours du stage, cette méthode d'analyse a été utilisée pour choisir les meilleures souches modifiées de W29 :

- a) Lancer des précultures des souches d'intérêts en YPD toute une nuit à 28°C
- b) Filtrer éventuellement les milieux utilisés pour la culture en biotek (il n'est pas possible de mesurer des DO sur les milieux à base d'exuvies, qui ne sont pas solubles).
- c) Lire l'absorbance des précultures de chaque souche à tester et les diluer dans chacun des milieux à tester pour obtenir une DO de 0,01.
- d) Réaliser un plan de la plaque en y inscrivant chaque échantillon (souche + milieu).
- e) Remplir la plaque 96 puits des différentes combinaisons souche/milieu (inoculés à 0,01 de DO).
- f) Lancer la culture dans le BioTek avec une agitation de 730 rpm et une température de 28°C.

Il est habituel de ne pas utiliser les puits en périphérie de la plaque pour éviter des biais positionnels lors de la lecture d'absorbance qui s'effectue à 600 nm, mais il est important de les remplir de liquide pour éviter des problèmes de trop forte évaporation des autres puits. On peut utiliser à cet effet de l'eau ou des milieux non inoculés (contrôle d'absence de contamination : cf. cases A2 à A11 ci-dessous)). Voici le plan de plaque utilisé complété avec les noms des souches utilisées (W29 sauvage ou transformants P+ et C+ choisis au vu des résultats des tests d'activités protéase et chitinase :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	Ex1		Ex2		Ex3		Ex4		YNB 1/10		
B		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	P+ n°4	P+ n°5	
C		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	P+ n°4	P+ n°5	
D		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	P+ n°4	P+ n°5	
E		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	C+ n°5	C+ n°6	
F		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	C+ n°5	C+ n°6	
G		W29 s	P+ n°1	P+ n°2	P+ n°3	C+ n°1	C+ n°2	C+ n°3	C+ n°4	C+ n°5	C+ n°6	
H												

Tableau n°9 : Plan de plaque de culture BioTek

3.4.4. Suivi de culture par cytométrie en flux et dénombrement CFU

La cytométrie en flux est une méthode qui permet de dénombrer et d'étudier les populations de cellules ou les particules dans un échantillon. L'échantillon passe au travers d'un faisceau laser, et la lumière réfléchiée par les cellules est capturée par des détecteurs. En fonction de l'angle et de la lumière réfléchiée, on peut déterminer la taille, la forme et d'autres caractéristiques des cellules.

L'application de cette méthode sur *Y. lipolytica* n'a été que très peu mise au point, et en tout cas pas sur la souche W29 ou en milieu exuvies. Il a donc fallu mettre au point cette technique ainsi que le protocole de marquage sur notre levure. Pour cette mise au point nous avons réalisé des cultures sur le milieu CA avec 3 souches sauvages de *Y. lipolytica*, W29, A101, et SWJ.

Voici le protocole mis au point au cours du stage et qui a donc été utilisé lors du suivi de croissance des souches modifiées dans le milieu FR :

- A partir des culture en milieu exuvies, réaliser une première dilution à 1/10 dans la solution de marquage
- Avant de réaliser les marquages, passer un premier échantillon pour vérifier que la dilution est suffisante, le débit doit être inférieur à 3000 cellules/s. Si ce n'est pas le cas, on peut diluer de nouveau la solution au 10ème et ainsi de suite.

- c) Pour le marquage ajouter 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'IP qui est un marqueur de mortalité et 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de V8 dilué au 10^{ème} dans l'acétone qui est un marqueur d'activité enzymatique (viabilité).
- d) Incuber au bain-marie à 40°C pendant 15 minutes
- e) Filtrer sur 30 μm et passer l'échantillon

Voici les paramètres à choisir pour préparer le cytomètre en analyse CMF :

- Cytomètre : BactiFlow
- FSC : Taille : 206,5 Log3
- SSC : Structure : 252 Log3
- FL1 : λem vert : 194 Log4
- FL3 : : λem rouge : 301,5 log4

En parallèle du dénombrement par cytométrie, nous avons réalisé des dénombrement sur boîte par la méthode des unités formant colonie (CFU). Ce dénombrement est basé sur le principe qu'un micro-organisme vivant et viable peut former une colonie visible.

3.5. Identification de souches par PCR et séquençage

Dans le cadre de l'étude transversale de la biodiversité de *Y. lipolytica* au cours de ce stage, nous avons réalisé un séquençage de la région D1D2 du gène codant pour l'ADN ribosomique 28S de certaines souches afin de les identifier comme appartenant bien à l'espèce *Yarrowia lipolytica*.

- La première étape à d'abord été de purifier les ADN des différentes souches avec un kit mini-prepADN-Biolabs Monarch Plasmid, les souches choisies sont les suivantes :

CLIB 183 ; Ex-fcom-LP ; CAM-43-C ; CAM-25-E ; CAM-28-E ; SWJ-1b ; 296

- La deuxième étape fut de réaliser une méthode PCR adaptée à l'amplification de ce gène.
 - a) diluer l'ADN préalablement dosé au Qubit dans de l'eau qualité BM pour obtenir une concentration de 20 ng/ μL .
 - b) réaliser un mélange de tous les réactifs sans les ADN en comptant le nombre d'échantillons en ajoutant un témoin négatif. Voici les proportions à utiliser :

Tampon GoTaq Promega 5x 10 μL
 + Oligo NL1 à 10 μM 1 μL (0.2 μM)
 + Oligo NL4 à 10 μM 1 μL (0.2 μM)
 + dNTP (2.5 mM chacun) 4 μL (0.2 mM final chacun)
 + GoTaq Promega (5 U/ μL) 0.25 μL
 + H₂O milliQ stérile qsp 50 μL (32.75 μL)
 + ADN 1 μL à 20 ng/ μL

- c) programmer le thermocycleur avec ces paramètres :

Dénaturation des 2 brins d'ADN 5 min à 94°C
 25 cycles

{ dénaturation 30 sec à 94°C
hybridation 30 sec à 54°C
Polymérisation 60 sec à 72°C

Elongation finale 5 min à 72°C
Refroidissement 4°C

- La dernière étape a été de contrôler les résultats de cette PCR sur gel d'agarose afin de les envoyer à séquencer pour une identification chez Eurofins.

3.6. Caractérisations et analyse des surnageants de cultures

Les surnageants de cultures ont été congelés à -30°C puis envoyés au Canada "en carboglace" par porteur spécialisé (Cryo Express). Ils ont été filtrés et lyophilisés à leur arrivée à l'Université Laval de Québec. Ils sont conservés au congélateur à -20°C pour permettre les caractérisations et analyses suivantes.

3.6.1. Solide totaux et cendres

La détermination des solides totaux et des cendres permet de caractériser la proportion d'humidité et de minéraux dans les échantillons :

- Identifier un creuset avec un marqueur résistant à la chaleur
- Tremper les creusets dans une solution d'acide nitrique à 0.1 M
- Laver les creusets avec de l'eau MilliQ
- Conditionner un creuset pendant 24h au four à cendre (550 °C)
- Laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 60 minutes
- Peser le creuset
- Peser 1 g de concentré
- Placer le creuset dans une étuve ventilée ou un four à vide à 100 °C
- Sécher un minimum de 5h pour le four à vide et une nuit pour l'étuve ventilée
- Retirer les creusets et laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 1h
- Peser le creuset avec les solides totaux
- Placer le creuset dans un four à cendre et chauffer à 550 °C jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de carbone (12 à 24h)

- Fermer le four et attendre que la température ait atteint 250 °C avant d'ouvrir la porte (4 à 5h)
- Ouvrir la porte lentement pour éviter la perte de cendres
- Refroidir pendant 1h le creuset dans un dessiccateur
- Peser le creuset avec les cendres

3.6.2. Dosage des sucres solubles

Cette analyse permet de déterminer la proportion de sucres solubles comme le glucose dans les échantillons :

- Mélanger l'échantillon avec de l'eau distillée (ratio 1 : 80 p/V) et mettre sous agitation à 400 rpm pendant 30 min à température pièce
- Centrifuger à 18000 g, 20 °C pendant 30 minutes
- Récupérer le surnageant et noter le volume
- En étant sous la hotte, mélanger dans un Eppendorf 1 mL de surnageant avec 1 mL d'une solution de phénol à 5 % et vortexer
- Ajouter rapidement 5 mL d'acide sulfurique concentré dans l'Eppendorf et vortexer (attention production de chaleur)
- Laisser réagir pendant 30 minutes à température ambiante
- Déterminer l'absorbance à 487 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (labo 1420)
- La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de D-(+)-glucose (solutions à 0.1 g/L, 0.08 g/L, 0.06 g/L, 0.04 g/L, 0.02 g/L et 0.01 g/L)

3.6.3. Dosage des lipides

Le dosage des lipides permet aussi de délipider les échantillons :

- Peser 500 mg d'échantillon dans un tube Falcon 15 mL et noter la masse précise
- Ajouter 1.67 mL de CHCl_3 ainsi que 1.67 mL de MeOH
- Agiter pendant 30 secondes
- Mettre à l'incubateur pendant 20 min à 60 °C
- Ajouter 1.67 mL de CHCl_3 pour obtenir un ratio 2:1
- Agiter 1 min

- Centrifuger 4500 rcf, 5 min, 20 °C (centri Eppendorf)
- Récupérer le filtrat dans un nouveau tube Falcon et laisser le culot dans le premier
- Refaire ces étapes deux fois sur le culot
- Rassembler les filtrats ensembles
- Ajouter $\frac{1}{5}$ du volume des filtrats, de solution de NaCl 0.58 %
- Centrifuger 4500 rcf, 20 °C, 5 min
- Récupérer la phase aqueuse sur le dessus
- Récupérer la phase organique (du dessous) dans un ballon préalablement pesé
- Évaporer la phase organique au Rotavap (50 °C)
- Mettre les ballons à l'étuve 60 °C pendant 2h puis laisser sous hotte ON
- Peser la masse du ballon avec lipides

3.6.4. Gels d'électrophorèse polyacrylamide

Les électrophorèses sur gel polyacrylamide sont aussi appelées native PAGE pour les natifs et SDS-PAGE pour les dénaturés réduits. Les gels seulement dénaturés permettent d'éliminer les formes tertiaires et quaternaires des protéines. Le SDS-PAGE consiste en la dénaturation et la coupure des ponts disulfure des protéines avec certains réactifs comme le SDS. Ils permettent la migration des protéines d'un échantillon suivant un courant électrique.

Le protocole est sensiblement le même :

- Préparer le tampon de migration en mélangeant 100 mL de tampon approprié avec 900 mL d'eau déionisée
- Préparer les échantillons à 1 % en protéines dans de l'eau distillée
- Annoter des Eppendorf pour les échantillons
- Ajouter 25 μ L d'échantillon dans un Eppendorf
- Native PAGE :
 - Ajouter 25 μ L de buffer (Native Sample Buffer #161-0738) dans chaque Eppendorf puis vortexer
- Dénaturés :
 - Ajouter 25 μ L de tampon de charge Laemmli 2X dans chaque Eppendorf puis vortexer

- SDS-PAGE :
 - Préparer le buffer avec 95 % de tampon de charge Laemmli 2X et 5 % de β -mercaptoéthanol
 - Ajouter 25 μ L de buffer dans chaque Eppendorf puis vortexer
- Assembler la chambre d'électrophorèse et enlever le papier vert en dessous (gel 12%)
- Remplir l'espace entre les 2 gels avec du tampon de migration
- Pipeter 5 μ L de marqueur des poids moléculaire (Precision Plus Protein All Blue Standard #161-0373) dans les puits 1 et 15
- Pipeter 10 μ L d'échantillon dans les autres puits
- Remplir le réservoir avec le tampon restant
- Placer le couvercle et brancher les fils en respectant le code couleur
- Régler l'appareil à 15 mA pour 1 gel ou 30 mA pour 2 gels
- S'assurer de la présence de bulles et suivre la migration
- Arrêter la migration lorsque les bandes bleues sont entre la première bande blanche et la verte
- Démontez les gels et laissez tremper pendant 1 heure sous agitation dans la solution de coloration
- Vider la solution, rincer le gel avec la solution de décoloration et laisser sous agitation pendant 1 heure dans cette dernière
- Prendre une photo des gels avec l'appareil BIORAD

3.6.5. Dosage des protéines par test BCA

Le test BCA (Bicinchoninic Acid Assay) est une technique de dosage colorimétrique utilisée pour quantifier les protéines présentes dans un échantillon :

- Diluer les échantillons dans un tampon approprié pour obtenir une concentration qui se situe dans la plage de linéarité du test BCA. Ne pas oublier de faire des répliques.
- Préparer également les échantillons témoins contenant uniquement le tampon utilisé pour diluer les échantillons.
- Préparer une série de dilutions des standards de protéines SAB dans le même tampon utilisé pour les échantillons. Les concentrations des standards doivent couvrir la plage de concentrations attendue pour les échantillons. Ils constitueront une gamme étalon.
- Préparer le réactif BCA en suivant les instructions du kit commercial. Le réactif BCA est généralement fourni sous forme de deux solutions qui doivent être mélangées dans un rapport spécifique.

- Préparer un tube pour chaque échantillon, standard et témoin.
- Ajouter le réactif BCA à chaque tube contenant les échantillons, les standards et les témoins. Mélangez doucement.
- Incuber les tubes à 37°C, pendant environ 30 minutes.
- Après l'incubation, mesurer l'absorbance des échantillons, des standards et des témoins à une longueur d'onde de 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

3.6.6. HPLC en gel d'exclusion stérique

L'HPLC en gel d'exclusion stérique est une méthode de séparation des molécules basée sur leur taille. Elle utilise une colonne remplie de billes de gel poreux qui agissent comme un tamis. Les molécules plus petites pénètrent dans les pores du gel et prennent plus de temps pour se déplacer dans la colonne, tandis que les molécules plus grandes ne pénètrent pas dans les pores et sortent de la colonne plus rapidement.

