



HAL
open science

Relation entre la structure des polymères pariétaux et la floculation des levures *Kluyveromyces lactis*

Mohand Mouloud Bellal

► To cite this version:

Mohand Mouloud Bellal. Relation entre la structure des polymères pariétaux et la floculation des levures *Kluyveromyces lactis*. Alimentation et Nutrition. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT: 1994NAN10375 . tel-01747146

HAL Id: tel-01747146

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747146v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

94 / 947

Sc N 94 / B
/ 375

UNIVERSITÉ HENRI POINCARRÉ, NANCY-I
1994

ÉCOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTÉ"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 14 Novembre 1994



pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

Par

Mohand Mouloud BELLAL

**RELATION ENTRE LA STRUCTURE DES
POLYMERES PARIETAUX ET LA FLOCCULATION
DES LEVURES *KLUYVEROMYCES LACTIS***

MEMBRES DU JURY

Président : Mr R. BONALY (Professeur)
Rapporteurs : Mr J.M. BOUDRANT (Directeur de recherche CNRS)
Mr R. MARCZAK (Maître de conférences)
Juges : Mr B. VITTOUX (Professeur)
Mr M. METCHE (Professeur)

UNIVERSITE DE NANCY I

UER ALIMENTATION - NUTRITION

T H E S E

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'ETAT es SCIENCES NATURELLES

RELATION ENTRE LA STRUCTURE DES POLYMERES
PARIETAUX ET LA GERMINATION DES LEVURES
KLUYVEROMYCES LACTIS

Par M. BELLAL Mohand Mouloud

*Soutenue publiquement le 14 Novembre 1994
devant la commission d'examen:*

P. GALZY : Professeur
R. BONALY : Professeur
M. VITOUX : Professeur
J. BOUDRANT : Directeur de recherche C.N.R.S.
M. MARCZAK : Professeur

UNIVERSITÉ HENRI POINCARRÉ, NANCY-I
1994

ÉCOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTÉ"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 14 Novembre 1994

pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

Par

Mohand Mouloud BELLAL

RELATION ENTRE LA STRUCTURE DES
POLYMERES PARIETAUX ET LA FLOCCULATION
DES LEVURES *KLUYVEROMYCES LACTIS*

MEMBRES DU JURY

Président : Mr R. BONALY (Professeur)
Rapporteurs : Mr J.M. BOUDRANT (Directeur de recherche CNRS)
Mr R. MARCZAK (Maître de conférences)
Juges : Mr B. VITTOUX (Professeur)
Mr M. METCHE (Professeur)

A la mémoire de mon Père
et celle de ma mère

A ma femme
A mes enfants DALIA, WARDA et YANIS

"Si votre maître est réellement sage
il ne vous invite pas à entrer dans
la maison de sa sagesse, mais il
vous conduit au seuil de votre
propre esprit"

A mes frères et sœurs
A mes beaux parents
A mes amis A. MEZAOUI, C. AYMARD, J. LAURENT
et leurs familles

A tous les miens

La Science véritable nous apprend
par dessus tout à douter et être
ignorant.

AVANT - P R O P O S

Qu'il me soit permis de faire ici un retour dans le passé et de réunir dans une même pensée reconnaissante tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Biochimie Microbienne de la Faculté de Pharmacie de NANCY, sous la direction de Monsieur le Professeur R. BONALY à qui, je dois une toute particulière reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle il m'a toujours accueilli, pour la confiance qu'il m'a accordée pour sa disponibilité et pour l'intérêt qu'il a apporté à mes travaux. Je suis heureux de lui témoigner ici ma profonde gratitude et mon respectueux attachement.

Je prie Monsieur le Professeur P. GALZY, directeur de la chaire de Génétique et de Microbiologie de l'E.N.S.A., de Montpellier, de croire à ma profonde reconnaissance pour sa précieuse et permanente collaboration. Il m'a toujours accueilli avec bienveillance et a manifesté un grand intérêt à mes travaux. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Il m'est infiniment agréable de remercier Monsieur J. BOUDRANT, directeur de recherche au CNRS de Nancy, qui a bien voulu accepter de juger ce travail. Malgré ses multiples tâches, il n'a pas hésité à me prodiguer ses précieux conseils et me faire bénéficier de sa haute compétence; je suis heureux de lui exprimer ici, une fois de plus, ma gratitude et mon dévouement.

Que Messieurs les Professeurs VITOUX et MARCZAC de la Faculté des Sciences de NANCY trouvent ici l'expression de mes respectueux remerciements pour l'intérêt qu'ils manifestent à ce travail, en acceptant de prendre place dans ce jury.

Mes remerciements vont également à tout le personnel, du laboratoire de Biochimie Microbienne et plus particulièrement J. COULON, auprès duquel j'ai trouvé aide et compréhension.

Je m'en voudrais de ne pas remercier tous mes collègues et amis de l'Institut National Agronomique d'Alger, nombreux pour tous les citer, qui m'ont soutenu par leur amitié et leurs encouragements.

Je dois une pensée reconnaissante à mes collègues et amis A. YOUYOU, B. AZZOUT, A. AMMOUCHE, D. SADOUN, A. et L. GUEZLANE, S.M. OUNANE B. KHEMMARI, D. MANSOURI et M. MAHMOUDI pour leur soutien et aide.

Enfin, que mes neveux Laziz, Salem, Djamel et mon beau-frère Hocine soient rassurés de toute mon affection.

P L A N

LISTE DES ABREVIATIONS

I N T R O D U C T I O N.....	1
------------------------------	---

CHAPITRE I

I. TERMINOLOGIE.....	6
II. CLASSIFICATION.....	7
III. FACTEURS INFLUENCANT LA FLOCCULATION DES LEVURES.....	9
III.1. LES FACTEURS GENETIQUES.....	10
III.2. LES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES.....	12
III.3. LES FACTEURS NUTRITIONNELS.....	12
III.3.1. Les glucides.....	12
III.3.2. Les éléments azotés.....	13
III.3.3. Les éléments minéraux.....	14
III.3.4. Les vitamines.....	16
III.4. LES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE.....	16
III.4.1. Influence de la température.....	16
III.4.2. Effet de l'agitation et de l'aération.....	17
III.4.3. Effet du pH.....	18
III.4.4. Effet de la pression du milieu de culture.....	18
IV. COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA PAROI DES LEVURES.....	19
IV.1. INTRODUCTION.....	19
IV.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS.....	19

IV.2.1. LES MANNANES.....	20
IV.2.1.1. Extraction et méthodes d'étude des mannanes.....	21
IV.2.1.2. Structure des mannanes.....	22
IV.2.1.3. Les phosphomannanes.....	30
IV.2.1.4. Les galactomannanes.....	32
IV.2.1.5. Conclusion.....	33
IV.2.1.6. Biosynthèse des mannanes.....	37
IV.2.1.6.1. Biosynthèse de la partie protéique.....	37
IV.2.1.6.2. Biosynthèse des carbohydrates fixés à l'azote.....	37
IV.2.1.6.3. Biosynthèse des carbohydrates fixés à l'oxygène.....	47
IV.2.2. Les glucanes.....	48
IV.2.3. La chitine.....	51
IV.2.2.1. Structure des glucanes.....	49
IV.2.2.2. Biosynthèse des glucanes.....	50
IV.2.3.2. La chitine.....	51
IV.2.3.1. Structure de la chitine.....	52
IV.2.3.2. Biosynthèse de la chitine.....	53
IV.3. LES PROTEINES.....	54
IV.3.1. Les protéines de structure.....	54
IV.4. LES LIPIDES PARIETAUX.....	56
IV.5. LES IONS MINERAUX.....	57
IV.6. MORPHOLOGIE DES PAROIS DE LEVURE	58
IV.7. ROLE DE LA PAROI DANS LE PHENOMENE DE FLOCULATION.....	62
IV.8. MECANISME DE FLOCULATION DES LEVURES.....	64
IV.8.1. Introduction.....	64
IV.8.2. Hypothèse des ponts salins.....	65
IV.8.3. Hypothèse des liaisons par des lectines.....	66

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL.....	69
------------------	----

I.1. MICROORGANISMES.....	69
I.2. MILIEUX DE CULTURE.....	69
I.2.1. Milieu Atkin (M ₁).....	69
I.2.2. Milieu Atkin modifié(M ₂).....	70
I.2.3. Milieu Déinéma (M ₃).....	70
I.2.4. Milieu Déinéma modifiés (M ₄ , M ₅ et M ₆).....	71
I.2.5. Milieu sabouraud (M ₇).....	71
I.3. CONDUITE DES CULTURES.....	71
I.3.1. Culture en fioles.....	71
I.3.2. Culture en fermenteur 2 litres.....	72
I.3.3. Culture en fermenteur 20 litres.....	72
II. METHODES.....	72
II.1. MESURE DE LA CROISSANCE.....	72
II.2. MESURE DE LA FLOCCULATION.....	75
II.2.1. Technique de sédimentation.....	75
II.2.2. Technique visuelle.....	76
II.2.3. Technique spectroscopique.....	76
II.3. METHODES D'ETUDE DE LA STABILITE DE LA FLOCCULATION.....	78
II.3.1. Effet du pH.....	78
II.3.2. Effet de la température.....	78
II.3.3. Effet des sucres.....	78
II.3.4. Effet de l'action d'enzymes.....	79
II.3.5. Effet de la régénération de la paroi.....	79
II.3.5.1.Préparation de protoplastes.....	79
II.3.5.2.Régénération des protoplastes.....	80
II.3.5.3.Flocculation des cellules régénérées....	80
III. METHODES D'OBTENTION ET DE TRAITEMENT DES PAROIS.....	80
III.1. PREPARATION ET ISOLEMENT DES PAROIS.....	80
III.2. TECHNIQUES D'HYDROLYSE DES PAROIS.....	81
III.3. FRACTIONNEMENT DES PAROIS.....	81
III.4. ISOLEMENT DE LA CHITINE.....	83
III.5. PREPARATION DES MANNANES.....	83

IV. METHODES ENZYMATIQUES.....	85
IV.1. TRAITEMENT DES PAROIS PAR LA CYTOHELICASE ET LA PRONASE.....	85
IV.2. TRAITEMENT DES PHOSHOPEPTIDOMANANES PAR LA PRONASE.....	86
V. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....	86
V.1. FILTRATION MOLECULAIRE.....	86
V.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	87
V.3. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.....	88
V.4. ELECTROPHORESE SUR GEL.....	88
V.5. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.....	89
VI. METHODES CHIMIQUES.....	89
VI.1. DOSAGE DES OSES NEUTRES.....	89
VI.2. ANALYSE QUALITATIVE DES OSES.....	90
VI.3. DOSAGE DES ACIDES AMINES.....	90
VI.4. ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINES.....	91
VI.5. DOSAGE DES HEXOSAMINES.....	91
VI.6. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL.....	92
VI.7. DOSAGE DU PHOSPHORE.....	92
VI.8. DOSAGE DES OLIGOELEMENTS.....	93
VI.9. ACETOLYSE DES MANNANES.....	94
VI.10. REACTION DE β -EMINATION.....	94
VI.11. TITRATION DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM).....	96
VI.12. TESTS DE PRECIPITATION DES PPM PAR LA CONCAVALINE A.....	96

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE III

I. ESSAIS PRELIMINAIRES.....	97
I.1. CROISSANCE DES SOUCHES <i>K. lactis</i> EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE.....	97

I.2. FLOCCULATION DE <i>K. lactis</i> EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE.....	101
II. INFLUENCE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES FACTEURS NUTRITIONNELS SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION DE <i>K. lactis</i>	106
II.1. INFLUENCE DE LA SOURCE AZOTEE.....	106
II.2. INFLUENCE DE LA SOURCE CARBONEE.....	109
II.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ELEMENTS MINERAUX.....	112
III. DISCUSSION.....	117

C H A P I T R E I V

I. INTRODUCTION.....	120
II. INFLUENCE DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA STABILITÉ DES AGREGATS CELLULAIRES.....	120
II.1 INFLUENCE DU pH.....	120
II.2 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.....	121
II.3. INFLUENCE "DIRECTE" DES IONS METALLIQUES.....	123
II.3.1. Influence des ions calcium.....	123
II.3.2. Influence du rapport Ca^{2+}/K^+	124
II.3.3. Influence des ions strontium (Sr^{2+}).....	125
II.3.4. Influence des ions baryum (Ba^{2+}).....	126
II.3.5. Influence des ions potassium (K^+) et sodium (Na^+).....	128
II.3.6. Influence des ions magnésium (Mg^{2+}) et manganèse (Mn^{2+}).....	128
II.4. INFLUENCE DE COMPOSES GLUCIDIQUES ET DERIVES... ..	131
II.5. INFLUENCE D'AGENTS CHIMIQUES.....	131
II.6. ACTION D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES.....	136
II.7. EFFET DE LA REGENERATION DES PAROIS.....	138
III. DISCUSSION.....	141

II.3.3.1. Composition chimique globale des sous fractions A1.....	181
II.3.3.2. Acétolyse des sous-fractions (A1)....	187
II.3.3.3. Réaction de B-élimination et analyse des produits issus.....	191
II.3.3.3.1. Analyse des fractions F1.....	194
II.3.3.3.2. Action de la pronase sur les fractions F1.....	195
II.4. DISCUSSION.....	201
III. ETUDE DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM) OBTENUS APRES ACTION DE LA CYTOHELICASE SUR LES PAROIS DE <i>K. lactis</i>	203
III.1. ISOLEMENT DES PPM.....	203
III.2. ETUDE DES PPM ISOLEES DES PAROIS DE <i>K. lactis</i> APRES ACTION DE LA CYTOHELICASE.....	204
III.2.1. Rendements pondéraux.....	204
III.2.2. Purification des fractions obtenues après action de la cytohélicase sur les parois.....	204
III.2.3. Analyse des fractions (A) obtenues par action de la cytohélicase sur les parois de <i>K. lactis</i>	208
III.2.3.1. Composition chimique globale....	214
III.2.4. Etude de l'activité des PPM isolés après action de la cytohélicase.....	214
III.2.4.1. Tests de défloculation et refloculation.....	214
III.2.4.2. Tests de précipitation des PPM par la concanavoline A (CON A)....	214
III.2.5. Acétolyse des PPM obtenus après action de la cytohélicase sur les parois de <i>K. lactis</i>	216
III.3. DISCUSSION.....	220

CHAPITRE V

I. INTRODUCTION.....	145
II. ISOLEMENT DES PAROIS ET COMPOSITION CHIMIQUE.....	146
II.1. CONDITIONS D'OBTENTION ET RENDEMENTS RELATIFS EN PAROIS.....	146
II.2. ANALYSE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES.....	147
II.3. ANALYSE DES HEXOSAMINES.....	150
II.4. ANALYSE DES ACIDES AMINES.....	152
II.5. TENEUR EN PHOSPHORE DES PAROIS.....	154
II.6. TENEUR EN OLIGO-ELEMENTS DES PAROIS.....	158
III. DISCUSSION.....	158

CHAPITRE VI

I. INTRODUCTION.....	164
II. ETUDE DES CONSTITUANTS EXTRAITS DES PAROIS TRAITÉES A L'ETHYLENEDIAMINE.....	165
II.1. RENDEMENTS RELATIFS EN DIFFÉRENTES FRACTIONS....	165
II.2. ANALYSE BIOCHIMIQUE COMPARÉE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS.....	166
II.2.1. Composition chimique globale.....	166
II.2.2. Analyse qualitative des oses des fractions pariétales (A,B,C).....	166
II.2.3. Analyse qualitative des acides aminés et teneur en hexosamines des différentes fractions pariétales.....	166
II.2.4. Estimation de la chitine.....	168
II.3. ETUDE DES FRACTIONS (A).....	168
II.3.1. Purification des fractions (A).....	175
II.3.2. Estimation des masses moléculaires des sous-fractions A1 et A2.....	175
II.3.3. Etude comparée des sous fractions A1.....	181

CHAPITRE VII

I. INTRODUCTION.....	222
II. ISOLEMENT ET ANALYSE DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM) A PARTIR DE CELLULES ENTIERES.....	223
II.1. RENDEMENTS RELATIFS EN PPM EXTRAITS DES CELLULES ENTIERES FLOCCULANTES ET NON FLOCCULANTES.....	223
II.2. ANALYSE CHIMIQUE DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM) "BRUTS".....	224
II.2.1. Composition chimique globale des PPM "bruts" dialysés.....	226
II.2.2. Analyse qualitative des oses.....	227
II.2.3. Analyse qualitative des acides aminés et des hexosamines.....	227
II.2.4. Teneurs en phosphore et en calcium des PPM "bruts" dialysés.....	231
II.3. DISCUSSION.....	231
III. PURIFICATION DES PPM "BRUTS" ET ETUDE DES FRACTIONS... ..	233
III.1. PURIFICATION DES PPM "BRUTS" DIALYSES.....	233
III.2. ESTIMATION DES MASSES MOLECULAIRES DES FRACTIONS A1 et A2 ISSUES DES PPM DE <i>K. lactis</i> FLOCCULANTE ET NON FLOCCULANTE.....	235
III.3. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES FRACTIONS A1 ET A2.....	237
III.4. TITRATION DES PPM.....	243
III.5. PRECIPITATION DES PPM PAR LA CONCANAVALINE A (CON A).....	243
IV. ACETOLYSE DES PPM EXTRAITS DE CELLULES DE LEVURES ENTIERES.....	246
IV.1. ANALYSE DES PRODUITS "BRUTS" D'ACETOLYSE.....	246
IV.2. ANALYSE DES PRODUITS D'ACETOLYSE "NEUTRES" ET "CHARGES" APRES FRACTIONNEMENT SUR DEAE-SEPHADEX.....	253
IV.2.1. Analyse des polymères "neutres".....	255
IV.2.2. Analyse des polymères "chargés".....	259
V. DISCUSSION.....	261

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA FLOCCULATION DES SOUCHES "HYBRIDES"

INTRODUCTION.....	266
-------------------	-----

CHAPITRE VIII:

I. CROISSANCE DES SOUCHES SUR DIVERS MILIEUX DE CULTURE	268
II. FLOCCULATION DES SOUCHES <i>K. lactis</i>	269
II.1. FLOCCULATION DES SOUCHES EN MILIEU DE SABOURAUD.....	269
II.2. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES DU MILIEU SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION DES SOUCHES <i>K. lactis</i>	270
II.2.1. Influence de l'agitation et de l'aération,	270
II.2.2. Influence de la concentration en glucose sur la croissance et la flocculation des souches <i>K. lactis</i>	272
II.2.3. Influence de la concentration en peptone sur la croissance et la flocculation des souches <i>K. lactis</i>	274
II.2.4. Influence de la concentration en calcium sur la croissance et la flocculation des souches <i>K. lactis</i>	275
III. ETUDE DE LA REVERSION DE LA FLOCCULATION DES SOUCHES <i>K. lactis</i>	276
III.1. INFLUENCE DU pH.....	276
III.2. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.....	279
III.3. INFLUENCE DES OSES ET DERIVES.....	283
III.4. EFFET "DIRECT " DE QUELQUES IONS MONO ET BIVALENTS SUR LES AGREGATS CELLULAIRES DES SOUCHES <i>K. lactis</i>	284

III.5.	EFFET D'UN TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LA FLOCCULATION DES SOUCHES <i>K. lactis</i>	290
III.6.	EFFET DE TRAITEMENTS CHIMIQUES SUR LA STABILITE DES AGREGATS CELLULAIRES DE <i>K. lactis</i>	292
IV.	DISCUSSION.....	294

C H A P I T R E IX

I.	ISOLEMENT ET COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PAROIS..	297
I.1.	ISOLEMENT DES PAROIS ET RENDEMENT PONDERAL.....	297
I.2.	COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PAROIS.....	298
I.2.1.	Analyse des oses neutres.....	298
I.2.2.	Dosage des hexosamines	299
I.2.3.	Analyse des acides aminés.....	299
I.2.4.	Dosage du phosphore.....	301
I.2.5.	Dosage du calcium.....	301
I.3.	DISCUSSION	304
II.	ETUDE DES STRUCTURES PARIETALES OBTENUES APRES ACTION DE LA PRONASE.....	306
II.2.	ISOLEMENT DES PPM.....	306
II.3.	COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES EXTRAITS PARIETAUX OBTENUS.....	307
II.4.	EVALUATION DES MASSES MOLECULAIRES DES PPM EXTRAITS DES PAROIS APRES ACTION DE LA PRONASE,	314
II.5.	COMPOSITION GLOBALE DES FRACTIONS F1.....	317
II.6.	ACETOLYSE DES FRACTIONS F1.....	318
II.6.1.	ANALYSE DES POLYMERES "NEUTRES".....	318
II.6.2.	ANALYSE DES POLYMERES "CHARGES".....	325
II.7.	DISCUSSION.....	326

CHAPITRE X

I. ISOLEMENT DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM) EXTRAITS A PARTIR DE CELLULES ENTIERES.....	332
II. ETUDE COMPAREE DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM) EXTRAITS	332
II.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PPM "BRUTS"....	332
II.2. PURIFICATION DES PPM.....	341
II.3. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES PPM.....	345
II.4. ANALYSE CHIMIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES PAR FILTRATION SUR BIOGEL A5M.....	346
II.5. CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS MAJEURES (FA1)...	352
II.5.1. Titration des mannoprotéines (FA1).....	352
II.5.2. Réaction de précipitation des PPM purifiés (Fraction FA1) par la Con A.....	353
II.5.3. Capacité de fixation des ions Ca^{2+} par les PPM "bruts" et purifiés.....	356
II.6. ACETOLYSE DES PPM PURIFIES (FA1).....	357
II.7. DISCUSSION.....	362
 CONCLUSION GENERALE.....	 367
 BIBLIOGRAPHIE.....	 372

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	: Acides aminés
ACGNP	: 2- Acétamide-2-déoxy-D-glucoopyranosyl
ABS	: Absorbance
ALa	: Alanine
Arg	: Arginine
Arabp	: Arabinopyranosyl
Asp	: Acide aspartique
ASN	: Asparagine
DF	: Degré de floculation
DOL	: Dolichol
DOL-pp	: Dolichol-phosphorique
DO	: Densité optique
CM	: Centi-morgan
C.P.G	: Chromatographie en phase gazeuse
EDA	: Ethylènediamine
EDTA	: Ethylènediamine tétra acétique
%FLO	: Pourcentage de floculation
FUC	: Fucose
FUCP	: L-fucoopyranosyl
GLcNA	: N-acétyl -D- glucosamine
GALP	: Galactopyranose
GLCP	: D-Glucoopyranose
Glc	: D- Glucose
G/P	: D- Glucoopyranosyl uranique
g	: Grammes
µg	: Microgrammes
Glu	: Acide glutamique
Gly	: Glycine
GAL	: Galactose
h	: Heures
His	: Histidine
Ile	: Isoleucine
INO	: Inositol
KL	: <i>Kluyveromyces lactis</i>
KLF	: <i>Kluyveromyces lactis</i> floculante
KLNF	: <i>Kluyveromyces lactis</i> non floculante
<i>K. bulgaricus</i>	: <i>Kluyveromyces bulgaricus</i>
l	: Litres
Leu	: Leucine
Lys	: Lysine
Man	: Mannose
Manp	: Mannopyranose
MF	: Modérement floculante
M1	: Milieu ATKIN
M2	: Milieu ATKIN à base de sulfate d'ammonium
M3	: Milieu Déinéma à base d'extrait de levure
M4	: Milieu Déinéma modifié à base d'extrait de levure

M5	: Milieu Déinéma à base de peptone
M6	: Milieu Déinéma à base de Caséine
M7	: Milieu de sabouraud
ml	: Millitres
nm	: Nanomètres
NF	: Non floculante
μ	: Taux de croissance.
mg	: Milligrammes
mM	: Millimoles
M	: Moles
MC	: Milieu de culture
T.A.H	: Tampon acétate de Helm
MS	: Matière sèche
P	: Phosphore
PPM	: Phosphopeptidomannane
P/V	: Poids/Volume
<i>P.Pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
P.E	: Phase exponentielle
P.S	: Phase stationnaire
Pro	: Proline
Phe	: Phénylalanine
R.M.N	: Résonance magnétique nucléaire
RhP	: Rhamnopyranosyl
R.E	: Réticulum endoplasmique
R.E.R	: Réticulum endoplasmique rugueux
<i>S.cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cervisiae</i>
<i>S.Uvarum</i>	: <i>Saccharomyces uvarum</i>
Ser	: Sérine
Thr	: Thréonine
TF	: Très floculante
Tf	: Temps de floclation
T.I.M	: Temps d'incubation minimum
T.R	: Taux de régénération
T _R	: Temps de rétention
TCA	: Trichloracétique
Tyr	: Tyrosine
UDP	: Uridine-5-diphosphate
V/V	: Volume à volume
Val	: Valine
Xylp	: D-Xylopyranosyl

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les levures, champignons unicellulaires manifestent plusieurs phénomènes biologiques, parmi lesquels la floculation c'est-à-dire la formation spontanée, au cours du cycle de croissance, d'agrégats pluricellulaires à partir d'éléments isolés.

Ce phénomène est très répandu dans le monde vivant et conditionne de nombreux aspects de la vie des organismes uni et pluricellulaires (WINDISCH, 1968).

Au cours de la floculation, les cellules de levures en suspension s'agrègent et adhèrent en formant des flocons qui sédimentent rapidement dans le milieu de culture (RUSSEL et al. 1980), ou qui, grâce à l'inclusion de bulles de gaz carbonique, vont flotter à la surface (STAHL et al. 1983).

Les levures peuvent manifester en plus un phénomène désigné sous le nom d'agglutination sexuelle qui constitue la première étape du processus de reproduction par la voie sexuelle. Ce phénomène apparaît pendant la phase de croissance dans un milieu nutritif déterminé. L'agglutination sexuelle se produit normalement entre des cellules de "mating type" différent (BALLOU, 1982).

Selon YEN et BALLOU (1974) la floculation se distingue de l'agglutination par les points suivants:

- Le nombre de cellules floculées est illimité
- Le temps d'apparition de la floculation est une caractéristique de l'espece de levure alors que l'agglutination sexuelle apparaît toujours pendant la phase de croissance.
- L'agglutination sexuelle nécessite un milieu nutritif, par contre la floculation peut apparaître en milieu nutritif ou non.
- Les levures de même "mating type" peuvent floculer.

La floculation des levures a été largement étudiée car son rôle, dans plusieurs industries alimentaires, notamment en brasserie, levurerie et production de protéines d'organismes unicellulaires, est considérable (STEWART et RUSSEL, 1981). Elle est aussi d'un grand intérêt lors de la culture de champignons filamenteux producteurs d'acide citrique, d'antibiotiques ou d'agents de fermentation variés.

La floculation des levures et le phénomène d'agrégation de cellules d'organismes pluricellulaires présentent des caractéristiques analogues. Ainsi la fixation de bactéries ou de levures pathogènes sur un hôte ou l'adhérence de microorganismes à des supports variés, est sous la dépendance de mécanismes analogues qui font intervenir les structures externes de l'enveloppe cellulaire (OFEK et SHARON, 1983).

Dans le domaine industriel, la maîtrise de ces processus a des conséquences économiques directes: une floculation précoce ralentit ou empêche les fermentations, les levures n'ayant plus un contact suffisant avec le milieu de culture. Par contre, une floculation tardive ou insuffisante oblige à des traitements de séparation coûteux (BONALY et LEMATRE, 1983).

Malgré la somme impressionnante de résultats accumulés, ce sujet demeure assez controversé car il pose de nombreux problèmes tant du point de vue fondamental que du point de vue appliqué.

Les mécanismes de la floculation, encore mal définis, font intervenir les parties externes des parois cellulaires (THORNE, 1951; KAMADA, 1984). Ils dépendent de facteurs intrinsèques et de facteurs extrinsèques. Ainsi la floculation est un caractère génétique dont la manifestation phénotypique dépend de plusieurs gènes.

LEWIS et al., (1976) ont identifié deux gènes dominants (FLOI et FLOII) et un gène récessif (FLO 3) dont l'expression conditionnerait la floculation; un seul d'entre eux serait suffisant pour qu'une floculence optimale se manifeste et il n'y a pas d'effet additif des gènes (RUSSEL et al., 1981; MIKI et al., 1982).

Le caractère floculant est aussi influencé par des facteurs nutritionnels. Les sources de carbone, la forme et la quantité des sources azotées ainsi que les ions minéraux jouent un rôle important dans l'apparition de la floculation. Les substances nutritives peuvent-être des inhibiteurs ou des activateurs; un même nutriment peut avoir des effets opposés suivant sa concentration, la souche de levure, ou la présence d'autres produits dans le milieu (TAYLOR et ORTHON, 1975; STEWART et GORING, 1976; AMRI et al., 1979 et 1982). La floculation dépend, par ailleurs, des facteurs physico-chimiques du milieu environnant tels que le pH, la température, l'agitation et l'aération (CALLEJA, 1970; TAYLOR et ORTHON, 1973).

La multiplicité des facteurs et la complexité de leurs interactions font que le phénomène de floculation n'est pas toujours maîtrisé et qu'une même souche peut manifester des aptitudes floculantes variables au cours du cycle de fermentation. Elle peut changer de degré de floculation, devenir de plus en plus floculante ou inversement perdre cette propriété (THORNE, 1951; PATEL et INDGLEDEW, 1975).

L'examen des travaux sur la floculation des levures révèle qu'une variété surprenante de facteurs influence ce phénomène. Les divergences des résultats selon les auteurs tiennent en partie à la multiplicité des déterminants, ceux du milieu, ceux de la souche de levure, de son métabolisme, de sa croissance et de la biochimie de son développement cellulaire (BONALY et LEMATRE, 1983).

Il apparaît, souvent, qu'une levure, pour floculer doit avoir, au cours de son développement, élaboré des structures pariétales spécifiques. Cette synthèse est conditionnée par une aptitude génétique qui ne peut s'exprimer que si le milieu de culture, d'une part contient des éléments indispensables et, d'autre part, offre des conditions physico-chimiques appropriées (NISHIHARA et al., 1976; HOLMBERG, 1978; MIKI et al., 1981).

En dépit des nombreux travaux sur la floculation, le mécanisme intime, les structures moléculaires et les forces mises en jeu, restent à être élucidés. En effet, si le caractère génétique de la floculation est maintenant établi, il n'en demeure pas moins que l'aspect moléculaire constitue encore un vaste champ d'investigations (AMRI et al., 1981).

Certains auteurs tels que PATEL et INGLEDEW (1975) se sont efforcés d'expliquer la floculation surtout d'un point de vue métabolique. S'il est vrai que des processus métaboliques particuliers apparaissent au cours de ce phénomène, cette approche s'avère cependant insuffisante pour expliquer les modes d'interactions cellulaires au moment de la floculation (MIKI et al., 1981).

L'évolution des techniques de désintégration des cellules de levure a permis des études sur la paroi cellulaire et son rôle dans le phénomène de floculation (MARFEY et al., 1977). A ce point de vue, des divergences subsistent encore quant à la nature des constituants pariétaux ou la qualité des groupements ioniques concernés.

Des données établies par des études récentes et anciennes montrent la nécessité de certains ions pour la manifestation de la floculation en, particulier les ions Ca^{2+} qui forment des ponts ioniques entre les groupements anioniques fonctionnels tels que phosphates (LYONS et HOUGH, 1971) ou Carboxyles (STEWART et RUSSEL, 1975), situés à la surface cellulaire.

D'autres auteurs ont insisté sur la nécessité d'un milieu riche en composants azotés et ont constaté, en brasserie, que la floculation précoce dépendait de la présence de polypeptides dans le milieu de fermentation (FUJINO et YOSHIDA, 1976).

BEAVAN et al., (1979) ont proposé une théorie électrostatique de la floculation, selon laquelle une partie de la paroi cellulaire chargée positivement s'associerait à une partie correspondante, chargée négativement d'une autre cellule; alors que HAMIS et MITCHELL (1973) ont mis l'accent sur la formation de polysaccharides exocellulaires par de nombreux micro-organismes au moment de la floculation.

TAYLOR et ORTON (1973) puis MIKI et al., (1981) ont suggéré l'implication d'un phénomène biologique spécifique qui met en jeu une liaison protéine-hydrate de carbone. Cette dernière hypothèse (type lectinique) selon laquelle des facteurs du type lectinique, permet à la surface cellulaire intervenant dans la floculation, a été vérifiée pour les levures *Saccharomyces* et plus récemment pour les levures *Kluyveromyces bulgaricus* (AL MAHMOOD et al., 1987).

En dépit des nombreux travaux réalisés sur la floculation des levures, il y en a peu, qui ont porté à la fois sur les facteurs nutritionnels et la paroi, ainsi que leur relation avec la floculation (McMURROUGH et ROSE, 1967; AMRI et al., 1981).

Afin de préciser si des mécanismes différents interviennent dans chaque cas de floculation des levures, nous avons entrepris une étude sur des levures *Kluyveromyces lactis* haploïdes floculantes et non floculantes.

L'objectif de cette étude est de faire un lien entre les différents concepts actuels, physiologiques, physicochimiques et structuraux pour tenter de développer un "schéma" cohérent du mécanisme de floculation des levures. Deux aspects ont été successivement étudiés:

- L'aspect physiologique: qui concerne l'incidence des facteurs nutritionnels et physico-chimiques sur la floculation

- L'aspect biochimique: qui consiste à isoler les structures pariétales, obtenues dans des conditions de culture identiques, soit à partir de cellules entières (floculantes ou non) soit à partir de parois isolées. IL s'agit ensuite de préciser la relation entre la floculation et les structures impliquées et d'évaluer les changements caractéristiques des constituants de la paroi intervenant au moment de la floculation des levures *Kluyveromyces lactis*.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. TERMINOLOGIE

La floculation est un phénomène biologique qui affecte des cellules vivantes dispersées. Elle se manifeste par la formation d'amas cellulaires qui se séparent du milieu en suspension par sédimentation ou par flottaison.

Ce phénomène a été observé par PASTEUR (1876) qui découvrit la présence d'une levure floculante dans une fermentation ordinaire. La floculation a été par la suite décrite sous divers termes: agglomération (GEILENKOTTEN et NYNS, 1971); association (TAYLOR et ORTON 1973); agrégation (STAHL et al., 1983); adhésion (KAMADA et MURATA, 1984 a et b) ou alors agglutination, coagulation ou formation de flocons (CALLEJA, 1974). D'après STEWART (1981) le terme de floculation est utilisé en général, pour décrire tous les processus d'agrégation dans lesquels un système Colloidal forme des particules plus grandes qui ne restent plus en suspension. Ainsi STEWART et RUSSEL (1981) distinguent différents types de floculation en particulier:

- l'autofloculation qui concerne l'agrégation de cellules d'une même espèce.

- La co-floculation qui désigne l'agrégation entre différentes souches de levures ou autres espèces de microorganismes.

Récemment ESSER et KUES (1983) puis ROSE (1984) définissent la floculation des levures comme étant le phénomène par lequel les cellules de levures en suspension s'agrègent et adhèrent en formant des flocons qui sédimentent ou flottent rapidement dans le milieu. Dans ce dernier cas, selon RAINBOW (1966) la flottaison est provoquée par l'inclusion de dioxyde de carbone.

Par ailleurs, l'agrégation de certaines levures constitue une condition préalable d'initiation du cycle sexuel, il s'agit alors de floculation ou d'agrégation sexuelle (CALLEJA et JOHNSON, 1971).

En outre, le phénomène de floculation est observé dans plusieurs systèmes biologiques très différents, comme le résume le tableau 1.

TABLEAU 1: "Principales réactions" d'agrégation, d'adhésion ou de floculation

SYSTEMES BIOLOGIQUES OU REACTIONS D'AGREGATION, D'ADHESION OU DE FLOCULATION	REFERENCES
Réaction anticorps-antigènes	SHAW et ALIS, (1972)
Agrégation des bactéries	CUMSKY et ZUSMAN, (1979,1981 a et b) EGGEST et al., (1983)
Production de mycéllium chez les champignons	MIRELMAN, (1986)
Agrégation de cellules d'éponges	HUMPHREY et al., (1977) JUMBLATT et al., (1980)
Agrégation des cellules dans les tissus de culture végétale	PUHAN et MARTIN, (1971) MC WILLIAM et al., (1974)
Agrégation cellulaire des moisissures (dans les boues)	ROSE et al., (1974) BARONDERS ET HAYWOOD, (1979)
Floculation des Levures	GILLILAND, (1951), RAINBOW, (1966) GEILENKOTTEN ET NYNS, (1964) STEWART, (1975), STEWART T. RUSSEL, (1981); ROSE, (1984)

II. CLASSIFICATION

De nombreuses classifications de différents types de floculation ont été proposées, en particulier, pour les levures de brasserie.

Dès 1951 GILLILAND avait isolé des souches pures de différentes levures utilisées en brasserie qu'il regroupe en quatre classes selon leur comportement au cours de la fermentation. Le tableau 2 rassemble les caractéristiques des principales classes de levures selon cet auteur.

TABLEAU 2: Principales classes de levures selon leur comportement au cours de la fermentation (d'après GILLILAND, 1951)

CLASSE	CARACTERISTIQUES
I	les levures restent dispersées pendant toute la fermentation. Elles ne sont pas floculantes.
II	les levures restent dispersées pendant la plus grande partie de la fermentation. Elles forment des flocons peu compacts en fin de fermentation
III	les levures floculent vers la fin de la fermentation en formant des masses solides qui sédimentent au fond de la cuve
IV	les levures floculent fortement dès les premiers stades de la fermentation

Plus tard, STEWART et al. (1975), étudiant la croissance de levures hautes de brasserie (*S. cerevisiae*) et leurs caractères de floculation, les ont classées en cinq catégories:

1/- Les souches non floculantes

Les cellules de ces souches de levure restent individuelles et n'ont aucune aptitude à floculer.

2/- Les souches cofloculantes

Les souches ne floculent pas mais forment des agrégats diffus en présence d'ions calcium (type B). En présence de souches partenaires co-floculantes (type A), les premières forment des agrégats qui sédimentent rapidement.

3/- Les souches floculantes en présence de Moût

Ces souches peuvent floculer au cours de la culture en moût, mais ne floculent pas quand elles sont cultivées en milieu synthétique. Elles semblent exiger des composés inducteurs qui

stimulent la floculation. Ainsi, elles flocculent en présence d'acides aminés tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique dans le milieu de culture.

4/- Les souches flocculantes

Ces souches peuvent flocculer sur divers milieux (Moût ou milieu synthétique). Elles sont aptes à synthétiser les composants qui induisent leur floculation.

5/- Les souches formant des chaînettes

Lorsque ces levures bourgeonnent, les cellules ne se séparent pas totalement des cellules mères, l'ensemble donne des flocons de cellules qui sédimentent dans le milieu de culture.

III. FACTEURS INFLUENCANT LA FLOCCULATION DES LEVURES

La floculation des levures est un phénomène complexe qui est soumis à l'influence de nombreux paramètres. Lorsque les conditions génétiques et physiologiques des cellules permettent la floculation, celle-ci dépend des facteurs environnants dont les plus importants sont ceux qui perturbent directement ou indirectement le métabolisme cellulaire ou/et altèrent la structure pariétale (ATKINSON et DAOUD, 1976). La figure 1 résume l'ensemble des facteurs qui interviennent dans le phénomène de floculation.

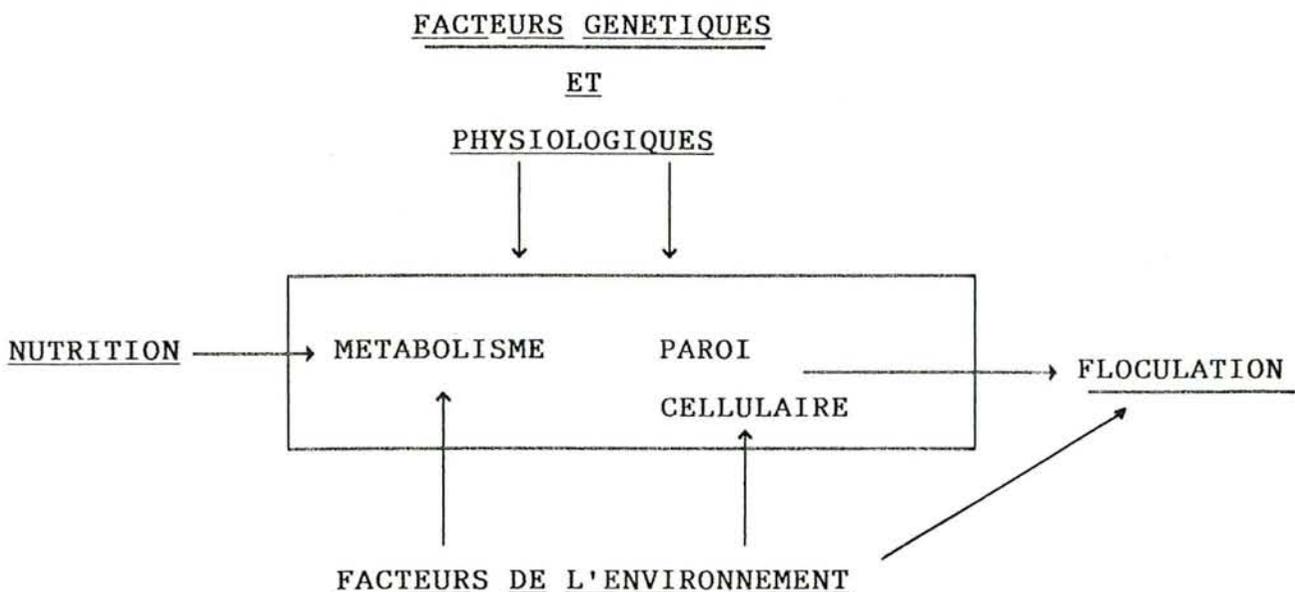


Fig. 1: Facteurs influençant la floculation (ATKINSON et DAOUD, 1976)

III.1. LES FACTEURS GENETIQUES

GILLILAND (1951) et THORNE (1951) ont montré pour la première fois l'aspect génétique de la floculation.

GILLILAND, pour étudier le caractère floculant chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a procédé à plusieurs croisements, il supposait alors que la floculation était un caractère héréditaire gouverné par un seul gène.

De son côté THORNE (1951) a proposé que la floculation de cette levure est gouvernée par au moins trois gènes dominants polymériques, chacun étant suffisant pour conférer à la levure le caractère floculant. Ce caractère peut-être modifié par l'influence d'autres gènes appelés supprimeurs et/ou modificateurs (CLAYTON et al., 1972; ANDERSON et MARTIN, 1975).

LEWIS et JOHNSTON (1974) et LEWIS et al., (1976) ont identifié trois gènes de floculation : deux gènes dominants (FLO 1 et FLO 2) et un gène récessif (Flo 3); la présence d'un seul gène dominant suffit pour l'expression du phénotype de la floculation, il n'y a pas d'effet additif en combinant les gènes.

STEWART et RUSSEL (1977) ont établi la carte des gènes de floculation de *Saccharomyces cerevisiae* Sp₁ et ont pu identifier un quatrième gène dominant supplémentaire désigné FLO 4 chez une souche de cette levure haploïde.

RUSSEL et al., (1980) ont confirmé que ces trois gènes dominants (FLO1, FLO2, FLO4) sont identiques et compris dans un seul locus du FLO1 sur le chromosome N°I (ROTHSTEIN et SHERMAN, 1980) et la distance entre FLO1 et a de 1 est estimée à 37 centimorgan (CM) (STEWART et RUSSEL, 1977).

Récemment, MIKI et al., (1982a) montrent l'existence d'un facteur de reconnaissance cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui s'attache au niveau du site du mannane pariétal et qui est gouverné par l'expression phénotypique du gène dominant FLO1.

LIPKE et HULL, (1984) en étudiant la floculation du mutant *S.cerevisiae tupl*, ont montré que celle-ci n'a pas les mêmes caractéristiques que l'agglutination sexuelle. De plus la floculation de ce mutant est différente de celle gouvernée par le gène FLO 1 particulièrement en ce qui concerne sa sensibilité au pH, aux cations et à l'inactivation chimique.

De leur côté, RUSSEL et STEWART (1972), JOHNSTON (1980, 1981) puis JOHNSTON et READER (1982,1983) ont identifié un autre

gène dominant différent FLO5 qui gouverne le caractère extrêmement flocculant. Ce gène serait localisé sur le chromosome III. A la même époque THORTON et al., (1980) ont mis en évidence, à côté du gène récessif flo3, deux gènes désignés FLO6 et FLO7 chez la levure *Saccharomyces*.

L'expression quantitative de la floculation gouvernée par le gène dominant FLO est complexe et dépend de deux types de gènes: les gènes modificateurs et les gènes suppresseurs (HOLMBERG, 1978; HOLMBERG et KIELLAND BRAND, 1978). Les travaux de ces auteurs ont révélé la présence de deux gènes suppresseurs désignés fsu 1 et fsu 2 qui suppriment chez la levure *Saccharomyces* la floculation gouvernée par le gène FLO1.

Selon JOHNSTON (1981), l'expression phénotypique de la floculation sous le contrôle des différents gènes peut être représentée par le schéma indiqué par la figure 2.

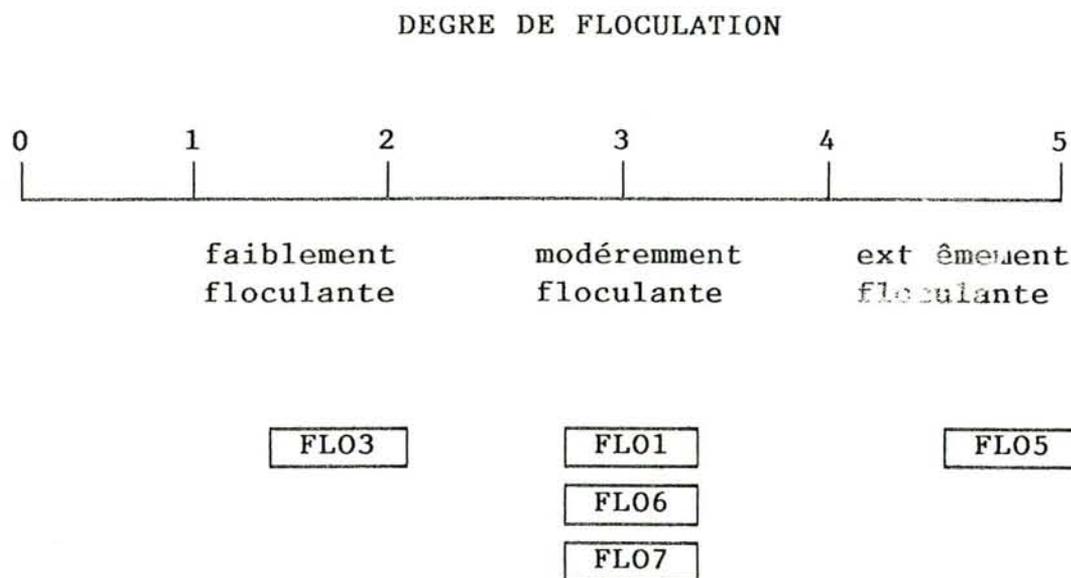


Fig. 2: Expression phénotypique de la floculation sous le contrôle des gènes. (JOHNSTON, 1981)

Des travaux récents (WILKIE et EVANS, 1982; WILKIE 1983; ESSER et al., 1987) supposent que des éléments génétiques extrachromosomiques seraient impliqués dans le contrôle de la floculation. En effet ces travaux montrent que les souches à petites mitochondries provenant de souches flocculantes présentent une baisse significative du degré de floculation par rapport à la souche parentale. Ces résultats permettent de supposer que le génome mitochondrial joue également un rôle

important dans le mécanisme de floculation. Ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'une mutation au niveau de ce génome provoque des changements structuraux de la paroi cellulaire (EVANS, 1983).

Enfin, malgré les nombreux travaux sur les gènes qui contrôlent la floculation les mécanismes qui modifient l'expression de ces gènes dans la floculation reste à être élucidés.

III.2. LES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES

La floculation peut-être affectée par l'âge physiologique des cellules de levures. Selon MILL (1964 a) la formation d'agrégats de *S. cerevisiae* est faible en phase exponentielle puis s'intensifie à la fin de cette phase. Par contre selon NISHIHARA et al., (1976a). Cette levure commence à flocculer pendant la phase exponentielle pour atteindre son maximum à la fin de cette phase. De même AMRI et al., (1979) et HUSSAIN et al., (1986) ont montré que la floculation d'une souche de levure de brasserie, *S. urarum* 0006 survient en fin de phase exponentielle. Par ailleurs, AL MAHMOOD (1988) a observé que *K. bulgaricus* floccule rapidement dès le début de la phase exponentielle.

III.3. LES FACTEURS NUTRITIONNELS

Ces facteurs se rapportent au milieu de culture et sont liés aux exigences de la levure. En effet comme tout microorganisme, la levure a besoin d'une source nutritive équilibrée pour sa croissance et éventuellement sa floculation .

Il est bien connu que toute variation qualitative ou quantitative des éléments du milieu de culture peut affecter la croissance et la formation d'agrégats cellulaires (AMRI et al. 1982). Aussi allons-nous passer en revue l'ensemble des travaux relatifs à l'influence des facteurs sur la floculation.

III.3.1. LES GLUCIDES

De nombreux travaux récents et anciens ont démontré l'action inhibitrice des glucides sur la floculation des levures (BURNS, 1937; KAMADA et MURATA, 1984 b).

Déjà BURNS (1937) montra chez une levure haute que le saccharose inhibe la floculation et qu'une baisse des teneurs de certains sucres en particulier le fructose, le glucose et le saccharose dans le moût correspond au moment de la floculation.

LINDQUIST (1953) puis RAINBOW (1966) ont affirmé que le glucose, le mannose, le maltose et le saccharose dispersent des agrégats de certaines souches de levure .

Les travaux de EDDY (1955) puis ceux de MILL (1966) attestaient que le mannose et le glucose étaient plus actifs que d'autres sucres sur la dispersion des agrégats cellulaires des levures *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs KREBS (1966) puis KIRSOP (1974) ont indiqué qu'un moût enrichi en glucose entraîne une floculation moins intense, par contre NISHIHARA et al. (1976 b) constataient que le glucose était indispensable pour l'induction de la floculation.

De leur côté, TAYLOR et ORTON (1978) ont remarqué que le mannose abaissait spécifiquement l'intensité de la floculation chez la levure de *Saccharomyces cerevisiae*, alors que le glucose le maltose et le fructose étaient sans effet.

Par la suite, AMRI et al., (1979) ont mis en évidence le rôle qualitatif et quantitatif que jouent les sucres sur la floculation de *Saccharomyces uvarum*. En effet, ils montraient qu'une réduction de la concentration en glucose à 5% dans le milieu de culture accélérât la floculation de ces levures. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de KAMADA et MURATA (1984b) sur les levures *Saccharomyces cerevisiae*.

Plus récemment, HUSSAIN et al., (1986) ont précisé le caractère spécifique de l'action des sucres. Ainsi ils montrent le rôle inhibiteur du mannose, du mannose-6-phosphate et des oligosaccharides ayant le mannose comme groupement terminal vis à vis de la floculation de *Saccharomyces uvarum*, et celui du galactose, du galactose-6-phosphate et des oligosaccharides avec comme groupement terminal le galactose vis à vis de la floculation de *Kluyveromyces bulgaricus* ce dernier résultat a été confirmé par MANGUNWIDJAJA (1988) pour les levures *Kluyveromyces lactis*.

III.3.2. LES ÉLÉMENTS AZOTÉS

L'incidence de la source azotée sur la floculation fait l'objet de nombreuses controverses. Selon certains auteurs (MILL, 1964; BAKER et KIRSOP 1972; STEWART et al., 1973), les protéines et/ou les peptides présents dans le milieu de culture seraient des inducteurs de la floculation de certaines souches de levures.

FUJI et HORTE (1975), MORIMOTO et al., (1975) et par la suite FUJINO et YOSHIDA (1976) ont isolé un composé de nature glycoprotéique capable d'induire la formation de flocons.

De même, STEWART et al., (1975) avaient émis l'hypothèse qu'un composé d'origine peptidique, riche en acides aminés dicarboxyliques (Glu et Asp), présent dans le moût de fermentation, était un inducteur de la floculation.

Selon MILL (1964a), les acides aminés basiques (His, Arg) et les sels d'ammonium retardent la floculation quand ils sont en excès dans le milieu de culture, alors que l'acide chloro-aminobenzoïque entraîne une floculation précoce.

Par ailleurs, CALLEJA et JOHNSON (1970) ont montré que la floculation d'une souche haploïde de *Schizosaccharomyces pombe* ne peut avoir lieu en milieu synthétique, pauvre en peptides et en acides aminés.

Plus récemment, AMRI et al., (1979) et SALHI (1986) ont observé que les acides aminés ne semblaient pas jouer un rôle important dans la floculation de la levure *Saccharomyces uvarum*

III.3.3. LES ÉLÉMENTS MINÉRAUX

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des éléments minéraux dans le phénomène de floculation.

Le rôle indispensable du calcium dans le phénomène de la floculation des levures a été prouvé par de nombreux auteurs. Ainsi, MILL (1964 b, 1966) LYONS et HONGH (1970, 1975) ont montré que la présence des ions calcium était indispensable pour la floculation des levures *Saccharomyces*.

Selon certains auteurs des cations bivalents, tels que le magnésium et le manganèse peuvent remplacer le calcium dans certains cas de floculation (STEWART et al., 1973, 1974; TAYLOR et ORTON, 1973. STEWART et GORING, 1976.); toutefois la substitution d'ions magnésium et manganèse au calcium ne peut se faire que dans des conditions particulières de pH; et d'une manière générale, selon MIKI et al., (1982a) le calcium reste un élément indispensable pour la manifestation d'une floculation maximale.

D'autres cations bivalents, en revanche, ont été décrits comme de puissants antagonistes des ions calcium. TAYLOR et ORTON (1973) ont observé que la floculation des levures peut-être inhibée par les ions alcalino-terreux (Sr^{2+} et Ba^{2+}) et les

substances complexant le calcium. Certains auteurs affirment que le strontium entre en compétition avec le calcium dans le mécanisme de floculation, résultat qui a été confirmé par les travaux de NISHIHARA et al., (1986).

De leur côté, STEWART et CORING (1976) ont montré que les ions potassium et sodium induisent la floculation à faibles concentrations. Cependant pour AMRI et al., (1982) le rapport Ca/K dans le milieu de culture semble constituer un facteur déterminant dans la manifestation de la floculation de *Saccharomyces uvarum*.

Il faut aussi signaler que, dès 1965 PORTER et MAC CAULEY avaient montré que l'effet du calcium dépendait du pH du milieu, et que cette dépendance variait d'une souche à l'autre. D'après ces auteurs les souches de levure peuvent être classées en 3 groupes:

- Les souches modérément floculantes qui montrent une réponse limitée aux changements de pH et de calcium.

- Les souches très floculantes dont la floculation dépend plus du pH du milieu que de la concentration en calcium

- Les souches qui flocculent à des pH élevés et n'ayant pas besoin de calcium.

Bien que les ions calcium, magnésium et manganèse jouent un rôle important dans les liaisons intercellulaires des levures (STEWART et GORING, 1976; STEWART et RUSSEL, 1976), les travaux de NISHIHARA et al., (1976 a et b) révèlent qu'il n'y a que le magnésium qui était capable d'induire la floculation de *Saccharomyces cerevisiae*. Cet élément serait indispensable dans le milieu de culture pour que la levure acquière l'aptitude à flocculer ce qui suggère que la biosynthèse de facteurs responsables de la floculation soit induite par le magnésium.

Les modes d'action des ions calcium sur la floculation ont donné naissance à de nombreuses hypothèses. Plusieurs auteurs s'accordent sur la formation des ponts calciques. Ainsi le calcium serait lié par des groupements anioniques des composants pariétaux des cellules adjacentes (MILL, 1964; LYONS et HOUGH, 1970 (a et b) STEWART et al., 1975, JAYATISSA et ROSE 1976; AMRI et al., 1981). Cependant ces auteurs considèrent qu'en plus des ponts calciques ou la neutralisation de charges, le calcium joue un rôle spécifique dans la floculation.

D'ailleurs, selon TAYLOR et ORTON (1978); AMRI et al., (1981) puis MIKI et al., (1982a) les ions calcium interviennent comme cofacteurs en activant les liaisons des composants lectiniques sur les sucres.

Notons enfin que l'action des anions sur la floculation est peu connue bien que LINDQUIST affirmait déjà en 1953, que les ions carbonates, phosphates et fluorures étaient des inhibiteurs de la floculation.

III.3.4. LES VITAMINES

Le rôle des vitamines sur la floculation des levures est peu connu. GHOSH et al., (1969) ont rapporté qu'une déficience en mésoinositol dans le milieu induit la formation d'agrégats chez *Saccharomyces cerevisiae*. Quant à DOMINIGUEZ et al., (1978), une carence en inositol conduit à la formation de filaments. Enfin NISHIHARA et al., (1976) ont observé, de leur côté, le même effet sur la floculation de cette levure cultivée en milieu déficient en inositol.

Plus tard AMRI et al., (1979) ont observé que la présence de mésoinositol ou de l'inositol-pantothénate inhibe la floculation de *Saccharomyces uvarum*.

III.4. LES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE

Les facteurs environnant la croissance de la levure jouent un rôle déterminant dans le phénomène de floculation il s'agit en particulier des facteurs physico-chimiques.

III.4.1. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

D'une manière générale, les fortes températures sont défavorables à la floculation des levures. Ainsi d'après GILLILAND (1951), la levure *Saccharomyces cerevisiae* ne flocule pas au-dessus de 25°C. MILL (1964 a) a montré que les températures de 50°C à 60°C dispersent les agrégats cellulaires, toutefois la dispersion totale n'est observée qu'à partir des températures de 60°C. Dans l'intervalle, de ces températures la dispersion des agrégats cellulaires est réversible. Toujours selon cet auteur, une température inférieure à 10°C provoque l'apparition précoce de la floculation des levures; CALLEJA (1970) a confirmé ce résultat chez *Schizosaccharomyces pombe*.

Pour STEWART et al., (1975), l'effet de la température varie selon les souches dont certaines apparaissent thermo-indépendantes, alors que d'autres perdent leur capacité de flocculer à des températures de 15°C à 20°C.

En opérant dans des conditions d'anaérobiose, AMRI (1980) a observé que la levure *Saccharomyces uvarum* est thermo-indépendante dans l'intervalle de 12°C à 25°C.

HUSSAIN (1983) a montré, de son côté que la défloculation irréversible et totale des agrégats de *Kluyveromyces bulgarius* est obtenue à des températures supérieures à 80°C.

Récemment SALHI (1986) a montré que dans les conditions d'aérobiose, la dispersion totale et irréversible des agrégats de *Saccharomyces uvarum* est obtenue pour des température égales ou supérieures à 100°C.

III.4.2. EFFETS DE L'AGITATION ET DE L'AERATION

D'une manière générale une agitation ménagée est nécessaire pour augmenter la fréquence de contact entre les cellules et de ce fait favoriser l'agrégation. En revanche une forte agitation engendre une turbulence qui diminue indirectement l'intensité de la flocculation.

D'après MARC (1982) la sédimentation des levures se manifeste dans tout milieu non agité. Cependant l'agitation permet, au cours de la fermentation, d'assurer l'uniformité de la suspension de microorganismes de façon à accélérer la vitesse d'échange avec le milieu de culture et d'augmenter la durée de leur contact avec le liquide (SIMON et MEUNIER, 1970).

Ainsi AIBA et NAGATANI (1971) puis GREENSHIELDS et SMITH (1971) et GREENSHIELD et al., (1972), ont observé qu'une forte agitation diminue la flocculation de la levure de boulangerie. Ce résultat a été quantifié par BROHAN et LOUGHLIN (1984), en étudiant les caractères physiques des flocons de *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces uvarum*.

L'aération constitue un paramètre déterminant pour la flocculation. Selon les résultats de STEWART et al., (1975) une teneur en oxygène inférieure à 1 ppm était défavorable à la formation des agrégats cellulaires.

MIKI et al., (1982) ont observé l'inhibition de la floculation de cellules en anaérobiose; l'induction de la floculation peut-être obtenue quand ces mêmes cellules sont cultivées en aérobiose.

PRINCE et BARDFORD (1982) ont réussi à induire la floculation de *Saccharomyces* non floculante par des conditions d'aération contrôlées. DURELL et CLARK (1985) ont confirmé ce résultat dans le cas de *Pachysolen tannaphilus*.

Enfin KIDA et al. (1989) ont expliqué la défloculation des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* en conditions d'anaérobiose par la sécrétion de protéases, par les cellules mortes, qui "digèrent" un éventuel facteur lectinique responsable de la floculation. Ils constatent par ailleurs que la floculation peut-être stabilisée par une aération durant une fermentation en continu.

Dans le cas des levures *Kluyvoromyces lactis*, MANGUNWIDJAJA (1988) a constaté que l'aération améliore la capacité de ces levures à floculer.

III...3. EFFET DU pH

L'agrégation cellulaire dépend étroitement du pH du milieu de culture. MILL (1964a) décrit que la floculation des levures se produit à un pH optimum compris entre 4,5 et 5,5, les pH extrêmes entraînant une dispersion des agrégats cellulaires.

PORTER et MAC CAULAY (1965) ont, par ailleurs, affirmé que les cellules de levures sont inaptées à floculer à des pH inférieurs à 4. Par la suite PATEL et INGLEDEW (1975) ont confirmé les résultats de MILL observant en effet que la floculation est maximale quand le pH du milieu est compris entre 4,6 et 4,9.

Des travaux plus récents étayent ces données à savoir que le pH optimal de floculation des différentes souches de levure est compris entre 4,0 et 5,5 d'une manière générale (HUSSAIN et al. (1986), SALHI (1986).

III.4.4. EFFET DE LA PRESSION DU MILIEU DE CULTURE SUR LA FLOCULATION

Ce facteur a été peu étudié. Cependant selon les travaux de KUMADA et al., (1975) des pressions élevées exercées sur le milieu de culture au cours d'une fermentation industrielle favorisent la floculation. En revanche POSADA et al., (1977) ont affirmé que ce paramètre n'a pas d'effet sur la floculation.

IV. COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA PAROI DES LEVURES

IV.1. INTRODUCTION

Les nombreux travaux relatifs aux parois de levure ont été répertoriés et analysés, par ARNOLD (1981), CABIB et ROBERTS (1982) et FLEET, (1985)...

La paroi, véritable exo-squelette pour la levure, est définie comme un ensemble complexe de macromolécules qui entoure la membrane cytoplasmique. Grâce à sa rigidité, elle assure le maintien de la forme et l'aspect caractéristique de l'espèce. Elle a aussi un rôle protecteur dans la résistance aux pressions externes et internes dues à l'activité métabolique de la cellule. Elle participe, en outre, aux fonctions de perméabilité sélective de la membrane cytoplasmique.

La paroi présente également une activité métabolique grâce à ses nombreuses activités enzymatiques. Chez certaines levures, elle joue un rôle dans leur pathogénéicité (CHATTAWAY et al., 1968). Elle constitue par ailleurs le support des propriétés immunologiques des levures (RASCHKE et BALLOU, 1971; CAMPBELL, 1971; CAWLEY et BALLOU (1972). Grâce à la présence de sites récepteurs des hormones sexuelles, de toxines "Killer" et certains anticorps (FLEET, 1985).

Enfin des travaux variés ont mis en évidence son rôle dans le phénomène de floculation (LYONS et HOUGH, 1970; PHAFF, 1971; RUSSEL et al., 1973; FLEET 1985). Cependant les différentes théories émises sont souvent controversées et révèlent la complexité de ce phénomène.

IV.2. COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS

La paroi des levures représente 6 à 27 % du poids total cellulaire (Mc WILLIAM, 1970). Les premières études relatives à sa composition chimique ont mis en évidence la richesse particulière des parois en dérivés glucidiques constitués essentiellement de polysaccharides neutres (SALKOWSKI, 1894; EDDY 1958; FLEET et MANNERS, 1975) qui peuvent se présenter sous forme de polymères, soit homogènes comme les mannanes et les glucanes, soit hétérogènes comme les glucomannanes, les phosphomannanes et les peptidoglucanes (NORTHCOTE, 1963; PHAFF, 1963). Ces polysaccharides représentent 80 à 90% des constituants des parois de *Saccharomyces cerevisiae*, le reste étant formé en proportion variée de protéines, hexosamines, chitine, lipides et éléments minéraux (BARTNICKI et NICKERSON, 1962).

Notons, par ailleurs, que la teneur en différents constituants de la paroi varie selon la souche de levure (Tableau 3), l'âge et les conditions de culture (SUOMALAINEN et al., 1967; NURMINEN et al., 1970).

TABLEAU 3: Composition chimique moyenne des parois de diverses levures (Constituants exprimés en % de matière sèche)

levures	levure de brasserie (1)	levure de boulangerie (2)	levure de boulangerie (3)	<i>Candida utilis</i> (4)	levure de boulangerie (5)	<i>Nadosnia elongata</i> (6)
polysaccharides	80	60	83	78	83	86
Protéines	12	13	10	9	10	8
lipides	6	8,5	11	1	3	11
cendres	1	3	-	-	-	-

1) Mc WILLIAM, (1970) NORTHCOTE et HORNE (1952)

3) NURMINEN et al., (1970)

4) NOVAES LEDIEU et GARCIA MENDOZA (1970)

5) SUOMALAINEN et al., (1967)

6) DYKE (1964)

IV.2.1 LES MANNANES

Les mannanes de la levure de boulangerie ont été isolés pour la première fois par SALKOWSKI (1894). Ils constituent 25 à 50 % de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* (PHAFF, 1971). Lorsque les mannanes sont extraits de façon ménagée, ils apparaissent liés de manière covalente aux protéines et constituent des mannoprotéines (BALLOU, 1974, 1976).

Ces mannoprotéines peuvent être classées en trois groupes: le premier correspond aux mannoprotéines structurales formant la partie externe des parois et sont associées aux glucanes. Elles constituent les principaux déterminants antéogéniques de la cellule. Le second groupe comprend des enzymes localisées dans l'espace périplasmique, il s'agit davantage de glycoprotéines.

Le troisième correspond à celui des mannoprotéines qui interviennent dans les phénomènes de floculation et d'agrégation sexuelle (BALLOU et al. 1974; AMRI et al., 1982; MIKI et al., 1982a).

IV.2.1.1 EXTRACTION ET METHODES D'ETUDE DES MANNANES

L'intégrité structurale des mannanes dépend des conditions d'extraction auxquelles ils sont soumis. Aussi constate-t-on une évolution des techniques d'extraction qui deviennent plus ménagées et sélectives.

HAWORTH et al., (1937) ont extrait les mannanes par action d'une solution NaOH à ébullition sur des cellules de levure, puis, ils les ont séparés des autres composés par précipitation sous forme de complexe avec le cuivre.

EDDY (1958) soumet des parois de *Saccharomyces cerevisiae* à l'action de la papaine et a précipité une mannoprotéine par la liqueur de fehling.

KORN et NORTHCOTE (1960) ont fractionné les parois de levure avec de l'éthylènediamine et isolé une mannoprotéine soluble dans l'eau.

La faible solubilité des mannanes dans l'eau a permis à PEAT et al., (1961) d'extraire les mannanes à partir de cellules de levure par autoclavage en présence de tampon citrate pH 7.

Par la suite CAWLEY et al., (1972) ont utilisé la pronase qui libère des parois de *Saccharomyces cerevisiae* un phosphopeptidomannane isolé par chromatographie ou précipitation avec du borate et du cétavlon.

BAUER et al., (1972) BUSH et HORIZ BERGER, (1973) et plus tard VALENTIN et al., (1984) isolent le mannane des parois de levure par action de glucanases.

Notons enfin que les mannanes extraits des cellules entières ou des parois par autoclavage sont précipités par la liqueur de fehling; l'extrême basicité de cette dernière conduit à l'obtention de mannoprotéines dégradées. En effet OKUBO et al., (1981) ont constaté une diminution de la réactivité immunologique de telles mannoprotéines.

Récemment ELORZA et al., (1985) ont proposé l'utilisation de détergents dans l'extraction des mannanes de levure.

IV.2.1.2. STRUCTURE DES MANNANES

Les techniques classiques utilisées pour l'étude structurale des polysaccharides ont été appliquées aux mannanes. Nous résumons succinctement les méthodes employées dans le Tableau 4.

TABLEAU 4 : Différentes techniques employées pour l'étude structurale des mannanes

TECHNIQUES	REFERENCES
Hydrolyse acide	HAWORTH et al., (1941) GORIN et al., (1969) YEN et BALLOU (1972)
Hydrolyse alcaline	SANBLAS et CUNNIGHAM (1974)
Acétolyse	PEAT et al., (1961) KOCOUREK et BALLOU (1969)
Méthylation associée à la CPG	LEE et BALLOU (1965) YEN et al., (1967)
Oxydation périodique	CIFONELLI et SMITH (1965) PEAT et al., (1961) THIEME et BALLOU (1971)
Actions enzymatiques	LI et LEE (1972) JONES et BALLOU (1969) GORIN et al., (1969) NAKAJIMA et al., (1976)
R.M.N.	LEE et BALLOU (1965) GORIN et SPENCER (1970)

Les travaux consacrés à l'étude structurale des mannanes ont porté sur diverses espèces. Les premières études structurales ont été réalisées sur les mannanes de la levure de boulangerie. Différentes espèces de levures ont, ensuite, retenu l'attention des chercheurs qui ont travaillé sur des cultures pures obtenues dans des conditions bien définies.

Ces travaux successivement répertoriés par divers auteurs (NORTHCOTE, 1963; PHAFF 1971; GORIN et SPENCER, 1970; BALLOU, 1976; FLEET 1985) conduisent à des résultats qui révèlent une certaine complexité, aussi diverses structures des mannanes ont été proposées.

Très tôt, c'est-à-dire en 1937-1941 HAWORTH et al., ont montré que les mannanes de *Saccharomyces cerevisiae* sont constitués d'une chaîne de base avec des unités mannose liées par les carbones 1 et 2 portant des ramifications en position 6. Ces auteurs ont proposé alors 3 structures possibles (figure 3).

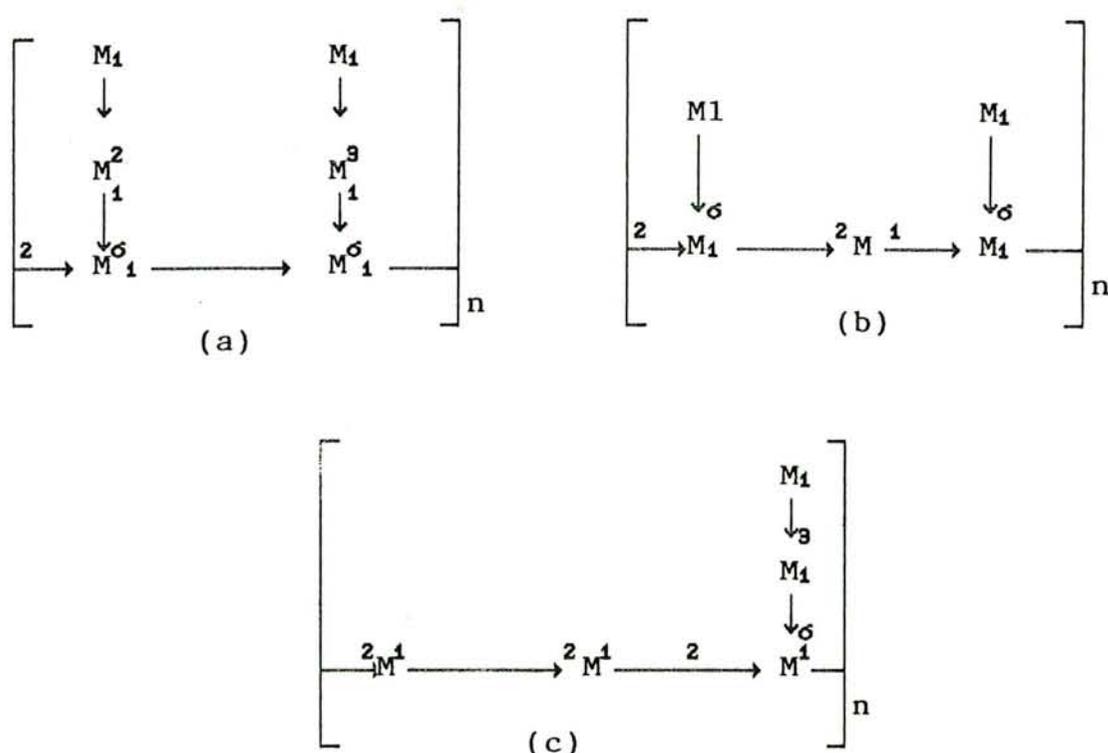


Fig. 3: Schéma des structures possibles des mannanes de levure *S. cerevisiae* (d'après HAWORTH et al., 1941)

n : serait compris entre 30 et 60

Plus tard, PEAT et al., (1961) ont décrit une structure très ramifiée des mannanes avec des séquences formées d'unités α - mannose associées en 1 \rightarrow 6. Ces séquences représenteraient une chaîne latérale sur laquelle seraient fixées des chaînes latérales en position 2 ou 3, constituées également d'unités mannose (figure 4).

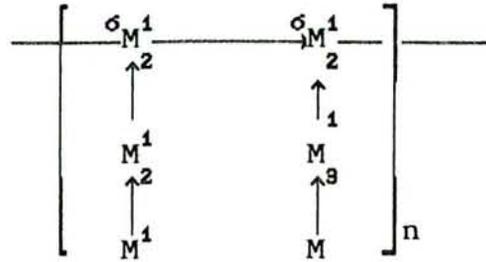


Fig.4: Schéma de la structure des mannanes de la paroi de la levure de boulangerie selon PEAT et al., (1961)

M = α -D-mannopyranosyl

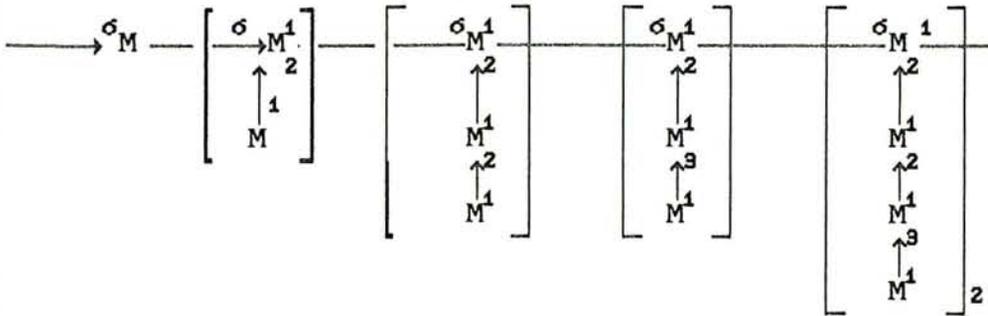


Fig. 5: Structure du mannane de *Saccharomyces cerevisiae* selon STEWART et BALLOU (1968).

M = α -D-mannopyranosyl

Toutefois dans un travail très récent KOGAN et al., (1988 a et b) ont montré que les mannanes de la levure pathogène *Candida krusei*, possèdent une chaîne de base faiblement ramifiée comportant des liaisons (1 \rightarrow 2) et (1 \rightarrow 6) dans un rapport 3/1 (figure 6).

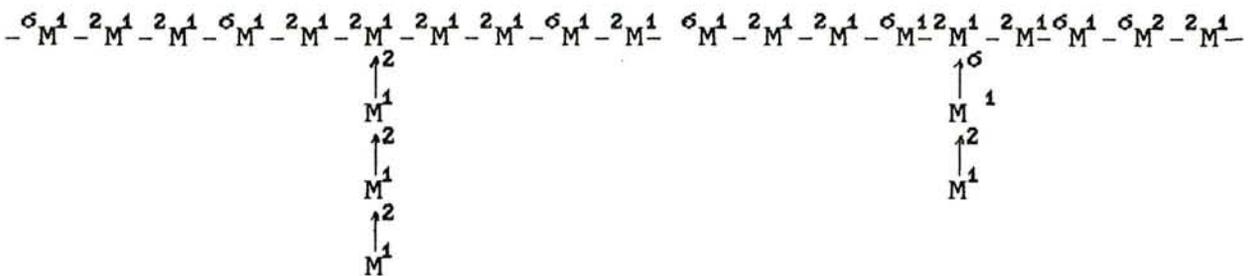


Fig 6: Structure des mannanes de *Candida krusei* selon KOGAN et al. (1988 b) M= α -D-mannopyranosyl

Chez la levure *Kluyveromyces lactis*, BALLOU (1976) a isolé un hétéromannane ramifié dans lequel une molécule de N-acétyl-D-glucosamine est fixée en position 2 sur une unité de mannose d'une chaîne latérale (figure 7). Ce même auteur a, par ailleurs, montré que la N-acétyl-D-glucosamine assure la liaison entre le polysaccharide et l'asparagine alors que la sérine ou la thréonine est liée directement à un oligosaccharide (figures 7, 8 et 9).

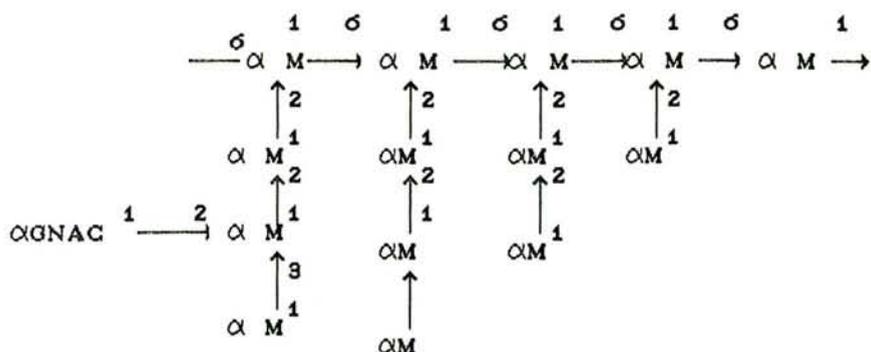
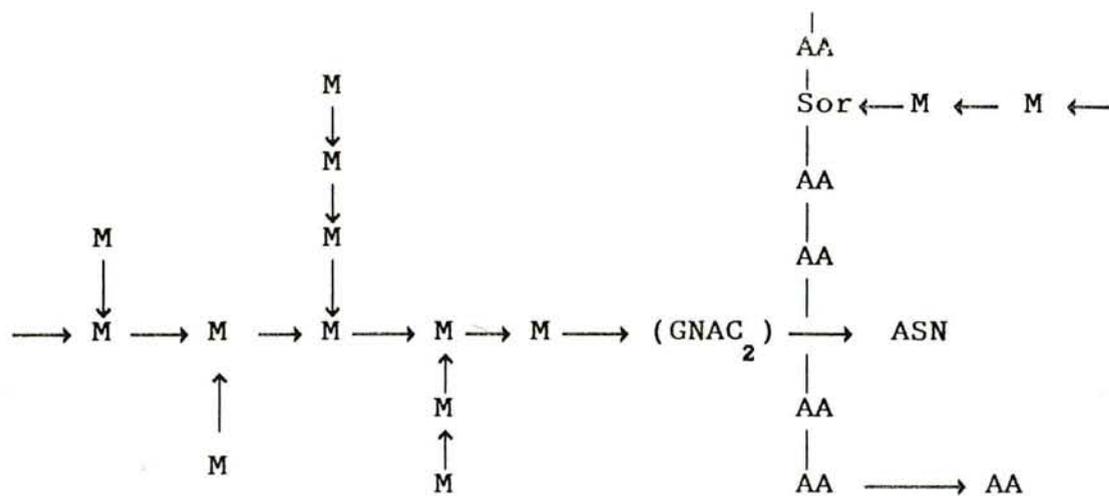


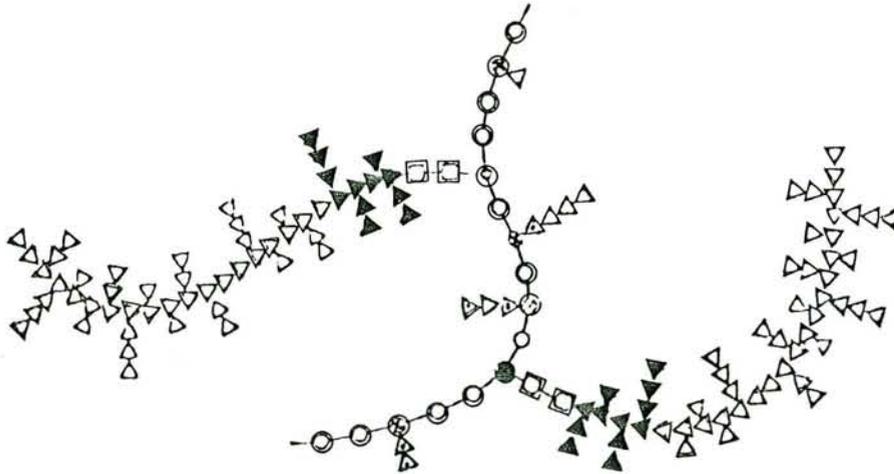
Fig. 7: Position de la N-acétyl-D-glucosamine (GNAC) dans un mannane ramifié de *Kluyveromyces lactis* (BALLOU, 1976).

M = D-mannopyranosyl



AA = Acide aminé
 Ser = Sérine
 ASN = Asparagine
 M = Mannose
 GNAC = N-acétyl-D-glucosamine

Fig. 8: Liaison entre la partie protéique et glucidique dans les mannoprotéines (BALLOU, 1974);



- ⊗● = Résidus d'acides aminés
 △▲▲ = Résidus mannose
 □ = Résidus de N-acétylglucosamine

Fig. 9: Modèle de mannane des parois de levure *Saccharomyces cerevisiae* (BALLOU, 1976).

LELEU et al., (1977) ont isolé des parois de la levure *Torulopsis candida* une mannoprotéine de structure particulière où les unités mannose sont liées en 1 → 2 et que de courtes (chaînes d'oligosaccharides étaient fixées à la sérine par des liaisons O-glycosidiques; tandis que le polysaccharide ramifié à base de mannose est fixé sur l'asparagine de cette même chaîne par une liaison N-glycosidique faisant intervenir une molécule de N-acétyl-chitobiose (figure 10).

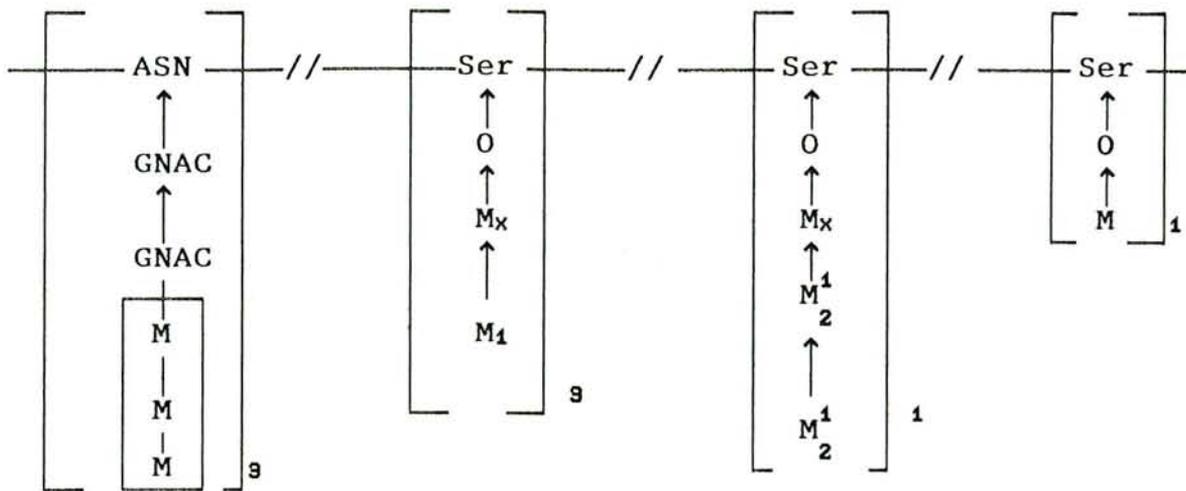


Fig 10 : Schéma de la mannoprotéine de *Torulopsis candida* proposé par LELEU et al., (1977)

ASN = Asparagine
 SER = Sérine
 GNAC = N-acétylglucosamine
 M = α -D- mannopyranosyl

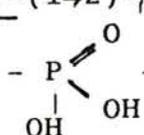
Erfin ZHANG et BALLOU (1981) ont montré que les mannoprotéines de *Saccharomyces kluyveri* sont constituées de petits oligosaccharides liés à la sérine ou à la thréonine et d'une chaîne polymannose (300 unités environ) dont les unités de mannose sont liées à l'asparagine probablement par une unité de N-acétyl-chitobiose.