Cette technique analytique a été utilisée durant le stage dans le but de déterminer la composition des échantillons en dérivés chitiniques par leur poids moléculaire, comme le chitosan ou les COS. Nous avons suivi un protocole spécifique à ces composés déjà mis en place par Arianne Tremblay et Françoise Nadeau au sein du département Sciences des Aliments de l'Université Laval. Voici une partie du protocole présenté entièrement en annexe n° :

- La première étape est de préparer la colonne :
 - a) Rincer le système avec la phase organique d'entreposage
 - b) Rincer le système à l'eau milliQ dégazéifiée à un débit de 4 mL/min pendant 30 min
 - c) Purger le détecteur à indice de réfraction (RID) à 1 mL/min pendant 20 min
 - d) Monter les deux colonnes Aquagel 8µm 30 et 50 puis les rincer à l'eau et ensuite à la phase mobile qui est un tampon acétate 0,1 M pH 5,4 filtré sur une membrane en nylon
- La deuxième étape est de préparer puis passer les échantillons :
 - a) Utiliser des standards avec des poids moléculaires connus
 - b) Préparer les échantillons à une concentration de 0,5% dans la phase mobile et les filtrer sur PVDF à 0,22 µm
 - c) Injecter d'abord le blanc et les standards, puis les échantillons, le tout à un débit de 0,2 mL/min, chaque passage durant 35 min
- La dernière étape est de rincer le système et de le remettre dans ses conditions d'entreposage.

4. Résultats et discussions

4.1. Continuité des travaux sur la biodiversité

Les tests d'activité lipase et le séquençage des souches ont permis une continuité de l'analyse de la biodiversité de *Yarrowia lipolytica*.

4.1.1 Activité lipase

Pour ce qui est de l'activité lipase du panel des 30 souches sélectionnés, le halo sur boîte YP ou YNB + tributyrine ont été mesurés respectivement jusqu'à 44h et 111h de culture. Les halos ont été mesurés sur tout leur diamètre, en triplicat.

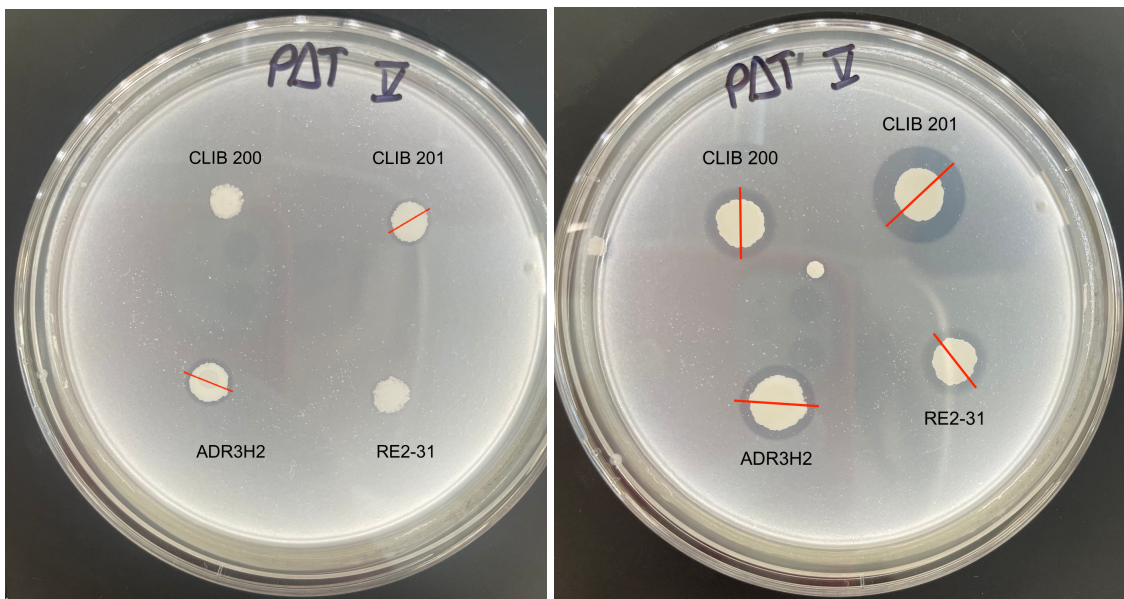


Figure n° 2: Exemple de photographie d'une boîte YP + tributyrine à 21h et 44h de culture

Les résultats ont été exploités dans un tableau excel dont voici un extrait correspondant aux photographies ci-dessus :

Souche	Date incubation t = 0	temps d'incubation t	diamètres halo sur la photo (cm)			moyenne diamètre halo	diamètre réel (mm)	diamètre réel (mm)	Ecart type (cm)	Ecart type réel	Interval de confiance
CLIB 200	01/03 à 13h45	21h	0	0	0	0	0	0	0	0	
		44h	2,2	2,2	2,2	2,2	11,06077348	11,06 ± 0,00	0	0	0
CLIB 201	01/03 à 13h45	21h	1,4	1,58	1,43	1,47	7,003664921	7,00 ± 0,52	0,0964365	0,4594618	0,519920526
		44h	2,9	3	3	2,966666667	14,91528545	14,92 ± 0,33	0,0577350	0,2902700	0,328465419
ADR3H21	01/03 à 13h45	21h	1,6	1,55	1,58	1,576666667	7,511867365	7,51 ± 0,14	0,0251661	0,1199013	0,135678696
		44h	2,33	2,35	2,35	2,343333333	11,78139963	11,78 ± 0,07	0,0115470	0,0580540	0,065693083
RE2-31	01/03 à 13h45	21h	0	0	0	0	0	0	0	0	
		44h	2,05	2,1	2,05	2,066666667	10,39042357	10,39 ± 0,16	0,0288675	0,1451350	0,164232709

Tableau n°10 : Exemple de tableau des résultats de mesure de halo sur boîte YP + tributyrine

Le tableau n°11 ci-dessous récapitule l'ensemble des résultats d'analyses sur les caractéristiques de *Y.lipolytica* déterminés au cours des deux stages encadrés par le projet, on peut voir les deux dernières colonnes (halo LIP2 YP et id.YNB) représentant les récents résultats. Les codes couleurs représentent une gradation des performances des souches. Le rouge indique aucune ou une très faible performance, le orange une faible performance, les 4 autres couleurs de verts du plus clair au plus foncé représentent une performance d'acceptable à très bonne.

	souche	source (pays)	Vmax BioTek	DOmax	lagtime BioTek	halo AXP pH 4	halo AEP pH 6,8	halo LIP2 YP	id. YNB	
environnement	H222	sol (DE)	§*	4,54 +/- 0,14	2,21	557 +/- 5 min	37 mm	<detect...	14 mm	11 mm
	CLIB 202	sol (NL)	§	4,40 +/- 0,05	2,30	543 +/- 7 min	25 mm	26 mm	13 mm	10 mm
	CLIB 205	sol (RU)	§	4,42 +/- 0,33	2,34	573 +/- 24 min	36 mm	29 mm	15 mm	9 mm
	CLIB 206	sol (JP)	§	4,62 +/- 0,24	2,35	576 +/- 12 min	28 mm	27 mm	12 mm	8 mm
	CLIB 703	sol (JP)	§	4,84 +/- 0,12	2,38	652 +/- 12 min	38 mm	<detect...	<detect...	7 mm
animaux pol.	W29	égouts (FR)	§*	4,32 +/- 0,46	2,30	590 +/- 50 min	24 mm	28 mm	13 mm	10 mm
	A-101	lav. voiture (PL)	§*	4,64 +/- 0,09	2,40	525 +/- 12 min	31 mm	28 mm	17 mm	10 mm
	SWJ-1b	poisson mer (CN)	*	5,40 +/- 0,08	2,30	554 +/- 2 min	37 mm	29 mm	15 mm	9 mm
	ME-37	insecte (FR) (sp.)		3,48 +/- 0,05	2,28	933 +/- 29 min	<detect 11 mm	24 mm	9 mm	8 mm
	ME-54	insecte (FR) (sp.)		3,43 +/- 0,12	2,29	923 +/- 20 min	<detect 13 mm	25 mm	8 mm	8 mm
agro-al.	CLIB 183	maïs (US) diploïde		4,96 +/- 0,15	2,32	579,5 +/- 7 min	19 mm	25 mm	11 mm	10 mm
	CLIB 79	maïs (US)	§	2,88 +/- 0,13	1,8	549 +/- 5 min	25 mm	27 mm	15 mm	12 mm
	EL13-B1-2-1	légumes (FR)		5,26 +/- 0,09	2,41	593 +/- 2 min	31 mm	<detect...	12 mm	9 mm
	CLIB 200	margarine (NL)	§	3,86 +/- 0,10	2,31	662 +/- 6 min	20/31 mm	23 mm	11 mm	9 mm
	CLIB 201	olives (IT)	§	4,84 +/- 0,19	2,35	568 +/- 2 min	15 mm	26 mm	15 mm	10 mm
aliments	ADR3H21	vin palme (CI)		4,91 +/- 0,11	2,32	597 +/- 29 min	<detect <detect	27 mm	12 mm	8 mm
	RE2-31	vin palme (CI)		5,04 +/- 0,22	2,33	573 +/- 12 min	29 mm	<detect...	10 mm	8 mm
	ME-674	levain pain (FR)		4,64 +/- 0,20	2,40	626 +/- 27 min	15 mm	26 mm	12 mm	8 mm
	CAM-25-E	lait (FR)		5,17 +/- 0,12	2,28	579 +/- 6 min	24 mm	25 mm	12 mm	9 mm
	CAM-28-E	lait (FR)		5,03 +/- 0,23	2,26	588 +/- 23 min	35 mm	24 mm	14 mm	9 mm
filière lait et fromages	CAM-43-C	Camembert (FR)		5,07 +/- 0,20	2,29	570 +/- 5 min	22 mm	26 mm	11 mm	9 mm
	1E07	Livarot (FR)	§*	5,53 +/- 0,58	2,32	602 +/- 36 min	27 mm	28 mm	12 mm	8 mm
	Ex-fcom-LP	Epoisses (FR)		5,51 +/- 0,23	2,30	625 +/- 30 min	21 mm	26 mm	12 mm	9 mm
	TL301	Chevroton (FR)	§	5,31 +/- 0,07	2,39	585 +/- 2 min	21 mm	<detect...	12 mm	9 mm
	TL302	Chevroton (FR)		5,44 +/- 0,14	2,40	598 +/- 4 min	23 mm	28 mm	13 mm	9 mm
	R18-455	Chèvre (FR, RE)		5,47 +/- 0,26	2,32	601 +/- 11 min	<detect 14 mm	22 mm	11 mm	9 mm
	R18-456	Chèvre (FR, RE)		5,41 +/- 0,18	2,29	595 +/- 15 min	<detect 12 mm	26 mm	11 mm	8 mm
	R18-457	Chèvre (FR, RE)		5,51 +/- 0,12	2,30	612 +/- 30 min	<detect 14 mm	24 mm	13 mm	9 mm
	141	Tome Brebis (ES)	§	5,37 +/- 0,08	2,31	573 +/- 1 min	15 mm	17 mm	13 mm	9 mm
	296	Tome Brebis (ES)		5,36 +/- 0,08	2,34	557 +/- 3 min	13 mm	<detect...	13 mm	9 mm

§ génome complet * dérivés Ura^r disponibles pour ingénierie génétique 92h 144h 72h 44h 111h

Tableau n°11 : Récapitulatif des résultats sur la biodiversité de *Y.lipolytica*

4.1.2. Séquençages

Les résultats des séquençages ont été analysés par Éric Dugat-Bony par Blast, les 7 souches analysées (CLIB 183 ; Ex-fcom-LP ; CAM-43-C ; CAM-25-E ; CAM-28-E ; SWJ-1b ; 296) appartiennent bien à l'espèce *Yarrowia lipolytica* à 100% d'identité nucléaire.

4.2. Mise au point de la cytométrie en flux sur *Yarrowia*

La mise au point de la méthode de suivi de croissance par cytométrie en flux s'est effectuée avec des cultures en YPD et en exuvies avec les trois souches sauvages W29, A-101 et SWJ-1b. Ces trois souches possèdent des caractéristiques dimorphiques différentes. Les différentes régions du cytogramme correspondent à un état de la cellule :

- Q1 : Morte
- Q2 : Paroi cellulaire altérée
- Q3 : Débris non cellulaires venant du milieu (exuvies)
- Q4 : Vivante

Chaque point correspond à une particule ayant passé devant le détecteur. Sa place est déterminée en fonction de ses propriétés et de son marquage

Les premiers essais ont eu pour but de déterminer le protocole de marquage et les réglages du cytomètre. Il a donc été vérifié que les marqueurs d'activité enzymatique (V8) et de mortalité (IP) n'interagissent pas avec le milieu et donc les exuvies. On peut voir sur ces cytogrammes que ce n'est pas le cas.