En conclusion l'ensemble des résultats bibliographiques relatifs aux mannanes des levures permettent de faire au moins trois observations:

- La majorité des mannanes étudiés sont constitués d'unités de α - mannose.

- Les mannanes sont des molécules ramifiées : Ils peuvent être classés en six groupes structuraux définis par SPENCER et GORIN (1973). Le tableau 5 résume ces principaux types structuraux des mannanes des levures.

TABLEAU 5: Différents types structuraux des polysaccharides de levures contenant du mannose d'après SPENCER et GORIN (1973)

CLASSE	CHAINE PRINCIPALE	CHAINE LATÉRALE	CLASSE LEVURE
I	$[(1 \rightarrow 6)\alpha\text{-D-Manp}]_n$	(1 → 3), (1 → 2)-Linked $\alpha\text{-D-Manp}$ (1 → 2), Linked $\beta\text{-D-Manp}$, Galp, Glc p AcNP	Ascomy- cètes
II	$[(1 \rightarrow 3)\alpha\text{-D-Manp}]_n$	GALP, xyIp, Arabp, GAP Fucp, Rhp.	Basidio- mycètes
III	(1 → 6) $\alpha\text{-D-Manp}$ et (1 → 3) $\alpha\text{-D-Manp}$	Faible % de Manp	Ascomy- cètes
IV	$[(1 \rightarrow 3)\beta\text{-D-Manp}$ et (1 → 4) $\beta\text{-D-Manp}]_n$	/	Basidio mycètes
V	Mélange (1 →) $\alpha\text{-D-Manp}$ et (1 → 6) $\alpha\text{-D-Manp}$	Faible % de Manp	Ascomy- cètes
VI	$[-(1 \rightarrow 2)\beta\text{-D-Manp-}$  -D-Manp] $_n$	Manp	

$\alpha\text{-D-Manp}$: $\alpha\text{-D-mannopyranose}$

$\beta\text{-D-Manp}$: $\beta\text{-D-mannopyranose}$

GALP : D-galactopyranose

GLcp : D-gluco-pyranose

Fucp : L-fuco-pyranosyl

ACGNP : 2-acétamido-2-déoxy-D- gluco-pyranosyl

XyIp : D-xylo-pyranosyl

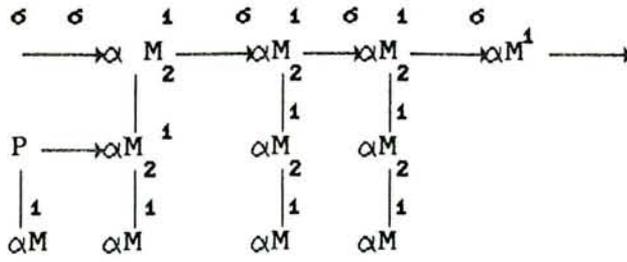
Arabp : L-arabino-pyranosyl

GAP : D-gluco-pyranosyl uranique

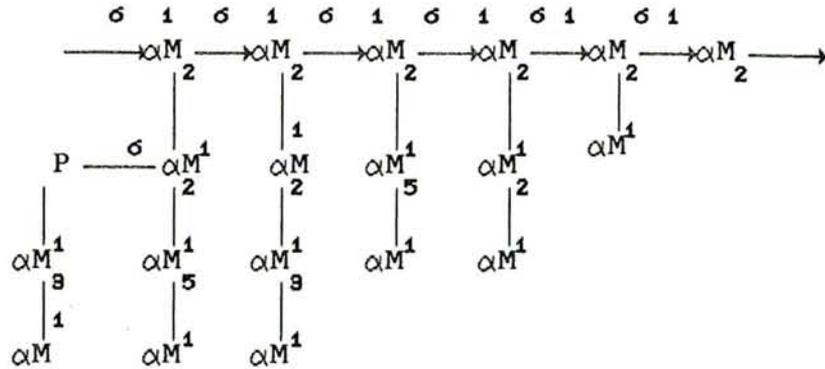
Rhp : L-rhamno-pyranosyl

La plupart des molécules de mannanes ramifiés ont une chaîne principale composée d'unités mannose liées en 1 → 6. Dans ce cas, quatre types structuraux ont pu être définis en fonction de la nature des chaînes latérales constituées quant à elles d'unités de mannose liées en 1 → 2 et 1 → 3. (fig. 11a, b, c, d,).

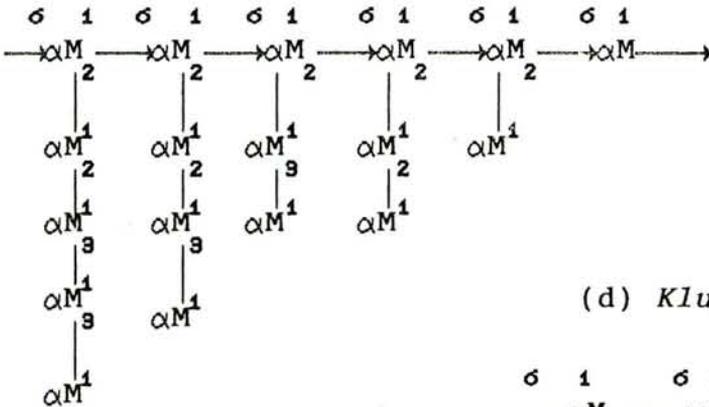
(a) *Kloeckera brevis*



(b) *Saccharomyces cerevisiae* X2180



(c) *Saccharomyces italicus*



(d) *Kluyveromyces lactis*

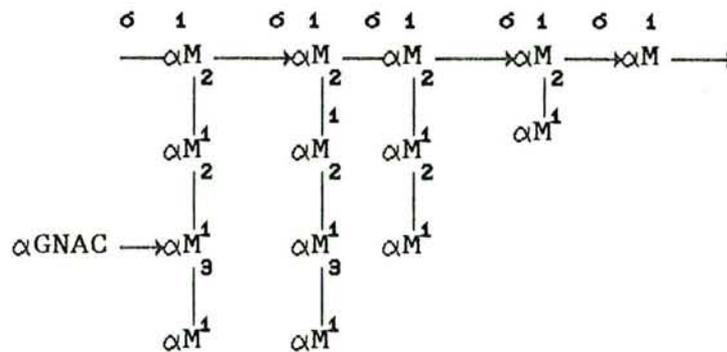


Fig. 11: Types structuraux de mannanes ramifiés dont la chaîne principale est constituée d'unités mannose associées en 1 → 6 (BALLOU, 1976)

IV.2.1.3. LES PHOSPHOMANNANES

L'hydrolyse des mannanes extraits de levure permet d'obtenir un nombre variable de molécules de phosphates. D'une manière générale, la teneur en phosphate varie d'une espèce à l'autre.

Une étude par RMN a permis à GORIN (1973) de montrer que le phosphore est lié en position 6 sur le carbone d'un résidu mannose de la chaîne latérale des phosphomannanes de *Hansenula capsulata* (figure 12).

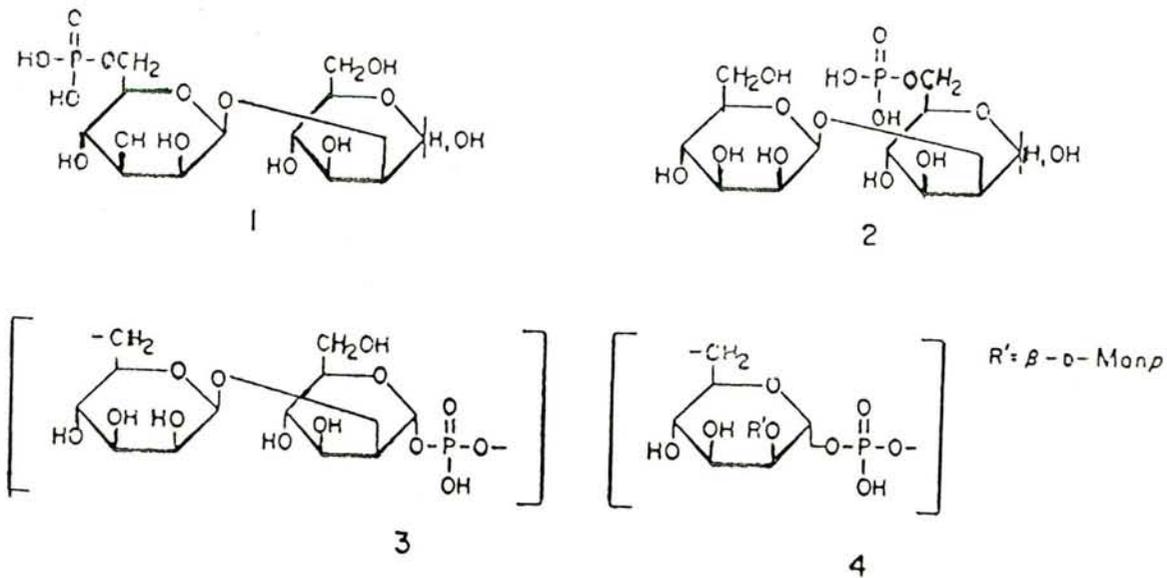
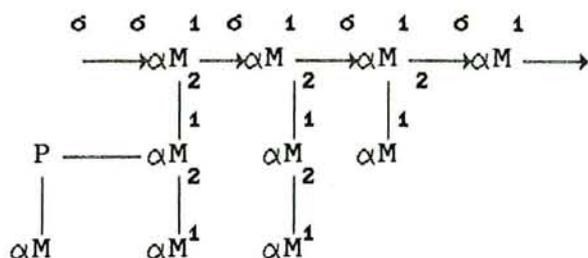


Fig 12: Structure partielle des phosphomannanes (3 et 4) de *Hansenula capsulata* et du mannobiose-6-phosphate dérivé (1 et 2) d'après GORIN (1973). (1 et 3 = Anciennes structures; 2 et 4 = Structures révisées)

RASHKE et BALLOU (1971) puis BALLOU (1980) ont pu séparer des dérivés monophosphates du mannobiose et du mannotriose après hydrolyse ménagée de phosphomannanes.

Selon NAKAJIMA et BALLOU (1974) les groupements sont localisés à l'extérieur de la molécule et liés sous forme phosphodiester au carbone 1 d'un mannose terminal et au carbone 6 d'un autre mannose lié au polyoside principal de la molécule (figure 13).

(a) *Klochera brevis*



(b) *Saccharomyces cerevisiae* x2180

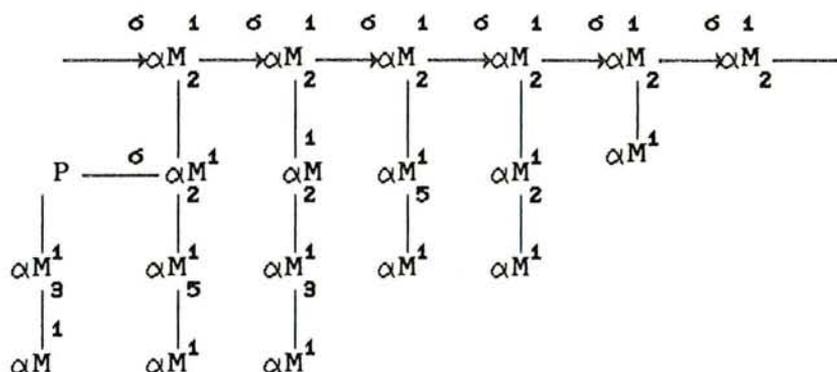


Fig. 13: Liaisons phosphodiesters dans des mannanes ramifiés (BALLOU, 1976)

Récemment SHIBATA et al., (1989) ont proposé pour la levure *Candida albicans* une structure du phosphopeptidomannane constituée d'unités oligomannosides liées entre elles par des liaisons acidolabiles de type β -(1 \rightarrow 2) et liées à d'autres chaînes ramifiées par une liaison phosphodiester (figure 14).

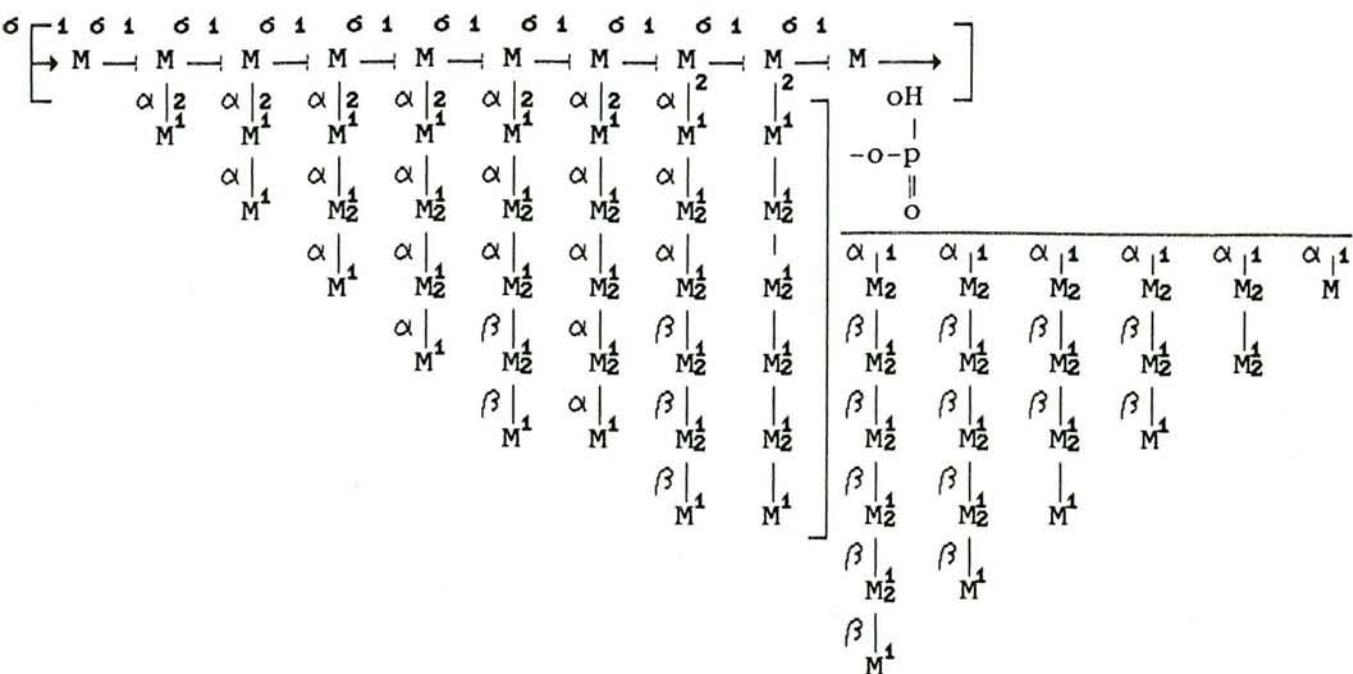


Fig.14 : Structure des phosphopeptidomannanes des formes levure et mycélium de *Candida albicans* NIH A-207 d'après SHIBATA et al., (1989)
M = Mannose

IV.2.1.4. LES GALACTOMANNANES

Dans les parois de certaines levures, il a été mis en évidence la présence d'hétéroglycanes qui renferment en plus du mannose, une teneur non négligeable de galactose.

GORIN et SPENCER (1968) ont isolé des parois de la levure *Trichosporon fermentans*, un polymère qui est constitué de mannose et galactose. Ce polymère a une structure ramifiée comportant une chaîne de base formée de résidus α -mannopyranose liés en (1 \rightarrow 6) et des chaînes latérales α -mannopyranose terminées par un résidu de galactopyranose non réducteur (figure 5).

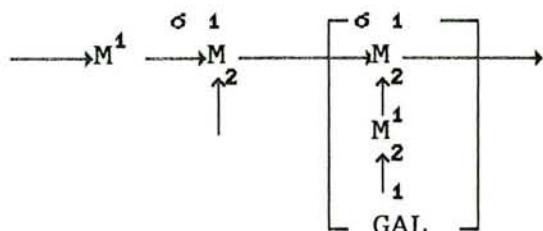


Fig. 15: Structure du galactomannane de *Trichosporon fermentans* (GORIN et SPENCER, 1968).
M = α -D-mannopyranosyl; GAL = α -D-galactopyranosyl

IV.2.1.5. C O N C L U S I O N

L'étude de la structure des mannanes pariétaux des levures par la technique d'acétolyse, couramment utilisée, a permis de mettre en évidence différentes chaînes latérales. Les profils d'acétolyse et les proportions des produits obtenus varient en fonction de la souche (MABLEY et al., 1975; BALLOU et al., 1980; ASPINALL, 1982).

La figure 16 et le tableau 6 donnent un aperçu sur les produits obtenus par acétolyse des mannanes. L'acétolyse est souvent complétée par la méthylation ou associée à la R.M.N.; ces méthodes permettent de préciser le type de liaisons entre les résidus de mannose des chaînes latérales.

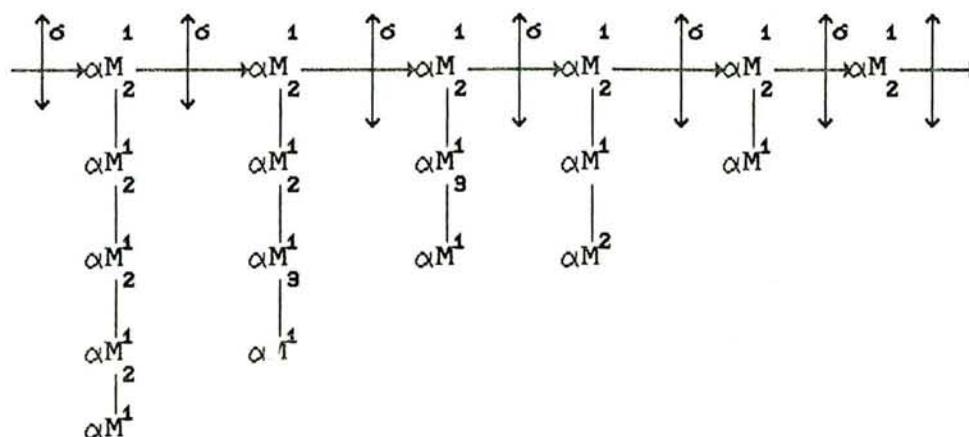
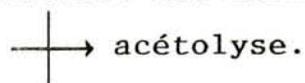


Fig. 16: Structure des mannanes de *Saccharomyces italicus*



Par ailleurs, d'autres méthodes notamment enzymatiques, ont permis une étude sélective des mannanes. En effet la lyse enzymatique libère les oligomannosides non substitués des chaînes latérales (NAKAJIMA et BALLOU 1974 (b); BALLOU, 1976).

La β .élimination permet, quant à elle de détacher sélectivement des oligosaccharides liés à la sérine ou à la thréonine (SENTANDREU et NORTHCOTE, 1968; CAWLEY ET HARRINGTON, 1972; NAKAJIMA et BALLOU, 1974 a).

TABLEAU 6: Oligosaccharides produits après acétolyse partielle de mannanes ayant une chaîne de base liée en 1--> 6 (ASPINALL, 1982)

LEVURES	OLIGOSACCHARIDES
<i>Torulopsisbombicola</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-7}-M$
<i>Torulopsis magnoliae</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-9}-M$
<i>Torulopsis apicola</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-9}-M$
<i>Torulopsis gropengiesseri</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-2}-M$
<i>Saccharomyces rouxii</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-2}-M$
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	$M-(1 \rightarrow 2)-M, M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M$
<i>Trichosporon aculeatum</i>	$[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-7}-M$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$M-(1 \rightarrow 3)-[M-(1 \rightarrow 2)]_2-M, M-(1 \rightarrow 3)-M,$
<i>Saccharomyces fragelis</i>	$M-(1 \rightarrow 2)-M$
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	$M-(1 \rightarrow 3)-[M-(1 \rightarrow 2)]_3-M, M-(1 \rightarrow 3)-M,$ $[M-(1 \rightarrow 2)]_{1-3}-M$
Various <i>Saccharomyces</i> SPP.	$M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M-(1 \rightarrow 2)-M$
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	$M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M-(1 \rightarrow 2)-M$
<i>Debaryomyces hansenii</i>	$M-(1 \rightarrow 2)-M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M-(1 \rightarrow 2)-M$
<i>Hansenula Wingei</i>	$M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M-(1 \rightarrow 2)-M-$ $M-(1 \rightarrow 3)-M-(1 \rightarrow 2)-M$. Possible pour tri-saccharides avec des liaisons, $M-(1 \rightarrow 2)-M$ et $M-(1 \rightarrow 3)-M$

* M = α -D-Manp

Enfin les techniques immunologiques et génétiques combinées ont contribué substantiellement à comprendre la structure fine des mannoprotéines (CAWLEY ET BALLOU, 1972)

L'ensemble de ces différentes techniques a permis à NAKAJIMA et BALLOU (1974 b) d'étudier chez *Saccharomyces cerevisiae*, la structure globale des phosphopeptidomannanes (PPM) dont la structure est représentée par la figure 17.

D'après ces mêmes auteurs, ce PPM est constitué essentiellement de mannose (90%), de protéines (10%) et de phosphates dont la teneur varie selon les souches de levure.

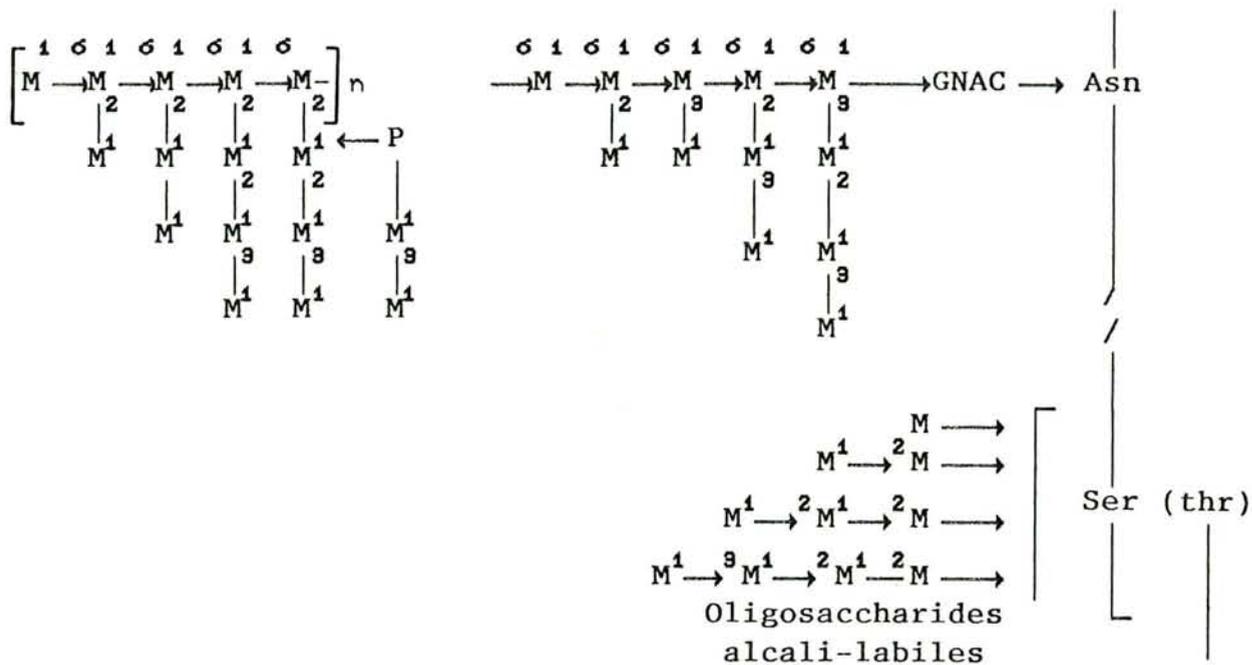


Fig 17: Structure des phosphopeptidomannanes de *Saccharomyces cerevisiae* d'après NAKAJIMA et BALLOU (1974 b)

Asn = Asparagine; GNAC = N-acétylgluco amine; Ser = sérine;
 Thr = thréonine; M = α - D -mannopyranose; P = phosphore;
 = peptide.

Ces auteurs estiment aussi que 10% des unités de mannose constituent les courtes chaînes liées aux protéines par l'intermédiaire de liaisons O-glycosidiques fixées aux résidus sérine ou thréonine. Le reste, c'est-à-dire 90% des unités de mannose, est lié à l'asparagine de la partie peptidique par l'intermédiaire de chitobiose. Ce polysaccharide se différencie en deux parties, un noyau composé d'environ 10 unités de mannose et de 2 résidus N-acétyl-glucosamine et une chaîne externe constituée d'environ 250 unités de mannose dont 70 forment la chaîne de base liée en $\alpha(1 \rightarrow 6)$ sur laquelle sont branchées des chaînes latérales d'oligomannosides renfermant des liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Certaines de ces chaînes latérales sont substituées par des résidusmannosylphosphate et mannobio-sylphosphate.

Dans un travail très récent HERNANDEZ et al., (1989) ont proposé chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae* sauvage et mutante une structure dans laquelle le noyau "INNERCORE" est composé de 8 unités de mannose reliées à l'asparagine de la partie protéique par l'intermédiaire de deux résidus N-acétylglucosamine, tandis que la chaîne externe porte des ramifications comprenant deux à plusieurs unités de mannose selon la mutation (figure 18).

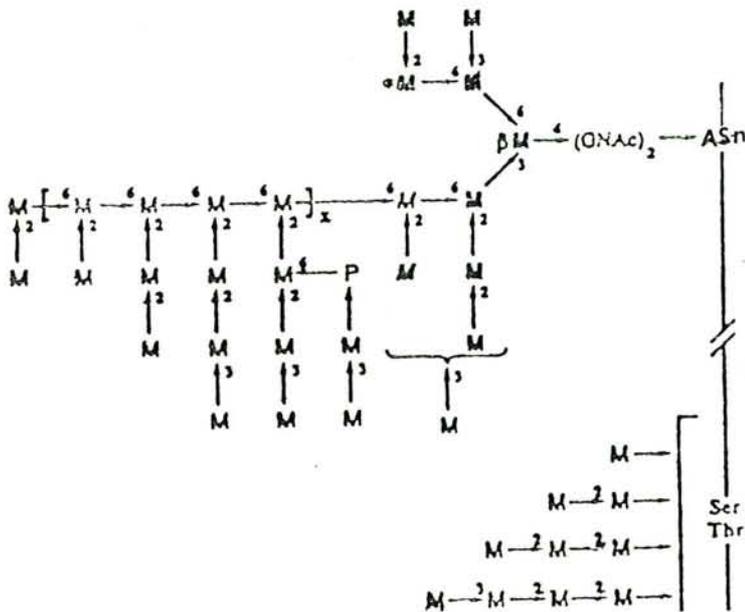


Fig 18: Structure des phosphopeptidomannanes de *Saccharomyces cerevisiae* souches sauvage et mutante selon HERNANDEZ et al., (1989)

IV.2.1.6. BIOSYNTHESE DES MANNANES

Contrairement aux autres constituants de la paroi, les mannanes présentent une voie de synthèse complexe similaire à celle de la synthèse des glycoprotéines des cellules eucaryotes supérieures.

Le processus par lequel les levures élaborent les mannanes pariétaux peut se subdiviser en trois étapes:

- Biosynthèse de la partie protéique ou polypeptidique
- Biosynthèse de la fraction glucidique et sa fixation au niveau de la chaîne polypeptidique.
- Formation des chaînes latérales de la partie glucidique

IV.2.1.6.1. BIOSYNTHESE DE LA PARTIE PROTEIQUE

L'élaboration de la partie protéique se déroule dans le cytoplasme au niveau des ribosomes selon un processus analogue à celui de la synthèse classique des glycoprotéines animales.

Sur la chaîne protéique viennent, ensuite, se greffer les sucres par les liaisons O-glycosidiques. Il a été mis en évidence que la biosynthèse des mannanes dépend directement de celle des peptides pariétaux (KOPECKA et FARKAS, 1979). En effet, FARKAS (1979) a montré que les levures de *S. cerevisiae* cultivées en présence de cydoheximide, antifongique inhibant la biosynthèse des peptides, montrent des altérations pariétales qui se traduisent par une baisse de la teneur en peptides et en mannose.

IV.2.1.6.2. BIOSYNTHESE DES CARBOHYDRATES FIXES A L'AZOTE

L'étude des structures des oligosaccharides riches en mannose et leur synthèse a été réalisée grâce à l'utilisation de mutants bloqués à différentes étapes de biosynthèse (HERNANDEZ et al., 1989a et b); par des inhibiteurs sélectifs de la glycosylation (MEDOWELL, 1988) d'enzymes spécifiques (TARENTINO et al., 1974); qui ont permis d'isoler des intermédiaires oligosaccharidiques.

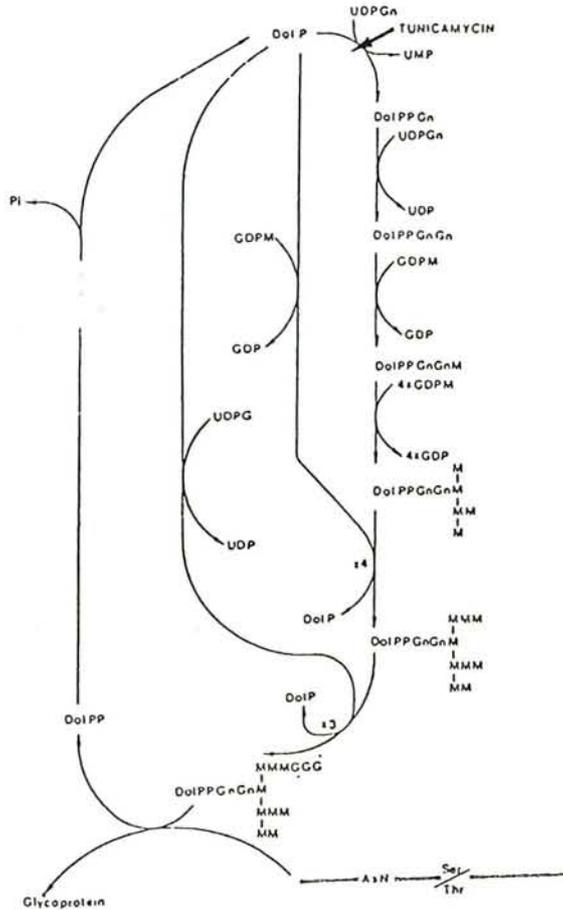
La N-glycosylation dans la levure présente de nombreuses similitudes avec celle qui a lieu dans les cellules animales, au cours des premières étapes de formation de la chaîne glucidique

et elle diffère pour les étapes tardives de biosynthèse ainsi que pour les modifications des chaînes glucidiques qui ont lieu dans l'appareil de Golgi (KORNFELD et KORNFELD, 1985 MONTREUILL et al., 1968).

Cette biosynthèse se déroule en plusieurs étapes:

- Assemblage de la région "Core"

Cette étape a lieu au niveau du réticulum endoplasmique(R.E) et fait intervenir le cycle du dolichol (figure. 19). Selon FARKAS (1989) le dolichol (DOL) est un lipide polyisoprénique linéaire contenant de 12 à 16 unités isopréniques et dont la structure est représentée par la figure 20.



ig. 19 Cycle du dolichol d'après STODDART, (1984)

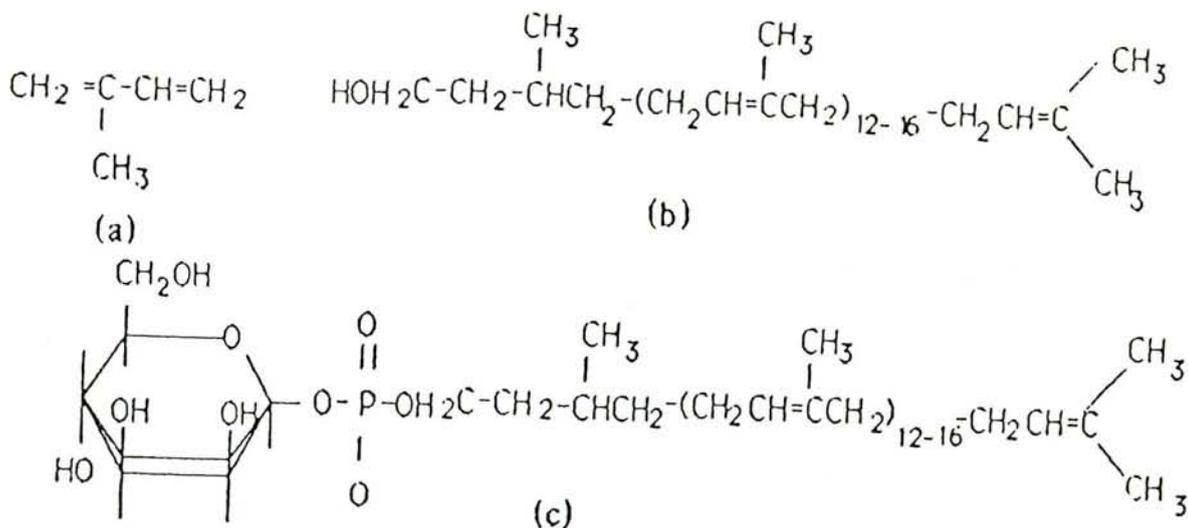


Fig. 20: Structure de l'isoprène (a) du dolichol (b), du dolichol-phosphate mannose de levure selon FARKAS (1989)

Le transfert d'oligosaccharides fixés sur un lipide a lieu sous forme d'esters phosphoriques. L'assemblage est initié par la formation de N,N'- diactétylchitobiose qui est fixé sur le DOL-PP par le transfert successif de deux résidus NAcGLC sous l'action d'une UDP-GLc2: DOL-P transférase. Cette première étape est inhibée sélectivement par la tumicanycine.

Ensuite, sous l'action d'une $\beta(1 \rightarrow 4)$ mannosyltransférase il y a addition de 5 unités de mannose pour former l'intermédiaire DOL-PP-Glc2-Man5. Ces 7 résidus sont ajoutés par l'intermédiaire des oses fixés sur des nucléotides: L'UDP-GLcNAC et le GDP-Man. Enfin il y a addition de 7 nouveaux oses (4 unités de mannose puis 3 unités de glucose) par les intermédiaires DOL-P-Man et DOL-P-GLc pour former la structure "core": Glc3-Man9-GlcNAC2-PP-DOL.

FLORES-CARREON et al., (1990) ont montré que l'assemblage du "Core" devait se faire de façon séquentielle pour que

l'élongation ultérieure puisse avoir lieu. Les réactions de fixation des 3 unités de glycosylation sont catalysées par des glycosyltransférases. Les deux premières unités de glucose sont fixées par une liaison α (1 \rightarrow 2).

RUNGE et al., (1986) ont isolé un mutant alg 8-1 de ces étapes de glycosylation (liée à l'asparagine) qui bloque l'addition du second glucose en α (1 \rightarrow 3), et qui accumule Glc-Man₉-GlcNaC₂ -lipide avant de le transférer sur la protéine.

La voie de biosynthèse de la région du "core" selon KUKURUZINSKA et al., (1987) est schématisée par la figure 21.

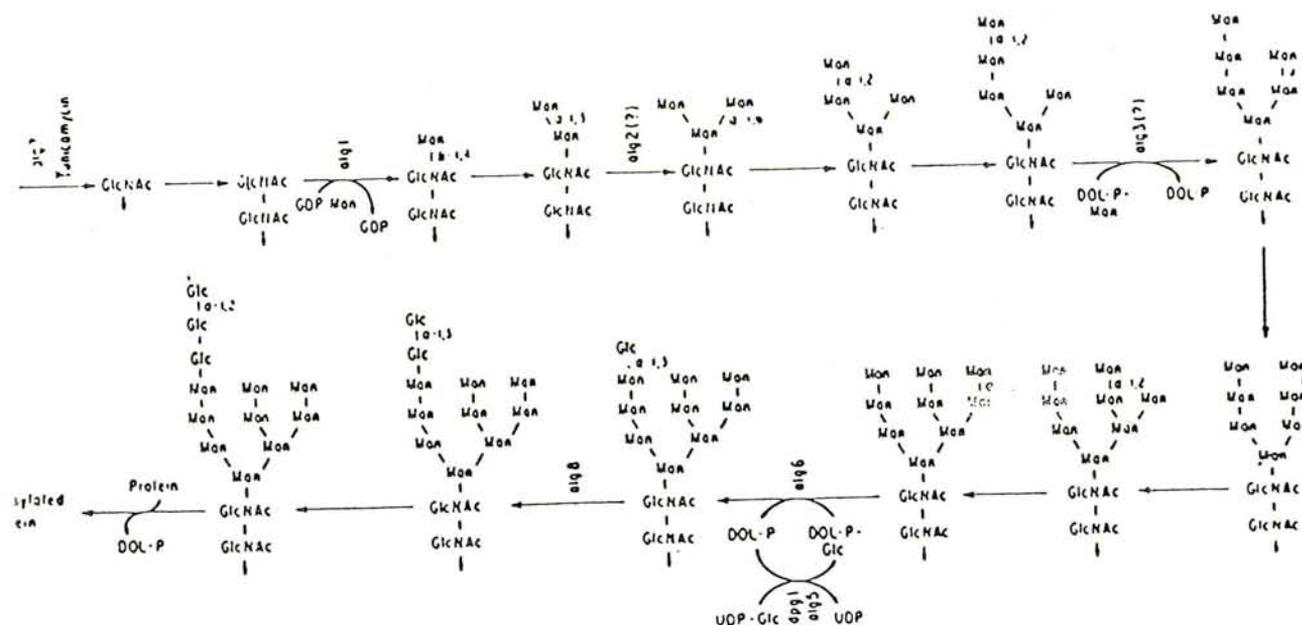


Fig. 21: Voie de biosynthèse de la région "core" (KUKURUZINSKA et al., 1987)

- Transfert du précurseur sur la protéine

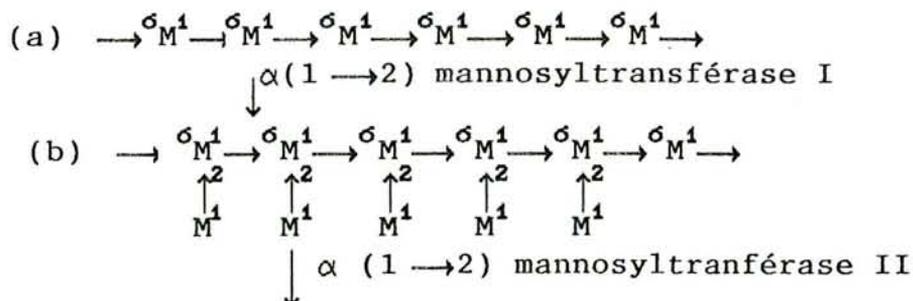
Le transfert du précurseur Glc3-Man9-GlcNaC2 vers l'asparagine de la protéine est catalysé par une oligosaccharyltransférase dont la spécificité est assez large; toutefois in vivo, l'oligosaccharide transféré doit avoir la taille minimale de Man5-GlcNaC2 (SCHARMA et al., 1981);

L'enchaînement des acides aminés du peptide accepteur doit obéir à une séquence particulière. Pour que la N-glycosylation ait lieu, il est nécessaire mais pas suffisant que le peptide contienne la séquence Asn-X-ser/Thr où X peut-être n'importe quel acide aminé, excepté la proline. D'autres facteurs, en particulier, l'accessibilité des sites et le taux de synthèse interviennent dans la N-glycosylation (HUBBARD, 1988).

Selon ZIEGLER et al., (1988), tous les sites ne présentent pas la même sensibilité à l'ENDO H dans la cas de l'invertase ce qui met en évidence le problème d'accessibilité. Par ailleurs GOPAL et BALLOU (1987) ont montré l'existence de processus de régulation de la N-glycosylation par l'inhibition de l'élongation de la chaîne latérale ("Outer chain") par la fixation d'un mannose en α (1 \rightarrow 2) sur le mannose α (1 \rightarrow 5) terminal chez le mutant *mnn9*. Cette inhibition provoque une augmentation du temps de transit lors de la secretion de l'invertase.

- Biosynthèse de l'"outer chain"

L'élaboration et la fixation des chaînes latérales sur la chaîne de base polysaccharide nécessite l'intervention des mannosyltransférases dont le rôle a été mis en évidence par NAKAJIMA et BALLOU (1975), FARKAS et BUER (1976), BALLOU et FARKAS (1976) (figure 22). La figure 23 schématise la formation des chaînes externes des mannanes et leurs ramifications latérales chez *S.cerevisiae* (BALLOU, 1976).