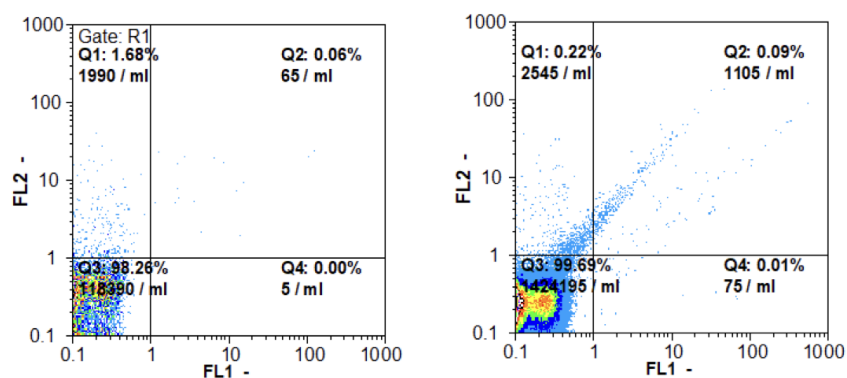
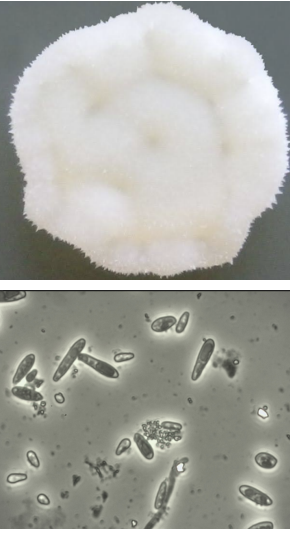
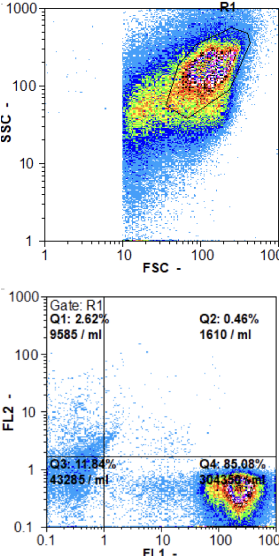
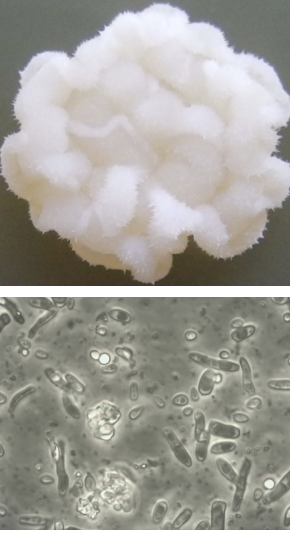
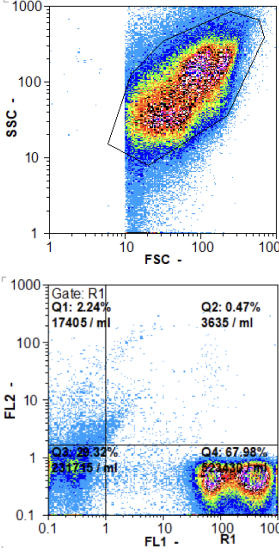

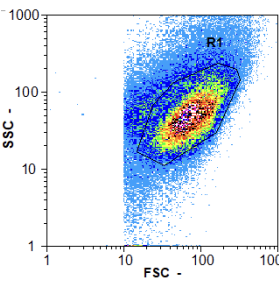
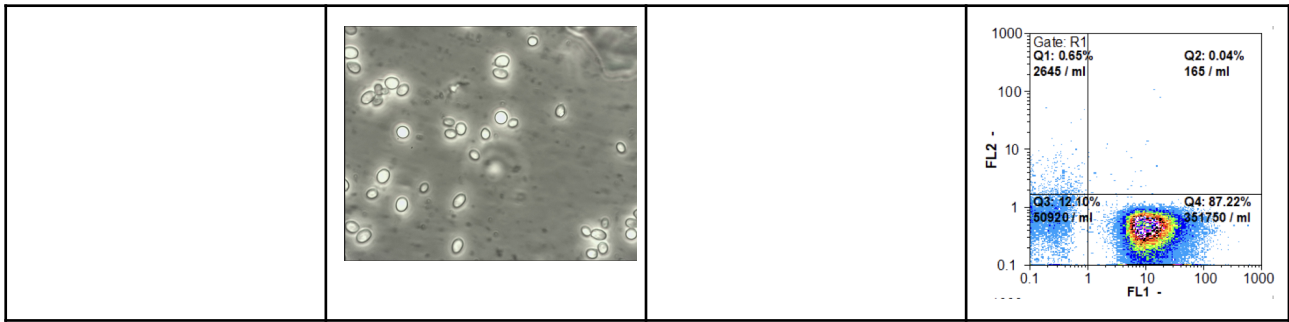


Figure n°3 : Absence de marquage des exuvies à l'IP et au V8

Souches	Photographie de colonie (haut) et cellules vues au microscope x400 (bas)	Description du dimorphisme	Cytogrammes en présence de marquage : structure/taille (haut) et IP/V8 (bas)
W29		W29 filamente facilement : on le voit en périphérie de la colonie et on visualise sur la vue au microscope quelques hyphes de taille moyenne.	
A101		A101 est une levure très filamenteuse : la colonie est très plissée et on peut voir sur la seconde image quelques levures rondes mais surtout de grands hyphes en plus grand nombre.	
SWJ		SWJ filamente très peu voire pas du tout : colonie lisse et seulement des cellules rondes, typiques de la forme levure en microscopie.	



On peut voir sur les cytogrammes de W29 et A-101 deux populations de cellules, et ce de manière plus distincte pour A-101. En revanche il n'y a qu'une seule population visible pour SWJ-1b. Une population regroupe des cellules de même taille et de même propriétés structurales. On peut donc émettre l'hypothèse que le degré de filamentation et la présence de populations distinctes sur le cytogramme sont corrélés, ce qui pourra être vérifié avec une culture à pH 4 ou *Y. lipolytica* ne filamente pas.

4.3. Choix des transformants génétiques

Une première intégration des vecteurs pINA1312-YICTS1 (surexpression de la chitinase) ou pINA1314-YIXPR2 (surexpression de la protéase AEP) dans le génome de la souche auxotrophe pour l'uracile dérivée de W29 a eu lieu de manière non-homologue (au hasard), ils seront appelés HC ou HP. La deuxième intégration a cette fois été réalisée par homologie avec la plateforme zeta (ciblée) de Po1z (autre dérivé auxotrophe pour l'uracile de W29), ces transformants seront notés C+ ou P+. De plus, pour ces dernières transformations, 2 clones distincts de la souche Po1z nouvellement construite ont été utilisés en parallèle, notés n°6 et n°1.

Transformation	Nombre de transformants choisis	Nom des transformants
HP	12	H1 – H12
P+	6 issus de la souche Po1z n°6 6 issus de la souche Po1z n°1	P6.1 – P6.6 P1.1 – P1.6
HC	0	–
C+	6 issus de la souche Po1z n°6 6 issus de la souche Po1z n°1	C6.1 – C6.6 C1.1 – C1.6

Afin de déterminer les meilleurs transformants surexprimant la chitinase et la protéase que nous avons par la suite utilisés dans la culture en milieu FR, plusieurs tests d'activité et de croissance ont été effectués.

4.2.1. Activité protéase

Pour choisir la souche P+ ou HP la plus performante nous avons réalisé des tests d'activité protéase sur des boîtes Skim Milk. De la même manière que pour le test d'activité lipase, nous avons mesuré les halos jusqu'à 64 h pour les intégrations au hasard et jusqu'à 44 h pour les intégrations ciblées.

Après une première sélection, nous avons choisi 5 transformants (H1 ; H5 ; P1.4 ; P1.5 ; P6.4) ainsi que W29 sauvage comme témoin, à tester sur de nouvelles boîtes en mesurant le halo cette fois-ci jusqu'à 72 h.

Souche	pH	Temps d'incubation	Diamètre halo (cm)			Dépôt 2	Dépôt 3	Dépôt 4	Dépôt 5	Moyenne (cm)	Diamètre réel (cm)	Ecart Type (cm)	Interval de confiance								
			Dépôt 1	Dépôt 2	Dépôt 3																
H1	6,8	24h	1,559	1,497	1,5	1,495	1,466	1,378	1,447	1,399	1,38	1,457888889	1,46 ± 0,13	0,1265721138	0,1432271985						
		72h	3,289	3,259	3,26	3,321	3,203	3,266	3,351	3,196	3,186	3,259	3,26 ± 0,07	0,07283199846	0,08241565051						
H5	6,8	24h	1,667	1,212	1,658	1,063	2,109	1,067	1,502	1,583	1,551	1,490222222	1,49 ± 0,08	0,08202438662	0,09281762582						
		72h	3,311	3,401	2,919	4,15	2,5764	2,543	3,177	3,204	3,569	3,2056	3,21 ± 0,18	0,1824335495	0,2064392022						
P1.4	6,8	24h	1,369	1,403	1,39	1,433	1,418	1,439	1,498	1,54	1,499	1,443222222	1,44 ± 0,09	0,09192388155	0,1040197531						
		72h	3,119	3,246	3,12	3,394	3,366	3,459	3,375	3,282	3,378	3,304333333	3,30 ± 0,18	0,1831406563	0,2072393542						
P1.5	6,8	24h	1,466	1,867	1,61	1,477	1,632	1,461	1,404	1,551	1,393	1,540111111	1,54 ± 0,05	0,05161879503	0,05841109211						
		72h	3,622	3,571	3,638	3,662	3,373	3,425	3,52	3,39	3,333	3,503777778	3,50 ± 0,20	0,2043538598	0,2312439126						
P6.4	6,8	24h	1,446	1,612	1,562	1,589	1,531	1,406	1,601	1,499	1,595	1,537888889	1,54 ± 0,11	0,1053589104	0,1192226401						
		72h	3,436	3,617	3,729	3,24	3,166	3,217	3,277	3,363	3,444	3,387666667	3,39 ± 0,01	0,005656854249	0,006401215574						
W29	6,8	24h	1,465	1,389	1,432	1,334	1,525	1,365	1,336	1,379	1,265	2,092	1,451	1,466	1,354	1,554	1,439	1,4564	1,46 ± 0,02	0,01838477631	0,02080395061
		72h	3,105	3,061	3,127	2,935	3,1	2,946	3,03	3,144	3,071	3,274	3,636	3,237	3,091	2,898	3,052	3,1138	3,11 ± 0,04	0,0374766594	0,04240805318

Tableau n°12 : Calculs des diamètres et des incertitudes des halos sur boîte Skim Milk

Nous avons calculé la significativité de ces résultats par rapport à la souche sauvage W29, avec les quantiles de la loi Student.

1- α	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %	97,5 %	99 %	99,5 %	99,75 %	99,9 %	99,95 %
k											
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	127,3	318,3	636,6
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,09	22,33	31,60
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,21	12,92
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,893	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959

Souche	Moyenne	Variance	Score t	1- α	> 99,75%
W29	3,1138	0,0902	4,324	6	> 4,317
ciblé 1.5	3,5038				

Tableau n°13 : Calculs de la significativité des mesures de halos

Le score t étant supérieur à 3,792, on peut dire que la différence d'activité protéase entre le transformant P1.5 et W29 sauvage est significative.

4.2.2. Activité chitinase

Le choix des meilleurs transformants C+ a été fait à l'aide du test fluorimétrique de l'activité endo-chitinase. Là encore un premier test a été effectué afin de sélectionner 6 transformants (C1.1 ; C1.2 ; C1.3 ; C6.2 ; C6.3 ; C6.5).

Voici les résultats du deuxième test réalisé avec ces souches modifiées, il se concentre sur l'activité endo-chitinase en milieu YPD.

W29	C6.5	C1.3	C6.2	C1.2	C1.1	C6.3
5,54E+02	1,68E+05	1,71E+05	1,71E+05	1,73E+05	1,81E+05	1,82E+05

Tableau n°14 : Résultats du deuxième tests fluorimétrique d'activité endochitinase

On peut y voir une très grande augmentation de l'activité pour les variants génétiques par rapport à la souche sauvage, près de 300 fois plus.

Le troisième test portait lui sur l'activité exo-chitinase en milieu YPD et en milieu exuvie FR filtré ou non, seulement sur les souches W29 sauvage, C6.5, C6.3 et C1.3.