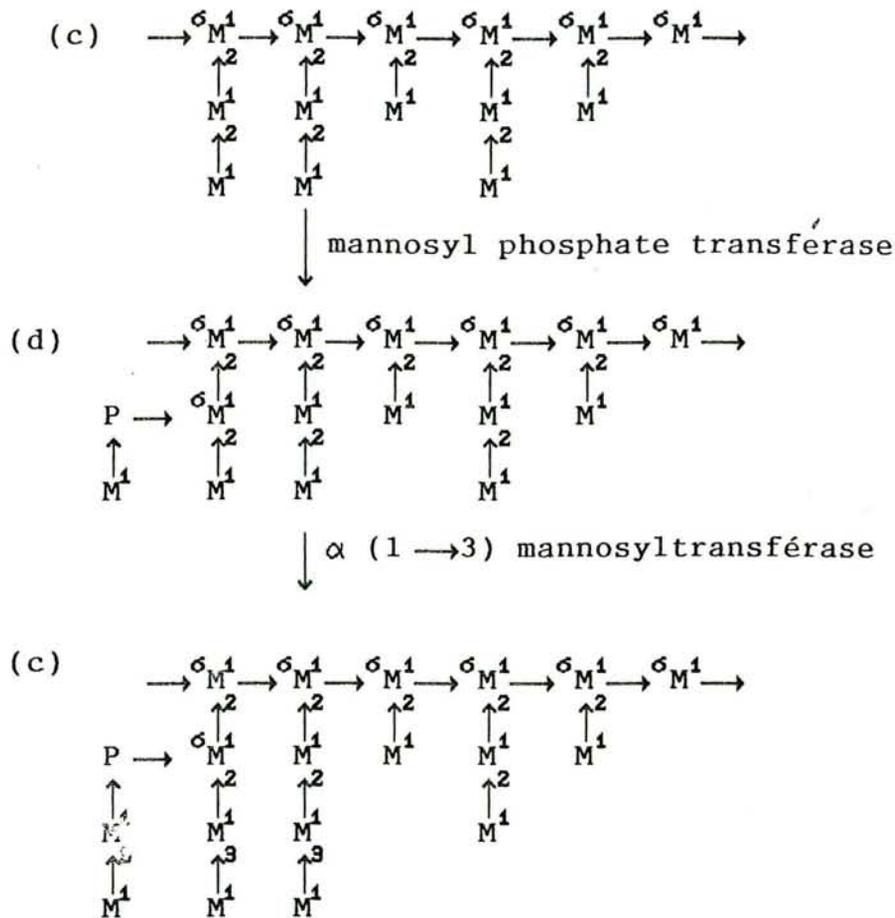


Fig. 22: Schéma de la formation des chaînes externes du mannane et de leurs ramifications latérales chez *Saccharomyces cerevisiae* (BALLOU, 1976)

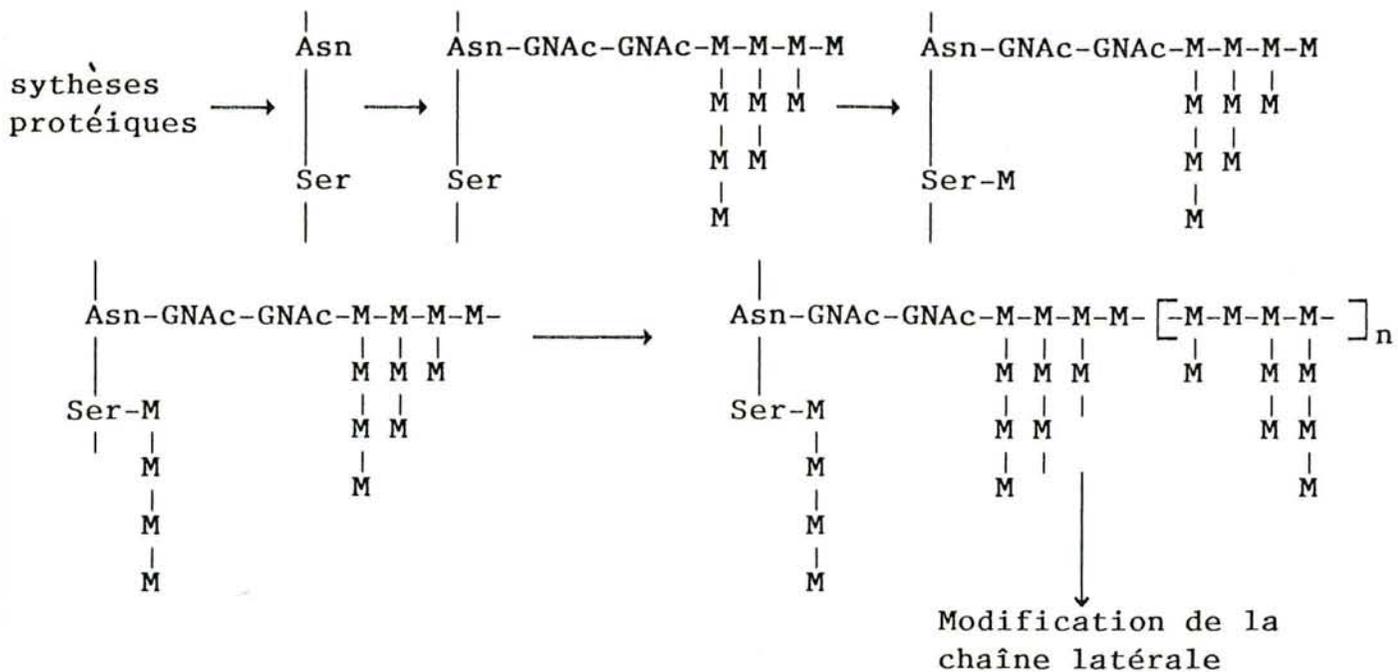


Fig. 23: Schéma de la séquence de glycosylation du mannane chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (BALLOU, 1976).

GNAC = N-acétylglucosamine

M = Mannose

Asn = Asparagine

Ser = Sérine

La région "core" fixée sur la protéine va subir des modifications qui vont conduire à la structure glucidique nature.

Chez la levure, 3 unités de glucose et une de mannose sont coupées pour permettre l'élongation de l'"outer chain". La coupure des résidus glucose est catalysée par deux glucosidases; la première élimine le glucose terminal lié en $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et la seconde libère les 2 autres en $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Le mannose dont la coupure semble essentielle pour l'initiation de l'"outer chain" à partir de l'intermédiaire $\text{Man}_8\text{-Glc-Nac}_2\text{-Protéine}$, est éliminé par une mannosidase (BYRD et al., 1982). Cette enzyme soluble localisée dans le réticulum endoplasmique a été purifiée et caractérisée par JEUNEK KALLY et al., (1988).

L'élongation de l'"outer chain" des mannoprotéines est catalysée par une série de mannosyltransférases impliquées dans la formation de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 6)$ entre les résidus mannose à partir du GDP-Mannose sans intervention d'un intermédiaire lipidique du type dolichol (ROMERO et al., 1989).

L'élongation aboutit à la formation d'une chaîne de 50 à 150 résidus de mannose liées en $\alpha(1 \rightarrow 6)$ avec de nombreuses ramifications en $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Certaines de ces ramifications peuvent être substituées par des mannosylphosphates ou mannosylphosphates. Cette série de réactions se déroule dans l'appareil de Golgi et obéit à la séquence de réactions proposées par KUKURUZINSKA et al., (1987) (figure 24).

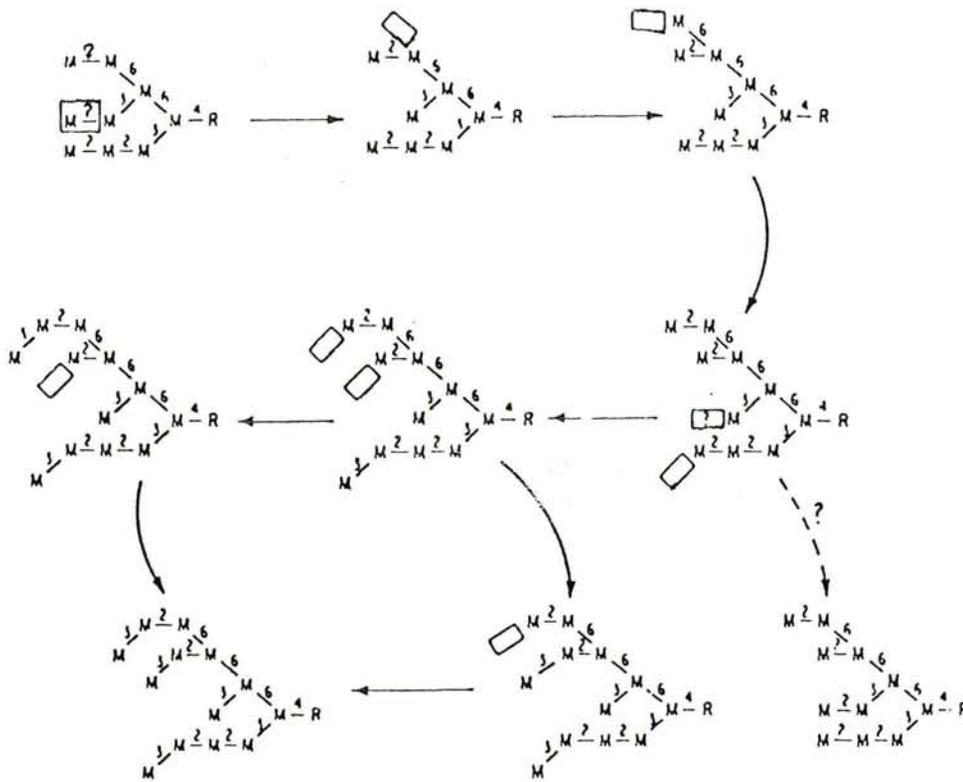


Fig. 24: Voie de biosynthèse de l'"outer chain"
(KUKURUZINSKA et al., 1987)

DOUGLAS et al., 1980) ont montré que les chaînes latérales des mannoprotéines de *K. lactis* pouvaient être modifiées par addition de NaCGLc, ce qui montre que des modifications ultérieures sont possibles.

Selon les travaux récents de BALLOU et al., (1989), la régulation de la chaîne externe est contrôlée par le greffage d'une unité de mannose liée en $\alpha(1 \rightarrow 2)$ en position terminale sur la base.

- Localisation cellulaire

D'après SNIDER et ROGERS (1984), l'intermédiaire Man5-Glc NAC2-PP-DOL serait synthétisé sur la face luminale ou il serait natéré en Glc-Man9-Glc NAC2-Lipide. Toutefois PEREZ et HIRSBERG (1986) ont proposé un modèle de double translocation dans lequel le transfert des deux résidus GlcNac sur le dolichol aurait lieu dans le lumen du RE (figure 25) puis serait transloqué sur la face cytosolique pour y suivre le modèle de SNIDER et ROGERS.

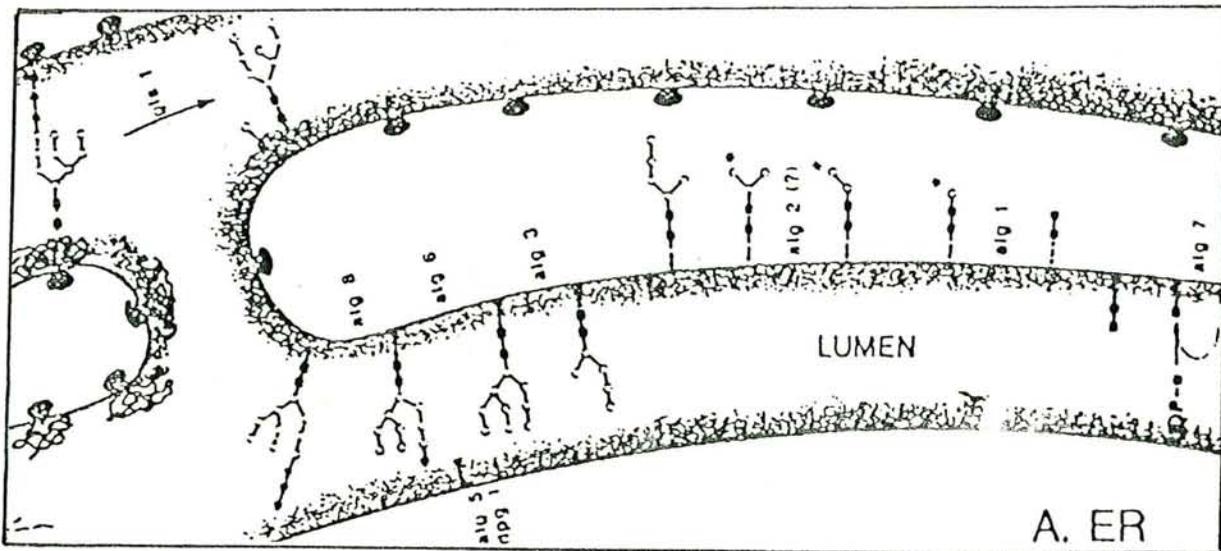


Fig. 25: Modèle de double translocation proposée par PEREZ et HIRSCHBERG (1986) et schématisé par KUKURUZINSKA et al., (1987)

- Sécrétion

Le transfert du précurseur Glc3-Man9-GlcNac2 sur la protéine et la coupure de 3 résidus de mannose et du glucose ont lieu dans le R.E.R. La protéine synthétisée par les ribosomes fixée sur la face externe du RER est transférée dans le lumen au niveau des pores, grâce à la présence du peptide signale qui sera coupé dans le lumen.

Ensuite, selon TANNER ET LEHLE (1987) l'élongation de la chaîne glucidique est réalisée dans l'appareil de Golgi (figure 26) après bourgeonnement des vésicules au niveau de la face cis du RER, qui fusionnent pour former le dictyosome de l'appareil de Golgi.

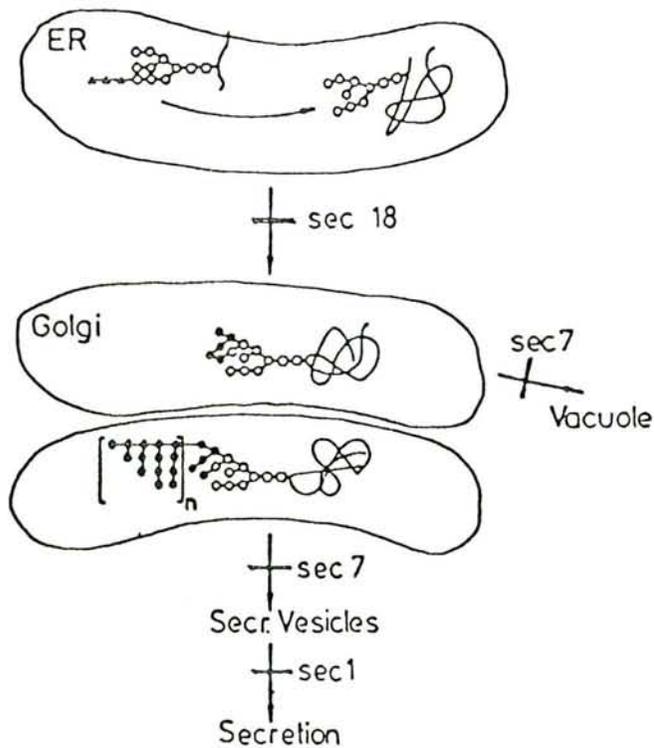


Fig. 26: Schéma d'élongation des chaînes glucidiques dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (TANNER ET LEHLE, 1987)

Selon MURGUI et al., (1985), des vésicules de sécrétion se forment sur la surface trans après condensation des protéines, elles sont libérées dans l'espace périplasmique par exocytose où elles pourront s'accumuler pour être libérées graduellement dans le milieu de culture ou s'intégrer dans la paroi cellulaire.

PELHAM et al., (1988) ont montré que la sécrétion pouvait être due à l'absence de la séquence C terminale HAGL (His-Asp-Glu-Leu) sur la protéine et qu'il existe un système régulateur qui empêche de sortir les protéines possédant cette séquence.

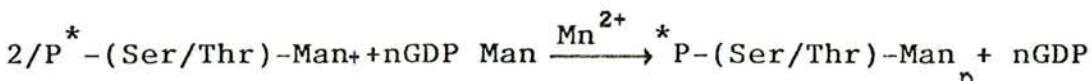
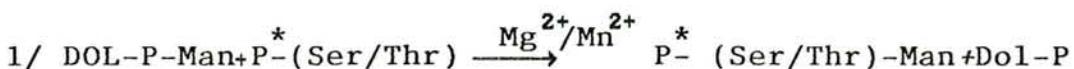
La relation entre la traduction, la translocation et la glycosylation est difficile à établir. Chez la levure, la glycosylation serait une modification cotraductionnelle; toutefois les travaux de ROTHBLATT et MEYER (1986) indiquent que la glycosylation et la translocation peuvent être également post-traductionnelles; ceci suggère que la traduction, la translocation et la glycosylation ne sont pas couplées pour toutes les protéines.

I.2.1.6.3. BIOSYNTHESE DES CARBOHYDRATES FIXES A L'OXYGENE

La voie de la O-glycosylation a été étudiée par l'incorporation, in vivo et in vitro, de mannose marqué dans les protéines et de sa libération par β -élimination en milieu alcalin.

D'après SENTANDREU et al., (1975), ROGERS et al., (1980), COHEN et BALLOU (1981 a et b) et HASHIMOTO et al., (1981) la partie externe du mannane est élaborée à partir de la partie interne avec la participation lipidique.

Récemment TANNER et LEHLE (1987) ont montré que le premier résidu de mannose est transféré sur un acide aminé, la sérine ou la thréonine à partir du DOL-P-Man et jusqu'à 4 autres unités de mannose sont fixées à partir du GAP-Man selon la schéma réactionnel suivant:



P^* représente la protéine

La première étape faisant intervenir le dolichol se déroule dans le réticulum endoplasmique et les suivantes dans l'appareil de Golgi. Les mannosyltransférases catalysant ces réactions nécessitent la présence de cations divalents, calcium et magnésium. La O-glycosylation serait une modification

cotraductionnelle et elle ne requiert pas de séquence particulière de la protéine acceptrice d'un acide aminé la sérine ou la thréonine.

La glycosylation, et tous les mécanismes qu'elle implique, doit jouer un rôle important au niveau cellulaire. Selon TAMMI et al.,(1987) la partie glucidique pourrait jouer, entre autre, un rôle dans le "folding" des protéines au cours de l'assemblage des sous-unités ainsi que dans le processus de transfert vers les vacuoles ou de sécrétion pour le ciblage des protéines.

MIZUNAZA et al.,(1982) et MARSÀ et al., (1987) ont montré que l'utilisation de tunicamycine, un inhibiteur de N-glycosylation a entraîné une inhibition complète de la sécrétion d'invertase et de phosphate, ce qui suggère l'existence d'un lien entre la glycosylation et la sécrétion.

Toutefois BALLOU et al., (1989) ont mis en évidence des mécanismes de régulation de la glycosylation indépendants de la structure glucidique; comme la structure de polypeptides qui seraient impliqués dans le phénomène de sécrétion.

Par ailleurs, de nombreux travaux attestent que les glycoprotéines de la surface cellulaire interviennent dans les interactions et la reconnaissance cellulaire en partie par l'intermédiaire de leurs chaînes glucidiques.

En définitive la biosynthèse des mannanes, se présente donc comme une opération unidirectionnelle c'est-à-dire que l'édification de la molécule se réalise dans un sens parfaitement défini à partir de la structure (AL BASSAM, 1982).

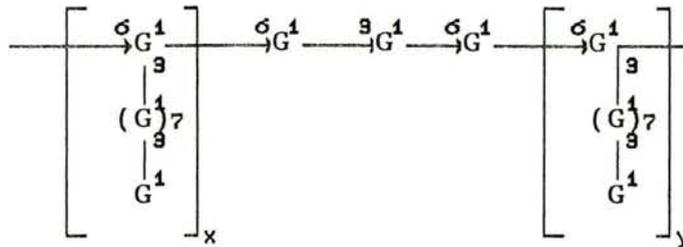
IV.2.2. LES GLUCANES

Les glucanes résultent de la polymérisation de molécules de glucose liées par des liaisons β ou $\alpha(1 \rightarrow 3)$ ou α ou $\beta (1 \rightarrow 6)$. La présence de liaisons $\beta(1 \rightarrow 3)$ et $\beta(1 \rightarrow 6)$ a été confirmée par les travaux de KOPECKA et al., (1974). Ils représentent 30 à 67% des parois selon la souche de levure (FLEET et MANNERS, 1976; CASSONE et al., 1979).

D'après CABIB (1976) les β -glucanes sont localisés au niveau des cicatrices de bourgeonnement et associés à la chitine, ils sont moins solubles en milieu alcalin que les α -glucanes.

IV 2.2.1 STRUCTURES DES GLUCANES

Les glucanes sont constitués par une chaîne linéaire principale portant des ramifications dont le nombre et le degré de polymérisation varient selon le type de levure. MISAKI et al. (1968) ont proposé pour le glucane de *S. cerevisiae* une structure ramifiée en β (1 \rightarrow 6) sur laquelle sont branchées des ramifications en position 3. La structure partielle proposée pour *S. cerevisiae* est représentée par la figure 27.



$$x + y = 40 + 50$$

Fig. 27 : Structure du glucane des parois de levure *Saccharomyces* selon MISAKI et al., (1968)
G = β -D-glucopyranosyl

Pour la même levure, MANNERS et al., (1973) ont proposé une structure d'un glucane ramifié de forme β (1 \rightarrow 3) contenant plus de 3% de liaisons β (1 \rightarrow 6) (figure 28).

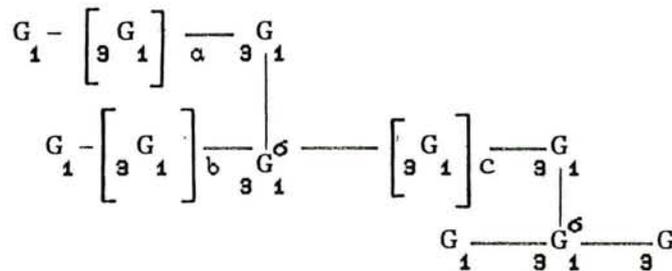


Fig. 28: Structure du glucane β (1 \rightarrow 3) de *Saccharomyces cerevisiae* selon MANNERS et al., (1973)
 $a+b+c= 60$; G = β -D-glucopyranosyl

Par la suite FLEET et MANNERS (1976) ont montré que les types de liaisons impliquées dans les glucanes de *S. cerevisiae* se répartissent de la manière suivante: 80 à 85% de β (1 \rightarrow 3), 8 à 12% de β (1 \rightarrow 6) et 3 à 4% de résidus liés par les carbones 1,3 et 1,6.

Dans les parois de levure *Schizosaccharomyces pombe*, MANNERS ET MEYER (1977) ont identifié deux types de glucanes, l'un contenant essentiellement des liaisons β (1 \rightarrow 6) et l'autre des liaisons β (1 \rightarrow 3).

Plus tard FLEET (1985) a rapporté la présence de 3 types de polymères dans les parois de *Saccharomyces cerevisiae*:

- Un glucane représentant environ 35% de la paroi avec un degré de polymérisation de 1500. Il est insoluble dans les solutions alcalines et d'acide acétique et serait essentiellement constitué de β (1 \rightarrow 6) glucane.

- un deuxième glucane représentant environ 5% de la paroi est insoluble dans l'eau. La molécule est très ramifiée avec un degré de polymérisation de 140. Il s'agit d'un β (1 \rightarrow 6) glucane.

- Un troisième glucane séparé de la paroi par action de la soude représenterait environ 20% de la paroi.

Les trois types de glucanes ont été décrits par différents auteurs en utilisant des techniques plus au moins appropriées d'extraction. Mais la possibilité de dégradation de ces composés au cours de la préparation est toujours possible, par conséquent la structure finie reste à établir.

Notons aussi que pour de nombreuses levures les glucanes ont été peu étudiés; seules les levures *S. cerevisiae* ont fait l'objet d'étude.

IV.2.2.2. BIOSYNTHESE DES GLUCANES

La biosynthèse des glucanes s'effectue dans les membranes intracytoplasmiques puis ils sont transférés au niveau de la paroi par fusion des vésicules de Golgi avec la membrane cytoplasmique (ROGER et al., 1980). Cette biosynthèse nécessite, d'après certains auteurs, la présence d'ions magnésium (NAMBA et KURODA 1974), de glyconuléotides (SENTANDREU et al., 1975), d'enzymes en particulier des glycosyltransférases (LOPEZ ROMERO et RUIZHERRERA, 1978); ces enzymes sont localisées dans le réticulum endoplasmique granulaire.

SENTANDREU et al., (1975) ont révélé, chez *S. cerevisiae* sur des cellules perméabilisées avec un mélange toluène -éthanol, que l'activité synthétase exige l'UDP-glucose comme substrat.

BALINT et al., (1976) ont étudié in vitro la synthèse des glucanes chez cette même levure à partir de fractions membranaires. Deux substrats ont été utilisés, le GDP-glucose et l'UDP-glucose. Le produit dans tous les cas est formé d'unités de β (1 \rightarrow 3) glucose et β (1 \rightarrow 6) glucose. Cependant l'incorporation de substrats obtenus par ces auteurs est faible; les mêmes préparations enzymatiques montrèrent par contre des activités chitine-synthétase beaucoup plus élevées. Le polymère formé par l'enzyme spécifique de l'UDP-glucose contient une plus grande proportion de liaison β (1 \rightarrow 3).

Jusqu'à présent, seuls des systèmes enzymatiques capables d'élaborer des structures β (1 \rightarrow 3) ont été identifiés.

L'activité glucane synthétase a été également décrite chez les formes filamenteuses et bourgeonnantes de *Candida albicans* (ORLEAN PETER, 1982). Récemment KANG et CABIB (1986) ont mis en évidence l'activité β (1-3) glucane synthétase à la fois chez *Saccharomyces*, *Hansenula anomala* et *Neurospora crassa*. Cette particule active a été notamment étudiée sur deux fractions: Une fraction dite soluble et une fraction membranaire. Ces auteurs remarquèrent qu'il n'y avait pas d'activité dans chaque fraction séparée par contre celle-ci pouvait être reconstituée par le mélange des deux fractions et addition de GTP. Ces auteurs suggèrent que la fraction soluble contient une protéine liée au GTP qui module la biosynthèse du β (1 \rightarrow 3) glucane de la paroi des levures, la fraction membranaire contiendrait alors le facteur catalytique. RIVAS et LEZICA, (1987) ont, par ailleurs, isolé et caractérisé d'une algue non photosynthétique *Prothotéca zopfii*, une glycoprotéine primaire dans la synthèse des β -glucanes.

IV.2.3. LA CHITINE

Ce polymère est défini comme étant le matériel insoluble retenu par la paroi après extraction par les acides et les bases. Certains auteurs l'associent à une partie de glucanes et parlent alors de complexe chitine-glucane.

Selon SIETSMA et WESSELS (1982) Chitine et glucanes seraient liés par liaisons covalentes et font intervenir des peptides. Le résidu, d'extraction de la paroi par les acides et les bases, traité à la chitinase conserve toujours l'intégrité structurale de la cellule; par contre l'action d'une association de glucanases et chitinases entraîne une dissolution complète de la cellule.

la teneur en chitine des levures est faible. Elle représente environ 2% de la paroi cellulaire où elle est surtout localisée dans la région des cicatrices de bourgeonnement. La synthèse de la chitine des parois semble être influencée par la nature du milieu de culture (MOULKI et BONALY, 1974).

IV.2.3.1. STRUCTURE DE LA CHITINE

La chitine dans les parois de levure a été identifiée par SCHMIDT (1936) par la mise en évidence de la glucosamine chez les levures filamenteuses. C'est un polymère de N-acétylglucosamine relié par des liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ dont la structure établie par DAVIS et al., (1968) est indiquée par la figure 29.

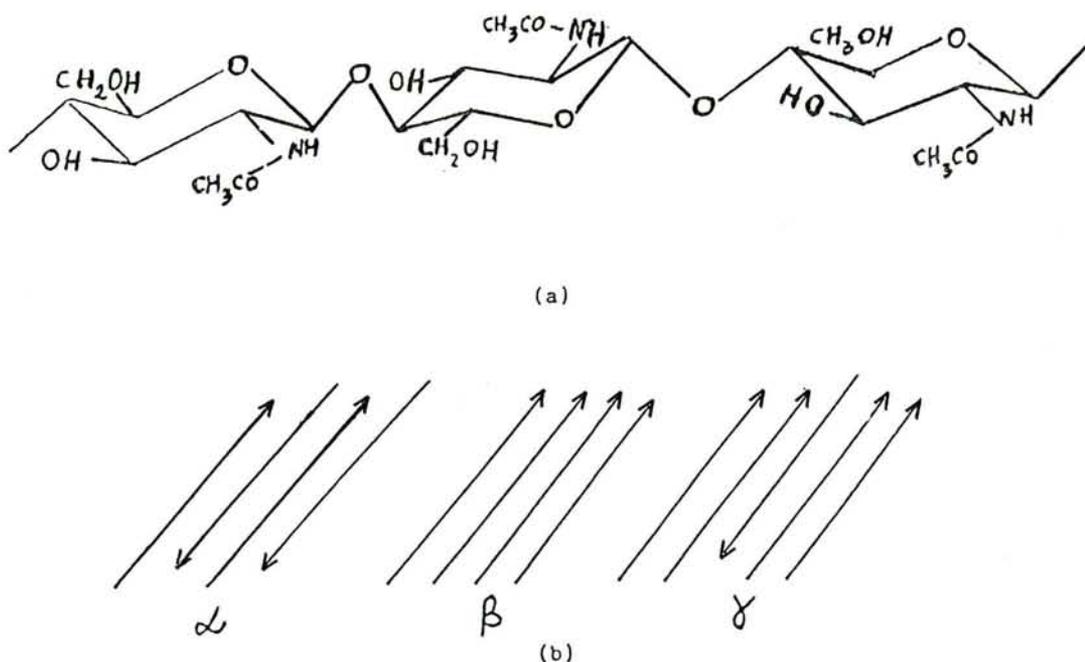


Fig. 29: Structure de la chitine d'après DAVIS et al., (1968) (a) (b). Les trois formes polymorphiques α , β , et δ de la chitine d'après MUZZARELLI (1977).

Selon MUZZARELLI (1977) la chitine se présente sous trois formes polymorphiques dues à l'association des chaînes en α , β et γ (figure 29). On distingue alors:

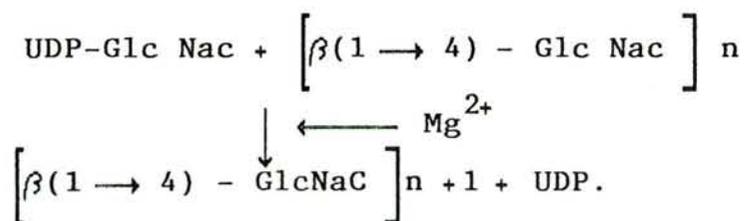
- La chitine α formée de chaînes qui sont associées de manière antiparallèle
- La chitine β dont les chaînes sont parallèles
- La chitine γ est formée de chaînes parallèles et antiparallèles.

La chitine aurait pour rôle de participer au processus de bourgeonnement. En effet, l'inhibition de la biosynthèse de la chitine conduit à l'éclatement des cellules (CABIB et BOWERS, 1970). Elle contribue donc à la formation du septum entre la cellule-mère et la cellule-fille pendant le bourgeonnement (CABIB 1975). Cependant BERAN et REHAREK (1969) ont suggéré que la chitine existerait sous 2 formes dont une constitue un polymère au niveau des cicatrices de bourgeonnement et l'autre dans la paroi sous-forme d'un polymère de structure distinct; ce dernier jouerait un rôle stabilisateur des glucanes

IV.2.3.2. BIOSYNTHESE DE LA CHITINE

C'est FARKAS (1970) qui montra qu'une préparation enzymatique isolée de levures catalyse l'incorporation de N-acétyl-D-glucosamine à partir de l'UDP-Glc-NaC en polymère de chitine.

Selon lui la réaction a pour équation:



Cette réaction nécessite la présence de cations divalents (Mg^{2+}) et de Glc NaC comme activateurs. Elle est catalysée par la chitine synthétase localisée dans la membrane cytoplasmique (ARCHER, 1977; GOODAY, 1977; BRAUN et CALDERONE, 1978).

Les propriétés générales de la chitine-synthétase de *Saccharomyces* ont été décrites dès 1971 par KELLER et CABIB (1978). Ces auteurs ont également mis en évidence un facteur

inhibiteur de cette enzyme dans la fraction d'un lysat de sphéroplastes de la même levure. L'enzyme a été solubilisée et partiellement purifiée par DURAN et CABIB (1978) à partir de fractions membranaires. L'enzyme purifiée exige un phospholipide pour son activité. HERRERA et al., (1975) ont retrouvé l'activité chitine-synthétase à la fois dans les fractions pariétales, microsomales et mitochondriales. L'activité spécifique maximale est obtenue à la fin de la phase exponentielle de croissance.

Récemment SUBURIATI et CABIB (1986) et CABIB (1988) ont caractérisé deux types de chitine-synthétase (ch₁ et ch₂) l'une localisée dans la membrane et l'autre au niveau de la paroi.

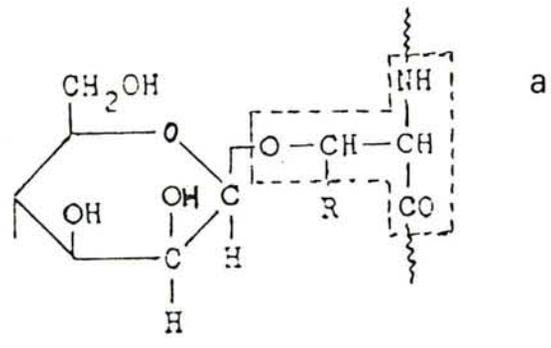
IV.3. LES PROTEINES

IV.3.1. LES PROTEINES DE STRUCTURE

Les différentes études sur la composition chimique des parois de levures révèlent que la teneur en protéines varie selon les espèces, l'âge des cellules et les conditions de culture. Les protéines constituent 10 à 18% de la paroi de *S. cerevisiae*; cependant, LELEU (1977) a trouvé 34% dans les parois de *candida tropicalis* cultivée sur n-paraffines.

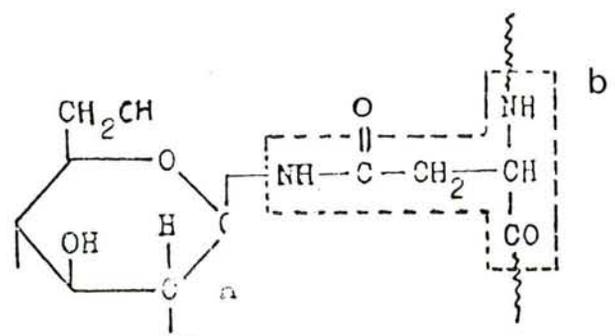
Les profils en acides aminés des protéines pariétales, généralement obtenus, font apparaître une prédominance d'acides aminés dicarboxyliques et d'acides aminés hydroxylés (COLONNA et LAMPEN 1974; AMRI et al., 1982).

Les protéines pariétales sont liées de façon covalente aux mannanes. Les liaisons impliquées sont du type O- et N-glycosidique (figures 30 et 31) (MONSIGNY et al., 1968; BALLOU, 1976).



mannose

R = H pour sérine
 R = CH₃ pour thréonine



[N-acétylglucosamine]₂

asparagine

Fig. 30: Liaisons glucoside-protéine retrouvées au sein des glycoprotéines.

- a) Liaisons O-glycosidique
- b) Liaisons N-glycosidique

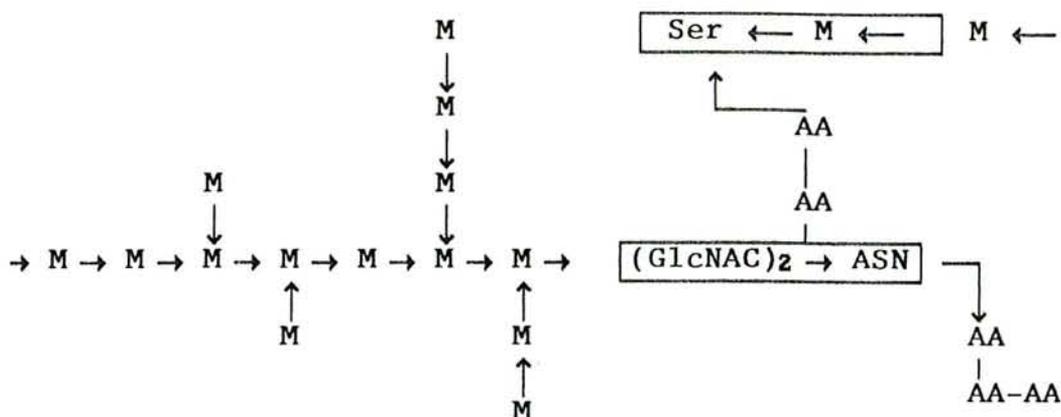


Fig. 31: Liaisons entre la partie protéique et glucidique dans les mannoprotéines (BALLOU, 1976)

AA = Acide aminé
 Ser = Sérine
 ASN = Asparagine
 GlcNaC = N-acétyl -D-glucosamine

Les protéines pariétales, malgré leur faible teneur, jouent un rôle important dans la vie cellulaire; elles participent à la formation et au maintien de la structure de la paroi.

LAMPEN (1968) en particulier a caractérisé dans différentes parois de levures des catalases, des phosphatases, des phospholipases.... Par ailleurs des enzymes endogènes telles que les β -glucanases sont excrétées par la levure, elles participent à la morphogénèse cellulaire.

IV.4. LES LIPIDES PARIÉTAUX

Les parois contiennent une faible teneur de lipides variable de 2 à 14% selon la souche de levure, l'âge et les conditions de culture, ou encore selon la morphologie du microorganisme (BIANCHI, 1967; COMBS et al., 1980).

Les lipides pariétaux sont constitués essentiellement de glycérides avec prédominance de résidus d'acides gras (acide palmitique et acide oleique). Toutefois SUOMALAINEN et NURMINEN (1970) ont constaté que l'acide palmitique est le constituant le plus important dans la paroi de *S. cerevisiae*.

Le rôle des composés lipidiques dans la biosynthèse des mannanes a été mis en évidence par JUNG et TANNER (1973) et MANACHINI (1973). Les lipides pariétaux peuvent s'associer aux polysaccharides pour former des complexes glucolipidiques (STODOLA et al., 1967; MANNIFLLO et al., 1979). Ces glycolipides auraient un rôle dans l'immunogénéicité de *Candida albicans*, et seraient responsables de la virulence de cette levure (ISEMBERG et al., 1963).

La pathogénéicité de *C. albicans* est liée à sa forme mycélium; BALMAN et CHAFFIN (1979) et YANO et al., (1982) ont montré que la forme mycélium renferme plus d'acides gras polyinsaturés que la forme levure.

Par ailleurs, POULAIN et al. (1985) ont confirmé la présence de lipides au niveau des structures périphériques cellulaires et leur association aux polysaccharides. DAVIS et al., (1982) ont suspecté les lipides d'avoir un rôle plus au moins important dans le phénomène d'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales. En effet, GHANNOUM et al., (1986 a et b; 1987) ont d'abord observé que le taux de lipides polaires et celui des lipides non polaires dans la forme mycélium de *C. albicans* est plus important que dans la forme levure. Par la suite, Ces auteurs ont montré que les extraits lipidiques de *C. albicans* et *C. tropicalis* inhibent l'adhérence de ces levures aux cellules épithéliales.

IV.5. LES IONS MINÉRAUX

Les parois des levures contiennent généralement du calcium, sodium, manganèse, fer, cuivre et des phosphates. CHARPENTIER (1979) a obtenu à partir de phosphopeptidomannanes de *Candida tropicalis* des teneurs de 0.3% de phosphates et 0.3% de cuivre.

Les ions calcium sont présents à des teneurs variables dans les parois et leur rôle dans la floculation a été mis en évidence dans de nombreux travaux entre autres ceux de STEWART et RUSSELL (1981).

AMRI et al., (1982) ont montré que la teneur en calcium et en magnésium diminuait dans les parois de *Saccharomyces uvarum* en phase stationnaire. Ils ont également observé que les parois de cette levure non floculante sont plus riches en calcium que celles des levures floculantes. Cependant cette observation n'est pas toujours vérifiée. En effet SALHI (1986) a trouvé que les parois des levures floculantes sont plus riches en calcium que celles des levures non floculantes, soit 0.11% et 0.064% respectivement. Ces auteurs ont, toutefois, cultivé les levures dans des milieux différents.

Par ailleurs, AMRI et al., (1981) ont montré que les souches de *S. uvarum* floculantes fixaient plus de calcium que les souches non floculantes.

Le rôle des ions calcium dans la floculation est très discuté par de nombreux auteurs. Selon certains (STEWART et al., 1975; YATISSA et ROSE, 1976; AMRI et al., 1981) les ions calcium servent à établir des ponts calciques entre les cellules alors que d'autres (TAYLOR et ORTON, 1978; MIKI et al., 1982) considèrent les ions calcium comme des Co-facteurs qui interviennent dans un phénomène de reconnaissance moléculaire (lectine-recepteur).

Les ions phosphates présents dans les parois sont impliqués dans la formation des macromolécules (Phosphopeptidomannanes). Ils sont liés aux peptidomannanes soit par des liaisons phosphodiesters soit par des liaisons phosphomonoesters (STEWART et BALLOU 1968; PHAFF, 1971; THEME et BALLOU, 1971; BALLOU, 1982).

Selon MILL (1966) et LYONS et HOUGH (1971) le degré de phosphorylation des mannanes est plus important dans les parois des levures floculantes que celles des levures non floculantes. Pour LYONS et HOUGH (1971), un degré de phosphorylation élevé de la couche superficielle (phosphopeptidomannanes) de la surface cellulaire est nécessaire pour la fixation des ions calcium au cours de l'agrégation cellulaire.

IV.6. MORPHOLOGIE DES PAROIS DE LEVURES.

Les parois de levure ont toutes une structure multicouche; le nombre de couches est propre au genre, à son état physiologique et aux techniques de fixation et de coloration employées .

D'une manière générale la structure des parois comprend essentiellement deux zones: une zone périphérique occupée par des phosphopeptidomannanes et une zone profonde constituée d'une matrice à base de complexe glucane-chitine associée à des traces de mannoprotéines. Entre ces deux couches, une zone comporte des enzymes liées ou non aux autres structures pariétales. L'association des différents éléments forme une structure qui confère à la paroi un aspect fibrillaire. Chez certaines espèces il y a une gaine (mucilagineuse) tout autour.