W29 YPD	C6.3 YPD	C6.5 YPD	C1.3 YPD	W29 Ex4	C6.3 Ex4	C6.5 Ex4	C1.3 Ex4	W29 filtrE	C6.3 filtrE
1,95E+04	1,49E+05	2,35E+04	6,04E+04	4,38E+03	1,51E+05	1,60E+04	7,65E+04	2,67E+03	1,30E+05

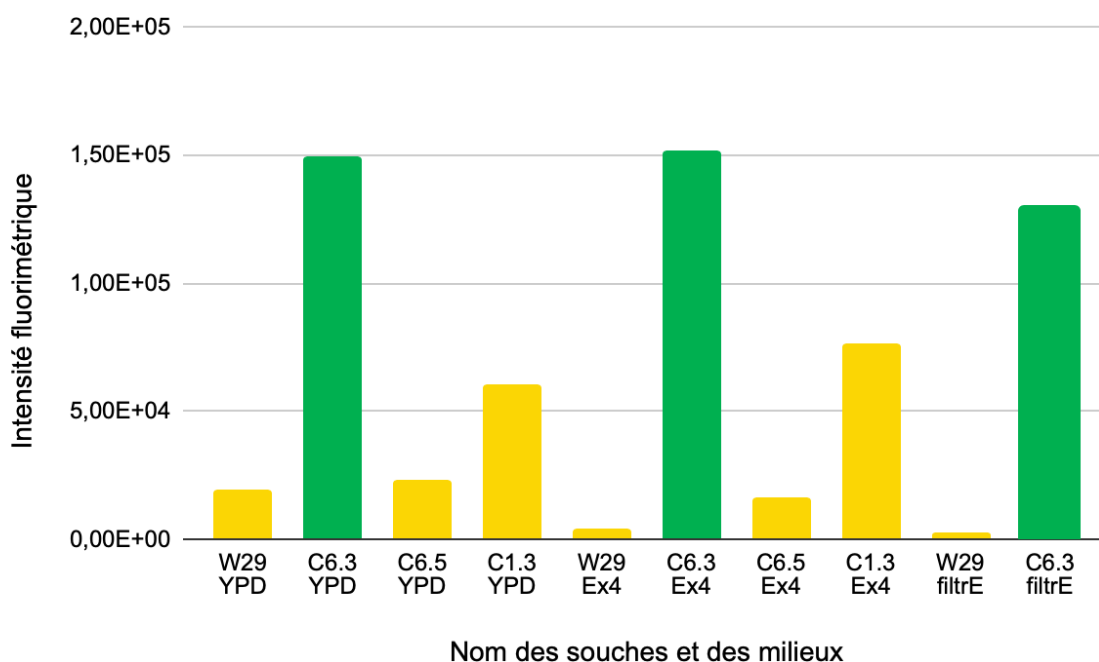


Figure n° 4: Tableau des résultats du test sur l'activité exo-chitinase et graphique à barres correspondant

On peut voir que l'activité exo-chitinase de la souche C6.3 est beaucoup plus performante que celle de la souche W29 sauvage, ou que des 2 autres souches étudiées. On remarque aussi que l'activité exo-chitinase est moindre dans le milieu exuvie pour W29 et C6.5 mais plus importante pour les souches C6.3 et C1.3. En revanche, dans le milieu exuvie FR filtré l'activité de C6.3 diminue.

On peut émettre l'hypothèse que l'activité exo-chitinase est stimulée par la présence de particules en suspension comme les résidus exuvies dans le milieu, mais seulement pour les souches dont la transformation génétique a été une réussite, comme chez C6.3.

4.2.3. Suivi BioTek

Les souches choisies pour la culture en BioTek sont les suivantes :

H5 ; H1 ; P1.5 ; P6.4 ; P1.4 ; C6.5 ; C6.3 ; C6.2 ; C1.1 ; C1.2 ; C1.3

Le logiciel intégré au BioTek permet de regrouper certaines courbes de croissance de chaque puits et ainsi de les comparer. Les courbes sont faites par des lectures de DO en fonction du temps de culture.

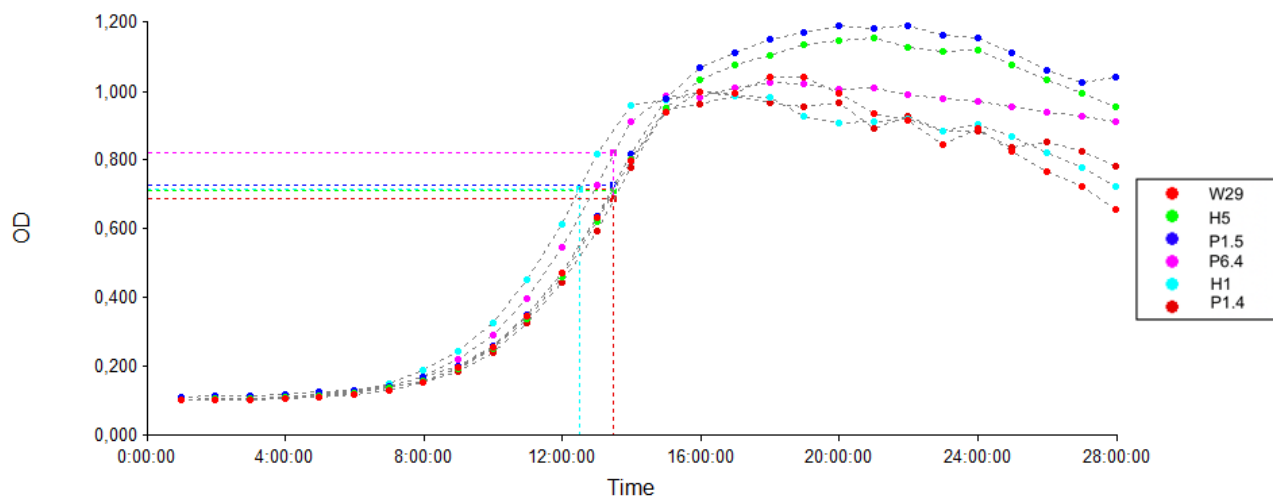


Figure n°5 : Courbes de croissances en milieu EX2 de W29 et des transformants P+

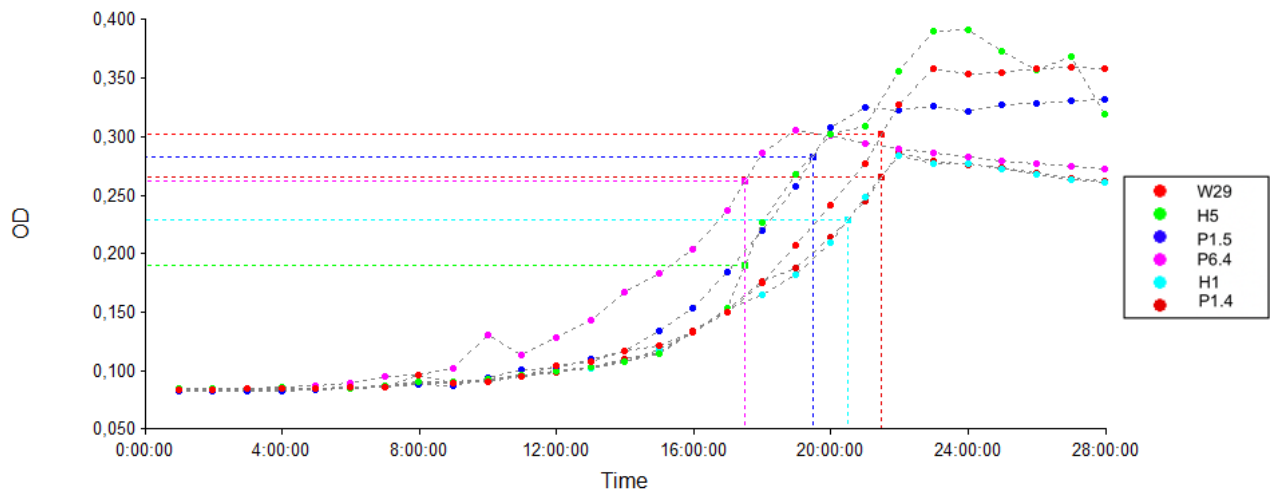


Figure n°6 : Courbes de croissances en milieu YNB dilué 1/10 de W29 et des transformants P+

Pour ce qui est des transformants P+ on remarque que dans le milieu exuvies FR c'est la souche W29 sauvage qui croît le moins bien, et au contraire on retrouve les souches modifiées H5 et P1.5 en tête pour le maximum de croissance. On note que dans le milieu YNB dilué à 1/10, W29 sauvage fait partie des plus performantes avec toujours, P1.5 et H5. On peut donc dire que ces deux variants génétiques sont les plus performants peu importe le milieu utilisé, et que en général les souches modifiées poussent mieux que la souche sauvage en milieu exuvies.

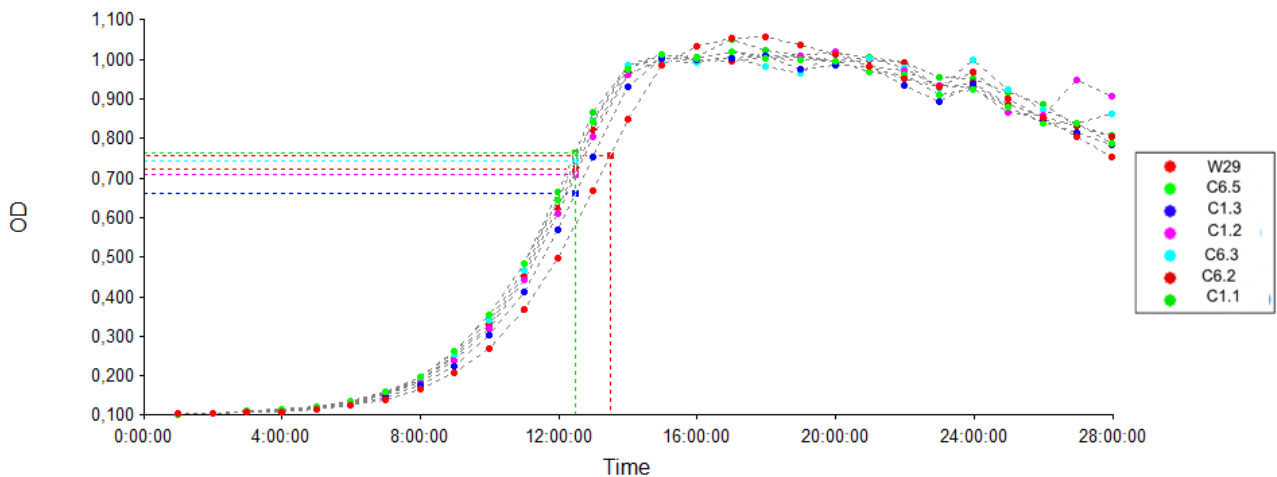


Figure n° 7: Courbes de croissances en milieu EX3 de W29 et des transformants C+

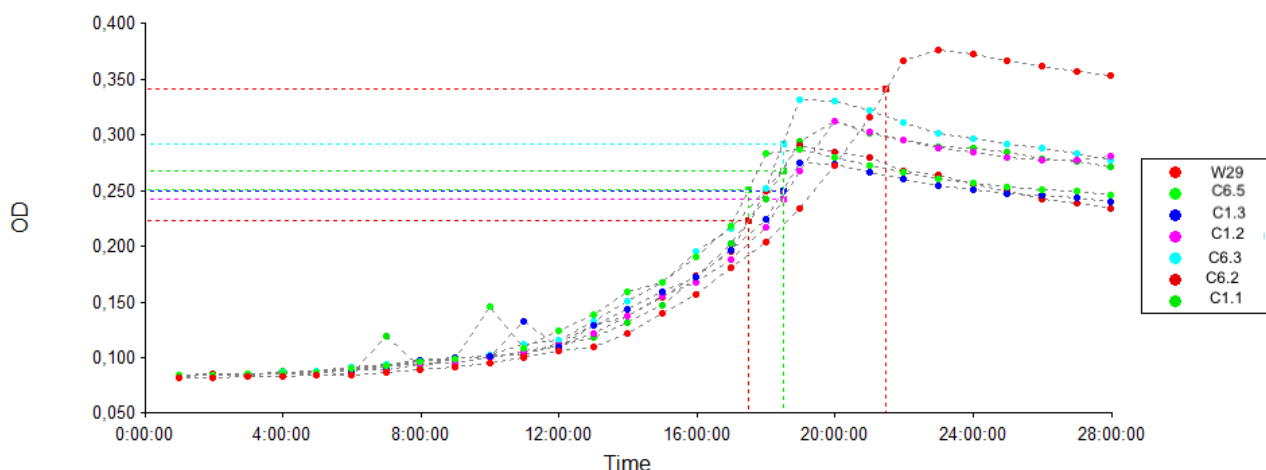


Figure n° 8: Courbes de croissances en milieu YNB dilué 1/10 de W29 et des transformants C+

En revanche, on ne remarque pas de réelle différence de croissance dans le milieu exuvies entre les souches modifiées pour sur exprimer la chitinase ou la souche sauvage. W29 se développe même mieux que les transformants dans le milieu YNB dilué. On peut tout de même noter une légère dominance des souches C6.3 et C1.2 autant dans le milieu exuvies que dans le YNB.

L'ensemble des résultats en BioTek et des tests d'activité nous ont permis de choisir une seule souche P+ et une seule souche C+ à mettre en culture dans le milieu exuvies FR dans la suite du projet.

Souche	Capacité de croissance	Activité enzymatique
P1.5	Meilleure croissance en milieu exuvies	Plus grande activité protéase sur boîte Skim Milk
C6.3	Meilleure croissance des souches modifiée en milieu exuvie et en YNB dilué	Activité endochitinase et activité exo-chitinase la plus importante en milieu YPD et en milieu exuvies

4.4. Test de biotransformation des milieux exuvies par *Yarrowia* sauvage ou génétiquement modifiée

Les cultures de la souche W29 sauvage et des deux souches modifiées génétiquement pour sur-exprimer la protéase P1.5 ou la chitinase C.6.3, a été réalisée en triplicate biologique dans les milieux FR EX1, EX2, et EX3. Chaque culture faisant environ 330 mL. Il a été prélevé un échantillon de chaque cultures à 24, 48, 72 et 96 heures pour le passer au cytomètre en flux et ainsi dénombrer les cellules vivantes, altérées et mortes.

Les cultures seront notées W1, W2, W3, P1, P2, P3, C1, C2, C3.

Nous avons obtenu des cytogrammes pour chaque échantillon, ainsi que le dénombrement de cellules dans chaque régions Q1, Q2, Q3 et Q4. On peut voir ci-dessous l'évolution des cytogrammes pour un des triplicates de chaque souches pendant ces 96h.

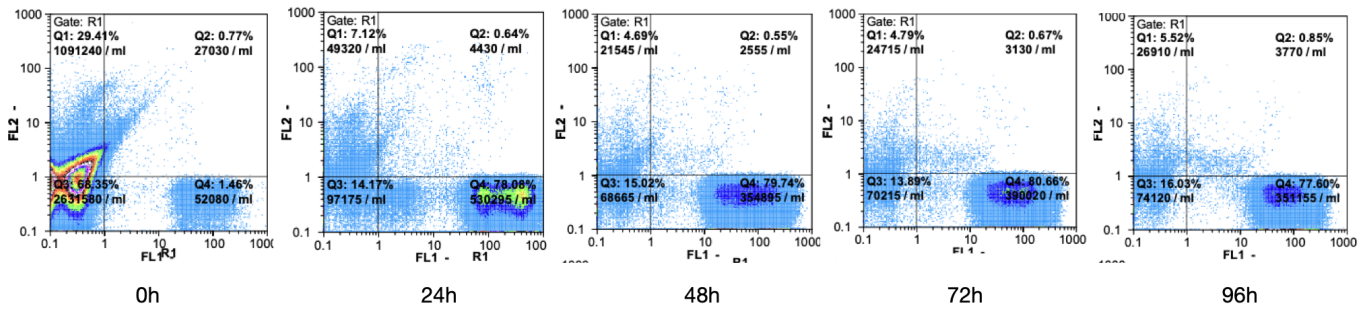


Figure n°9 : Evolution des cytogrammes de W1 au cours des 96h de culture

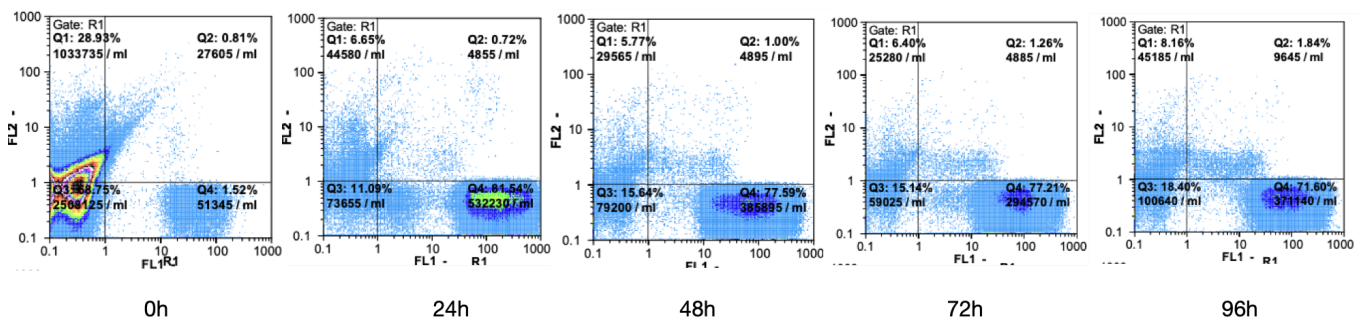


Figure n°10 : Evolution des cytogrammes de P1 au cours des 96h de culture

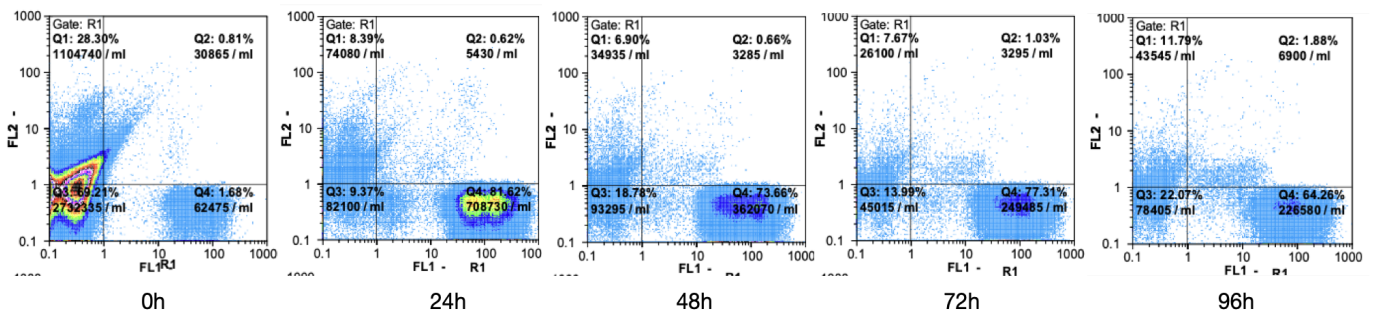


Figure n°11 : Evolution des cytogrammes de C1 au cours des 96h de culture

Grâce aux données du cytomètre sur chaque régions on peut représenter les phases de croissances des cellules :

- Q4 = cellules viables (ou actives)
- Q1 = cellules mortes
- Q2 + Q4 = cellules viables + altérées
- Q1 + Q2 + Q4 = cellules totales

Temps de culture	W29	Protéase +	Chitinase +
0h	4,53E+05 ± 9,17E+04	4,61E+05 ± 8,17E+04	5,20E+05 ± 1,34E+05
24h	6,37E+07 ± 1,04E+07	5,05E+07 ± 1,04E+07	6,98E+07 ± 9,74E+06
48h	7,56E+07 ± 1,11E+07	7,55E+07 ± 2,76E+06	6,67E+07 ± 7,98E+06
72h	7,45E+07 ± 3,76E+06	6,46E+07 ± 5,81E+06	5,56E+07 ± 5,74E+06
96h	7,09E+07 ± 1,90E+06	6,35E+07 ± 1,26E+07	5,27E+07 ± 7,47E+06

Dénombrement des cellules vivantes par cytométrie en flux sur des cultures en milieu exuvies pH2->pH4 puis 6.8 (+ 50mM Ph buffer)

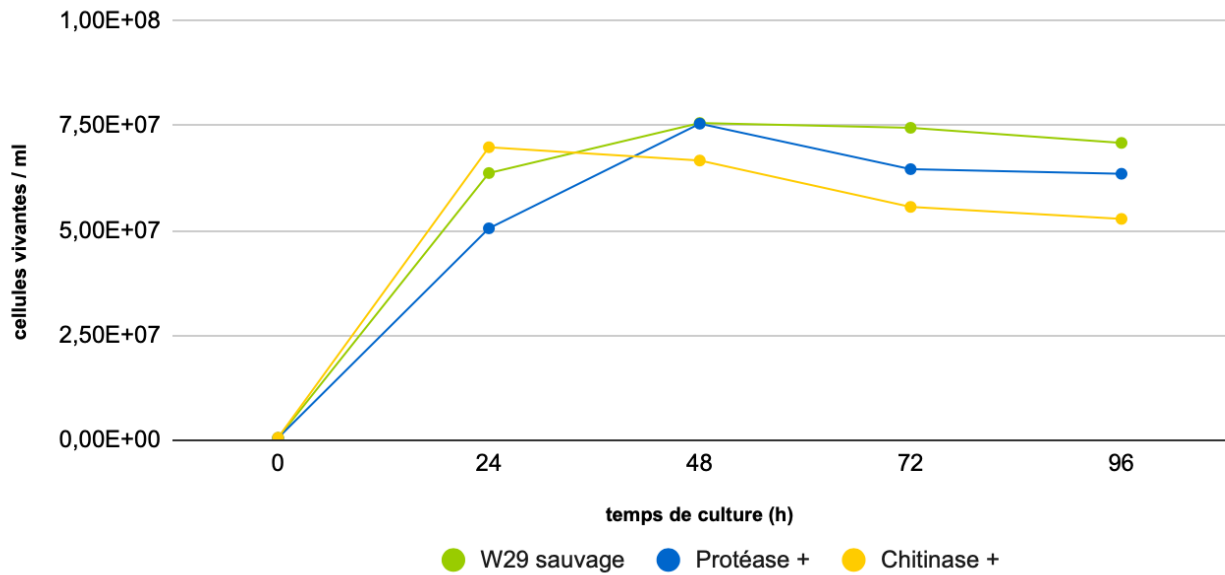


Figure n°12 : Tableau de valeurs des moyennes des dénombrements en cellules/mL et courbes de croissance des cellules vivantes (Q4)

Temps de culture	W29	Protéase +	Chitinase +
0h	7,14E+05 ± 1,12E+05	7,46E+05 ± 8,12E+04	8,08E+05 ± 1,62E+05
24h	6,41E+07 ± 1,05E+07	5,09E+07 ± 1,05E+07	7,04E+07 ± 9,79E+06
48h	7,62E+07 ± 1,12E+07	7,64E+07 ± 2,77E+06	6,73E+07 ± 8,01E+06
72h	7,53E+07 ± 3,56E+06	6,59E+07 ± 6,09E+06	5,65E+07 ± 6,00E+06
96h	7,22E+07 ± 2,15E+06	6,54E+07 ± 1,27E+07	5,43E+07 ± 7,68E+06

Dénombrement des cellules "viables" par cytométrie en flux sur des cultures en milieu exuvies pH2->pH4 puis 6.8 (+ 50mM Ph buffer)

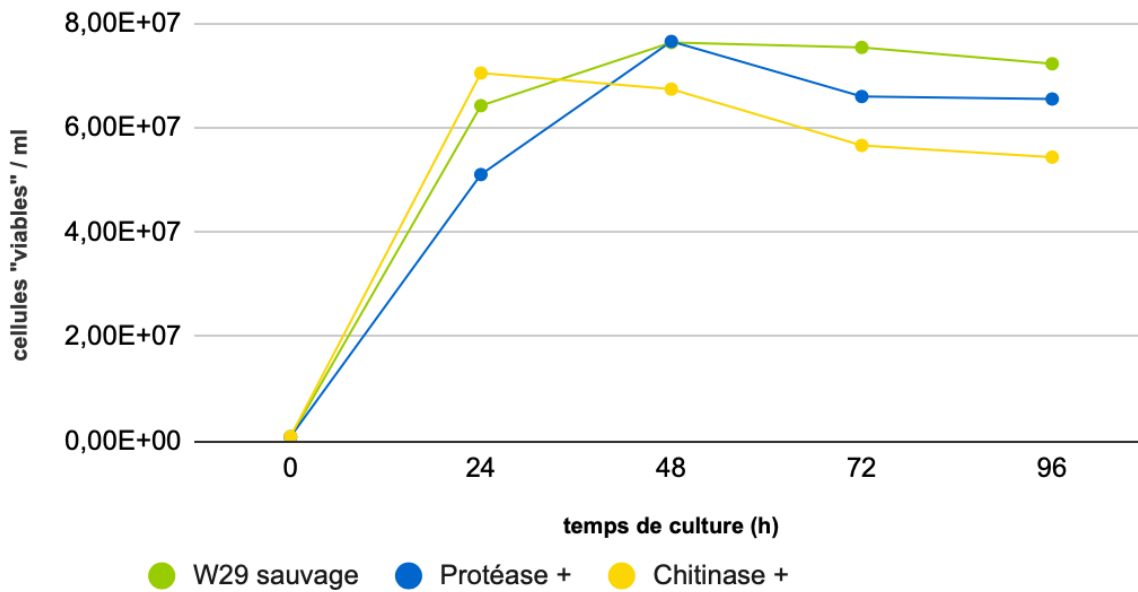


Figure n° 13: Tableau de valeurs des moyennes des dénombrements en cellules/mL et courbes de croissance des cellules viables (Q2 + Q4)

Temps de culture	W29	Protéase +	Chitinase +
0h	1,07E+07 ± 1,20E+06	1,13E+07 ± 5,04E+05	1,08E+07 ± 1,25E+06
24h	6,92E+07 ± 1,06E+07	5,53E+07 ± 1,10E+07	7,72E+07 ± 1,02E+07
48h	8,13E+07 ± 1,18E+07	8,22E+07 ± 2,93E+06	7,49E+07 ± 7,96E+06
72h	8,10E+07 ± 2,73E+06	7,20E+07 ± 7,05E+06	6,46E+07 ± 8,77E+06
96h	7,89E+07 ± 2,75E+06	7,37E+07 ± 1,43E+07	6,35E+07 ± 8,06E+06

Dénombrement des cellules (total) par cytométrie en flux sur des cultures en milieu exuvies pH2->pH4 puis 6.8 (+ 50mM Ph buffer)

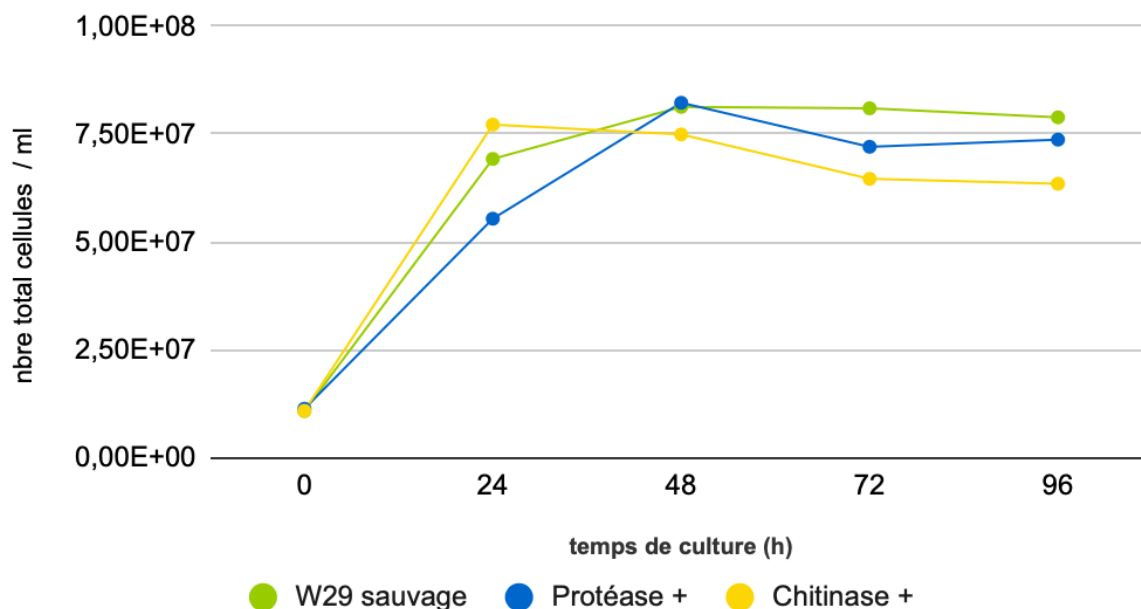


Figure n°14 : Tableau de valeurs des moyennes des dénombrements en cellules/mL et courbes de croissance des cellules totales (Q1 + Q2 + Q4)

Que ce soit sur les populations totales, les cellules viables, ou seulement les vivantes, on remarque que les levures modifiées sur-exprimant la chitinase atteignent leur maximum de croissance à 24h, contrairement à celles sur-exprimant la protéase AEP et la souche sauvage qui l'atteignent à 48h. De même, le maximum de cellules est plus petit chez C+ que chez P+ et W29. On peut noter que dans les cellules viables c'est P+ qui détient le plus grand maximum de croissance, cependant les cellules de la souche sauvage reste en grand nombre même à 96h contrairement au souches modifiés qui décroissent dès le maximum atteint.