Les études sur l'ultra-structure des parois concernent particulièrement les levures *Saccharomyces* et *Candida* (POULAIN et al., 1978 TRONCHIN et al., 1979; AL BASSAN 1983). La paroi de *Saccharomyces cerevisiae* apparaît constituée de l'extérieur vers l'intérieur:

-D'une couche superficielle très dense aux électrons de 45 à 55 nm.

- Un deuxième feuillet de densité moyenne dans toutes les directions.

- Un troisième feuillet d'épaisseur variable

- Un quatrième feuillet très dense également et étroitement collé à la membrane cytoplasmique et se confond souvent avec le troisième.

Différents types de structure ont été proposés et correspondent à l'évolution dans le temps des hypothèses retenues sur la structure des parois de levures.

LAMPEN (1968) a préconisé un schéma de la structure des parois de *S. cerevisiae*, caractérisée par la présence de deux couches distinctes: l'une externe qui est à base de mannanes reliés entre eux par des ponts phosphodiester et l'autre interne, constituée d'une zone de glucanes (figure 32).

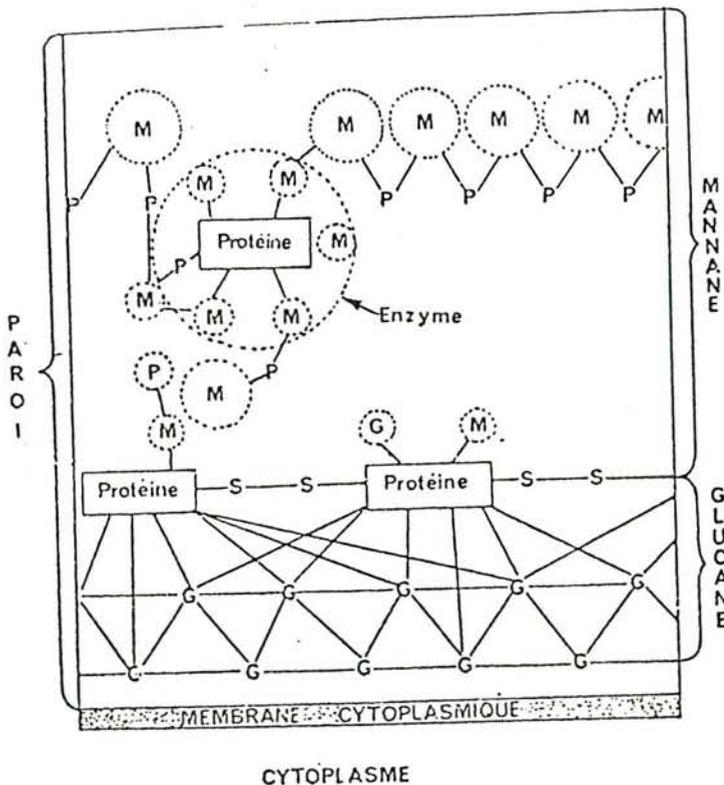


Fig. 32: Représentation schématique de la structure de la paroi de levure *Sacharomyces cerevisiae* d'après LAMPEN (1968)
M = Mannane; G = Glucane; P = Phosphore; S = Soufre

En se basant sur un ensemble de données, BONALY (1974) a établi un autre schéma de structure pour les parois de certaines levures. On distingue trois zones, dont une superficielle est composée de mannoprotéines liées entre elles par des liaisons phosphodiesters et des liaisons peptidiques. Une autre zone interne formée de glucanes et de chitine. Dans l'espace entre les deux couches se trouvent des enzymes; cependant, une telle localisation est, actuellement, controversée (figure 33)

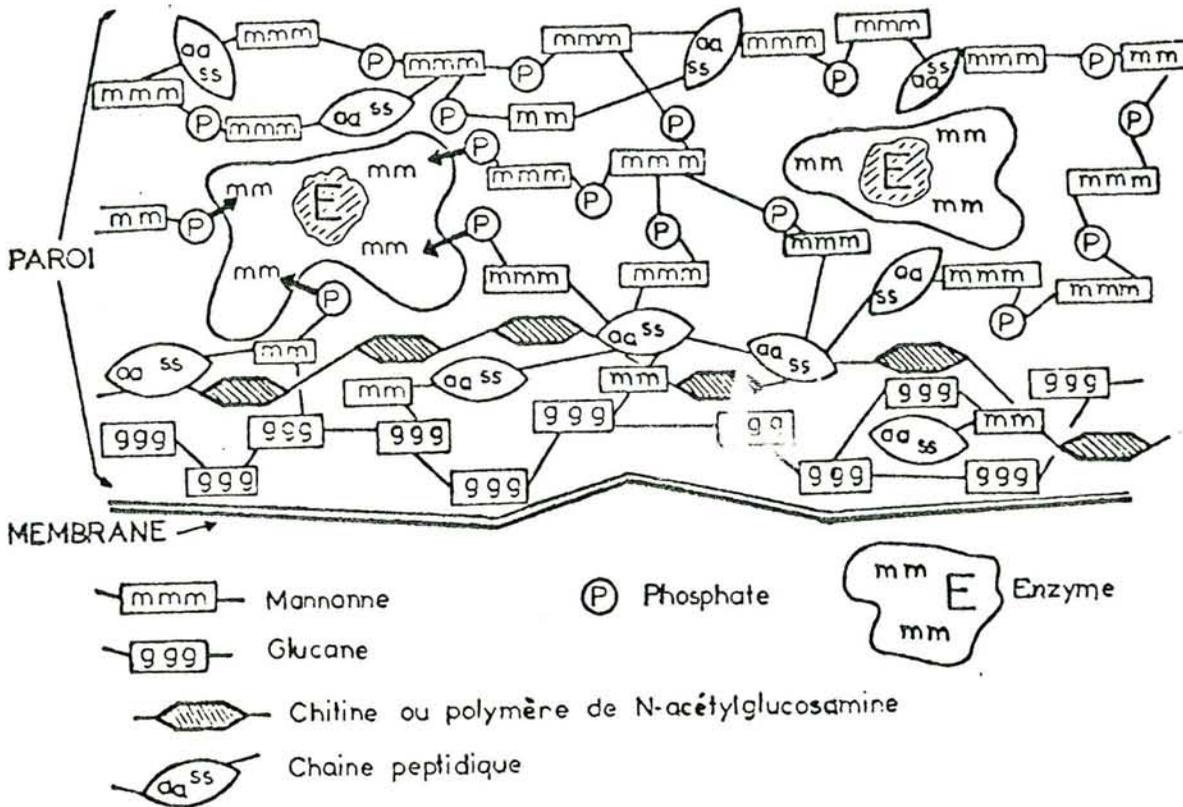


Fig. 33: Schéma général de la paroi de certaines levures des genres *Saccharomyces* et *Candida* (BONALY, 1974).

Des travaux ultérieurs devaient conduire FARKAS (1979) à proposer un autre schéma de structure selon lequel les mannanes sont également reliés entre eux par des liaisons phosphodiesteres mais le rôle des ponts disulfures dans les chaînes protéiques ou peptidiques est accentué (figure 34).

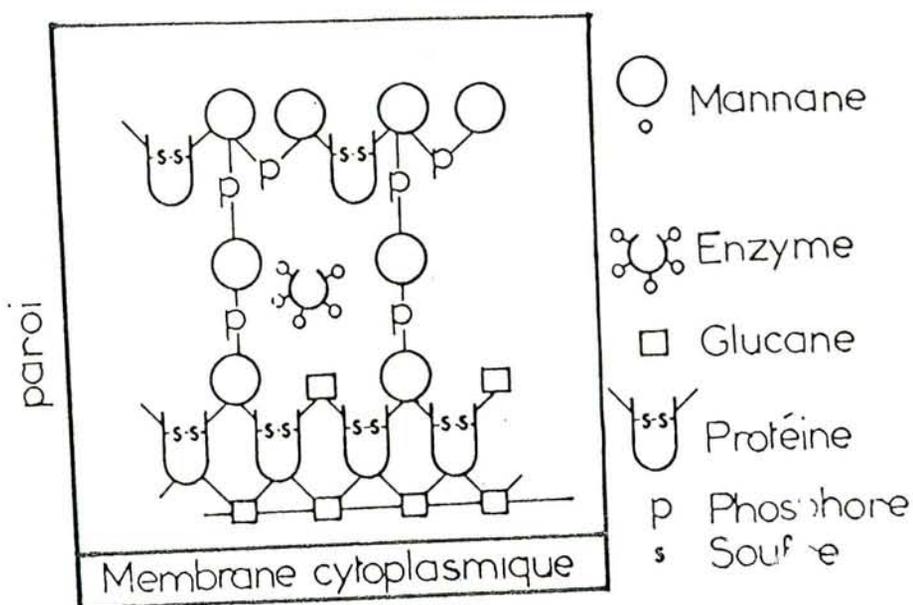


fig. 34: Structure de paroi de levure *Saccharomyces cerevisiae* selon FARKAS (1979)

Plus récemment, SCHEKMAN et NOVICK (1982) ont proposé une autre présentation de l'arrangement de la paroi de la levure *S. cerevisiae*. Cette représentation (figure 35) met en évidence l'élaboration et l'insertion des glucanes synthétases au sein de cet ensemble cellulaire qui forme la membrane, l'espace périplasmique et la paroi.

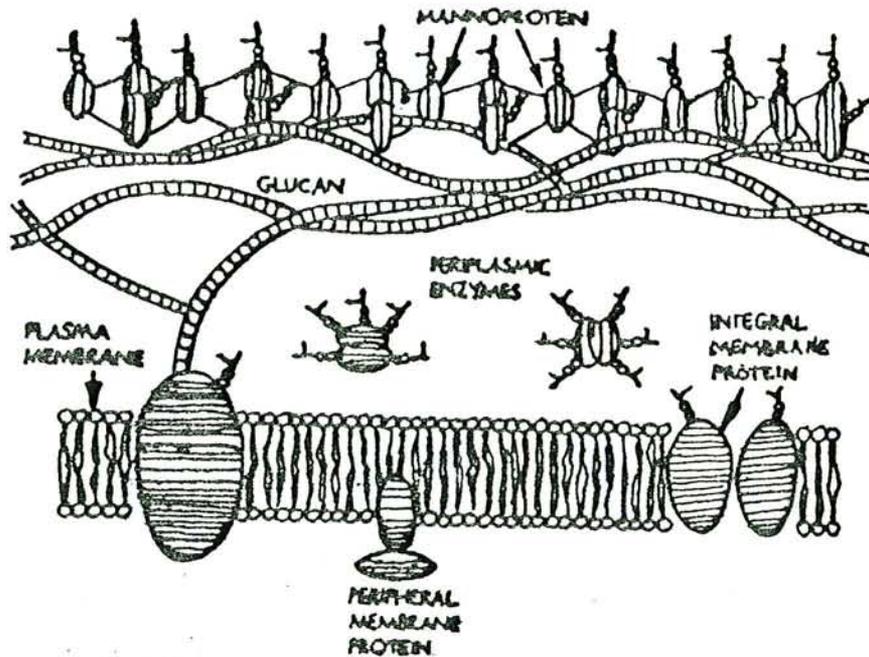


Fig. 35: Représentation schématique de la paroi de levure selon SCHEKMAN et NOVICK (1982)

Il faut cependant reconnaître que de nos jours il est difficile de présenter un schéma exact de la structure de la paroi de levures. Il est également probable que ce schéma soit très différent suivant les genres, voire les espèces.

IV .7 . ROLE DE LA PAROI DANS LE PHÉNOMÈNE DE FLOCCULATION

La paroi constitue le siège des contacts intercellulaires au moment de la floculation. De nombreuses études ont tenté de clarifier son rôle et sa participation dans ce phénomène . En effet, il a été montré que des parois isolées de levures floculantes reproduisent les mêmes caractères de floculation que les cellules mères dont elles sont issues (EDDY et RUDIN 1958; AMRI et al., 1982; HUSSEIN et al., 1986).

BALLOU (1974) a estimé que le potentiel génomique de la floculation est exprimé au niveau de la structure pariétale et que les variations des complexes mannoprotéines peuvent expliquer les fluctuations du degré de floculation

Des études effectuées au microscope électronique, après marquage à la ferritine-Con A, ont montré des interactions entre les couches de mannanes des parois cellulaires durant la floculation (MIKI et al., 1980 et 1981). Ces interactions sont fortement réduites ou éliminées par des traitements chimiques ou enzymatiques.

Déjà, DAY et al. (1975) avaient observé la présence de "poils" à la surface des parois de souches floculantes de *S. cerevisiae* et de *S. uvarum*. Les "poils" seraient de nature mannoprotéique (STEWART, 1975) et impliqués dans le phénomène de floculation. En effet, une séparation ménagée de ces structures des cellules floculantes, entraîne une perte de l'aptitude de ces levures à floculer.

Selon LYON et HOUGH (1971) et RUSSELL et al., (1973) la floculation des levures est liée aux peptidomannanes mais particulièrement à la teneur en phosphate des phosphopeptidomannanes.

MIKI et al., (1982a) et NISHIHARA et al., (1982) ont confirmé qu'un traitement enzymatique par la pronase, la papaine ou encore la trypsine, des levures floculantes leur fait perdre l'aptitude à floculer; ce traitement détache les phosphopeptidomannanes pariétaux.

Par la suite HODSON et al., (1985) ont montré que l'action d'enzymes protéolytiques sur des cellules floculantes de *S. Cerevisiae* dépend du type de gène qui régule le caractère floculant. Ces auteurs ont observé que l'action de la chymotrypsine sur les souches floculantes du type FL01 est efficace; alors que les souches floculantes du type FL05 sont résistantes.

Cette analyse a permis aux auteurs de conclure que l'expression des gènes FL01 et FL05 conduit à la production de protéines pariétales dont les caractéristiques diffèrent selon le phénotype.

Déjà, BAKER et KIRSOP (1972) avaient remarqué que l'inhibition de la synthèse des phosphomannanes, par l'emploi de cycloheximide rendait non floculantes des cellules potentiellement floculantes.

Certains auteurs, entre autres BALLOU (1974) ont observé que la période de floculation correspond à la synthèse de mannanes, éléments régulateurs de ce phénomène. D'autres ont noté une augmentation significative des teneurs en mannanes chez des souches floculantes par rapport aux souches non floculantes de *S. cerevisiae* (GRIFIN et WILLIAM, 1960; JAYATISSA et ROSE, 1976; STEWART et RUSSEL, 1981). Ces résultats ont été confirmés plus récemment chez d'autres levures (HUSSAIN et al., 1986; ALMAHMOOD et al., 1987).

MASCHELEIN et al., (1963), JEUNEHOMME- RAMOS et al., (1969) BALLOU (1974), avaient constaté que les parois de levures *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis* récoltées en fin de fermentation, se caractérisent par une augmentation de 30 à 40% des acides aminés totaux; cependant cette augmentation globale n'entraîne pas de variations importantes dans les rapports entre chaque acide aminé et les acides aminés totaux. En revanche la teneur en mannanes diminue en fin de fermentation. Ces auteurs avaient alors admis que la floculation apparaît comme un phénomène cyclique où les phases de défloculation et de floculation se succèdent au cours de la fermentation. La durée réciproque de ces deux phases dépendrait de la vitesse de synthèse et de dégradation du mannane et par conséquent du rapport mannane/protéine de la paroi cellulaire.

Si la quasi-totalité des chercheurs sont d'accord sur l'implication des parois ou précisément des phosphopeptidomannanes de ces parois dans la floculation des levures; ils ne sont plus unanimes quant à l'interprétation de ce rôle, du mécanisme intime, des structures moléculaires et des forces mises en jeu, qui restent à être élucidés

IV.8. MÉCANISME DE LA FLOCCULATION DES LEVURES

IV.8.1. INTRODUCTION

En dépit des très nombreux travaux, les mécanismes de la floculation restent encore mal connus, ceci rend compte de leur complexité. Cependant il est établi qu'ils font intervenir les parties externes des parois cellulaires (JEUNEHOMME-RAMOS et MASCHLEIN, 1964; KAMADA et MURATA, 1984). Ils dépendent, comme nous l'avons rappelé, de plusieurs facteurs habituellement classés en deux groupes: facteurs intrinsèques et extrinsèques: Ainsi la floculation est un caractère génétique dont la manifestation phénotypique dépend de plusieurs gènes (THORNE, 1951; JOHNSTON et MARTIN 1976; MIKI et al., 1982). Ce phénomène est en premier lieu contrôlé par un gène (FL01) dont l'expression phénotype peut être modifiée par d'autres gènes qui

ne lui sont pas liés (RUSSEL et al, 1980). Il est aussi influencé par des facteurs nutritionnels et physicochimiques du milieu environnant (HOLMBERG et KIELLAND - BRANDT, 1978 ; AMRI et al., 1982).

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

- La formation de ponts soit calciques, soit avec d'autres ions entre les groupements carboxyliques ou phosphates des phosphopeptidomannanes composant la couche externe de la paroi.

- La présence de facteurs du type lectinique à la surface cellulaire qui permettraient l'interaction entre les cellules, entraînant ainsi la floculation.

- Interaction par diverses liaisons entre autres, hydrophobes, hydrophiles, électrostatiques, phosphodiesters...

Parmi toutes ces hypothèses, celle qui a retenu l'attention des auteurs est celle du pont calcique.

Actuellement c'est l'hypothèse lectinique qui est fort travaillée (ALMAHMOOD et al., 1987. MANGUNWIDJAJA, 1988).

IV.8.2. HYPOTHESE DES PONTS SALINS

Pour expliquer le mécanisme de floculation LINDQUIST (1953) fut le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle les groupements ioniques pariétaux étaient déterminants dans ce phénomène. La formation d'agrégats serait due à l'interaction entre ces différents groupements ioniques parmi lesquels les groupements anioniques seraient dominants bien que l'hypothèse de LINDQUIST présente des insuffisances, FISHER (1975) confirma que les groupements anioniques des composants pariétaux des cellules adjacentes sont reliés par le calcium. Cependant les types d'anions impliqués sont très discutés. Ainsi pour certains auteurs (MILL, 1964 (a); RAINBOW 1970; HARRIS et MITCHELL 1973; STEWART et al., 1975; JAYATISSA et ROSE, (1976), Puis AMRI et al., 1981), ce sont les groupements carboxyliques des protéines de surface qui sont impliqués dans la formation de ponts salins; pour d'autres auteurs (MASSCHELEIN, 1963; LYONS et HOUGH, 1971) ce sont les groupements phosphates des phosphopeptidomannanes qui sont impliqués.

De plus JAYATISSA et ROSE (1976) affirment que les liaisons seraient stabilisées par des ponts hydrogènes impliquant les groupements hydroxyles des structures glucidiques

de la surface cellulaire. Par ailleurs, NISHIHARA (1977), BEAVAN et al., (1979) et KAMADA et MURATA (1984) ont signalé que les groupements phosphates ne jouent pas de rôle important dans la formation des ponts calciques, mais ce sont les groupements carboxyliques de la partie peptidique qui seraient responsables de la formation de ces ponts entre les cellules.

Si cette hypothèse du pont calcique est supportée par plusieurs travaux, elle ne permet pas d'expliquer le rôle spécifique des ions calcium ni l'action défloculante des simples sucres mais spécifiques selon le genre de levures, ni l'inhibition de la floculation par des cations de la famille du calcium tels que le strontium et le baryum (CALLEJA, 1974; TAYLOR et ORTON, 1973).

IV.8.3. HYPOTHESE DES LIAISONS LECTINIQUES

Une autre hypothèse récemment émise pour expliquer le mécanisme de floculation, met en jeu des protéines ou des glycoprotéines. Elle repose sur le fait que certains oses spécifiques défloculent des levures floculées ou empêche la floculation des levures potentiellement aptes à s'agréger.

C'est TAYLOR et ORTON (1973, 1978) qui ont suggéré l'intervention d'une protéine activée par la présence de calcium dans le processus de floculation.

Le rôle des lectines dans l'agrégation des microorganismes a été mis en évidence particulièrement dans l'agrégation des cellules bactériennes à partir desquelles des lectines spécifiques pour les glucides bien définis ont été isolées (DUGUID et OLD, 1980; FINKEISTAIN et HANNE 1982. SNABORGEDEN et al., 1983; MAEBA, 1986 et SHARON, 1986).

Les lectines ont été également isolées à partir des champignons (NODRING-HERTZ et CHET, 1986), des moisissures (BARONDES, 1986) et des éponges (JUMBLATT, 1980; CONRAD et al., 1984).

Si les nombreux travaux relatifs aux lectines des bactéries et des champignons ont conduit à mieux connaître leur rôle dans l'adhésion cellulaire; la nature et le rôle des lectines dans le phénomène de floculation restent à être précisés.

Plusieurs auteurs ont montré que la reconnaissance cellulaire dans différents systèmes biologiques est obtenue, en partie, grâce à un facteur lectinique de nature protéique (CUMSKY et ZUSMAN, 1979, MULLER et al., 1983; MONSIGNY et al.,

1983, 1984) NISHIHARA et al., (1982) ont montré que la fixation du calcium sur un site spécifique de certains composés protéiques pariétaux, provoque un changement structural nécessaire à la floculation de *S. Cerevisiae*. Selon AMRI et al., (1981, 1982) la variation en mannose et en acides aminés serait nécessaire à la formation, sur la surface des parois, de constituants de nature peptidomannane du type lectinique indispensable à la floculation des levures.

MC COURTIE et DOUGLAS (1985 a et b), CRITCHLEY et DOUGLAS (1987) ont signalé qu'une mannoprotéine ("adhésin") est responsable de l'adhérence de la levure *Candida albicans* sur les cellules épithéliales et la partie protéique de cette mannoprotéine jouerait le rôle le plus important dans l'adhésion de ces levures aux cellules épithéliales.

A partir de l'hypothèse de BURKE et al. (1980), MIKI et al. (1981, 1982) ont proposé un modèle de mécanisme de floculation des levures selon lequel le facteur lectinique ("COGNOR") est solidement ancré à la paroi des levures floculantes et relie des sites mannanes ("COGNON") des cellules voisines. Le calcium interviendrait comme co-facteur en activant les liaisons des composants lectiniques aux glucides. La synthèse de ce facteur lectinique est gouvernée par le gène responsable de la floculation (FLO1). La représentation schématique de ce modèle de mécanisme de floculation est indiqué par la figure 36.

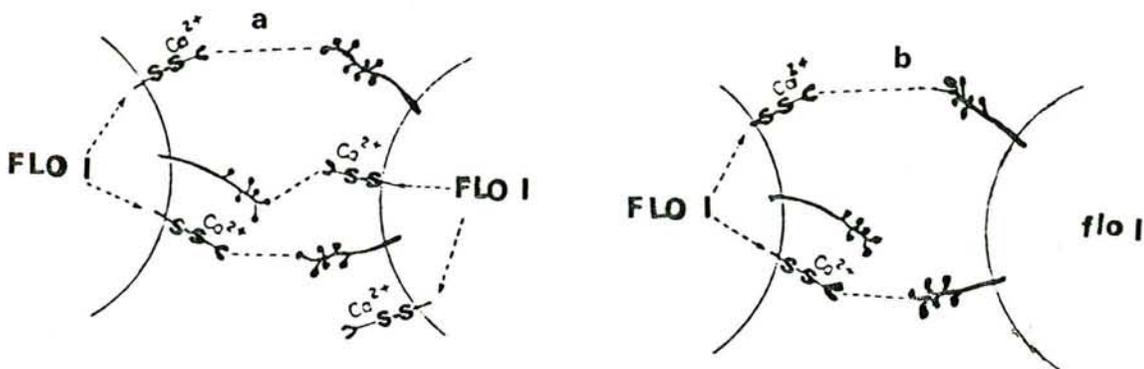


Fig. 36: Modèle du mécanisme de floculation de *Saccharomyces* selon BURK et al., (1980 a) MIKI et al., (1982 b)

Même si l'étude détaillée des substances lectiniques des levures n'est pas toujours réalisée, de nombreux auteurs ont réussi à isoler des lectines à partir de diverses levures.

BASU et al., (1983) ont ainsi isolé une lectine d'une souche de *S.cervisiae* cultivée dans un milieu de culture enrichi en acide linoléique. Cette lectine de poids moléculaire 320KD a une spécificité pour le D-galactose, toutefois son rôle dans la floculation des levures n'a pas été établi.

Par ailleurs, AL MAHMOUD et al., (1988) ont mis en évidence deux activités lectiniques dans le milieu de culture de *Kluyveromyces bulgaricus*. L'une est spécifique du galactose et intervient dans la floculation; l'autre a une affinité pour la N-acétyl-glucosamine mais elle est sans effet sur la floculation de la levure. Par la suite MANGUNWIDJAJA (1988) a mis en évidence une "Composante lectinique" localisée à la surface des cellules de levures *Kluyveromyces lactis*, au niveau d'un récepteur ayant une configuration stéréochimique reconnaissant l' α -D-galactopyranose. Cependant si l'hypothèse lectinique permet d'expliquer l'action défloculante des sucres ainsi que l'action superficielle des ions calcium, le mécanisme d'action de ces lectines reste à être précisé.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. M A T E R I E L

I.1. M I C R O O R G A N I S M E S

Dans la première partie de notre expérimentation nous avons utilisé deux souches (désignées souches "mères") de *Kluyveromyces lactis* haploïdes référenciées:

- α -y 11630 souche non floculante (KLNF)
- α -y 11631 souche floculante (KLF)

Dans une seconde étape, nous avons étudié quatre souches haploïdes (désignées souches "filles") issues d'un croisement des deux souches précédentes et référenciées comme suit:

- KL9c:souche très floculante (TF)
- KL9a:souche moyennement floculante (MF)
- KL9b:souche faiblement floculante (FF)
- KL9d:souche non floculante (NF)

Ces souches ont été fournies par la chaire de génétique et de microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (France).

Toutes les souches sont entretenues par repiquages réguliers sur milieu gélosé et conservées à + 4°C.

I.2. MILIEUX DE CULTURE

Dans nos essais préliminaires, divers milieux de culture ont été utilisés. Ces tests ont permis de sélectionner et retenir pour la suite de notre étude le milieu le plus favorable.

I.2.1. MILIEU ATKIN (M1)

Ce milieu appelé usuellement "milieu A" a été décrit par ATKIN et al. (1949). Sa composition est la suivante:

Glucose	50 g
KH ₂ PO ₄	0.55 g
KCl	0.425 g
Ca Cl ₂ (2H ₂ O).....	0.125 g
Fe Cl ₃ (6H ₂ O).....	2.5 mg
Mg SO ₄ (7H ₂ O).....	0.125 g

Mn SO ₄ (4H ₂ O).....	2.5 mg
Tampon citrate de k PH 5.5 (0.4M).....	50 ml
Hydrolysate de Caséine 8% PH 5.5.....	50 ml
Mésoinositol.....	2.5 mg
Pantothénate de Ca.....	2.5 mg
Biotine.....	0.025 mg
Thiamine.....	0.5 mg
Pyrodoxine.....	0.5 mg

Les différents constituants, à l'exception des vitamines sont dissouts dans 900ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 5.5. Ce milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C. Les vitamines sont dissoutes dans 100ml d'eau distillée et filtrées sur membrane millipore (type H.A.0.45 μ) stérile. Quand il s'agit de culture en fioles d'erlenmeyer de 100ml, elles sont ajoutées au milieu à raison de 1 ml d'une solution mère de vitamines pour 19 ml de milieu de culture. La concentration en vitamines de la solution mère est la suivante:

Mésoinosotol.....	50 mg
Pantothénate de ca	5 mg
Pyrodoxine	1 mg
Thiamine hydrochlorure.....	1 mg
Biotine	0.05 mg
Eau distillée.....	100 ml

I.2.2. MILIEU (M2)

C'est le milieu ATKIN modifié où la caséine est remplacée par le sulfate d'ammonium.

I.2.3. MILIEU DEINEMA (M3)

Ce milieu décrit par DEINÉMA (1961) est de composition suivante:

Glucose.....	40 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Mg SO ₄ (7H ₂ O).....	0.2 g
Ca Cl ₂ (2H ₂ O).....	0.2 g
Extrait de levure.....	1.5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Le pH du milieu est ajusté à 5,2.

I.2.4. MILIEU DEINEMA MODIFIE

Le milieu Déinema a été modifié comme suit:

- M4 : à base d'extrait de levure sans CaCl₂
- M5 : à base de peptone
- M6 : à base de caséine

I.2.5. MILIEU DE SABOURAUD (M7)

Glucose.....20, g
Peptone.....10, g
Eau distillée.....1000, ml

La teneur en calcium des différents milieux est indiquée dans le tableau 7.

TABLEAU 7: Teneur en calcium et nature de la source azotée des différents milieux utilisés pour la croissance de *K. lactis*

MILIEUX DE CULTURE	SOURCE D'AZOTE	TENEUR EN Ca ²⁺ (mM)
Atkin (N)	Hydrolysate de caséine	1.2
Atkin (M)	Sulfate d'ammonium	1.02
Déinema (N)	Extrait de levure	1.5
Déinema(M)sans Ca	Bactopeptone	0.04
Déinema(M)avec Ca	Bactopeptone	1.8
Sabouraud	Bactopeptone	0.07

M : milieu modifié

N : milieu normal

I.3. CONDUITE DES CULTURES

I.3.1. CULTURES EN FIOLES

L'inoculum est préparé à partir de levures conservées sur milieu gélosé. A l'aide d'une anse de platine stérile, on

transfère l'inoculum estimé à 0,1mg de levure en matière sèche par ml, dans 20ml de milieu de culture contenu dans une fiole d'erlenmeyer.

Nous faisons ainsi une préculture de 24 heures dont nous prélevons l'équivalent de 1mg/ml de levure pour ensemençer les cultures. L'aération est assurée par une agitation magnétique. Les cultures sont conduites à 25°C.

I.3.2. CULTURES EN FERMENTEUR DE 2 LITRES

Ces cultures ont été mises en oeuvre pour l'obtention de biomasse et la préparation de parois cellulaires. L'inoculum est constitué par deux précultures successives.

- La première préculture: 20 ml de milieu contenu dans des fioles d'erlenmeyer de 100 ml sont ensemençés avec 0.1mg/ml de levure en matières sèche et incubés pendant 24 heures sous agitation magnétique à 25°C.

- La deuxième préculture:

La première préculture sera transférée dans 1.5 litres de milieu de culture contenus dans un fermenteur de 2 litres. L'aération est assurée par barbotage d'air stérile avec un débit de 30l/heure. La durée d'incubation est de 24 heures environ à 25°C.

I.3.3. CULTURES EN FERMENTEUR DE 20 LITRES

La culture issue du fermenteur de 2 litres sera utilisée comme inoculum pour 15.5 litres de milieu de culture dans un fermenteur de 20 litres. L'agitation et l'aération sont assurées respectivement par un agitateur à palettes à vitesse réglable (300 tours / minute) et par barbotage d'air stérile (50 à 60ml/minute); le temps d'incubation, à 25°C, varie (phase exponentielle ou phase stationnaire). A la fin de la culture, les cellules sont récoltées par centrifugation.

II. M E T H O D E S

II.1. MESURE DE LA CROISSANCE

La croissance des levures est évaluée par différentes méthodes:

- Turbidimétrie: Elle consiste à mesurer l'absorbance d'une suspension de levures à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre type Coleman J.

- Matière sèche: Les cellules lavées 3 fois à l'eau distillée sont remises en suspension. Le poids de la matière sèche est déterminé après dessiccation à 100°C jusqu'à poids constant.

- Comptage de cellules: A l'aide d'une cellule de Malassez et sur une dilution appropriée, le comptage est effectué en présence de bleu de méthylène, témoin de la vitalité des cellules.

La relation absorbance-poids sec des cellules et le nombre de cellules a été établie et représentée par les figures 37 et 38.

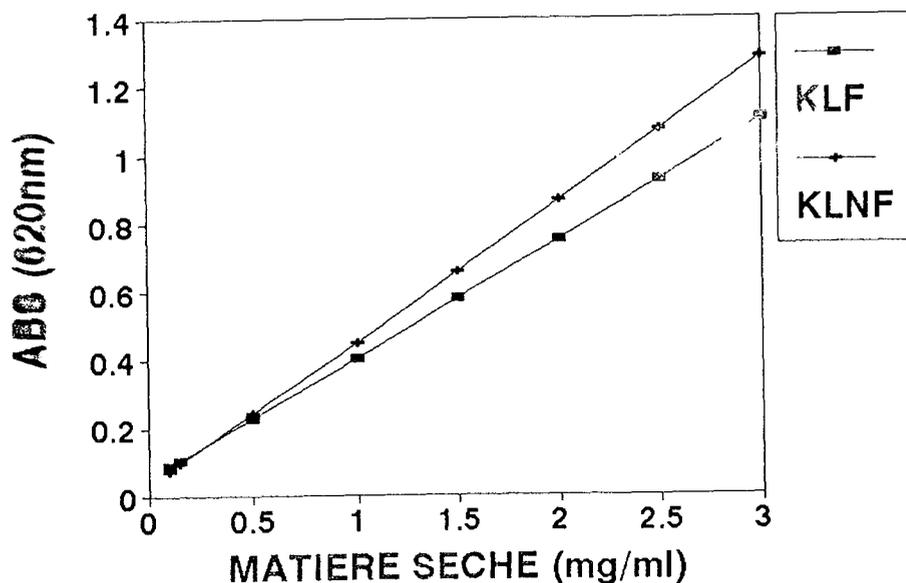


Fig. 37: Relation absorbance - matière sèche

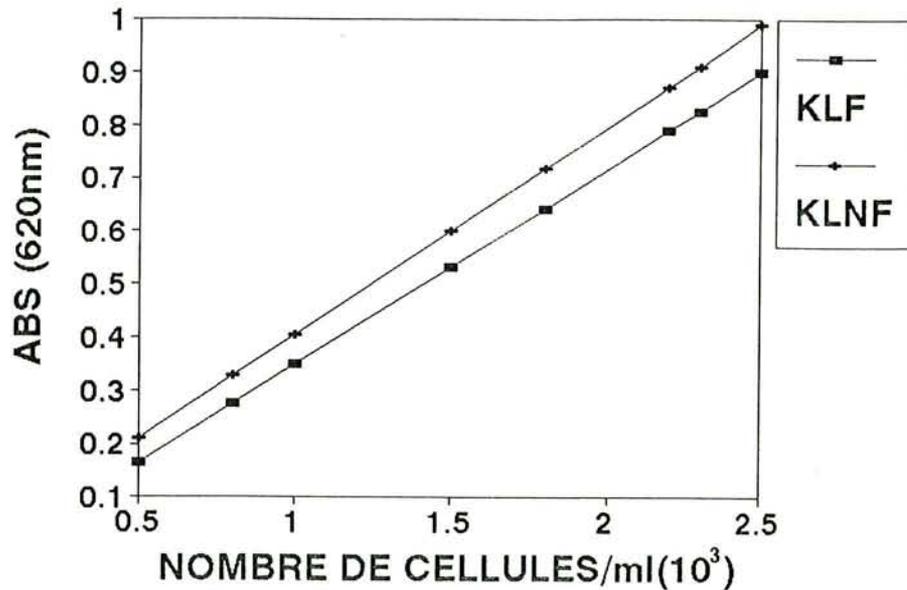


Fig. 38: Relation absorbance-nombre de cellules par ml

Le taux de croissance (μ) ou vitesse spécifique de croissance et le temps de génération sont calculés à l'aide de l'équation de MALTHUS:

$$\mu = \frac{\text{Log}x_2 - \text{Log}x_1}{(T_2 - T_1) \text{Log}2}$$

Ou X_1 = Biomasse au temps T_1

X_2 = Biomasse au temps T_2

II.2. MESURE DE LA FLOCCULATION

De nombreuses techniques de mesure du degré de flocculation ont été décrites dans la littérature; cependant elles présentent des insuffisances ou du moins ne répondent pas réellement aux mesures objectives de la flocculation.

En effet selon CALLEJA et JOHNSON (1977), une technique objective de mesure de la flocculation des levures doit permettre d'apprécier trois critères : le nombre, la taille et la stabilité des agrégats cellulaires.

Les diverses techniques décrites sont classées en trois catégories.

II.2.1. TECHNIQUES DE SEDIMENTATION

Ces techniques ont été développées par BURNS (1937) et HELM et al., (1953) puis modifiées par PATEL et INGLEDEW (1975).

Un volume connu d'une suspension de levure est centrifugé pendant 10 minutes à 2000g dans un tube conique de 15ml gradué et calibré. Le culôt de centrifugation est lavé avec une solution d'EDTA 10mM, pH 4.5, puis 3 fois avec de l'eau distillée. Le culôt de centrifugation est remis en suspension dans 10ml de tampon acétate de Helm dont la composition est la suivante

CaSO ₄	0.51g
CH ₃ COONa,	6.80g
CH ₃ COOH (glacial).....	4.05g
Eau distillée qsp.....	1000ml

le pH est de 4.5

La concentration cellulaire doit être ajustée à 0.1g/ml.

Après agitation énergique, les tubes sont laissés à température ambiante 10 à 60 minutes; le volume du culôt de sédimentation ou le volume du surnageant est mesuré au cours du temps. Le degré de flocculation des levures est alors donné par la valeur de ce volume au temps 10 minutes. Cette technique évalue surtout la taille des agrégats et convient aux levures très flocculantes.

II.2.2. TECHNIQUE VISUELLE

Dans la technique originale de GILLILAND (1957) le degré de floculation est exprimé quantitativement à l'aide d'une échelle de graduation subjective (Tableau 8).

TABLEAU 8: Classification des levures en fonction du degré de floculation (GILLILAND, 1957)

$(DO_2/DO_1) \times 100$	DF	TYPES DE LEVURES
0	5	levures extrêmement floculantes
0 à 10	4	levures très floculantes
10 à 30	3	levures modérément floculantes
30 à 65	2	levures faiblement floculantes
60 à 90	1	levures très faiblement floculantes
100	0	levures non floculantes

(DF = degré de floculation)

II.2.3. TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

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

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

Au cours de nos essais, nous avons adopté la technique visuelle associée à des mesures spectroscopiques selon le protocole préconisé par PATEL et INGLEDEW (1975): 10ml d'une suspension de levure (milieu de culture ou tampon acétate de Helm) sont placés dans un tube calibré de colorimètre ou dans la tubulure latérale des fioles d'erlenmeyer, après agitation énergique, on note l'absorbance à 620 nm (DO_1). La suspension de levure est ensuite laissée au repos pendant un laps de temps à la température ambiante et l'absorbance est notée (DO_2). Le temps optimal nécessaire à la mesure de DO_2 est déterminé en traçant la courbe de variation de l'absorbance en fonction du temps de sédimentation (figures: 39 et 40).

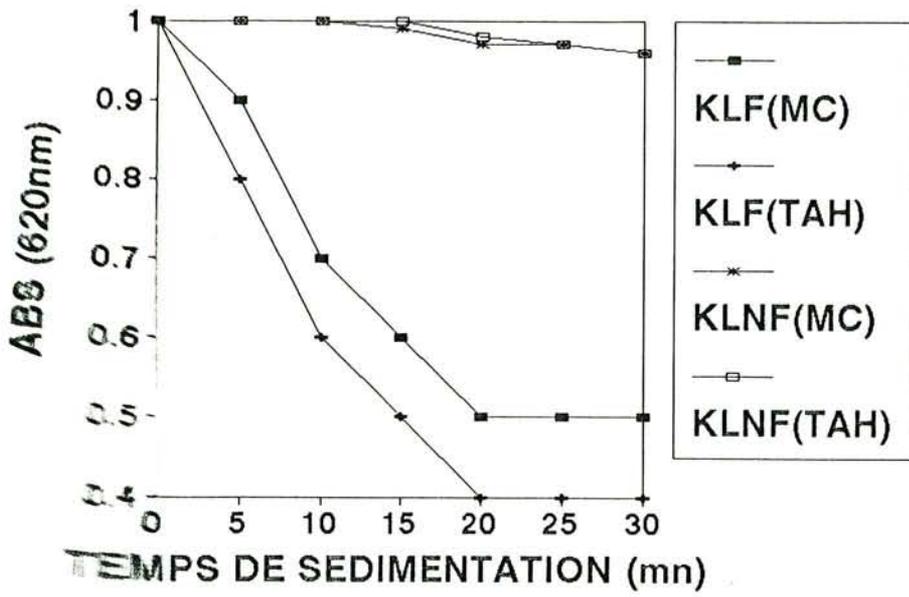


Fig. 1. Cinétique de sédimentation des cellules de KLF et de KLNf, en milieu de culture (MC) et en tampon acétate de Helm (TAH) (pH 4,5)

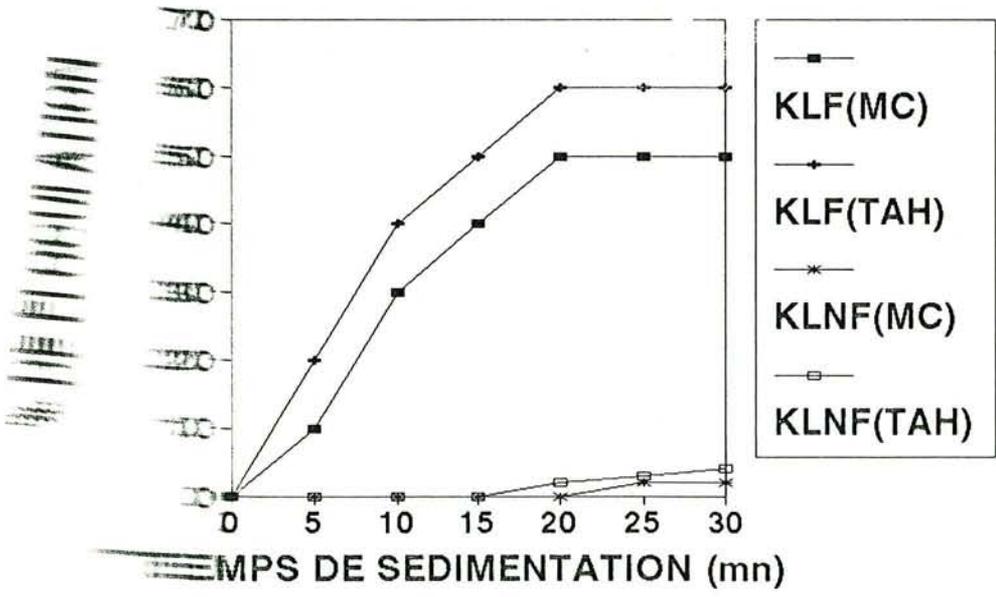


Fig. 2. Variation du pourcentage de floculation de KLF et de KLNf en fonction du temps de sédimentation dans le milieu de culture (MC) et dans le tampon acétate de Helm (TAH)

Le degré de floculation peut-être exprimé de deux manières:

- Par le rapport $(DO_2/DO_1) \times 100$, qui représente le pourcentage des cellules restées en suspension après le temps optimal de repos. La valeur du rapport peut être rapportée à l'échelle proposée par GILLILAND.