Les intervalles de confiances de ces dénombrements en cytométrie ne permettent pas d'être précis et de constater des différences significatives entre les souches mais ils permettent d'obtenir une vision plus complète des populations en culture que les dénombrement sur boîte en CFU (unité formant colonie) par exemple.

4.5. Caractérisations et analyses des surnageants de cultures

Les surnageants filtrés de ces cultures en triplicate biologiques ont été analysés à l'Université Laval de Québec. Étant filtrés, toutes les analyses ne concernent que les produits solubles dans le milieu.

4.5.1. Caractérisation des échantillons

La caractérisation des surnageants permet de déterminer la composition des échantillons et ainsi décider quelles sont les analyses intéressantes à faire par la suite et par quelles méthodes. Les surnageants sont arrivés congelés au Canada, il a donc fallu les lyophiliser, mais même après cette étape il reste de l'humidité dans les échantillons. Nous avons donc déterminé la proportion en humidité puis celle en cendres ou en minéraux en brûlant toute la matière organique dans un four à cendres.

Echantillon	Masse creuset (g)	Masse creuset + échantillon (g)	Masse échantillon (g)	Masse creuset + échantillon sec (g)	Masse échantillon sec (g)	Humidité (%)
W1	3,8431	3,9431	0,1000	3,9372	0,0941	5,90
P1	3,7872	3,8880	0,1008	3,8833	0,0961	4,66
C1	3,8703	3,9706	0,1003	3,9621	0,0918	8,47
W2	3,6221	3,7225	0,1004	3,7174	0,0953	5,08
P2	3,8992	3,9992	0,1000	3,9932	0,0940	6,00
C2	3,7932	3,8932	0,1000	3,8889	0,0957	4,30
W3	3,8015	3,9016	0,1001	3,8969	0,0954	4,70
P3	3,7512	3,8515	0,1003	3,8469	0,0957	4,59
C3	3,7433	3,8430	0,0997	3,8384	0,0951	4,61
EX4	3,8462	3,9462	0,1000	3,9394	0,0932	6,80

Tableau n°15 : Tableau de calculs de la proportion en humidité

Échantillon	Masse creuset + échantillon calciné (g)	Masse cendres (g)	Cendres (%)
W1	3,8905	0,0474	47,40
P1	3,8319	0,0447	44,35
C1	3,9163	0,0460	45,86
W2	3,6715	0,0494	49,20
P2	3,9457	0,0465	46,50
C2	3,8385	0,0453	45,30
W3	3,8495	0,0480	47,95
P3	3,7974	0,0462	46,06
C3	3,7920	0,0487	48,85
EX4	3,8577	0,0115	11,50

Tableau n°16 : Tableau de calculs de la proportion en cendre dans les surnageants

On remarque qu'il y a environ 4 fois moins de minéraux dans le milieu EX4 que dans les surnageants de cultures. Cette proportion très élevée nous a par ailleurs empêchées de faire un dosage de protéines par la méthode Dumas, car la colonne d'analyse ne supporte pas les fortes teneurs en sels. On peut penser que cette différence est due à l'ajout du tampon phosphate à 50 mM au cours de la culture pour rester à un pH de 6,8.

Nous avons ensuite déterminé la proportion en sucres solubles dans les échantillons par la méthode colorimétrique de réaction des phénols.

Echantillon	Absorbance (487 nm)	Concentration (mg/mL)	Concentration avec FD (mg/mL)	Volume surnageant (mL)	Masse Sucres solubles (mg)	Masse échantillon (mg)	Sucres solubles (%)
W2	0,2730	0,0482	9,6383	4,0000	38,5532	320,1000	12,04
P2	0,2720	0,0480	9,6030	4,0000	38,4120	321,6000	11,94
C3	0,2670	0,0471	9,4265	4,0000	37,7059	320,6000	11,76
W1	0,2750	0,0485	4,8545	4,0000	19,4178	159,5000	12,17
W3	0,3180	0,0561	5,6135	4,0000	22,4541	160,2000	14,02
P1	0,2940	0,0519	5,1899	4,0000	20,7594	160,1000	12,97
P3	0,2780	0,0491	4,9074	4,0000	19,6296	159,7000	12,29
C1	0,2670	0,0471	4,7132	4,0000	18,8529	160,1000	11,78
C2	0,2590	0,0457	4,5720	4,0000	18,2881	159,8000	11,44
EX4	0,3670	0,0648	25,9140	2,3000	59,6021	233,7000	25,50

Tableau n°17 : Tableau de calculs de la proportion en sucres solubles dans les surnageants

On peut voir qu'il y a 2 fois plus de sucres solubles dans le milieu EX4 sans levures que dans les autres échantillons. On peut émettre l'hypothèse que le principal sucre soluble présent est le glucose et que dans les surnageants de culture il a été consommé par les levures.

La dernière caractérisation était celle des lipides, par souci d'économie des échantillons, l'analyse a été faite seulement sur la première réplique biologique et sur le milieu sans cultures (W1 ; P1 ; C1 ; EX4).

Echantillon	Masse échantillon (mg)	Masse lipides (mg)	Lipides %
W1	0,2008	0,0018	0,8964
P1	0,2005	0,0033	1,6459
C1	0,1997	0,0028	1,4021
EX4	0,2002	0,0035	1,7483

Tableau n°18 : Tableau de calculs de la proportion en lipides dans les surnageants

Les résultats ne paraissent pas assez significatifs pour émettre une hypothèse.

4.5.2. Analyse des protéines

Aux vues de la caractérisation des échantillons, il a été convenu d'analyser les protéines des surnageants par un test BCA et des gels d'électrophorèse sur gel polyacrylamide après des filtrations sur Microcons de 10 kDa. Les Microcons ont permis d'obtenir des filtrats concentrés en sels et des rétentats concentrés en molécules de plus de 10 kDa comme des protéines par exemple.

Le test BCA a été réalisé sur les échantillons avant filtration (complets) et sur les filtrats (contenant des molécules de moins de 10 kDa). Tout d'abord nous avons établi la courbe d'une gamme étalon de SAB.

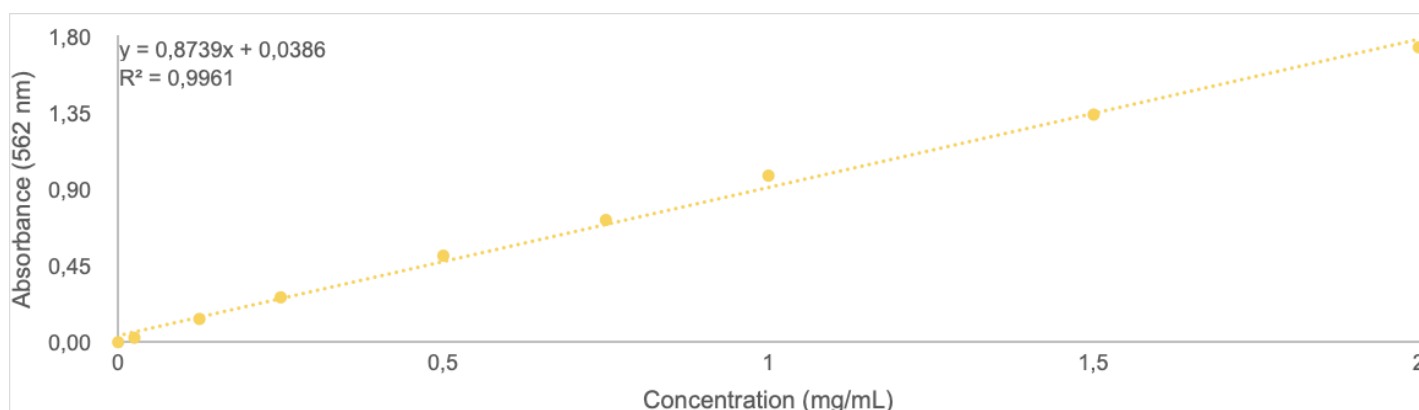


Figure n°15 : Gamme étalon de SAB pour le test BCA

Après avoir réalisé les moyennes des triplicats, on obtient la proportion de protéines dans les échantillons complets et dans les filtrats correspondants.

Échantillon	Protéines (%)	Filtrat/Rétentat (%) [Protéines - 10 kDa]	Protéines + 10 kDa (%)
W-Complet	19,7431		
P-Complet	21,9253		
C-Complet	19,2912		
W-Filtrat	9,8940	50,3842	49,6158
P-Filtrat	9,6421	44,0858	55,9142
C-Filtrat	9,3267	48,3687	51,6313

Tableau n°19 : Tableau de résultats du test BCA

Le calcul filtrat/rétentat permet d'obtenir la proportion de protéines de moins de 10 kDa dans la totalité des protéines de l'échantillon. On remarque alors qu'il y a une plus grande proportion de protéines supérieures à 10 kDa dans les surnageants de culture de P+. Il y a plusieurs hypothèses à cela si ces résultats sont significatifs. La première serait que ces protéines sont en fait la protéase AEP surexprimée de la levure, et la deuxième serait que la levure dégrade plus de protéines dans les exuvies.

Ces résultats nous amènent donc à effectuer des vérifications sur gels d'électrophorèse des rétentats. En effet le fait de filtrer, et de rincer une, deux, ou trois fois permet de concentrer les protéines et de mieux les voir sur gels dénaturés réduits. On peut voir ci-dessous les photographies de gels après une première filtration sur 10 kDa et après 3 rinçages à l'eau. Le marqueur est le Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards #1610363¹⁹.

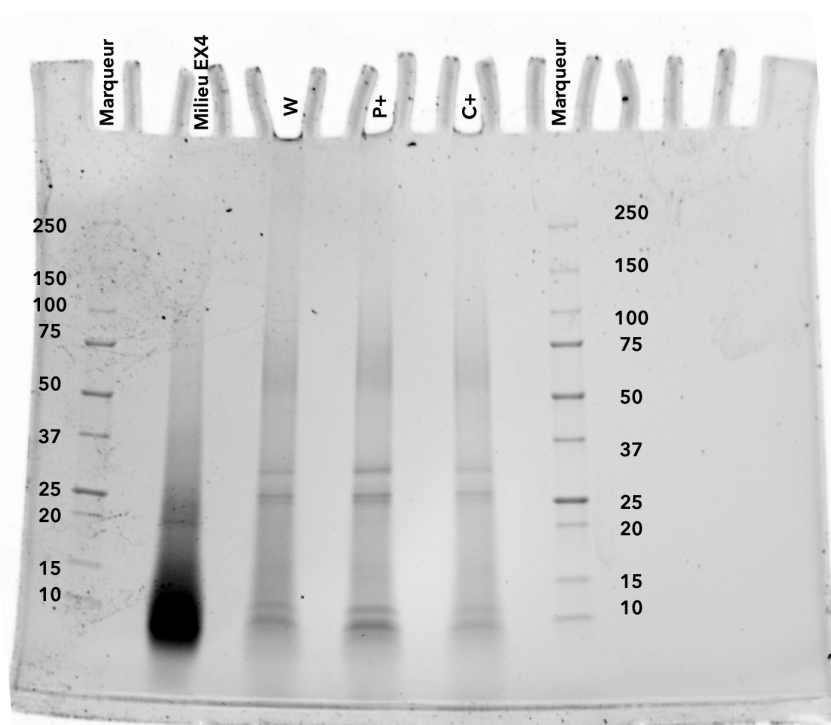


Figure n°16 : Photographie migration sur gel polyacrylamide dénaturé réduit après filtration sur 10 kDa

On remarque dans le milieu EX4 sans culture un amas de protéines aux alentours de 10 kDa et deux légères bandes à 20 et 25 kDa, qui ne sont pas présentes dans les migrations de W, P+ et C+.

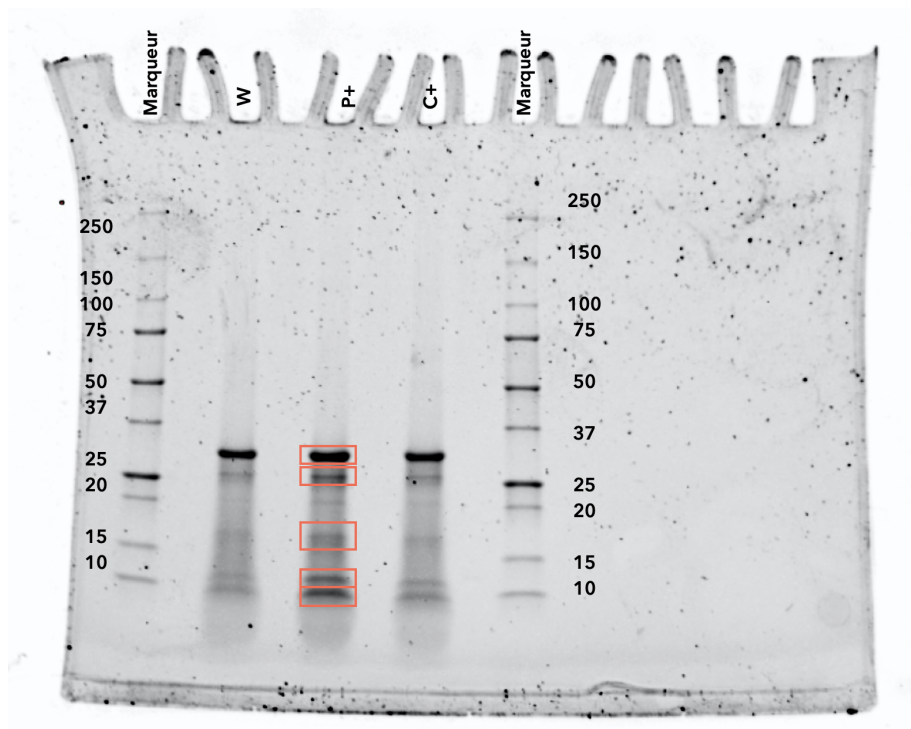


Figure n° 17: Photographie migration sur gel polyacrylamide dénaturé réduit après filtration sur 10 kDa et 3 rinçages

Lorsque les échantillons sont plus concentrés en protéines on peut voir d'autres bandes apparaître. On remarque une plus grande intensité des bandes sur la migration de P+ que sur celles de W et C+, en revanche il n'y a pas de bandes supplémentaires.

Plusieurs hypothèses peuvent être tirées de ces résultats. On peut penser que les bandes aux alentours de 10 et 15 kDa dans les cultures sont aussi présentes dans le milieu sans culture mais en quantité beaucoup plus importante, comme des protéines d'exuvies consommées par les levures. Dans le gel plus concentré on retrouve la bande à 20 kDa présente dans le milieu, en revanche les bandes entre 25 et 37 kDa ne sont pas du tout présentes dans le milieu, il se pourrait qu'elles proviennent de la levure, comme par exemple la protéase AEP (forme à 28,32, et 36 kDa) surexprimée chez P+ ce qui expliquerait sa plus grande intensité.

On peut aussi noter qu'il n'y a aucune bande aux alentours de 250 kDa pouvant représenter la chitinase de *Y. lipolytica*

Les bandes encadrées en rouge seront envoyées en protéomique pour être identifiées et comparées aux bases de données regroupant les protéines issues de *Y. lipolytica* ou du ver de farine *Tenebrio molitor*.

4.5.3. Analyse des dérivés chitiniques

L'analyse des dérivés chitiniques a été faite à l'aide d'une méthode spécifique mise au point pour une HPLC en gel d'exclusion stérique. On cherche ainsi à déterminer les poids moléculaires des composants des échantillons en fonction de leur temps de rétention. La première étape de la méthode était de réaliser une gamme étalon avec des standards aux poids moléculaires connus.

Nom du standard	Poids moléculaire (Da)	Log PM (Log Da)	Volume d'élution (mL)
410000	276 500	5,441695136	12,712
270000	196 300	5,2929203	13,058
150000	123 600	5,092018471	14,033
80000	66 700	4,824125834	14,605
50000	43 500	4,638489257	15,17
25000	21 400	4,330413773	15,987
5000	4 440	3,64738297	17,684
1000	1 080	3,033423755	18,907
stachyose	666,6	2,823865309	19,325
glucose	180	2,255272505	20,01

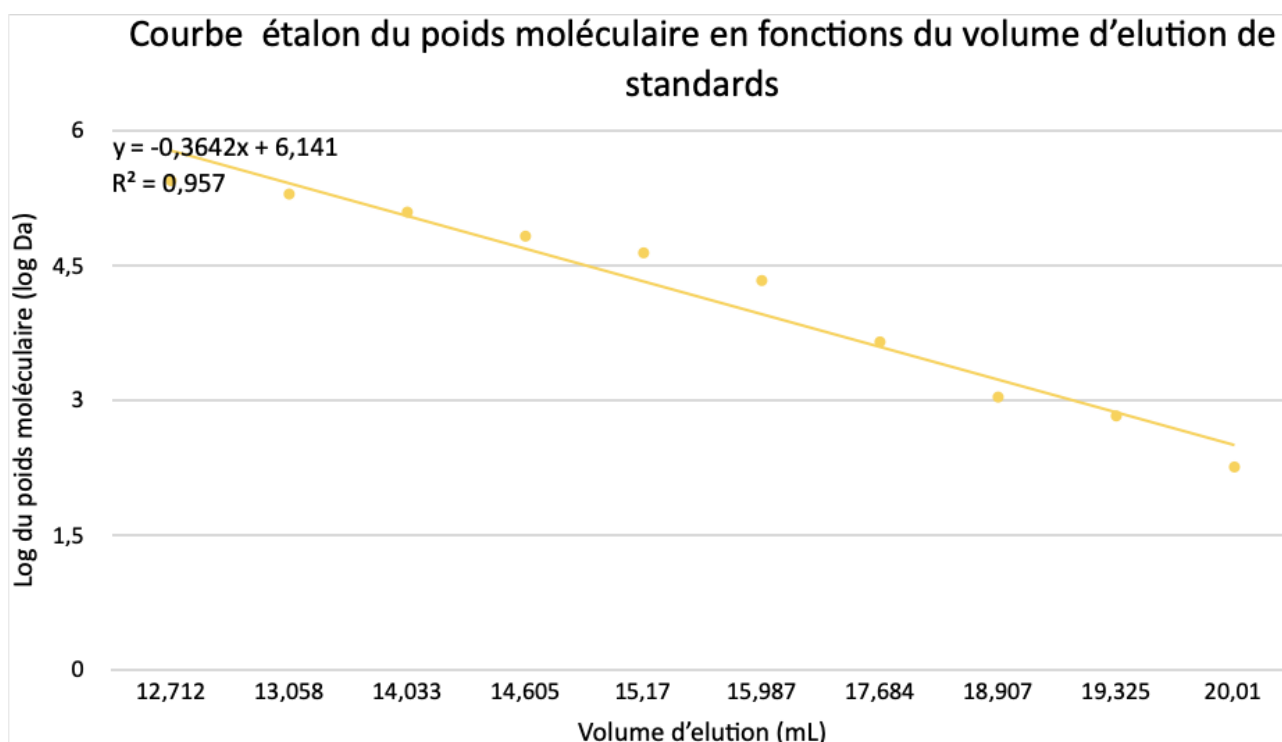


Figure n°18 : Tableau de valeurs et courbes de la gamme étalon utilisée pour l'étude en HPLC

Après l'éluion des échantillons dans la colonne d'HPLC on obtient des chromatogrammes avec des pics correspondant à un composant.

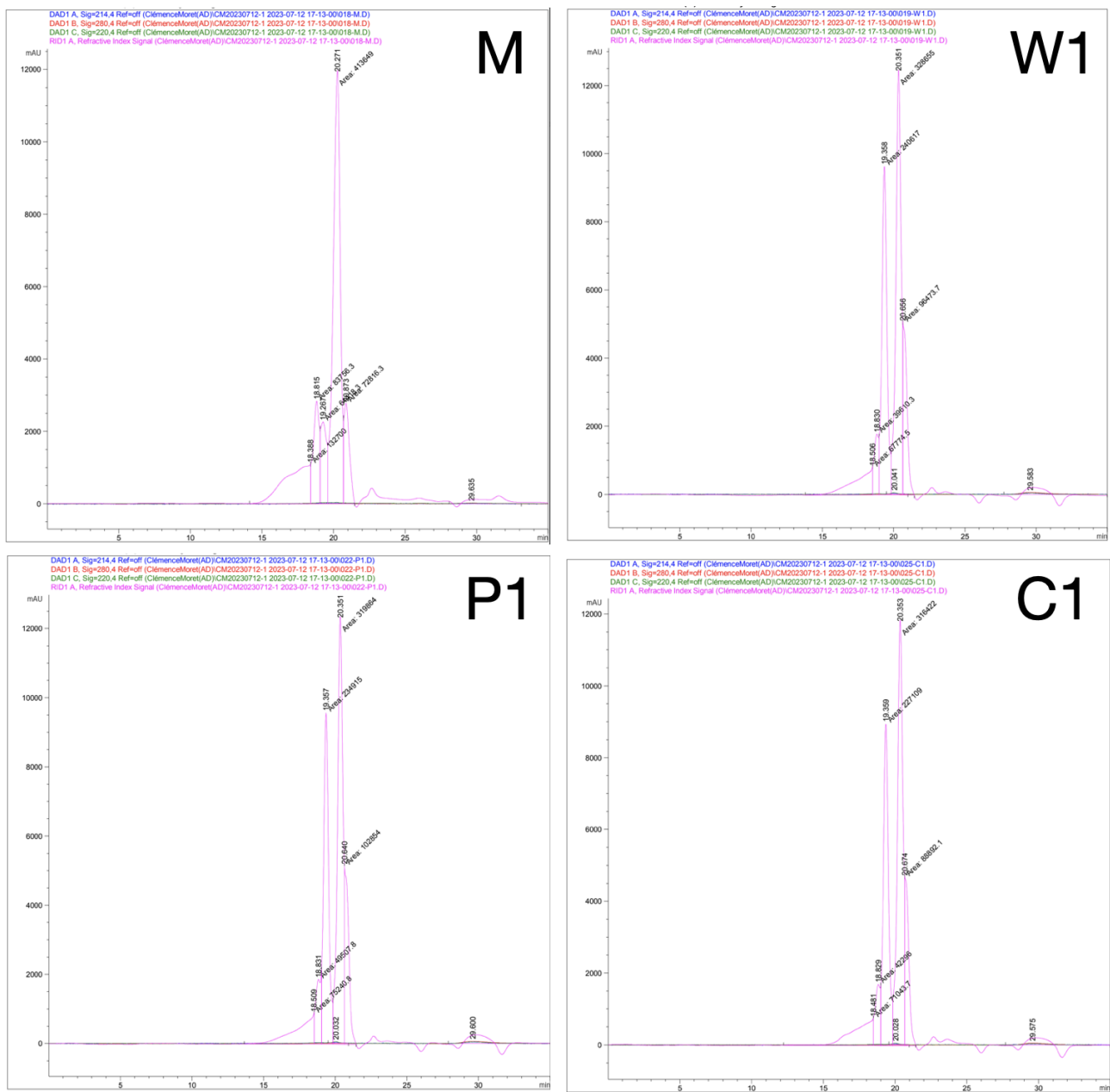


Figure n°19 : Chromatogramme des échantillons M, W1, P1 et C1

Chacun possède une aire et un temps de d'éluion qui permet de déterminer le poids moléculaire des composants à l'aide de la gamme étalon. On peut aussi déterminer l'aire relative, ce qui correspond à la proportion des composants de l'échantillon.

On remarque sur la figure n°19 qu'il y a le même nombre de pics peu importe la souche, les temps d'éluion sont relativement les mêmes. On note cependant des aires différentes.

Echantillon	N° pic	Aire du pic	Temps d'élution	Log poids moléculaire	Poids moléculaire (Da)	Aire relative
M	1	1,33E+05	1,84E+01	3,20	1 583,39	17,29%
	2	8,38E+04	1,88E+01	3,02	1 048,66	10,92%
	3	6,44E+04	1,93E+01	2,83	677,95	8,40%
	4	4,14E+05	2,02E+01	2,43	268,42	53,91%
	5	7,28E+04	2,09E+01	2,16	143,92	9,49%
W1	1	6,78E+04	1,85E+01	3,15	1 412,98	8,77%
	2	3,96E+04	1,88E+01	3,01	1 033,59	5,12%
	3	2,41E+05	1,94E+01	2,79	620,96	31,12%
	4	3,29E+05	2,04E+01	2,38	238,17	42,51%
	5	9,65E+04	2,10E+01	2,12	132,84	12,48%
P1	1	7,52E+04	1,85E+01	3,15	1 408,89	9,62%
	2	4,95E+04	1,88E+01	3,01	1 032,59	6,33%
	3	2,35E+05	1,94E+01	2,79	621,56	30,03%
	4	3,20E+05	2,04E+01	2,38	238,17	40,88%
	5	1,03E+05	2,06E+01	2,26	180,21	13,15%
C1	1	7,10E+04	1,85E+01	3,16	1 447,48	9,53%
	2	4,23E+04	1,88E+01	3,01	1 034,58	5,67%
	3	2,27E+05	1,94E+01	2,79	620,36	30,45%
	4	3,16E+05	2,04E+01	2,38	237,72	42,43%
	5	8,89E+04	2,07E+01	2,24	174,39	11,92%

Tableau n°20 : Exemple du tableau de calculs des poids moléculaires et des aires relatives

N°pic	M EX4 (%)	W (%)	P+ (%)	C+ (%)
1	17,29%	9,60%	10,08%	9,96%
2	10,92%	5,47%	5,94%	5,70%
3	8,40%	30,56%	30,24%	30,59%
4	53,91%	41,29%	40,78%	41,61%
5	9,49%	13,08%	12,97%	12,14%

Tableau n°21 : Moyennes des aires relatives de chaque pic

N°pic	M EX4 (Da)	W (Da)	P+ (Da)	C+ (Da)
1	1 583,39	1 396,31	1 437,90	1 460,20
2	1 048,66	978,20	1 033,59	1 033,59
3	677,95	620,76	621,56	620,36
4	268,42	238,02	238,02	237,72
5	143,92	164,07	179,06	175,58

Tableau n°22 : Moyenne des poids moléculaires (Da) de chaque composants

Le tableau n°21 nous indique que les proportions des composants sont les mêmes pour les surnageants avec culture, W, P+ et C+ mais différents pour le milieu exuvies seul. On peut voir avec le tableau n° 22 que les poids moléculaires diffèrent peu entre le milieu et les cultures. On peut dire que les échantillons sont composés des mêmes molécules.