- Dans le cas de levures classées moyennement floculantes, le degré de floculation est calculé selon l'expression préconisée par EGGSET et al., (1983):

$$\% \text{ FLO} = \left(1 - \frac{DO_2}{DO_1}\right) \times 100$$

II.3. MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE LA FLOCULATION

II.3.1. EFFET DU pH

Une prise d'essai de 10ml d'une suspension de levure floculante est soumise à des variations de pH basiques par addition de NaOH 1N et acides avec HCl 1N pour obtenir une gamme de pH allant de 2 à 14. Le pourcentage de floculation est alors déterminé dans chaque cas selon la méthode décrite.

II.3.2. EFFET DE LA TEMPERATURE

Après croissance et floculation des levures, 10ml d'une suspension sont prélevés et portés à des températures variables pour des temps allant de 1 à 10 minutes. L'effet réversible ou irréversible de la température sur les agrégats cellulaires est déterminé après refroidissement de la suspension à 25°C.

II.3.3. EFFET DES SUCRES

Une prise d'essai de 10ml d'une suspension de levure contenant environ 1.5mg d'extrait sec par ml est préparée soit dans le tampon acétate de Helm, soit dans le milieu de croissance.

Des quantités croissantes de sucres ou dérivés à tester, sont ajoutées; après agitation vigoureuse, on laisse les suspensions au repos à température ambiante (25°C) pendant 30 minutes. La mesure de l'absorbance des surnageants résultats permet de déterminer la qualité de sucre nécessaire à la dispersion totale des agrégats cellulaires.

II.3.4. EFFET DE L'ACTION D'ENZYMES

Des suspensions de levures sont centrifugées à 2000g pendant 10 minutes, puis lavées 3 fois avec de l'eau distillée. Les culôts de centrifugation sont ensuite mis en suspension dans une solution tampon acétate de Helm à pH 4.5 pour la pronase et dans la solution tampon tris HCl 0.1M (pH 8.5). Pour la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (pH 3.0). La concentration en enzyme est de 0.2%. Les suspensions (10mg de levure) sont ensuite incubées à 37°C pendant des temps variables allant de 5 à 60 minutes sous agitation intermittante.

II.3.5. EFFET DE LA REGENERATION DE LA PAROI

II.3.5.1. PREPARATION DE PROTOPLASTES

Les proplastest sont préparés à partir de suspensions de levures prélevées en phase de croissance (ou stationnaire, par action du dithiostréitol et de la cytohélicase.

- Prétraitement

Une suspension de levure contenant 1.5g de levure fraîche environ, est centrifugée, lavée avec de l'eau distillée puis additionnée de 6ml d'une solution de dithiostréitol 10^{-2} M, EDTA 25mM à pH 7.0. Le mélange est incubé sous agitation pendant 30 minutes à 37°C. Après incubation, les levures sont centrifugées et lavées 3 fois avec 6ml de tampon isotonique (KH_2PO_4 , 150mM; citrate, 50mM; sorbitol, 1.08 mM pH 5.8).

- Traitement à la cytohélicase

Les protoplastest sont des cellules sensibles au choc osmotique, aussi cette sensibilité est mesurée, à 20°C, par addition d'une partie aliquote (0.1ml) d'une suspension de

protoplastes renfermant 10mg de matière sèche de cellules par ml, à 2.9ml d'une solution tampon phosphate citrate pH 5.8. Le nombre de protoplastes dans la suspension est déterminé par comptage hématimétrique après dilution dans de l'eau distillée et dans le tampon précédent.

II.3.5.2. REGENERATION DES PROTOPLASTES

La régénération des parois cellulaires a été réalisée en milieu liquide de Sabouraud avec addition de sorbitol comme agent protecteur osmotique. Les cultures ont été réalisées dans des fioles de 100ml, à 25°C, sous faible agitation.

II.3.5.3. MORPHOLOGIE DES CELLULES REGENEREES ET LEUR APTITUDE A LA FLOCCULATION

Pour suivre la régénération des protoplastes et la formation des premiers réseaux fibrillaires qui apparaissent dès les premiers stades du processus de synthèse de la paroi, les cellules sont prélevées à des intervalles de temps réguliers et observées au microscope optique. Le test de floculation est également réalisé.

III. METHODES D'OBTENTION ET DE TRAITEMENT DES PAROIS

III.1. PRÉPARATION ET ISOLEMENT DES PAROIS

Les levures sont récoltées en phase exponentielle ou stationnaire par centrifugation et lavées à l'eau distillée.

Les parois cellulaires ont été isolées après broyage mécanique des cellules selon le protocole suivant: les levures sont mises en suspension dans l'eau distillée pendant 24 heures à une concentration 2 à 3g de levures, environ, pour 10ml d'eau, puis broyées avec un broyeur MSK (Braun Melsungen RFA) à l'aide de billes de verre (0.45 à 0.50mm de diamètre). Chaque lot de levure subit trois broyages de trois minutes à une température avoisinant 0°C obtenue par une détente de gaz carbonique dans la chambre du broyeur.

Les broyats sont repris par de l'acétone puis par un mélange éther de pétrole-éther sulfurique afin d'éliminer les lipides.

La biomasse récupérée par centrifugation à 20.000g est alors mise en suspension dans une solution de phosphate disodique à 12g/l et soumise à une agitation constante pendant 5 à 6 heures. Après lavage à l'eau distillée, les parois sont incubées pendant trois heures dans une solution de phosphate disodique à 12g/l contenant 0.2% de trypsine. Ce dernier traitement permet d'éliminer les débris cytoplasmiques protéiques qui adhèrent aux parois cellulaires.

Dans une dernière étape, les parois sont lavées plusieurs fois à l'eau distillée et, après vérification de leur état de pureté au microscope à contraste de phase, elles sont conservées sous forme lyophilisée.

III.2. TECHNIQUES D'HYDROLYSE DES PAROIS

Les parois de levure sont des éléments insolubles dans l'eau et leur suspension est très instable. L'analyse qualitative et quantitative des oses, osamines et acides aminés, nécessite une hydrolyse préalable des parois par HCl en tube scellé sous vide.

Des essais préliminaires destinés à déterminer les conditions optimales de ce traitement nous ont conduits à adopter, dans tous les cas, une température de 105°C et des concentrations en HCl 2 N pour les oses et 6 N pour les acides aminés et les osamines

Il faut cependant signaler que l'hydrolyse des parois n'est pas toujours totale. En effet, un faible résidu persiste même après un temps d'hydrolyse très prolongé.

III.3. FRACTIONNEMENT DES PAROIS

L'isolement des constituants de la paroi sous forme hautement polymérisée nécessite un traitement beaucoup moins sévère que l'hydrolyse chlorhydrique. Nous avons utilisé le traitement à l'éthylène diamine décrit par KORN et NORTHCOTE (1960).

A 1g de parois lyophilisées, on ajoute 150ml d'éthylènediamine distillé et la suspension est mise en incubation à 37°C pendant 24 heures avec agitation intermittente. Après centrifugation, on recueille le surnageant et le culôt est remis à nouveau en suspension dans l'éthylènediamine pendant 48 heures à 37°C. Après une nouvelle centrifugation le culôt lavé

par du méthanol puis par de l'eau distillée jusqu'à neutralité, constitue la fraction C (figure 41).

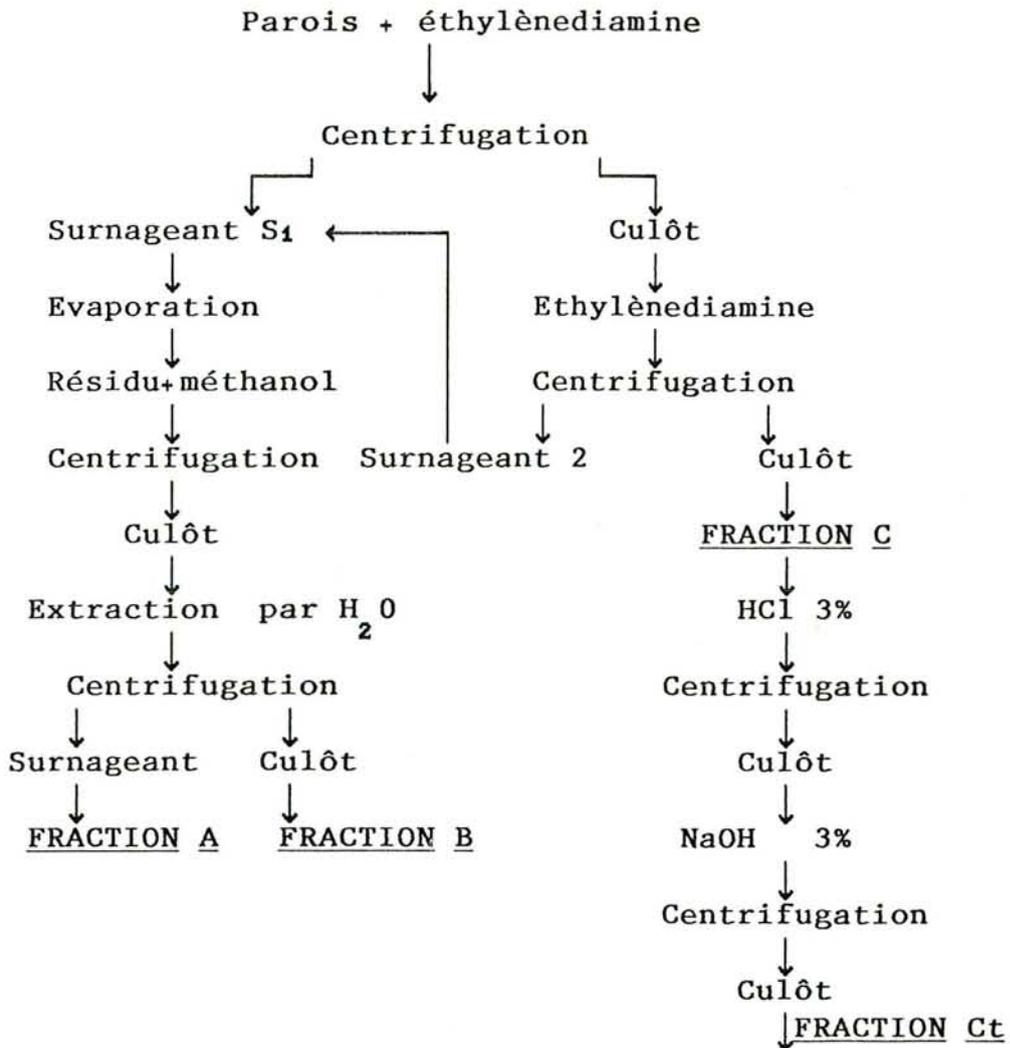


Fig. 41: Différentes étapes du fractionnement des parois à l'éthylènediamine, d'après KORN et NORTHCOTE (1960)

Les différents surnageants sont réunis et l'éthylènediamine est évaporé sous-vide à une température n'excédant pas 40°C. Après reprise du résidu sec par 300ml de méthanol et conservation pendant une nuit à 4°C, il se forme un précipité qui est recueilli par centrifugation. Le traitement de ce précipité par de l'eau distillée sous agitation énergique et à température ambiante pendant 1h30, fournit une fraction A hydro-soluble. Le résidu insoluble, recueilli sous forme d'un gel, constitue la fraction B.

II.4. ISOLEMENT DE LA CHITINE

La chitine se trouve dans la fraction insoluble provenant du traitement des parois par l'éthylène diamine (Fraction C). Nous avons appliqué à cette fraction le mode opératoire déjà utilisé par HOUWINK et KREGER (1953) et KORN ET NORTHCOTE (1960), pour l'isolement de la chitine de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.

Un échantillon de 100mg est traité par 50ml d'acide chlorhydrique à 3% pendant une heure au bain marie bouillant. Le résidu, recueilli par centrifugation est lavé jusqu'à neutralité avec de l'eau distillée puis lyophilisé. Il constitue la fraction Ct (Figure 41).

III.5. PRÉPARATION DE MANNANES

L'intégrité structurale des mannanes dépend des conditions d'extraction auxquelles ils sont soumis. Pour l'extraction des mannanes à partir de levures entières, nous utilisons la méthode décrite par PEAT et al., (1961) modifiée dont les différentes étapes sont résumées par la figure 42. Les cellules sont détruites par chauffage à l'autoclave en présence de tampon citrate pH7.

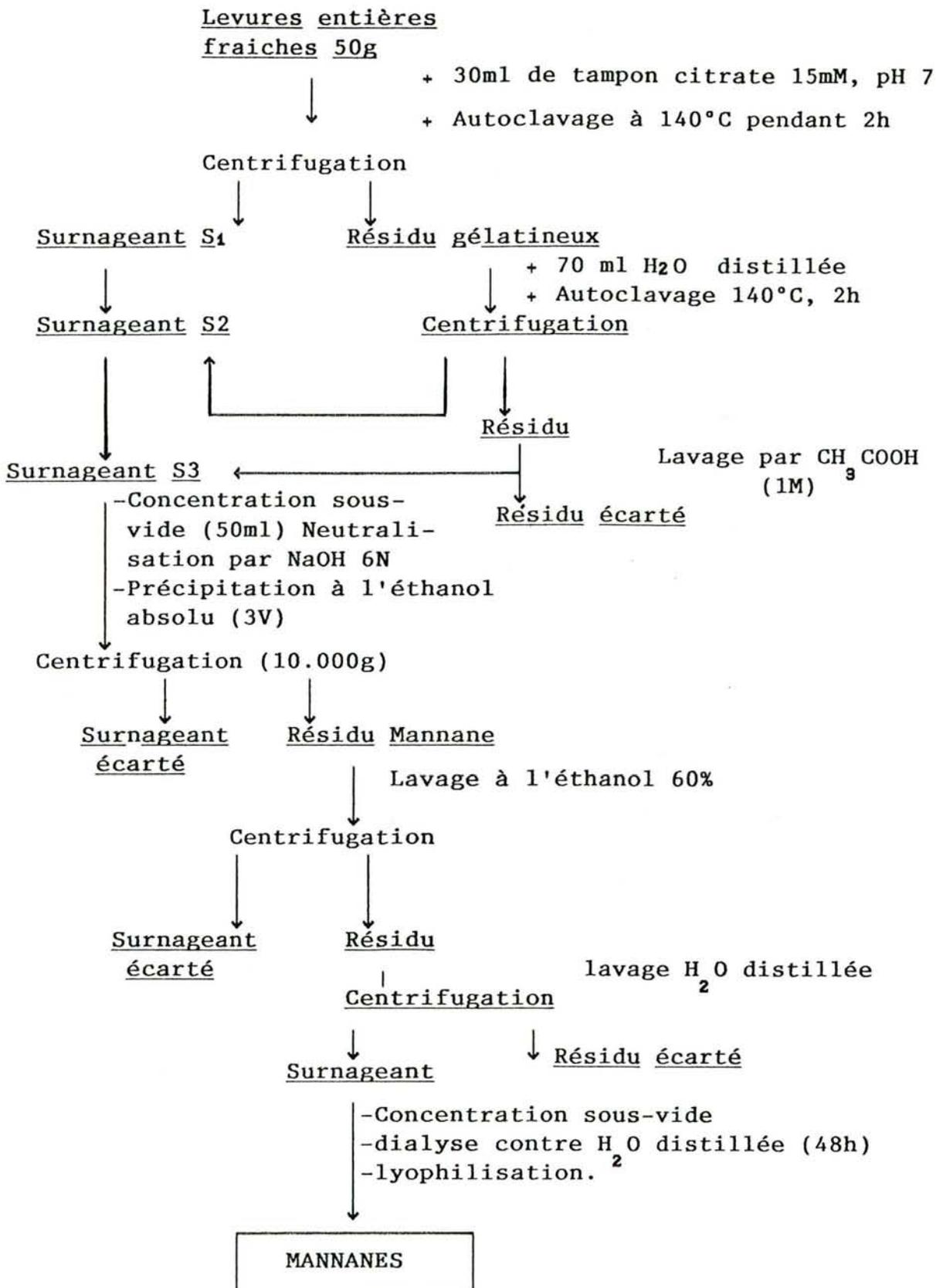


Fig. 42: Extraction des mannanes selon la méthode de PEAT et al., (1961) modifiée

IV. METHODES ENZYMATIQUES

IV.1. TRAITEMENT DES PAROIS PAR LA CYTOHELICASE

Les parois de levures floculantes ou non floculantes ont été traitées par la cytohélicase caractérisée par la présence d'endo- β (1 \rightarrow 3)-D-glucanases. L'expérience a été réalisée selon la méthode décrite par EDDY et al., (1968) modifiée pour l'extraction de phosphopeptidomannanes. Le protocole expérimental est indiqué par la figure 43.

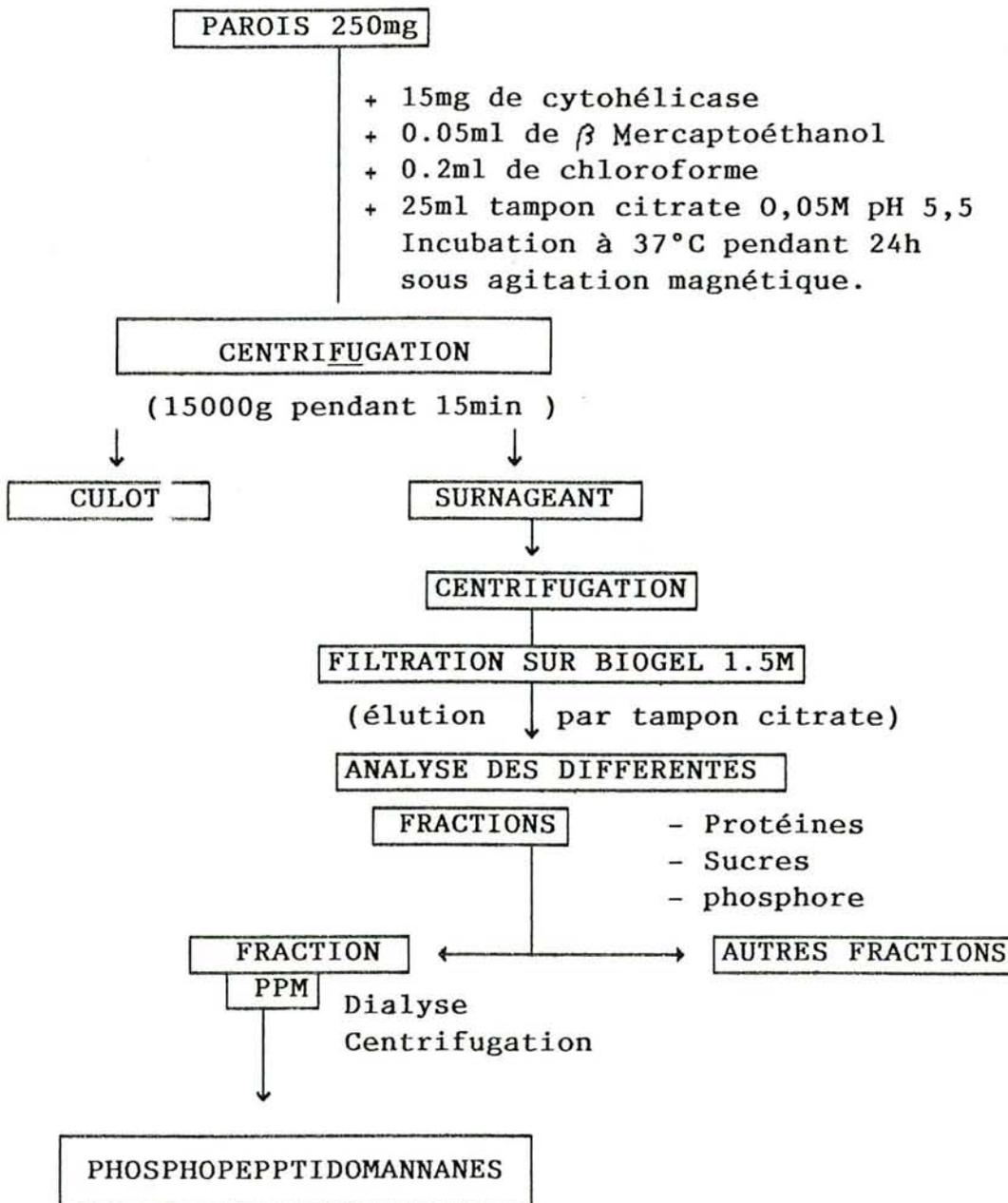


Fig. 43 : Traitement des parois par la cytohélicase selon EDDY et LONGTON (1969)

IV.2. TRAITEMENT DES PAROIS PAR LA PRONASE

L'extraction de phosphopeptidomannanes à partir des parois par action de la pronase a été réalisée selon la méthode de CAWLEY et BALLOU (1972). Un gramme de parois est mis en suspension dans 50 ml de tampon acétate 0.1M pH4.2 et traité par 25mg de pronase à 37°C pendant 18 heures. Après centrifugation (1500g) les phosphopeptidomannanes contenus dans le surnageant sont récupérés par précipitation au borate de sodium à 5% (P/V) et de cétyl- α -triméthyl - bromure d'ammonium à 5% P/V). Le précipité est alors lavé par l'éthanol, l'acétone et l'éther de pétrole, puis lyophilisé.

IV.3. TRAITEMENT DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM) PAR LA PRONASE

Le traitement a pour but de séparer les glycanes de la chaîne protéique. l'échantillon est mis en solution dans un tampon acétate de calcium 0.1M contenant de la pronase à raison de 1% (P/V). L'hydrolyse est effectuée pendant 48 h à 37°C et le pH est maintenu constant à 8 par apport de NaOH à 0.1N.

L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4.5 par de l'acide acétique puis il est concentré et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le précipité ainsi formé est recueilli et le même traitement est répété deux fois.

Le précipité est alors dissous dans l'eau distillée puis additionné d'un volume égal d'une solution d'acide trichloracétique à 10%. Après une nuit à + 4°C, la phase aqueuse est séparée du précipité nouvellement formé, par filtration sur un filtre en verre fritté de porosité G5. La solution est alors passée sur une colonne de résine échangeuse d'ions DOWEX 50-X 8 (200-400 mesh) sous forme H⁺ et sur Duolite A 102 sous forme OH⁻.

Les éluats contenant les glycanes sont recueillis, concentrés sous vide et lyophilisés.

V. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

V.1. FILTRATION MOLÉCULAIRE

Pour la purification et l'estimation de la masse moléculaire des produits obtenus par différents procédés, nous avons utilisé la méthode de filtration sur gel. Les différents types de gel utilisés sont indiqués dans le tableau 9.

TABEAU 9: Caractéristiques des principaux types de gel utilisé

NATURE	TYPE	ZONE DE FRACTIONNEMENT (daltons)
Trisacryl	GF 2000	15.000.000 à 12.000
Ultrogel	ACA 22	1.200.000 à 10.000
Biogel	A 5M	5.000.000 à 10.000
	A 1.5 M	1.500.000 à 10.000
	P2	2000 à 100

Les colonnes de gel sont d'abord étalonnées avec des dextrans de masse moléculaire de :2.000.000, 450.000, 154.000, 20.000 et 10.000 daltons; et avec des sucres de 180 à 1800 daltons.

Les débits sont maintenus à l'aide de pompe péristaltique. A la sortie de la colonne des fractions de 3 à 4ml sont collectées.

La droite d'étalonnage de chaque colonne est obtenue en portant sur un graphe, le logarithme de la masse moléculaire de chaque produit en fonction du rapport du volume d'élution sur le volume mort de la colonne (V_e/V_0). Cette droite permettra d'estimer la masse moléculaire de chaque produit de l'échantillon en connaissant son volume d'élution.

V.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

L'analyse qualitative des oses par chromatographie sur couche mince ascendante a été réalisée selon la méthode décrite par WEILL et HANKE (1962), sur des plaques de gel Kieselgur G, d'épaisseurs de 0.25 à 0.5cm. La migration est effectuée à l'aide d'un mélange de solvants (butanol/éthanol/eau; 5/3/2 (V/V)). Les chromatogrammes sont révélés avec le réactif de STAHL et KALTENBACH (1961): 9ml d'éthanol à 95%, 0.5ml d'acide sulfurique concentré, 0.5ml de P- amisaldéhyde et quelques gouttes d'acide acétique glacial.

Après pulvérisation, les plaques sont placées dans une étuve à 105°C pendant 30 minutes.

V.2. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

L'identification des oses obtenus par hydrolyse a été, d'abord, effectuée par chromatographie sur papier WHATMANN 3MM selon la méthode de JERMIN et ISHERWOOD (1949) et TRAVELYAN et al. (1950).

V.3. ELECTROPHORESE SUR GEL

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode développée par ALLAN (1981). Une courbe étalon a été réalisée à l'aide de protéines standards (figure 44).

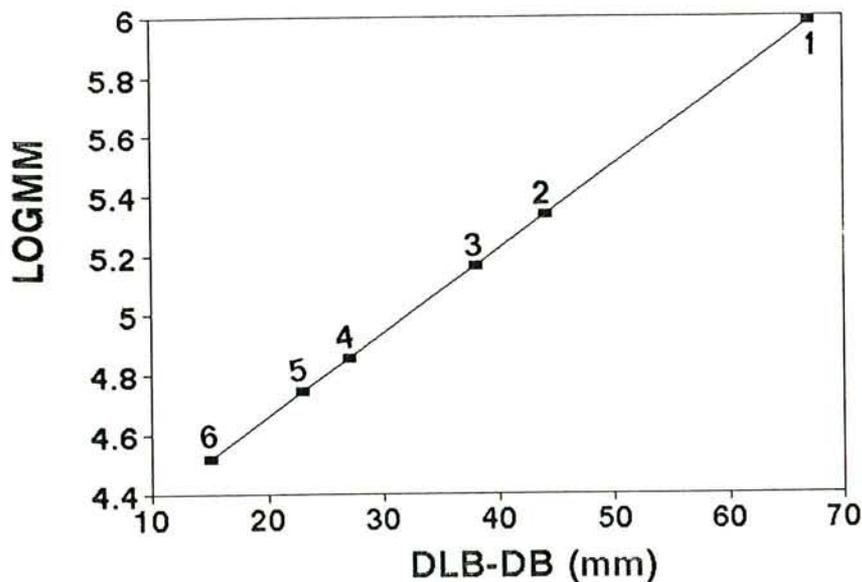


Fig. 44: Droite d'étalonnage du gel de polyacrylamide

\overline{db} : distance du bleu de bromophénol

\overline{db} : distance de la bande

1- UREASE (545.000 da)

2- Myosine (205.000 da)

3- Phosphorylase b (97.400 da)

4- Albumine bovine (66.000 da)

5- Albumine de boeuf (45.000 da)

6- Anhydrase Carbonique (29.000 da)

V.4. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

L'analyse qualitative des oses a été, également, réalisée par chromatographie en phase gazeuse selon la technique de LIPKE et BALLOU (1980) à l'aide d'un chromatographe Girdel 3000 à détecteur ionisation de flamme. La séparation des oses, après transformation en acétates d'alditols, se fait en colonne de Verre de 180 cm de long, 2 mm de diamètre intérieur, garnie d'une phase Sp 23402, 3% sur Chromosorb-Wan-DMS 80/100 mesh

L'analyse se fait dans les conditions suivantes:

- Volume injecté : 10 μ l
- Température de l'injecteur : 225°C
- Température du détecteur : 300°C
- Température de la colonne : 210°C
- Le gaz vecteur est de l'azote avec un débit de 40 ml/min.

L'aire des pics est calculée par un enregistreur intégrateur. L'appareil est régulièrement étalonné par des solutions équimolaires (de mannose, galactose, glucose, fucose, inositol).

VI. METHODES CHIMIQUES

VI.1. DOSAGE DES OSES NEUTRES

Le dosage des oses dans les échantillons, après hydrolyse chlorhydrique, a été réalisé selon la méthode de DUBOIS et al., (1956) au phénol sulfurique dont le principe consiste à transformer à chaud par l'acide concentré les oses en dérivés qui se condensent avec le phénol et donnent une coloration brune orangée. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 485 nm.

Une gamme d'étalonnage est réalisée avec du mannose dont les concentrations varient de 0 à 200 n moles (figure 45)

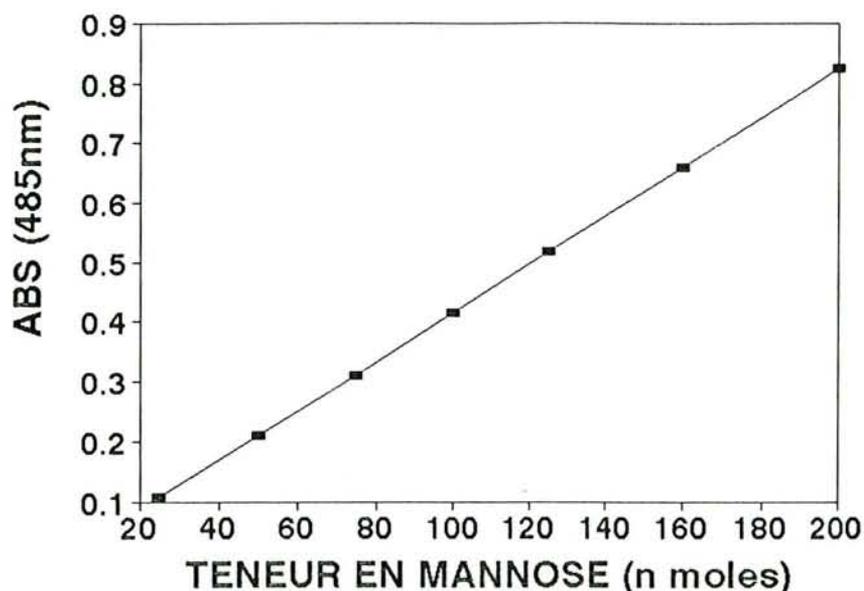


Fig. 45: Courbe d'étalonnage du dosage des oses
(DUBOIS et al., 1956)

VI.2. ANALYSE QUALITATIVE DES OSES

L'analyse qualitative des oses a été réalisée après leur transformation, par chromatographie en phase gazeuse.

La transformation des monosaccharides en acétates d'alditols a été effectuée selon la méthode de SAWARDEKER et al., (1965) modifiée par LIPKE et BALLOU (1980).

VI.3. DOSAGE DES ACIDES AMINÉS

Le dosage des acides aminés totaux est effectué avec le réactif au 2-4- dinitrofluorobenzène (DNFB) selon la méthode de GHUYSEN et al., (1965). Le réactif se condense avec les groupements NH_2 libres des acides aminés pour donner une coloration jaune.

Une courbe d'étalonnage est établie avec la D-alanine dont les concentrations varient de 0 à 100 nanomoles (figure 46).

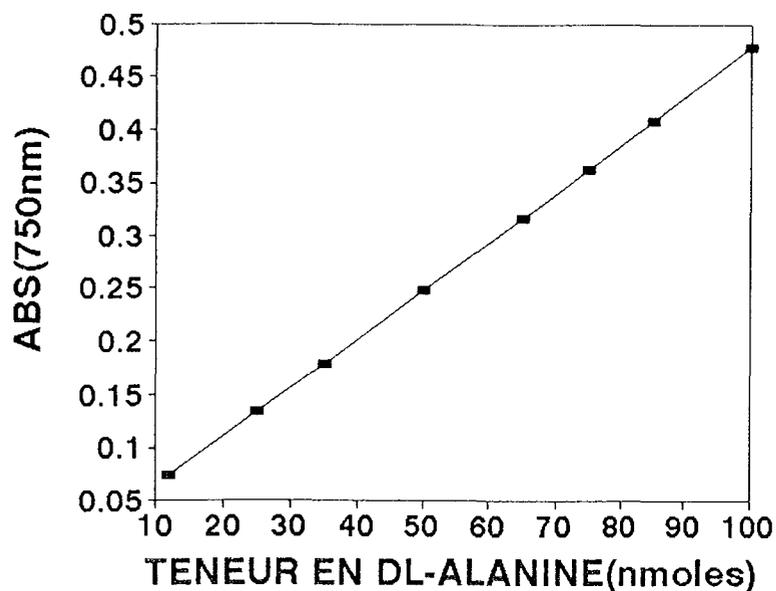


Fig. 46 : Courbe d'étalonnage du dosage des acides aminés (GHUYSEN et al., 1965)

VI.4. ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINÉS

La teneur de chaque acide aminé des échantillons hydrolysés, après séparation sur colonne de résine échangeuse d'ions est déterminée à l'aide d'un auto-analyseur Technicon type NC-2P, selon la méthode de PIEZ et MORRIS (1960).

VI.5. DOSAGE DES HEXOSAMINES

La teneur en hexosamines est déterminée selon la méthode d'ELSON-MORGAN (1933), suivant le protocole décrit par GHUYSEN et al., (1966). En milieu alcalin, à chaud et en présence d'anhydride acétique, les hexosamines libres sont transformées en dérivés pyrroliques qui se condensent avec le réactif D'ELSON - MORGAN. (p-diamino-benzène) pour donner une coloration violette.

une gamme d'étalonnage est réalisée avec du chlorhydrate de glucosamine (Figure 47)

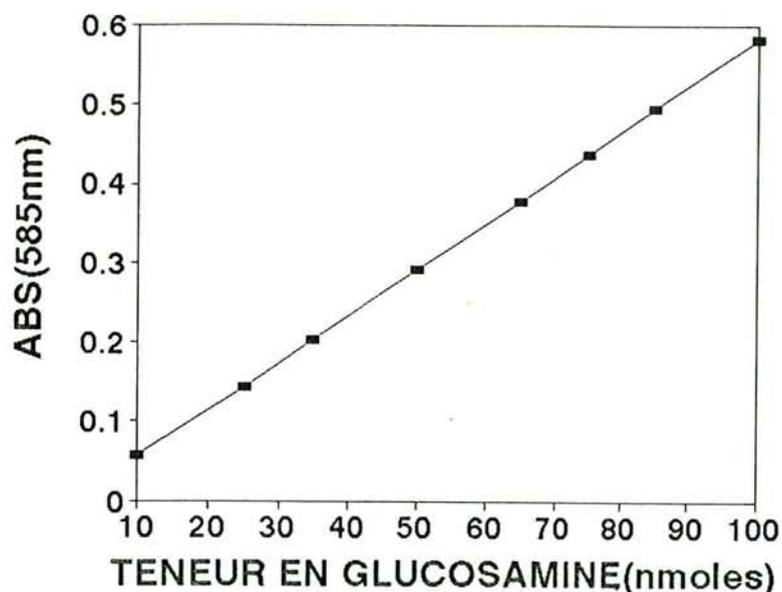


Fig. 47: Courbe d'étalonnage du dosage de la glucosamine (GHUYSEN et al., 1966)

VI.6. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Après minéralisation des échantillons par l'acide sulfurique concentré durant 15 à 20 heures en présence du catalyseur de DUMAZERT et MARCELET (1937), l'azote total est dosé à l'auto-analyseur technicon.

VI.7. DOSAGE DU PHOSPHORE

Le phosphore a été dosé par la méthode au molybdate d'ammonium après minéralisation des produits par un mélange d'acide sulfurique et perchlorique selon le protocole préconisé par ALLEN (1940). Le phosphore ainsi libéré est dosé selon la méthode de MCCLARE (1971) qui consiste à le transformer en phosphomolybdate d'ammonium, complexe de coloration bleue dont l'intensité de la coloration est mesurée à 780nm. Une courbe d'étalonnage est établie avec KH_2PO_4 (figure 48).

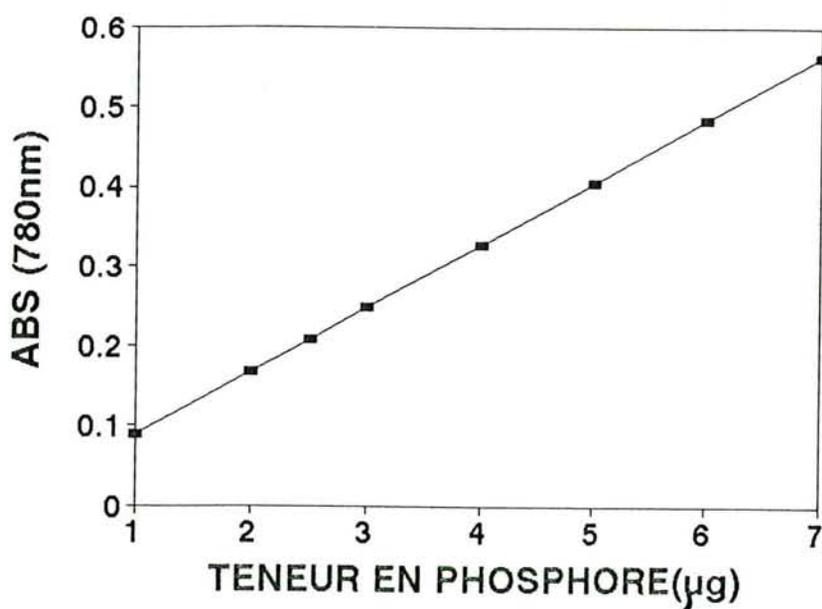


Fig. 48: Courbe d'étalonnage du dosage du phosphore
(Mc CLARE, 1971)

VI.8. DOSAGE DES OLIGOÉLÉMENTS

Les oligoéléments sont dosés par spectrophotométrie de masse. Cette méthode nécessite la mise en œuvre de deux techniques successives:

- La minéralisation des échantillons: 20mg sont portés à 105°C dans une étuve jusqu'à poids constant; ils sont ensuite calcinés dans un four à moufle à 530°C jusqu'à l'obtention de cendres blanches.

- Préparation de la solution: les résidus de calcination sont repris par 5ml d'HCl pur et évaporés à sec sur bain de sable; le volume est ajusté à 100ml avec de l'eau distillée.

Les oligoéléments sont dosés à des longueurs d'ondes différentes:

- Le calcium 422.7 nm
- le potassium 766.5 nm
- Le magnésium 285,2 nm
- le sodium 589.0 nm

Pour chaque élément une courbe étalon est établie (2 à 10ppm)

VI.9. ACÉTOLYSE DES MANNANES

L'acétolyse des mannanes réalisée selon la méthode de KOCOURECK et al. (1969) est basée sur le fait que sous des conditions contrôlées, les liaisons (1→6) peuvent se rompre sans qu'il y ait rupture des liaisons (1→2) et (1→3) qui sont plus stables. Par filtration sur gel, les oligosaccharides obtenus par acétolyse peuvent-êtré ensuite séparés selon leur masse moléculaire.

Les différentes étapes de l'acétolyse sont indiquées par la figure 49.

VI.10. RÉACTION DE B-ÉLIMINATION

Cette réaction, effectuée en milieu alcalin, est généralement employée, pour démontrer l'existence d'une liaison O-glycosidique avec la sérine ou la thréonine dans une glycoprotéine; les liaisons O-glycosidiques conjuguées avec une fonction hydroxyle en position β d'un groupement carbonyle sont en effet extrêment labiles en milieu alcalin. La rupture de la liaison glycosidique et la déshydratation du composé hydroxyle s'expliquent par une double induction électrophile:

- L'une est provoquée par la polarisation de la liaison O-glycosidique. Elle confère au carbone (β) une charge positive partielle permanente;

-L'autre est due à l'énolisation du groupement carbonyle en milieu alcalin;

-Les deux effets s'additionnent fragilisant la liaison de l'hydrogène sur le carbone α , un proton se détache facilement sous l'action de la base, il s'en suit la formation d'un carbanion.

Finalement, la molécule se stabilise par le tranfert d'un électron de la fonction énol vers le carbanium et du doublet libre du carbanion vers le carbone porteur d'une charge électropositive partielle. Cette dernière délocalisation refoule vers l'oxygène glycosidique le doublet de la liaison O ← C et provoque la rupture de cette dernière en transformant la sérine en déhydro-alanine et la thréonine en acide 2- amino -2-buténoïque. Ces derniers, en milieu réducteur sont hydrogénés.

Le mécanisme de la réaction de β - oxydation, a été décrit par PIGNAN et al., (1974).