On peut émettre l'hypothèse que la modification génétique permettant de surexprimer la chitinase de W29 n'a pas d'effet direct et significatif sur la métabolisation des exuvies. En revanche, on voit bien une évolution de la composition du milieu après la culture en termes de proportion.

Conclusion

Au terme de ce stage d'assistante ingénieure dans le cadre de la recherche, il est désormais possible de tirer des conclusions et de formuler des hypothèses sur les aspects clés du projet de biotransformation des exuvies d'insectes par *Yarrowia lipolytica*.

La poursuite de l'analyse de la biodiversité de *Y. lipolytica* a permis de quantifier l'activité lipase d'un panel de 30 souches, et de confirmer l'appartenance des souches CLIB 183, Ex-fcom-LP, CAM-43-C, CAM-25-E, CAM-28-E, SWJ-1b et 296 à l'espèce *Yarrowia lipolytica*.

Nous avons eu l'occasion de modifier génétiquement la souche W29 afin de surexprimer sa protéase AEP ou sa chitinase. Les résultats obtenus nous indiquent clairement le succès de ces manipulations génétiques au vu des activités protéase et chitinase bien supérieures à celles de la souche sauvage.

Pour effectuer les tests en culture de la souche sauvage et des souches modifiées dans le milieu enrichi en exuvies, nous avons dû mettre au point un nouveau protocole de cytométrie en flux adapté à ce milieu et à ces levures. Le suivi de leur croissance puis l'analyse des surnageants de culture ont permis d'établir que la surexpression de la chitinase de *Y. lipolytica* n'a pas d'effet significatif sur la métabolisation des exuvies en dérivés chitiniques, mais que celle de la protéase AEP permet une meilleure déprotéinisation des exuvies présentes dans le milieu qu'avec seulement la souche sauvage.

De nouvelles pistes de recherche ont pu être dégagées, comme l'analyse des pics des chromatogrammes issus de l'HPLC ciblée sur les chitooligosaccharides ou des bandes de gels d'électrophorèses en protéomique afin d'identifier les protéines et les dérivés chitiniques présents dans les surnageants avant et après la culture.

Ce stage a été pour moi un enrichissement professionnel et culturel de par la découverte du monde de la recherche et de mon voyage au Canada. J'ai pu développer mes compétences dans de nombreux domaines comme la microbiologie, l'ingénierie génétique ou encore la physico-chimie, en mettant en œuvre un panel varié de techniques. J'ai aussi eu l'occasion d'en apprendre plus sur les métiers de la recherche et c'est avec joie que j'ai pu découvrir la passion avec laquelle chaque professionnel de recherche apporte sa pierre à l'immense édifice qu'est la science.

Bibliographie

1. Comité d'Histoire INRAE - INRA. (n.d.). inra.com.
<https://www6.inrae.fr/comitedhistoire/Organisations-amies/Histoire-des-Instituts/INRA>
2. Da Silva Lucas, A. J., Oreste, E. Q., Costa, H. S., López, H. S., Saad, C. F., & 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>
3. 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>
4. *Autorisation la mise sur le marché de biomasse de levures de Yarrowia lipolytica en tant que nouvel aliment en application du règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil et modifiant le règlement d'exécution (UE) 2017/2470 de la Commission.* (2019).
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0760&from=EN>
5. Microbial cell factories engineering for production of biomolecules. (2021). In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/c2019-0-03952-0>
6. Young, T. M., Wadeson, A., Glover, D. M., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. (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>
7. Park, J., Han, C. S., Lee, D., Cheon, S. A., & Kang, H. (2014). Functional characterization of extracellular chitinase encoded by the YICTS1 gene in a dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4070-8>

8. De Oliveira Gonçalves, F., Colen, G., & Takahashi, J. A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/476207>
9. Qian, J., Shi, B., Mo, L., Shu, D., & Guo, H. (2021). Preparation of chitooligosaccharides by α -amylase from Chitosan of oxidative pretreatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6901>
10. *Loading*. . . (n.d.). <https://cirm-levures.bio-aware.com/>
11. New England Biolabs. (n.d.). *NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) | DH5 α | NEB*. <https://international.neb.com/products/c2987-neb-5-alpha-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information>
12. New England Biolabs. (n.d.-a). *CutSmart® Buffer | NEB*. <https://international.neb.com/products/b7204-cutsmart-buffer#Product%20Information>
13. New England Biolabs. (n.d.-c). *NEBuffer 3.1 | NEB*. <https://international.neb.com/products/b7203-nebuffer-3-1#Product%20Information>
14. New England Biolabs. (n.d.-d). *Shrimp Alkaline phosphatase (RSAP) | NEB*. <https://international.neb.com/products/m0371-shrimp-alkaline-phosphatase-rsap#Product%20Information>
15. New England Biolabs. (n.d.-e). *T4 DNA Ligase | NEB*. <https://international.neb.com/products/m0202-t4-dna-ligase#Product%20Information>
16. *GeneArt Products and Services | Thermo Fisher Scientific - IE*. (n.d.). https://www.googleadservices.com/pagead/aclk?sa=L&ai=DChcSEwjS_oGPraaAAxUQOXIKHRgeDakYABACGgJxdQ&ae=2&ohost=www.google.com&cid=CAESauD2CNYKG31Eoy9xyxAvz8nKRtC6s8sv9c9g3xrWDQuZc-CYRaYWzkhOuoNPQvuXedHnF8_-b0HiVLafaLS8GmHtLLvC7C3sCJDY_AH0F8or6EkJ5vDlyNdNRg-1_Vt909hHa-VIXQ6KHP8&sig=AOD64_2

[DAeFowdyeLAMV1PXiW2TF9GdbBg&q&adurl&ved=2ahUKEwir4PuOraaAAxWIE1kFHW8HAYgQ0Qx6BAgJEAE&nis=2&dct=1](https://doi.org/10.1002/9781118475341.ch17)

17. New England Biolabs. (2015, November 20). *Monarch® Plasmid DNA MiniPrep Kit Protocol (NEB #T1010) | NEB.*

<https://international.neb.com/protocols/2015/11/20/monarch-plasmid-dna-miniprep-kit-protocol-t1010>

18. *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant, 1 ml.*

(n.d.). Bio-Rad Laboratories.

<https://www.bio-rad.com/en-ca/sku/1610363-precision-plus-protein-unstained-protein-standards-strep-tagged-recombinant-1-ml?ID=1610363>

Annexes

Annexe n°1 : Étapes de valorisation des exuvies d'insectes détaillées

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.

Annexe n°2 : Etat de l'art des recherches précédentes sur la biodiversité de *Y.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	+
IEO7	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°3 : Protocole de transformation de *E.coli*

Transformation Protocol

Protocols.io also provides an [interactive version of this protocol](#) where you can discover and share optimizations with the research community.

Overview

Quick Ligation products may be transformed by many different methods. The following protocol is recommended by New England Biolabs.

Protocol

1. Thaw competent cells on ice.
2. Chill approximately 5 ng (2 µl) of the ligation mixture in a 1.5 ml microcentrifuge tube.
3. Add 50 µl of competent cells to the DNA. Mix gently by pipetting up and down or flicking the tube 4–5 times to mix the cells and DNA. Do not vortex.
4. Place the mixture on ice for 30 minutes. Do not mix.
5. Heat shock at 42°C for 30 seconds*. Do not mix.
6. Add 950 µl of room temperature media* to the tube.
7. Place tube at 37°C for 60 minutes. Shake vigorously (250 rpm) or rotate.
8. Warm selection plates to 37°C.
9. Spread 50–100 µl of the cells and ligation mixture onto the plates.
10. Incubate overnight at 37°C.

* Please note: For the duration and temperature of the heat shock step as well as for the media to be used during the recovery period, please follow the recommendations provided by the competent cells' manufacturer.

Products

**Lithium Acetate 0.1 M buffered at pH 6.0 with acetic acid 10%.
Sterilization: autoclave or sterile filtration.**

**Carrier DNA : preferably Clontech Ref. 630440 (10 mg/ml Herring Testes Carrier DNA denatured). Stock solution aliquoted in Eppendorf tubes and kept at 4°C.
Alternatively, fish sperm DNA could be dissolved at 10 mg/ml in TE (10 mM Tris at pH8, 1 mM EDTA) and sonicated to adjust the mean DNA fragment size to 500 bp)**

**PEG 4000: 40% in Lithium Acetate 0.1 M pH 6.0. pH adjusted with acetic acid 10%.
Sterilization: sterile filtration. Prepare extemporaneously, or keep 1-2 weeks at 4°C.**

DTT : dithiothreitol 1 M in water with sterile filtration.

Media

Plates : + 15 g/L agar

YPD : 10 g/L yeast extract, 10 g/L bacto peptone, 10 g/L glucose

**YNB-N₅₀₀₀ : 1.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate
10 g/L glucose
5 g/L ammonium sulfate
(or 6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids
10 g/L glucose)**

Following transformation :

**Re-streak transformants on YNB-N₅₀₀₀ plates, for obtaining colonies issued from a single cell.
Transformants obtained from pBR-based vectors are fairly stable. However, it is recommended to maintain the selective pressure, and to perform rapidly glycerol stocks.**

Conditions recommended for heterologous protein production :

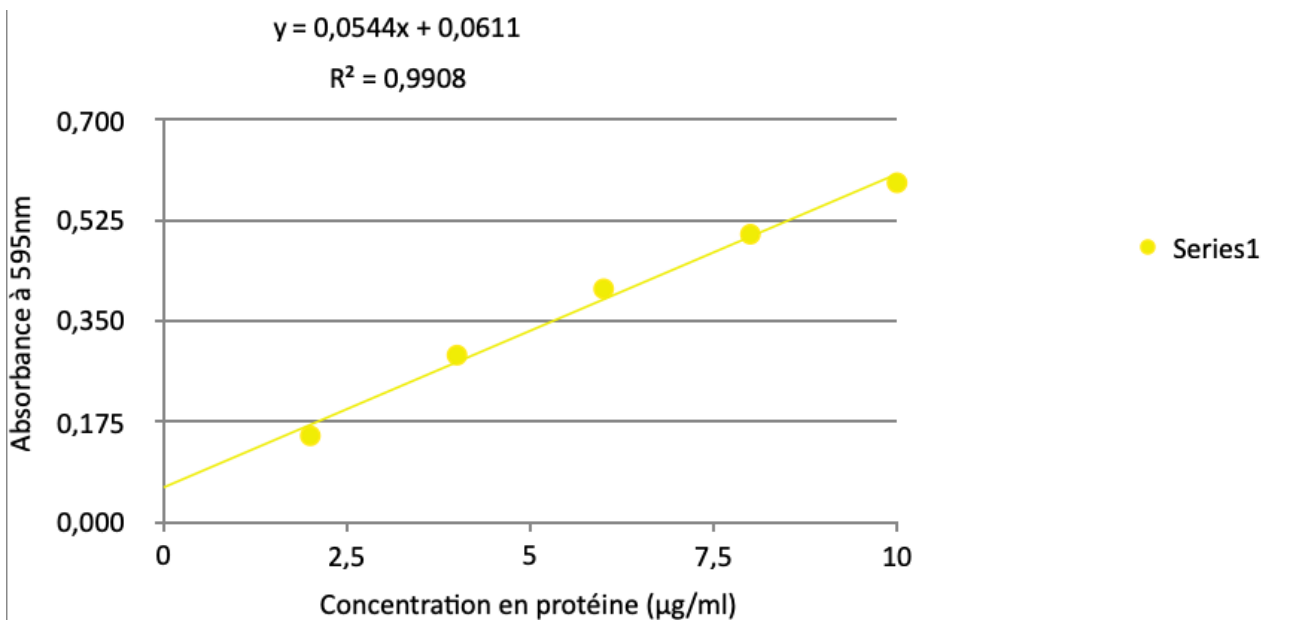
Either rich YPD medium, or industrial PPB medium.

**Perform overnight preculture in YPD, inoculate culture in YPD or PPB at OD₆₀₀ = 0.1-0.2.
incubate with shaking at 23 to 28°C, for 2 to 9 days (i.e. : try 3 days, 5 days and 7 days).**

**PPB (20 mM Cit) : 20 g/L sucrose
1.32 g/L yeast extract
0.32 g/L KH₂PO₄
1.32 g/L NH₄Cl
0.132 g/L MgSO₄
0.334 mg/L thiamine
buffer with 20 mM citrate buffer pH 6**

Alternatively, sucrose can be replaced by glucose, or by a 50/50 sucrose/glucose mix. Other buffers, such as phosphate buffer can be tried.

Annexe n°5 : Résultats du dosage par la méthode Bradford



Echantillons	Quantité cuvette (µg)	Concentration prot (µg/µL)	Vol (µL) pour 10 µg
pH2 T0	Trop peu de quantité pour détermination		
pH10 T0			
pH2 T4			
pH10 T4	3,28	0,41	24,4
pH2 T A			
pH10 TA	3,6215	0,4527	22,1