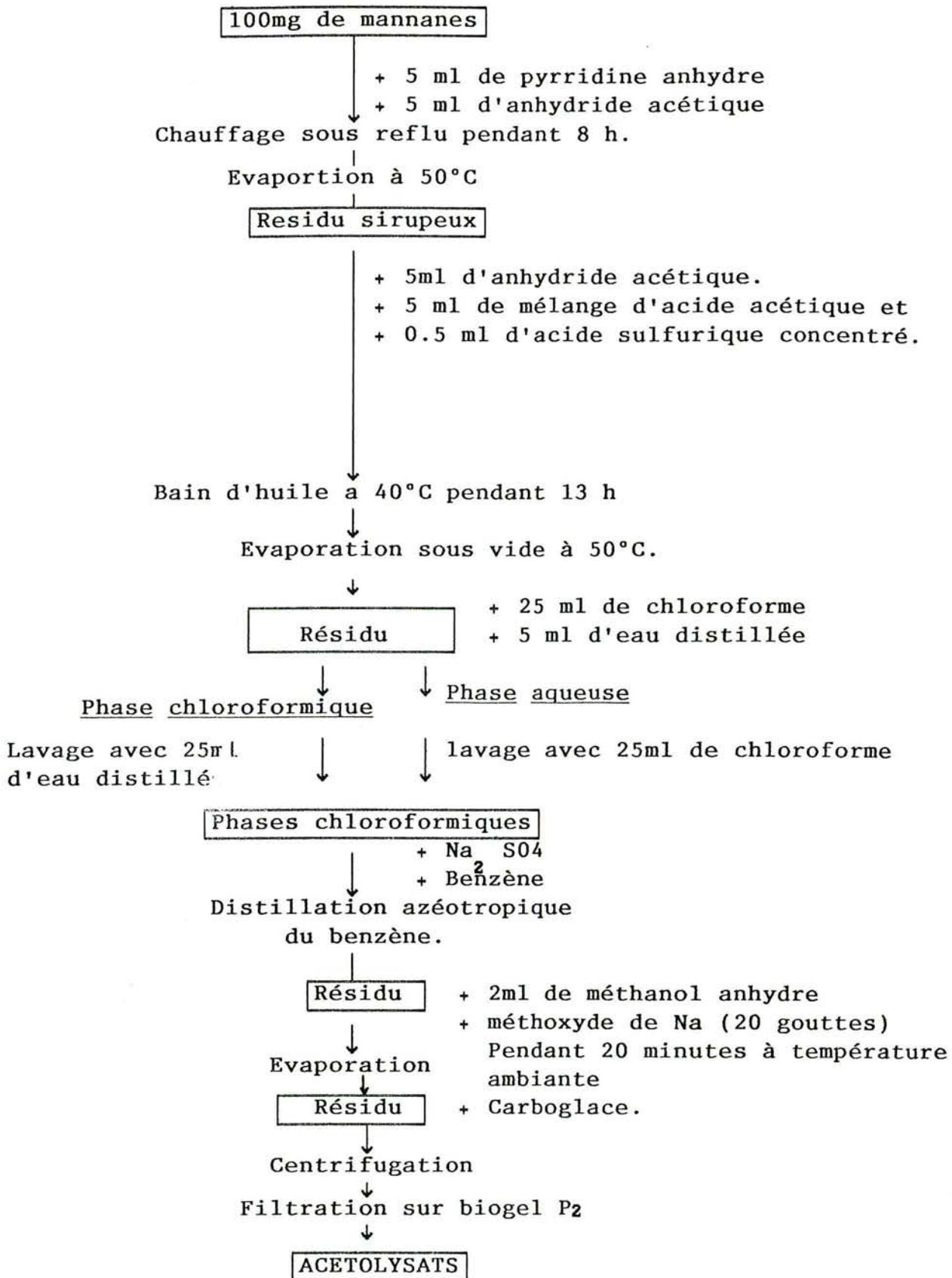


Fig. 49: Acétolyse des mannanes (selon KOCOURECK et al., 1969)

Nous avons d'abord déterminé le temps de réaction au cours d'essais préliminaires effectués sans réducteur.

Une prise d'essai de 1mg du produit en solution dans 3ml de NaOH 0.1N est incubé pendant 48 heures à température ambiante. L'absorbance de la solution est lue à 280 nm; elle permet de suivre la cinétique de la réaction.

La β - élimination est ensuite réalisée sur 10 mg de l'échantillon. On les traite par 100ml d'une solution de NaOH 0.1N en présence de borhydrure de sodium 0.3 M durant 20 heures selon les conditions décrites par PIGNAN et al. (1974).

Les ions Na^+ de la solution sont éliminés par passage sur une résine DOWEX 50WX8 forme H^+ (200 à 400 mesh).

Après décantation, le surnageant est évaporé à sec, on y ajoute du méthanol, et par une série d'évaporations successives en présence de méthanol on élimine l'acide borique sous forme de borate de méthyle.

VI.11. TITRATION DES PHOSHOPEPTIDOMANNANES (PPM)

Elle a été réalisée selon la méthode de OKUBO et al., (1981) modifiée: 30mg de phosphapeptidomannanes sont dissous dans 50ml d'eau distillée, puis filtrés sur colonne DOWEX (H^+) et élués avec de l'eau distillée. Les filtrats décationisés sont rassemblés et titrés par de la soude 0.0025N au pH mètre.

VI.12. TEST DE PRÉCIPITATION DES PPM PAR LA CONCAVALINE A (CON A)

La réaction de précipitation des PPM de levures floculantes et non floculantes par la concavaline A a été réalisée suivant la méthode de OKUBO et SUZUKI (1978).

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA FLOCCULATION DES SOUCHES ("MERES")

REFERENCES: x Y 11630 ET x Y 11631

CHAPITRE III

CROISSANCE ET FLOCCULATION DE *K. LACTIS*

INFLUENCE DE FACTEURS NUTRITIONNELS

I. ESSAIS PRELIMINAIRES

Afin de déterminer les conditions optimales de croissance et de floculation, nous avons étudié le comportement des deux souches *Kluyveromyces lactis* haploïdes, floculante (KLF) et non floculante (KLNF) vis à vis de différents milieux, couramment utilisés et qui se distinguent essentiellement par la nature de la source azotée et de la teneur en calcium.

Les cultures ont été conduites en fioles de 100ml selon les conditions décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Les courbes de cinétiques de croissance et de variation du pourcentage de floculation ont été établies pour chaque milieu de culture.

I.1. CROISSANCE DES SOUCHES *K. lactis* EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE

Les courbes de croissance enregistrées (figures 50, 51, 52 et 53) permettent de mettre en évidence, pour chaque souche une légère différence de vitesse de croissance selon le milieu.

Par ailleurs, la vitesse de croissance de la souche non floculante est légèrement supérieure à celle de la souche floculante quel que soit le milieu de culture. De même les taux de croissance calculés varient selon le milieu et les plus élevés ont obtenus sur milieux à base de peptone (Tableau 10).

TABLEAU 10: Variation du taux de croissance des souches KLF et KLNF en fonction du milieu de culture

	KLF	KLNF
TAUX CROISSANCE	$\mu(h^{-1})$	$\mu(h^{-1})$
MILIEU DE CULTURE		
M ₁	0,21	0,26
M ₂	0,19	0,22
M ₃	0,28	0,29
M ₄	0,28	0,27
M ₅	0,31	0,31
M ₆	0,24	0,26
M ₇	0,31	0,31

(μ) taux de croissance

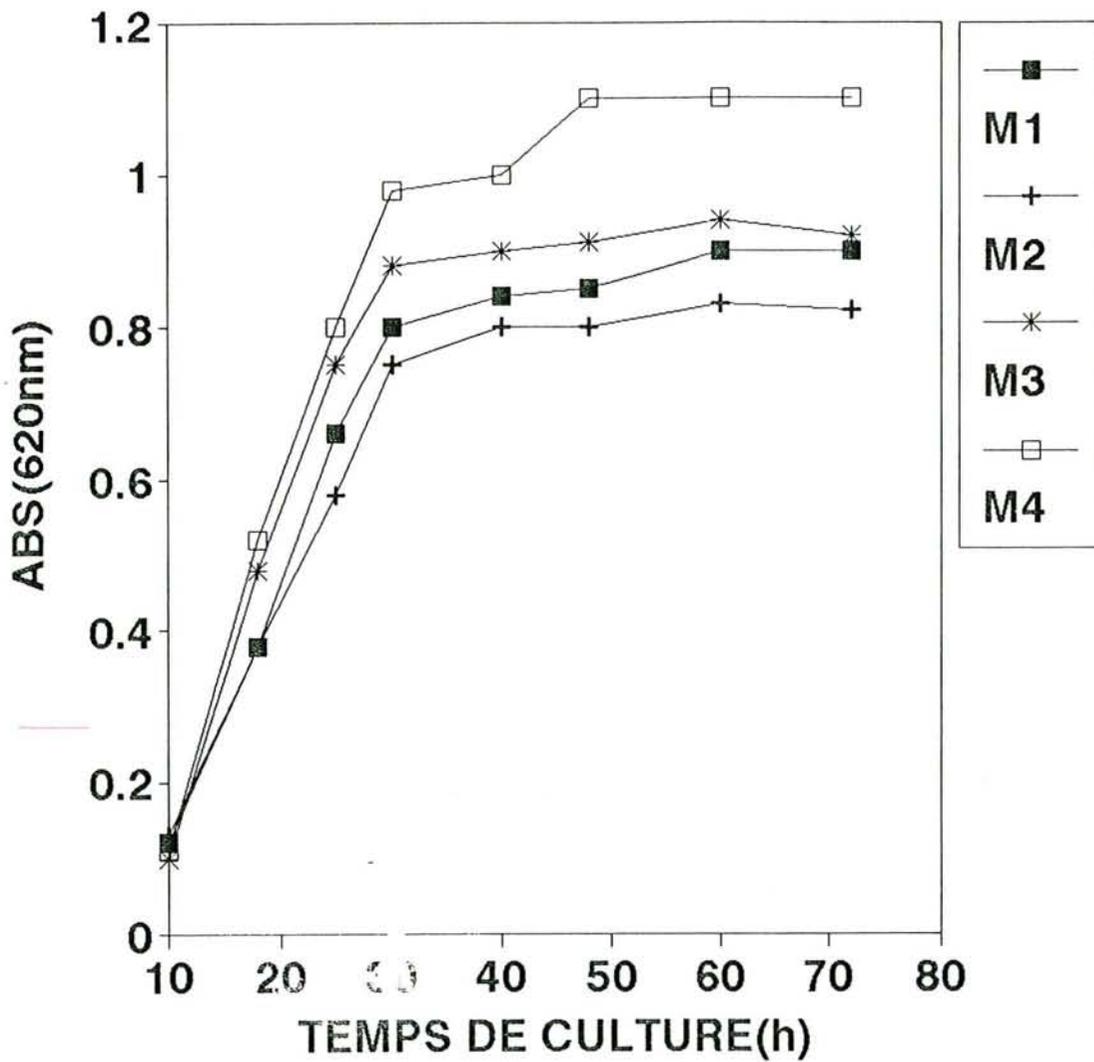


Fig. 50: Cinétique de croissance de *K. lactis* flocculante sur différents milieux

M1 Milieu Atkin

M2 Milieu Atkin à base de sulfate d'ammonium

M3 Milieu Déinéma

M4 milieu Déinéma à base d'extrait de levure

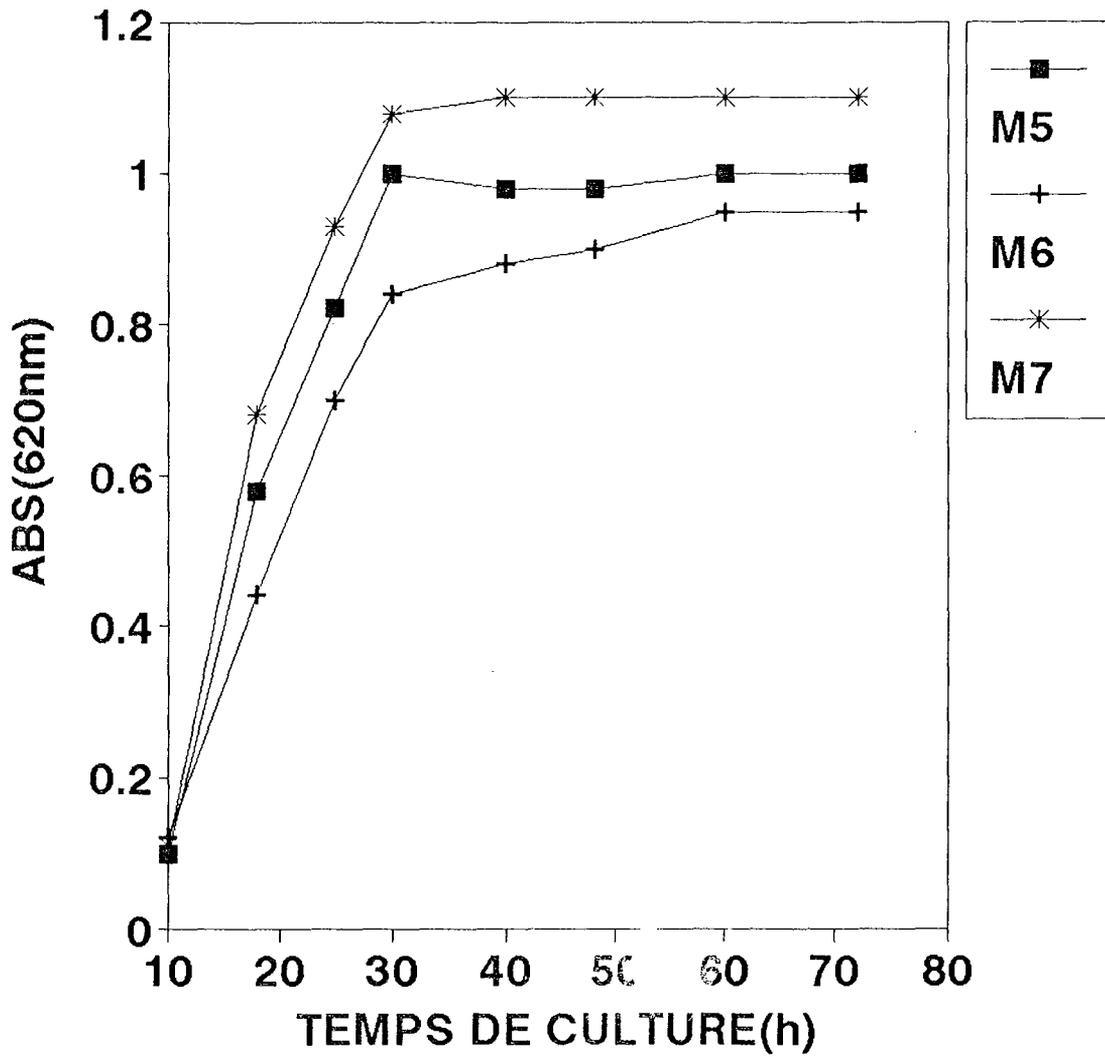


Fig. 51: Cinétique de croissance de *K.lactis* flocculante sur différents milieux.

- M5 Milieu Déinéma à base de peptone
- M6 Milieu Déinéma à base de caséine
- M7 Milieu de Sabouraud

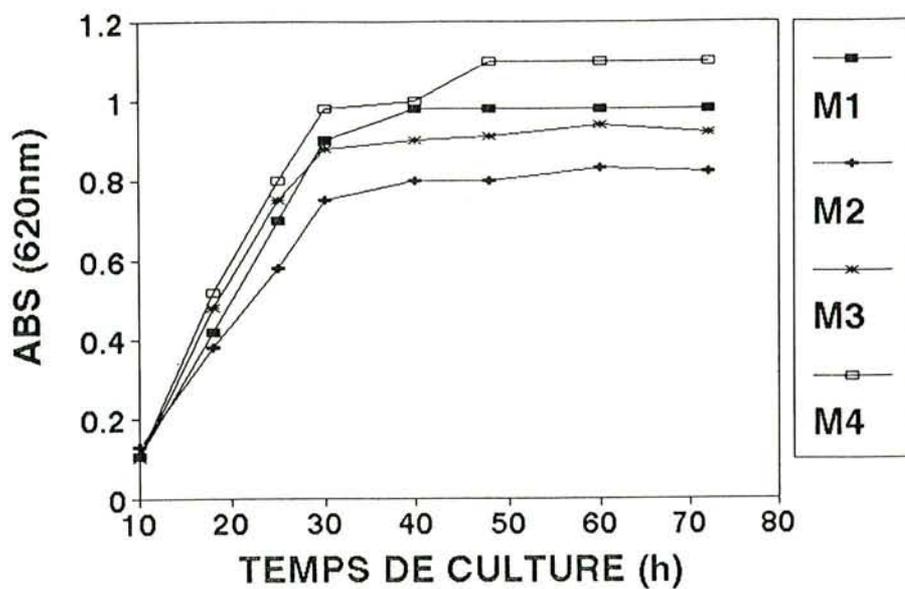


Fig. 52: Cinétique de croissance de *K.lactis* non flocculante sur différents milieux.

M1 Milieu Atkin

M2 Milieu Atkin à base de sulfate d'ammonium

M3 Milieu Déinéma

M4 milieu Déinéma à base d'extrait de levure

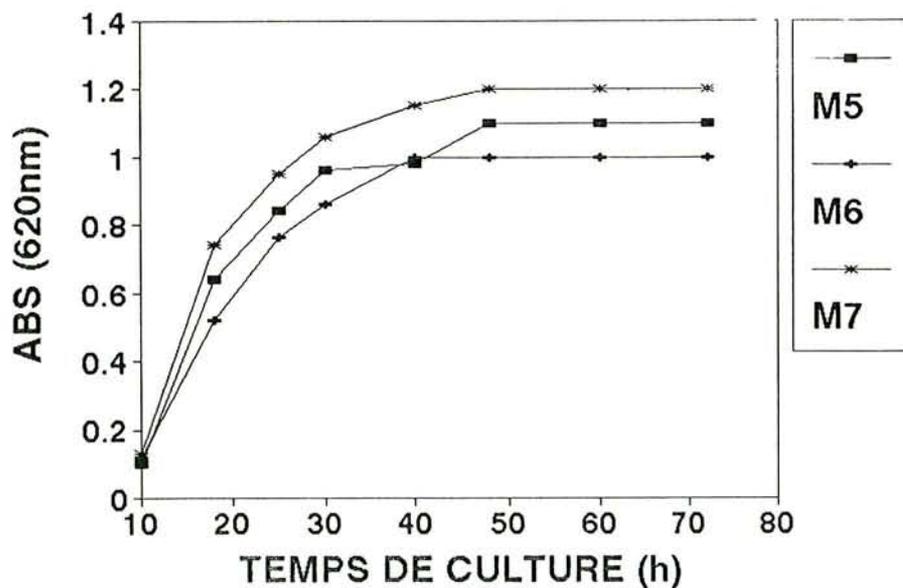


Fig. 53: Cinétique de croissance *K. lactis* non flocculante sur différents milieux

M5 Milieu Déinéma à base de peptone

M6 Milieu Déinéma à base de caséine

M7 Milieu de Sabouraud

Au cours de la croissance les variations du pH du milieu de culture (résultats indiqués sur les figures 54 (a et b) et 55 (a et b) montrent une diminution de pH, sensiblement régulière, qui passe pratiquement de 5,5 à 4,2 et 4,0 selon le milieu, après 72 heures de culture.

Notons que la baisse de pH la plus élevée est enregistrée en milieu ATKIN à base de sulfate d'ammonium. Les résultats montrent également que la baisse de pH est légèrement plus accentuée chez la levure floculante.

I.2. FLOCCULATION DE *K. lactis* EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE

La variation du pourcentage de floculation en fonction du milieu de culture a été suivie au cours de la croissance directement dans le milieu selon la méthode décrite. Nous avons, d'abord déterminé le temps et le pourcentage de floculation (%FLO) maximum observé pour chaque milieu utilisé. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11.

TABLEAU 11: Croissance et floculation de *K. lactis* en fonction du milieu de culture

MILIEU DE CULTURE	SOURCE AZOTEE	KLF				FLNF			
		μ (h^{-1})	R	T.F.	%FLO	μ (h^{-1})	R	T F	%FLO
M ₁	caséine	0,21	2,4	24	15	0,26	2,5	-	0
M ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,19	2,2	48	5	0,22	2,3	-	0
M ₃	Ext.levure	0,28	2,4	22	25	0,29	2,6	-	0
M ₄	Ext.levure sans CaCl ₂	0,28	2,7	18	30	0,27	2,9	-	0
M ₅	Peptone	0,31	2,9	20	50	0,31	3,1	-	0
M ₆	caséine	0,24	2,4	24	20	0,26	2,7	-	0
M ₇	Peptone	0,31	3,0	15	60	0,31	3,2	-	0

μ : Taux de croissance (h^{-1})

R : Rendement pondéral maximal en biomasse (g/l)

TF : Temps de floculation (h) (début de floculation)

%FLO: Pourcentage de floculation maximum observé

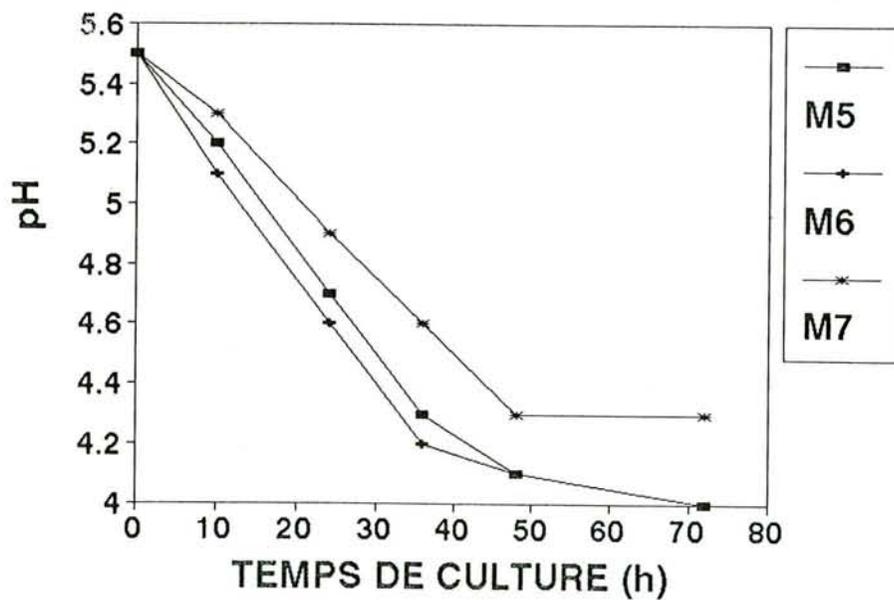
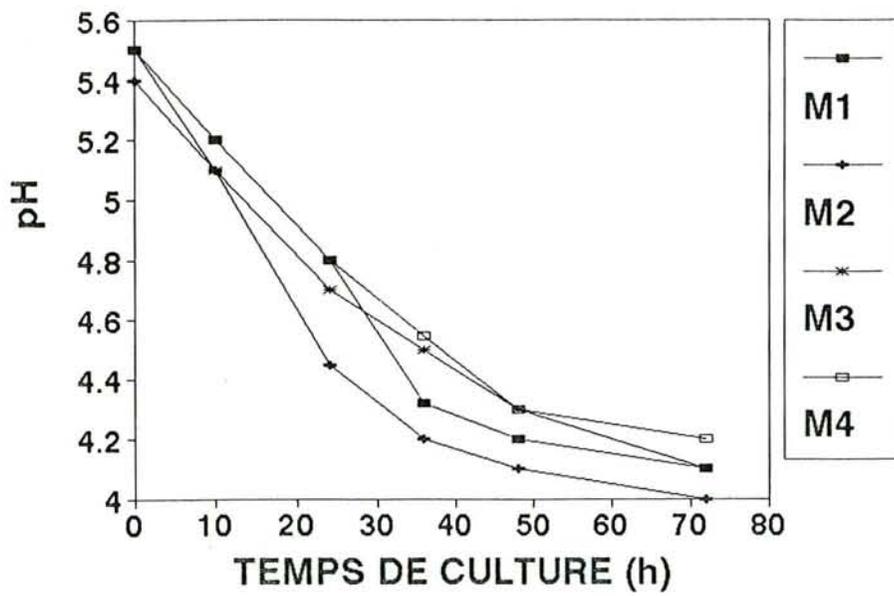


Fig. 54: Evolution du pH du milieu de culture au cours de la croissance de *K. lactis* flocculante sur différents milieux

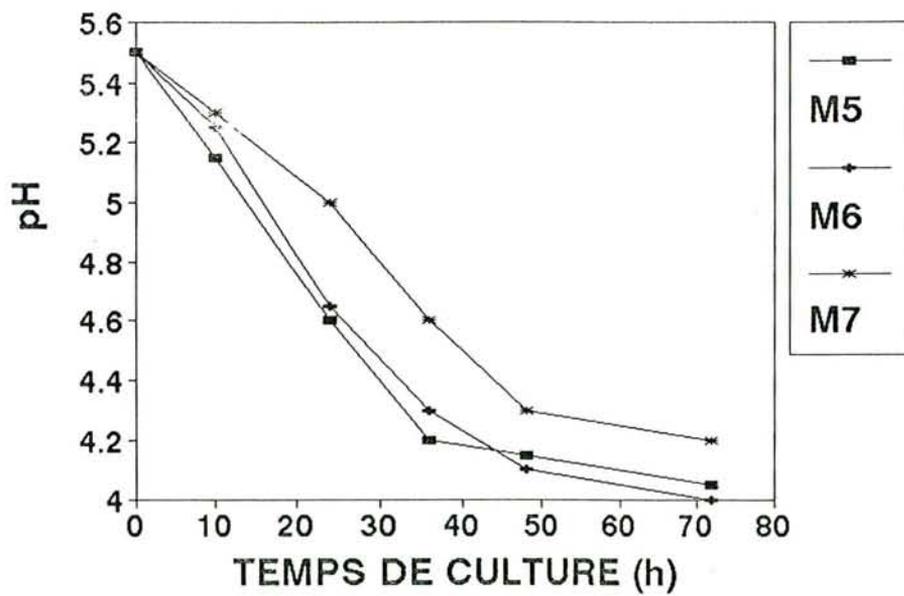
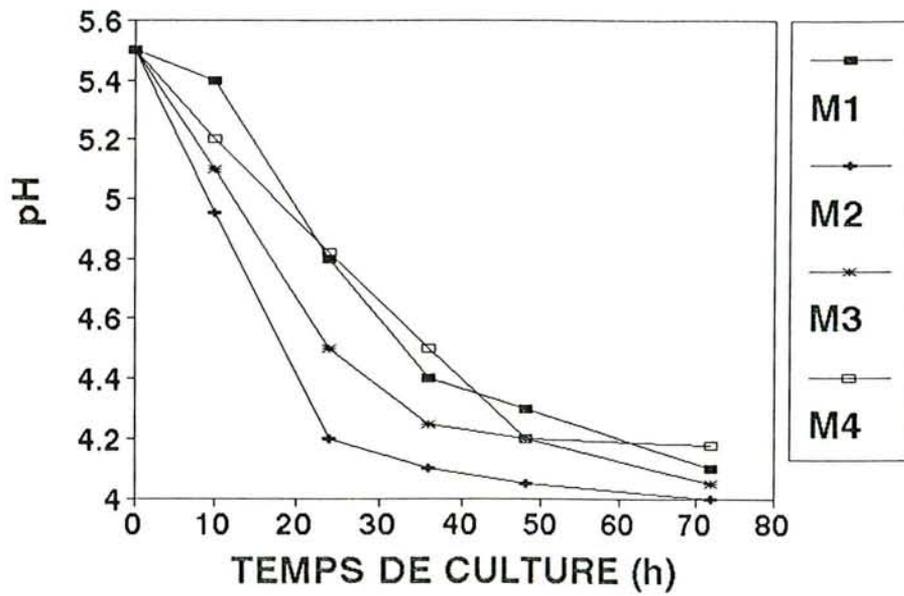


Fig. 55: Evolution du pH du milieu de culture au cours de la croissance de *K. lactis* non flocculante sur différents milieux

A la lumière de ces résultats, le temps et le pourcentage de floculation sont influencés par la nature de la source azotée. De plus, les milieux à base de peptone, en particulier le milieu de sabouraud (M7) sont les plus favorables à la floculation de la souche potentiellement floculante (le pourcentage de floculation maximum est voisin de 60% après 48 heures de croissance). Cette observation permet de supposer que la peptone contiendrait des composés inducteurs de la floculation. Par ailleurs, la souche désignée KLNF ne flocule pas quel que soit le milieu de culture. Dans les milieux à base de peptone la floculation apparaît en phase exponentielle (après 15 heures de croissance dans le cas du milieu de sabouraud).

Nous avons, ensuite, suivi les variations du pourcentage de floculation en fonction du temps de croissance pour chaque milieu de culture. Les résultats indiqués sur la figure 56 (a et b) permettent de faire les observations suivantes:

- La floculation se manifeste en phase exponentielle, et le pourcentage de floculation augmente pour atteindre une valeur maximale, après 48 heures de croissance (phase stationnaire).

- Après 48 heures de croissance, le pourcentage de floculation baisse de façon plus ou moins prononcée selon le milieu de culture.

- Lorsque la baisse de l'intensité de la floculation apparaît en phase stationnaire, elle s'explique par des phénomènes d'autolyse des cellules et d'inhibition de charges à la surface cellulaire.

- De telles observations ont été faites par certains auteurs pour d'autres levures, en particulier BAJPAI et MARGARITIS (1986) qui notent une diminution de l'intensité de la floculation de *Kluyveromyces marxianus* en fin de phase exponentielle. MANGUNWIDJAJA (1988) obtient les mêmes effets pour des souches hybrides de *Kluyveromyces lactis* haploïdes. Cependant, une telle observation n'est pas générale, en effet NISHIHARA et al., (1976) ont constaté que *S. cerevisiae* commence à floculer pendant la phase exponentielle puis s'intensifie en fin de cette phase.

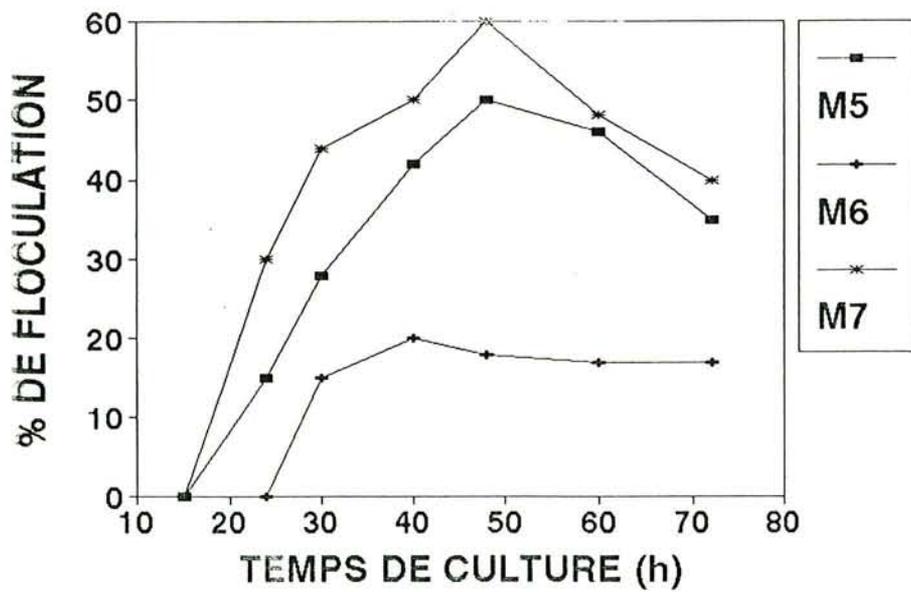
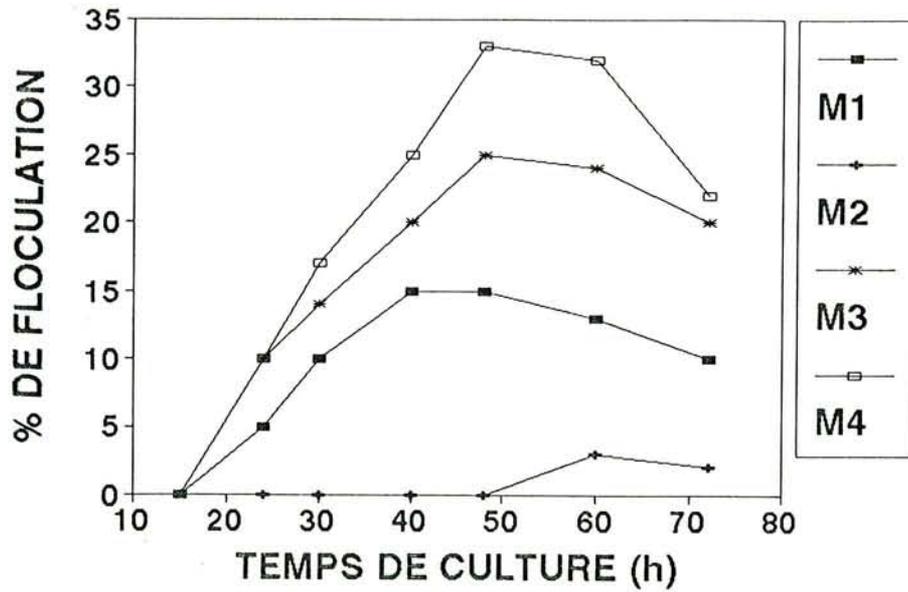


Fig. 1. Evolution du pourcentage de floculation de *K. lactis* en fonction du temps de croissance sur divers milieux

II. INFLUENCE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES FACTEURS NUTRITIONNELS SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION DE *K. Lactis*

Dans de nombreux cas, il a été constaté que toute variation qualitative ou quantitative des éléments du milieu de culture, peut affecter la croissance et la formation d'agrégats cellulaires des levures (AMRI et al., 1982).

Les essais préliminaires nous ont conduits à retenir pour la suite de notre étude le milieu de type sabouraud plus favorable à la croissance et la floculation. Ces mêmes essais ont permis de mettre en évidence l'influence de la nature azotée sur la croissance, le temps et le pourcentage de floculation.

Nous avons alors étudié l'effet de la concentration en éléments azotés, carbonés et minéraux du milieu de culture, sur la croissance et la floculation des deux souches *K. Lactis*.

Les cultures sont conduites en fioles de 100ml contenant 20 ml de milieu et maintenues à 25°C sous agitation magnétique.

II.1. INFLUENCE DE LA SOURCE AZOTÉE

L'effet de la source azotée a été étudié en milieu de type sabouraud. Nous avons utilisé successivement la peptone, la caséine, l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium; en faisant varier leurs concentrations de 0,1% à 5% (P/V

Les courbes de croissance (figures 57, 58, 59 et 60) montrent que le développement des deux souches en fonction de la concentration d'une même source azotée est analogue. Cependant elles mettent en évidence dans tous les cas une concentration optimale correspondant aux valeurs maximales de croissance et de floculation. Cette concentration optimale varie légèrement selon la source azotée: elle se situe dans l'intervalle de 0,4% à 2% (P/V) pour la peptone, la caséine et le sulfate d'ammonium et de 3% (P/V) pour l'extrait de levure. Ces mêmes courbes indiquent, par ailleurs, que le taux de croissance et le pourcentage de floculation baissent pour des concentrations supérieures à 3% (P/V). Cette baisse est plus ou moins prononcée selon la nature de la source azotée.

Signalons, en outre, que la souche floculante est plus sensible aux variations de la concentration en sulfate d'ammonium. En effet, la souche ne flocule plus pour une concentration en sulfate d'ammonium supérieure à 0,5 % (P/V).

Les mêmes résultats montrent également que la souche KLNf ne flocule pas quelles que soient la nature et la concentration de la source azotée.

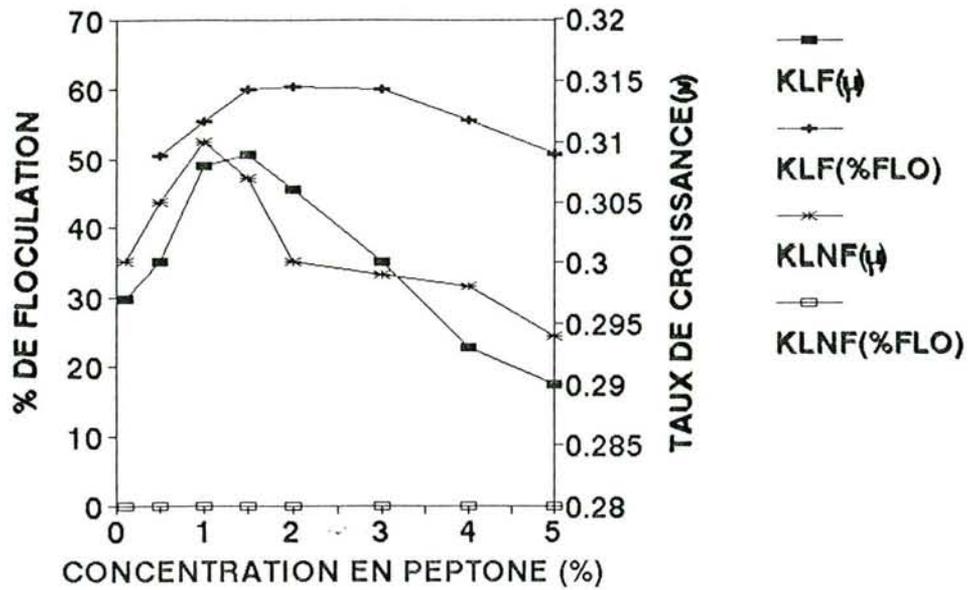


Fig. 57: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration en peptone

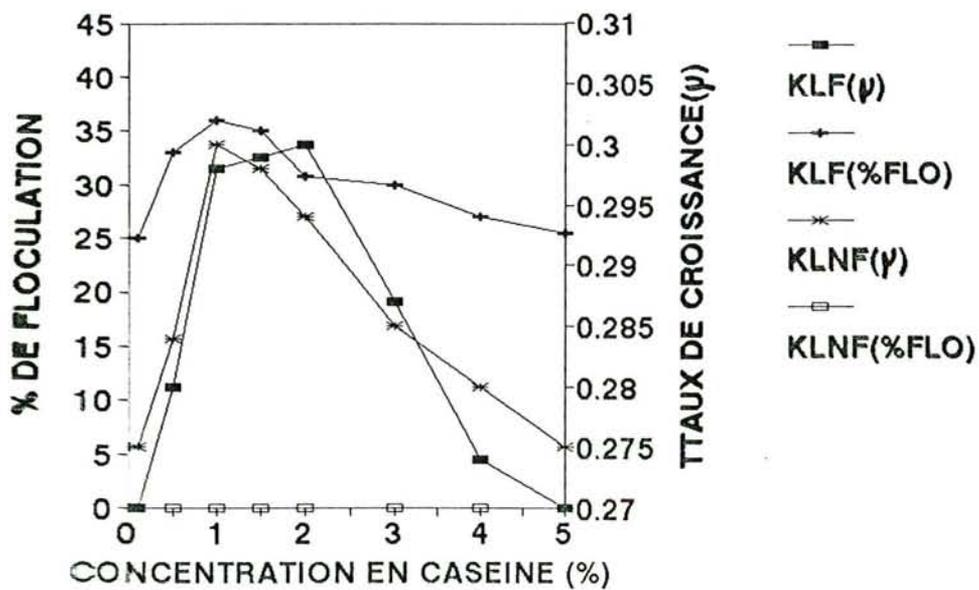


Fig. 58: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration en caséine.

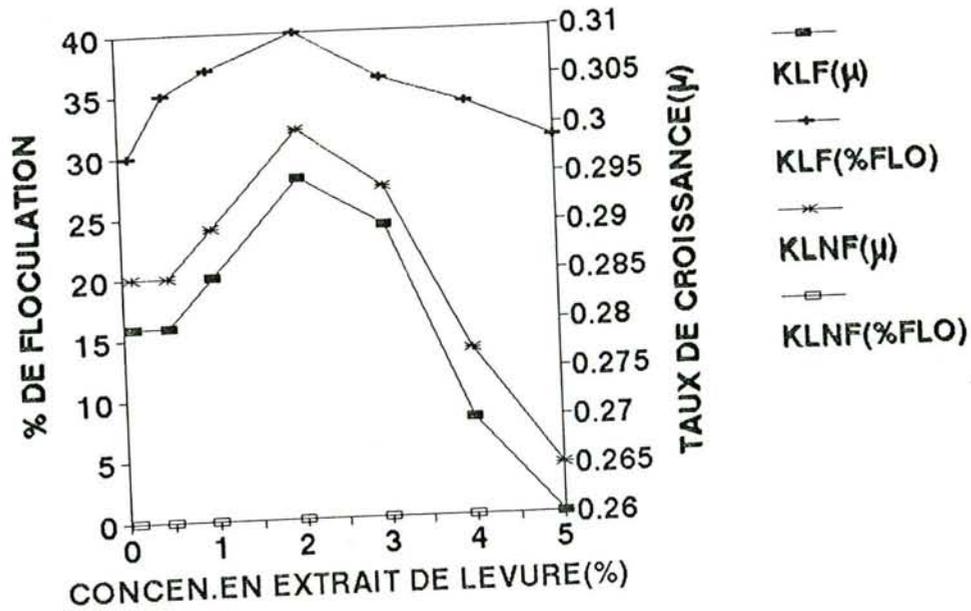


Fig. 59: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration de l'extrait de levure

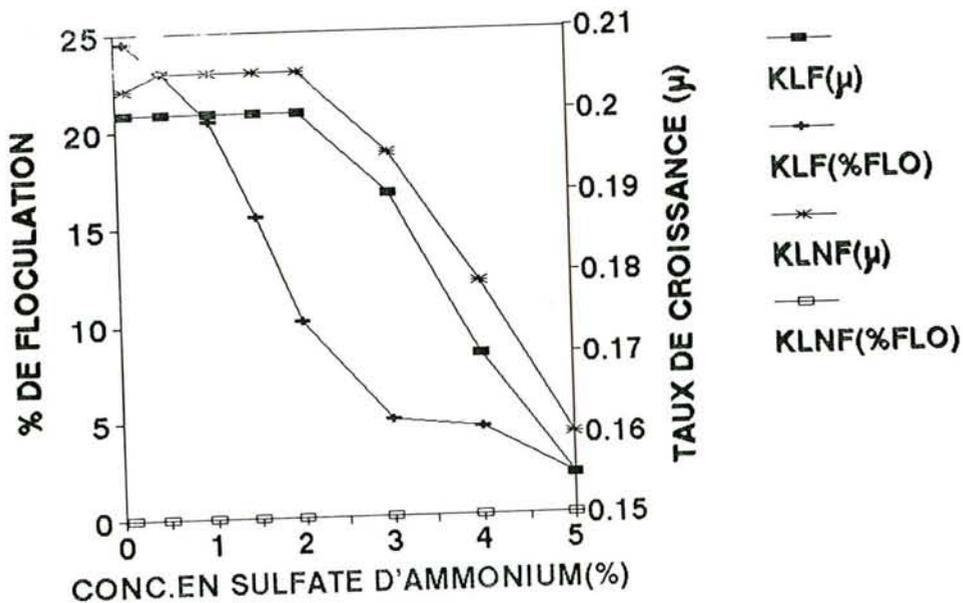


Fig. 60: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium

II.2. INFLUENCE DE LA SOURCE CARBONÉE

La croissance et la floculation ont été étudiées en milieu de type sabouraud dans lequel la source de carbone a été modifiée en remplaçant le glucose par le mannose, le galactose et le lactose; et en faisant varier la concentration de chaque sucre de 0,1% à 5% (P/V).

Les deux souches se développent dans tous les milieux quelle que soit la nature de la source carbonée (figures 61, 62, 63 et 64).

Le taux de croissance de KLF et KLNf est maximal pour des concentrations comprises entre 0,1% et 2% (P/V) d'une manière générale. Ce taux baisse, dans tous les cas, lorsque les concentrations sont supérieures à 2% (P/V).

Quand les souches sont cultivées en milieu de sabouraud à base de galactose, la croissance de la souche floculante est ralentie pour des concentrations supérieures à 1% (P/V) alors que celle de la souche non floculante n'est pas affectée.

La floculation est dépendante de la concentration et de la nature du sucre utilisé. Ainsi lorsque le milieu est à base de glucose et de mannose, nous observons une augmentation de l'intensité de floculation pour de faibles concentrations, pour atteindre une valeur maximal qui correspond à 1% et 2% de sucre respectivement. Pour une concentration de 0,1% la floculation est pratiquement nulle (figures 61 et 62) de même une concentration supérieure à 2% entraîne une diminution relativement accentuée de la floculation dans le milieu à base de glucose (soit une baisse d'environ 30%).

Lorsqu'on remplace le glucose dans le milieu de culture par le galactose, la floculation est pratiquement nulle dès que la concentration atteint 0,25 %. La croissance des 2 souches n'est pas affectée par des concentrations de l'ordre de 1%. Cependant pour des concentrations supérieures, la croissance de la souche floculante est ralentie; en effet on note une baisse du taux de croissance d'environ 0,13 quand la concentration en galactose passe de 1% à 4%. La sensibilité de la souche floculante au galactose, peut s'expliquer par des phénomènes d'inhibition liés à la biologie de la souche ou à une assimilation partielle de ce sucre par la souche. Cette dernière hypothèse semble la plus probable puisqu'en milieu lactosé on note une baisse du taux de croissance et du pourcentage de floculation de cette souche, ce qui laisse suggérer que la souche floculante, en présence du lactose assimile une partie du galactose issu de l'hydrolyse du lactose et une partie est libérée dans le milieu de culture.

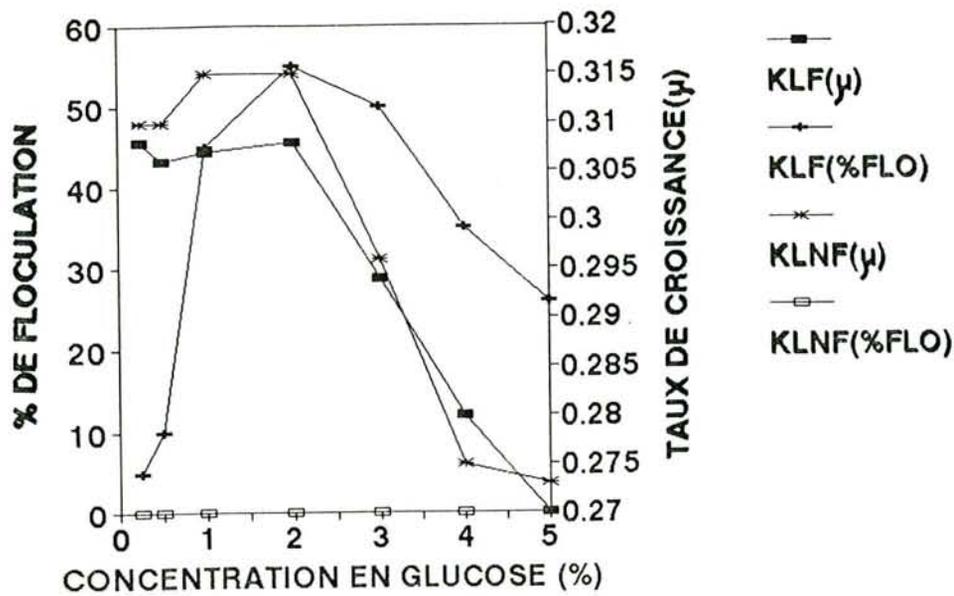


Fig. 61: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en glucose

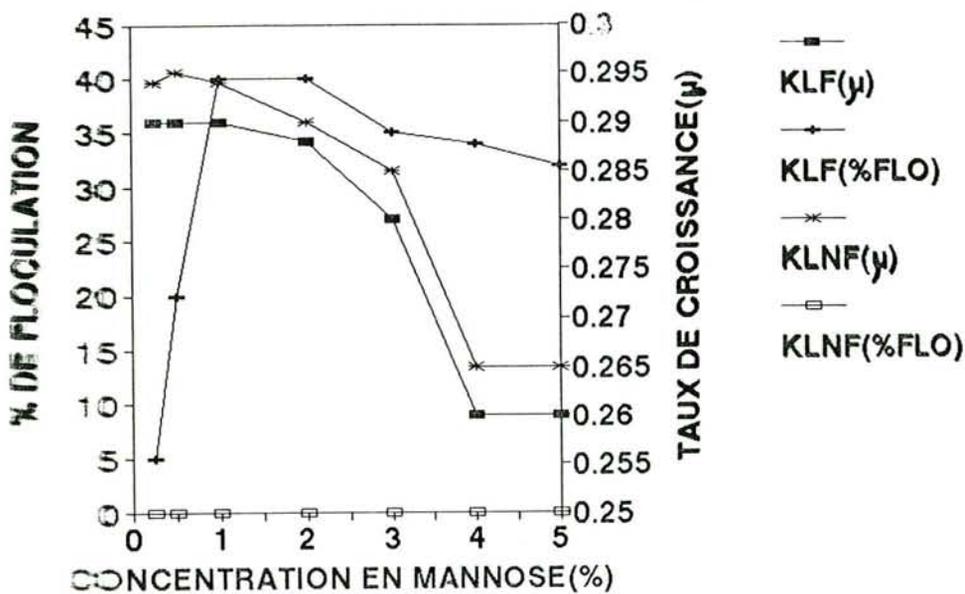


Fig. 62: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en mannose

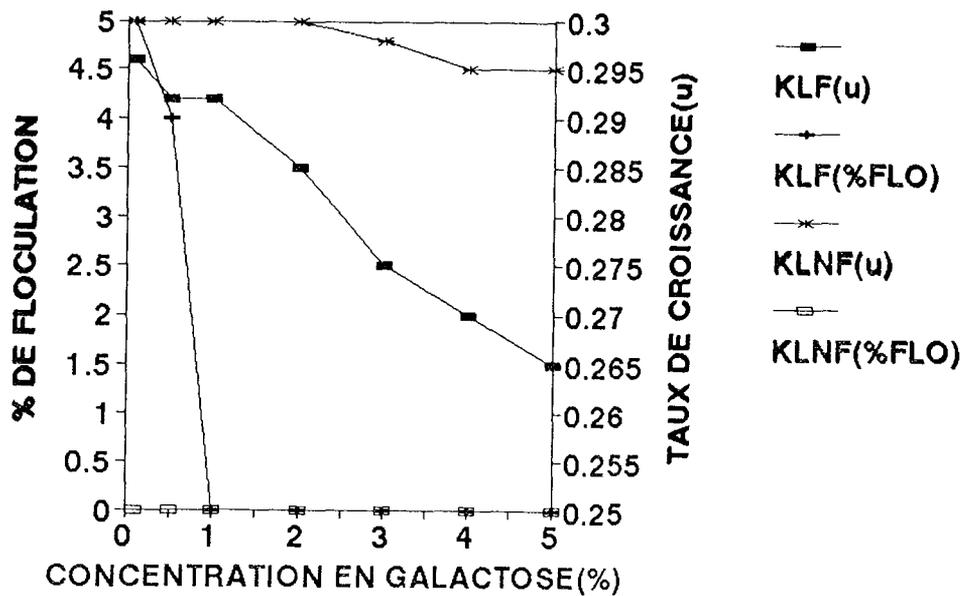


Fig. 63: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en galactose

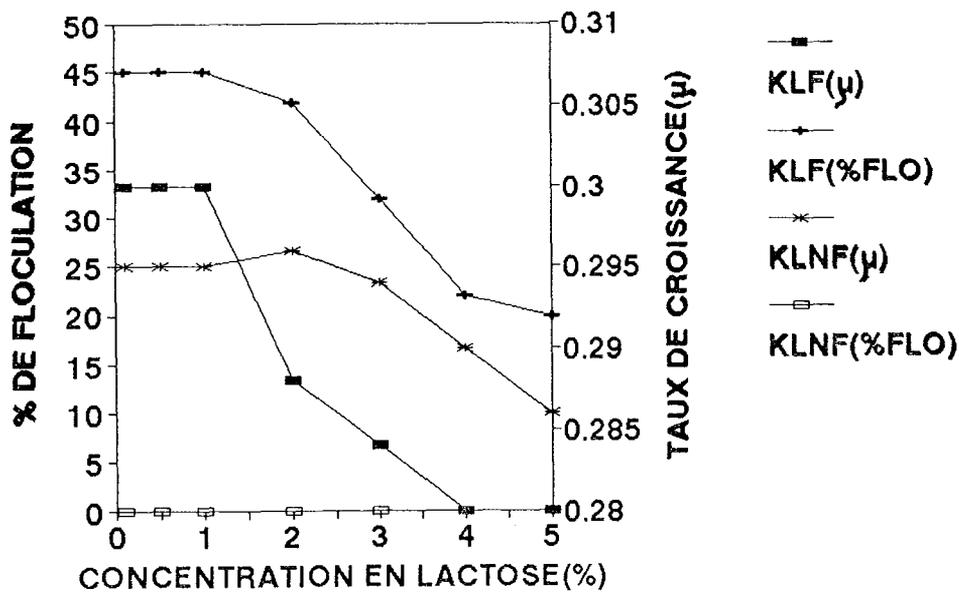


Fig. 64: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en lactose

II.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ELEMENTS MINERAUX SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION

Certains éléments minéraux sont cités comme inducteurs ou inhibiteurs de la floculation, quoique leur effet soit fortement influencé par la présence ou l'absence d'autres éléments du milieu de culture.

Nous avons étudié l'effet de certains éléments en modulant leur teneur dans le milieu de sabouraud (à base de peptone et de glucose), aux concentrations optimales déterminées précédemment.

Les différents éléments sont ajoutés au milieu de culture séparément, sous forme de chlorure, à des teneurs allant de 0,1 à 4 m M.

Pour chaque élément, nous évaluons son effet en suivant la cinétique de croissance et en déterminant le pourcentage de floculation après 48 heures de culture.

II 3.1. EFFET DU CALCIUM

L'addition de calcium dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la croissance (figure 65); toutefois cette augmentation est faible comparativement à celle observée pour d'autres levures, LOTON et al., (1976) pour *Saccharomyces uvarum*; KOVAC (1985) pour *Saccharomyces cerevisiae* et MANGUNWIDJAJA (1988) pour les souches *K. lactis* haploïdes. Ces auteurs ont constaté que l'addition de calcium dans le milieu de culture permet de multiplier par 2 ou 3 la vitesse de croissance des levures.

Bien que la floculation apparaisse lorsque le milieu de culture contient une teneur en calcium minimale de 0,07 mM, une augmentation de l'intensité de floculation d'environ 20% est observée quand cette concentration passe à 1m M .Cependant les résultats montrent qu'un excès de cet élément diminue la floculation (figure 65).

II.3.2 INFLUENCE DU RAPPORT ca^{2+} / k^{+}

Afin de mettre en évidence l'action antagoniste éventuelle des ions ca^{2+} et K^{+} , ces deux éléments sont ajoutés simultanément au milieu de culture à des concentrations variables.

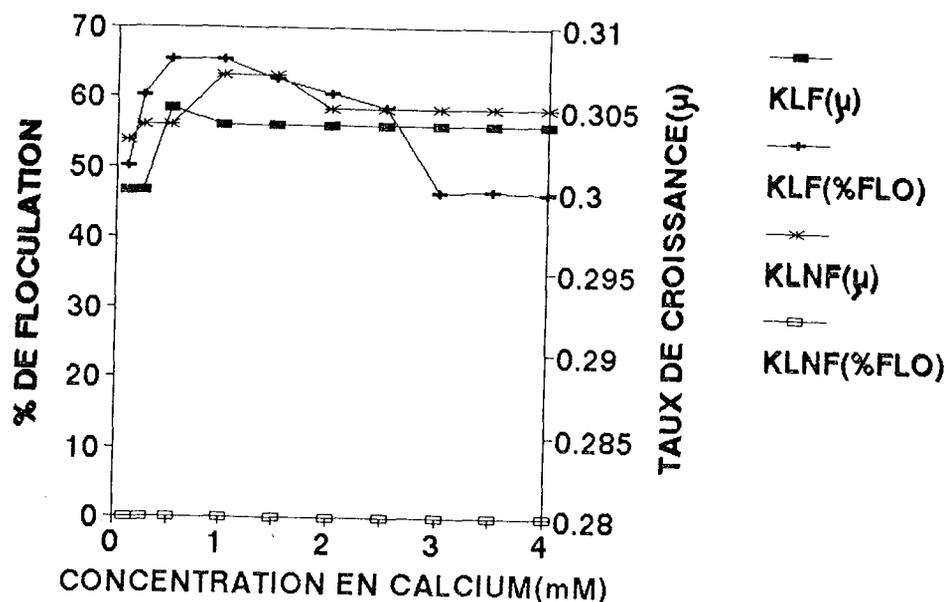


Fig. 65: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de culture

Le potassium n'intervient pas directement dans le phénomène de floculation, mais sa présence dans le milieu de culture est indispensable à l'assimilation du glucose; le calcium, au contraire joue un rôle direct, comme activateur, en induisant un changement dans les structures impliquées, favorable à la formation d'agrégats cellulaires.

D'après les résultats indiqués dans le tableau 12, la croissance et la floculation sont peu influencées par les variations du rapport Ca^{2+}/K^+ . Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus pour *Saccharomyces uvarum* par AMRI et al., (1979). Selon ces auteurs, ce rapport serait déterminant pour l'expression de la floculation de cette levure.

TABLEAU 12: Variation du taux de croissance et du pourcentage de floculation de *K. lactis* en fonction du rapport Ca^{2+}/K^+ dans le milieu de culture

$\frac{Ca^{2+}}{K^+}$ (mM)		0	0,1	0,1	0,5	1,0	1,0	0
		0	0	0,1	1,5	2,0	3,0	5,0
LEVURES								
KLF	$\mu(h^{-1})$	0,30	0,30	0,30	0,30	0,29	0,28	0,28
	% FLO	50,6	55,5	57,4	60,4	55,8	55,7	50,2
KLNF	$\mu(h^{-1})$	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,29	0,29
	% FLO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

II.3.3. EFFET DU MAGNESIUM ET DU MANGANESE

Ces éléments ont été reconnus indispensables à la croissance des levures. Le magnésium, en particulier, intervient dans la biosynthèse de facteurs responsables de la floculation et qu'une concentration de 50 ppm est nécessaire dans le milieu de culture (SALTUKOGLU et SLAUGHTER, 1983; WALKER et DUFFUS, 1980).

Dans nos conditions expérimentales l'addition de Mg^{2+} et Mn^{2+} ne semble pas affecter la croissance et la floculation (figures 66 et 67); ceci laisse supposer que la peptone contiendrait ces deux éléments à des concentrations suffisantes pour la croissance et l'expression de la floculation de *K. lactis*.

II.3.4. EFFET DU BARYUM ET DU STRONTIUM

Les résultats obtenus montrent que le baryum affecte la croissance, en particulier de la souche floculante, et la floculation diminue pour des concentrations supérieures à 0,25 mM. La floculation est totalement inhibée par cet élément par addition de 1mM dans le milieu de culture (Figure 68).

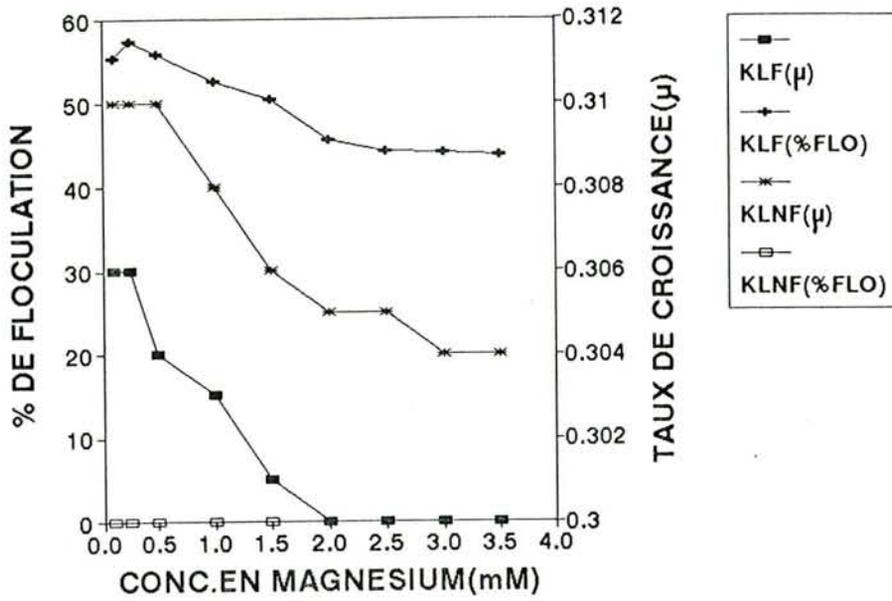


Fig. 66: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (% FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la teneur en magnésium dans le milieu de culture

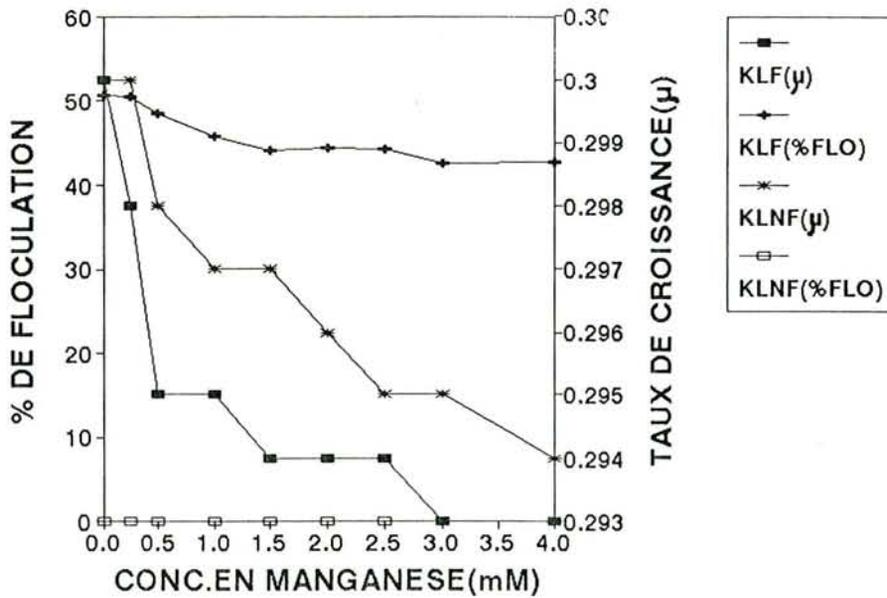


Fig. 67: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (% FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en Manganèse dans le milieu de culture

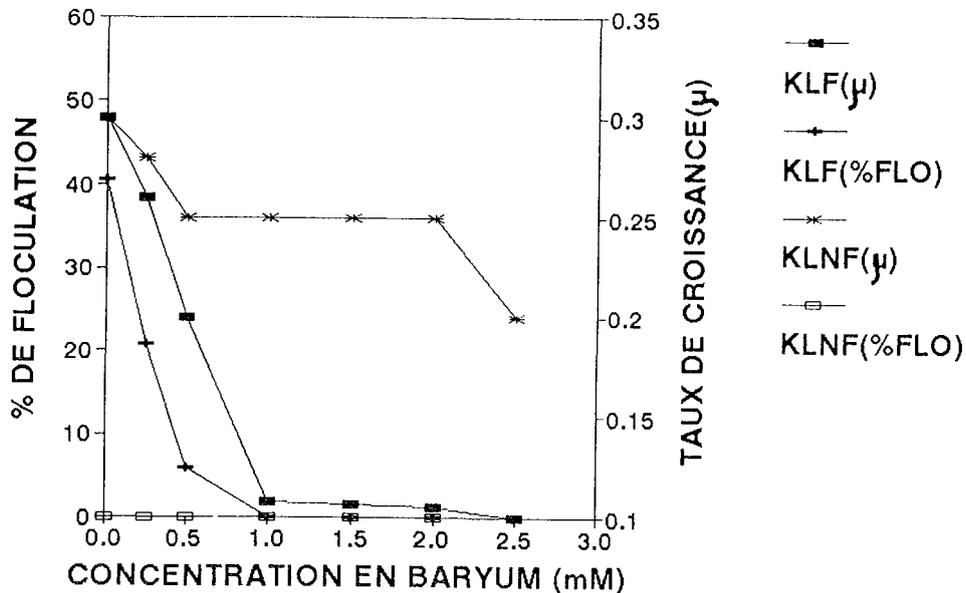


Fig. 68: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (% FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en baryum dans le milieu de culture

En revanche, le strontium inhibe totalement la floculation à une concentration de 0,5 mM. A partir de cette concentration, la croissance des 2 deux souches diminue. Le taux de croissance passe de 0,3 à 0,294 et 0,285 respectivement pour KLF et KLNf (figure 69).

Par ailleurs, l'effet du strontium sur la floculation est plus prononcé que celui du baryum.

L'effet inhibiteur sur la floculation du baryum et du strontium a été signalé par certains auteurs en particulier TAYLOR et ORTON (1973) et NISHIHARA et al., (1982).

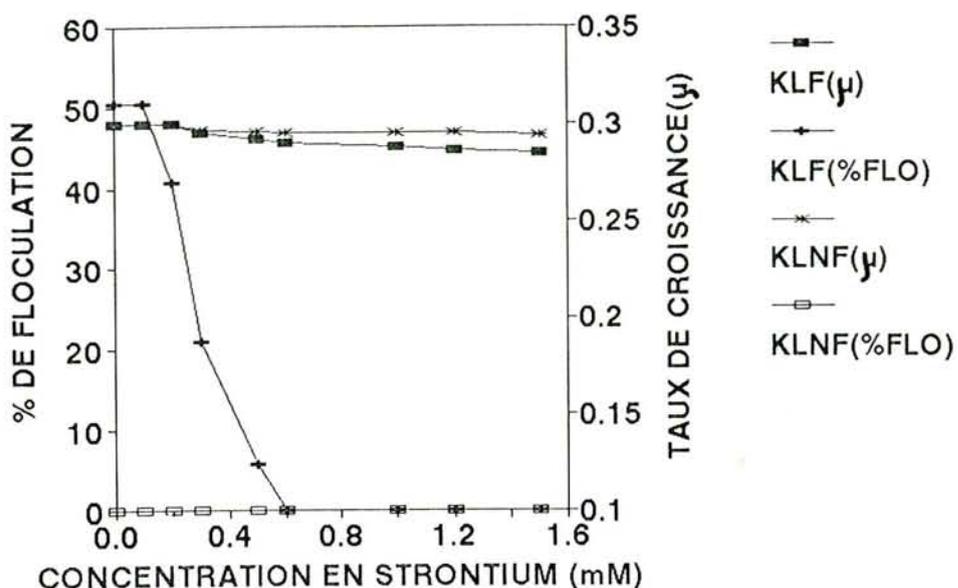


Fig. 69: Variation du taux de croissance (μ) et du pourcentage de floculation (% FLO) de *K. lactis* floculante et non floculante en fonction de la concentration en strontium dans le milieu de culture

III. D I S C U S S I O N

Les éléments nutritifs du milieu ont une influence sur la floculation des levures; c'est pourquoi dans nos essais préliminaires, 7 milieux se différenciant par leur source azotée et la teneur en calcium, ont été testés.

D'après les résultats obtenus, les deux souches floculante ou non floculante se développent dans tous les milieux. En revanche la floculation maximale est observée sur les milieux de culture à base de peptone. Le milieu type sabouraud s'est avéré le plus favorable.

L'incidence de la source azotée sur la floculation a fait l'objet de nombreuses controverses. Selon certains auteurs (BAKER et KIRSOP, 1972; STEWART et al., 1973) les protéines et/ou les peptides présents dans le milieu de culture seraient des inducteurs de la floculation de certaines souches.

Lorsqu'on fait varier la concentration de la source azotée, il apparaît dans tous les cas une concentration pour laquelle la croissance et la floculation atteignent des valeurs maximales, mais au delà de cette concentration les éléments azotés altèrent la floculation. En effet, le sulfate d'ammonium, par exemple, inhibe totalement la floculation pour une concentration de 3% (P/V); cette observation est en accord avec les résultats de MILL (1964a) qui constate que les sels d'ammonium retardent la floculation quand ils sont en excès dans le milieu de culture.

D'après cet auteur, les variations du pouvoir floculant seraient dues à des modifications de structure chimique des parois; en effet, dans ces conditions, des processus métaboliques de la levure sont affectés par les facteurs nutritionnels.

L'influence de la source carbonée se manifeste sur la croissance et la floculation tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Le galactose se révèle être un inhibiteur de la floculation et la croissance de la souche floculante est ralentie pour des concentrations supérieures à 1% (P/V). La sensibilité de la souche floculante au galactose peut s'expliquer par une assimilation partielle de ce sucre; puisqu'en milieu lactosé on note une baisse du taux de croissance et du pourcentage de floculation de cette souche, ce qui laisse supposer que la souche floculante, en présence du lactose libre du galactose non assimilé dans le milieu de culture.

Lorsque la teneur en sucre varie dans le milieu, on observe une concentration minimale nécessaire à la floculation et une concentration au delà de laquelle la croissance et la floculation diminuent.

Les travaux relatifs au rôle qualitatif et quantitatif des sucres sont divergents; ainsi, si KRABBE (1966) et KIRSOP (1974) montraient qu'un moût enrichi en glucose entraînait une floculation moins intense; NISHIHARA et al., (1976b) quant à eux, constataient que le glucose était indispensable à l'induction de la floculation.

Selon AMRI et al., (1979) des concentrations en glucose inférieures à 5% dans le milieu de culture accélèrent la floculation de *Saccharomyces uvarum*. Ces résultats ont été confirmés par KAMADA et MURATA (1984b) pour *Saccharomyces cerevisiae*.

De nombreux travaux ont mis en évidence, par ailleurs, l'importance des éléments minéraux dans le phénomène de floculation des levures.

Dans nos conditions expérimentales, nous observons une faible sensibilité de la souche floculante et non floculante vis à vis des variations de la concentration en calcium. Une concentration de 0,07 mM est suffisante pour induire la floculation; cependant lorsqu'on augmente la teneur en cet élément de 0,1 à 1 mM, on constate une augmentation de la floculation de 15 à 20%, mais la croissance des deux souches n'est pas affectée.

L'addition d'ion K^+ simultanément avec Ca^{2+} n'entraîne pas de variations significatives de la croissance et de la floculation..

L'addition de magnésium et de manganèse dans le milieu de culture n'a pas d'effet sur la croissance et la floculation. En revanche, l'addition du baryum et strontium inhibe la floculation pour des teneurs supérieures à 1mM et 0,5mM respectivement. Ces deux éléments ont été, en effet, décrits comme de puissants antagonistes du calcium et inhibiteurs de la floculation (TAYLOR et ORTON, 1973); NISHIHARA et al., 1983). En dépit de nombreux travaux relatifs à l'influence des éléments minéraux leur mode d'action reste à préciser pour chaque cas de floculation.

CHAPITRE V

ISOLEMENT ET ETUDE COMPAREE DE LA COMPOSITION

CHIMIQUE DES PAROIS DE *K. LACTIS* FLOCCULANTE

ET NON FLOCCULANTE:

INFLUENCE DE LA PHASE DE CROISSANCE.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA STABILITE DES AGREGATS
CELLULAIRES DE K. LACTIS
INFLUENCE DES TRAITEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES
ET ENZYMATIQUES

I. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu, la floculation des levures est sous la dépendance de nombreux paramètres qui peuvent être de nature génétique ou liés au milieu et à l'environnement dans lequel se développent les levures (ESSER et KUES, 1983; ROSE, 1984; CALLEJA 1984). De plus les nombreuses recherches ont montré que l'expression des potentialités génétiques est modulée par des facteurs nutritionnels et physico-chimiques de l'environnement.

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent mettent en évidence l'incidence des facteurs nutritionnels sur la croissance et la floculation de *K. lactis*. Lorsque la floculation se produit, des facteurs physico-chimiques peuvent affecter la stabilité des agrégats cellulaires formés; il s'agit entre autres facteurs, du pH, de la température ou de l'addition de certains agents chimiques dans le milieu. Des travaux récents montrent que des cellules floculantes soumises à des traitements enzymatiques perdent leur propriété de flocculer (HODGSON et al., 1985).

Afin de vérifier les observations faites pour d'autres levures nous avons étudié l'influence de facteurs physiques et chimiques sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis*.

Pour cela, après croissance et floculation, les levures sont récoltées par centrifugation, lavées à l'EDTA puis à l'eau distillée. Elles sont ensuite remises en suspension dans le milieu de culture ou dans le tampon acétate de Helm (pH 4.5) en présence de CaCl_2 .

Les effets sont suivis en mesurant le pourcentage de floculation comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes.

II. INFLUENCE DES FACTEURS PYSICO-CHIMIQUES SUR LA STABILITE DES AGREGATS CELLULAIRES

II.1. INFLUENCE DU pH

Après 48 heures de croissance le pH du milieu est voisin de 4. lorsque par addition de HCl 0.1N ou de NaOH 0.1N on modifie le pH du milieu la floculation maximale se situe entre pH 4.5 et 5.5 (figure 70).

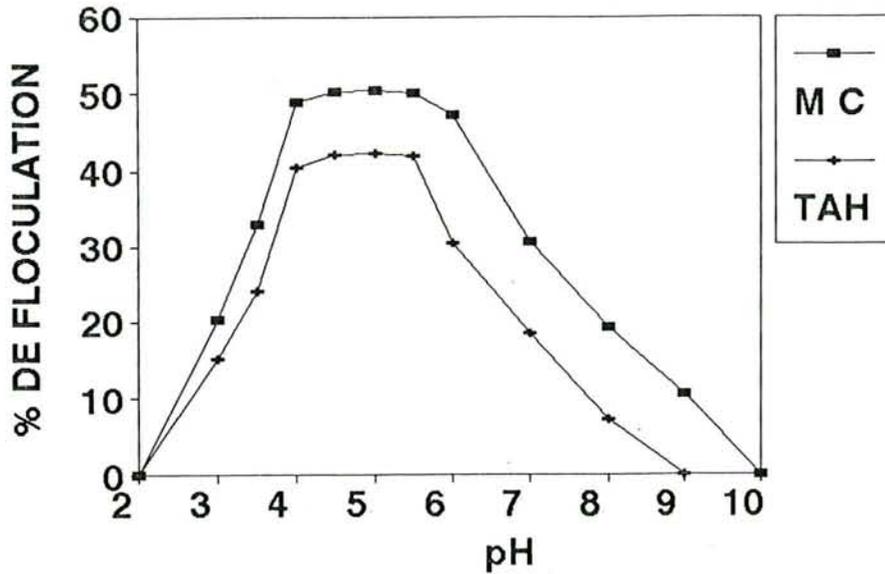


Fig. 70: Influence du pH sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis* en milieu de culture (M.C.) et en tampon acétate de Helm (T.A.H.)

Aux pH inférieurs à 3 ou supérieurs à 8 le pourcentage de floculation diminue et s'annule pour des valeurs égales à 2 et à 9. Les courbes de variation de la floculation en milieu de culture et en tampon acétate sont similaires.

II.2. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'effet de la température sur la stabilité des agrégats cellulaires a été étudié en présence du milieu de culture et du tampon acétate de Helm. Pour cela, 10ml de suspension de levures sont soumis à des températures variables allant de 30°C à 100°C, pour des temps de 1 à 10 minutes.

Les résultats sont illustrés par les figures 71 et 72. A pH 4.5, nous observons une variation du pourcentage de floculation en fonction de la température. Ainsi, jusqu'à 40°C le pourcentage de floculation n'est pas modifié, aussi bien en milieu de culture qu'en tampon acétate de Helm. A 50°C, pendant 10 minutes on note une défloculation partielle de 10 à 20 % respectivement pour les levures en suspension dans le milieu de culture et dans le tampon acétate de Helm.

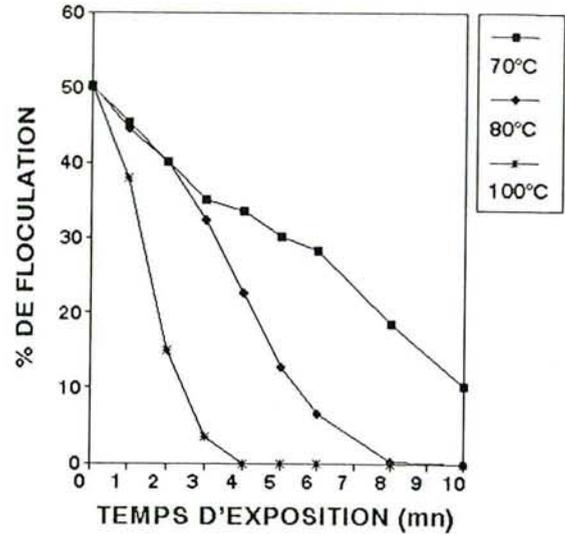
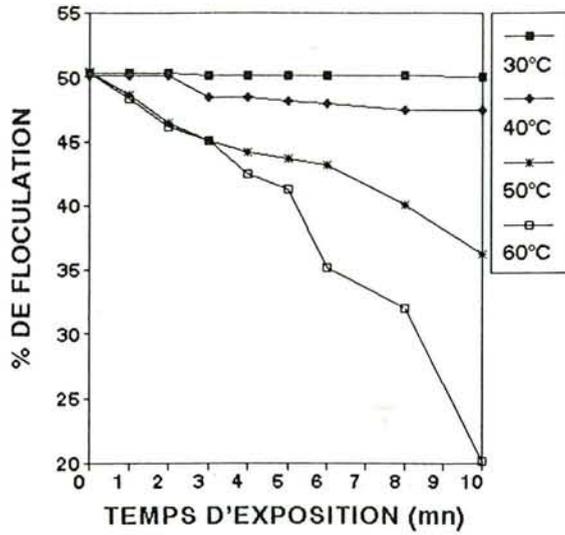


Fig. 71: Cinétique de dispersion des agrégats cellulaires de *K. lactis* par la température en milieu de culture.

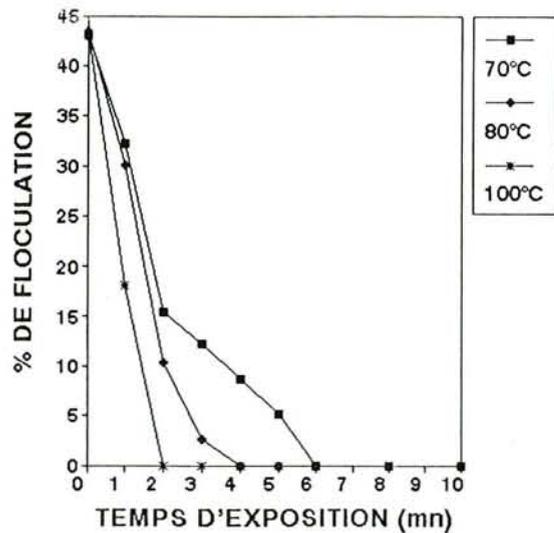
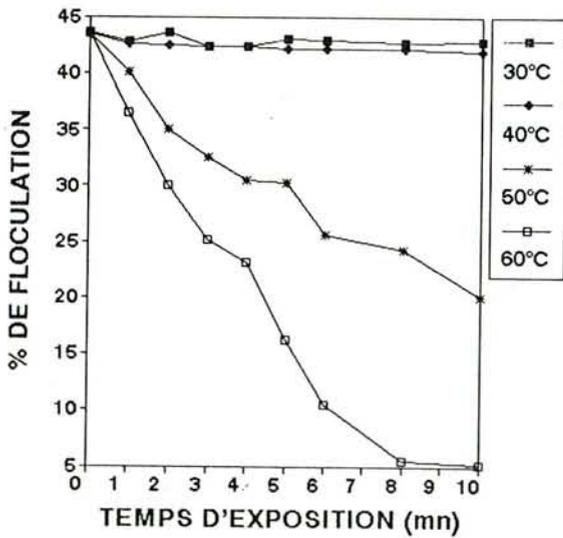


Fig. 72: Cinétique de dispersion des agrégats cellulaires de *K. lactis* par la température en tampon acétate de Helm.

A 60°C pendant 10 minutes la défloculation est totale dans les deux milieux, elle est cependant réversible lorsque les cellules sont remises à 25°C. A 70°C il se produit une défloculation irréversible pour le même temps d'exposition (tableau 13).

TABLEAU 13: Effet de la température sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis* (après 10 minutes d'exposition)

Température (°C)	M.C	T.A.H	Nature de L'effet
	%FLO	% FLO	
30	50	40	-
40	50	38	-
50	38	20	±
60	0	0	R
70	0	0	IR
80	0	0	IR
90	0	0	IR
100	0	0	IR

(-): effet négatif

R :réversible

(±): effet partiel

IR :irréversible

Par ailleurs, lorsque des levures floculantes sont introduites dans un milieu de culture préalablement chauffé à 70°C pendant 10 minutes, elles floculent. En revanche, lorsque les levures floculantes sont traitées de la même façon puis réintroduites dans le milieu de culture elles ne floculent pas; ceci laisse suggérer que les structures responsables de la floculation sont localisées à la surface des cellules et détruites par ce traitement. Il n'y a apparemment pas de composés thermolabiles dans le milieu intervenant sur la floculation.

II.3. INFLUENCE "DIRECTE" DES IONS MÉTALLIQUES

II.3.1. INFLUENCE DES IONS CALCIUM

L'influence "directe" des ions calcium a été étudiée en ajoutant des quantités variables (de 0 à 7 mM) de calcium (CaCl₂) dans le milieu de floculation. Les résultats rapportés sur la figure 73, montre qu'en tampon acétate la floculation est très influencée par la concentration en calcium.

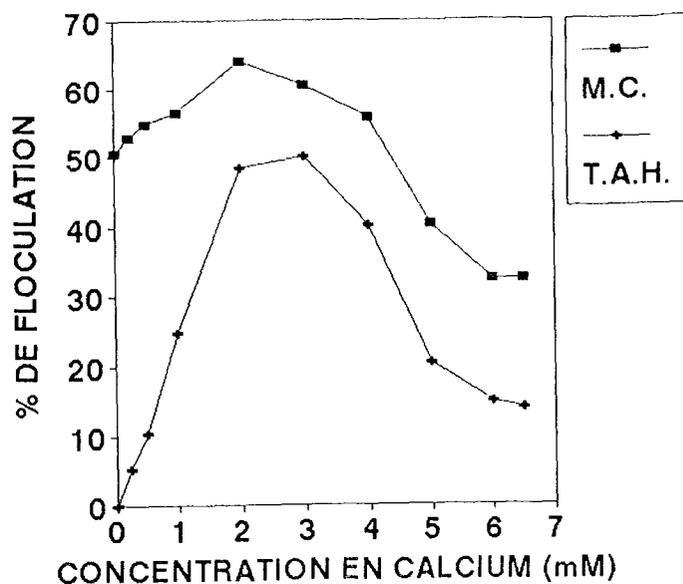


Fig. 73: Effet "direct" des ions calcium sur la floculation de *K. lactis* en milieu de culture (MC) et en Tampon acétate de Helm (TAH) (pH 4.5).

Ainsi pour des concentrations inférieures à 1mM la floculation est très faible en tampon acétate; la valeur maximale est obtenue pour des concentrations comprises entre 3mM et 4mM. en revanche pour ces mêmes concentrations le pourcentage de floculation en milieu de culture n'augmente que faiblement (environ 10%). Pour des concentrations supérieures à 4mM, nous observons un effet inhibiteur du calcium, plus prononcé en tampon acétate.

II.3.2. INFLUENCE DU RAPPORT Ca^{2+} / K^+

Lorsque les ions calcium et potassium sont apportés simultanément dans les milieux de floculation, les levures flocculent quel que soit le rapport Ca^{2+}/K^+ en milieu de culture; la valeur maximale est obtenue pour 0.5mM de Ca^{2+} /1.0mM de K^+ (tableau 14). En absence de calcium et pour une concentration de 5mM de K^+ , en milieu de culture, le pourcentage de floculation n'est pas modifié par rapport au témoin ($\frac{Ca^{2+}}{K^+} = \frac{0}{0}$).

TABLEAU 14 : Effet " direct " des ions Ca^{2+} et K^+ sur la floculation de *K. lactis*

(mM) $\frac{Ca^{2+}}{K^+}$	0	0.1	0.1	0.5	3	1	0
Milieux de mesure	0	0	0.1	1.0	2.0	3.0	5.0
M.C	50.75	50.80	50.80	58.7	55.8	55.8	50.50
T.A.H	0.0	10.45	10.50	20.30	36.8	40.70	0.0

MC : milieu de culture

TAH : Tampon acétate de Helm (pH4.5)

(Résultats exprimés en % de floculation)

Cependant, en tampon acétate de Helm (pH 4.5) la floculation est nulle en absence de calcium quelle que soit la concentration en K^+ . Dans ce cas le pourcentage de floculation le plus élevé correspond au rapport de Ca^{2+}/K^+ égal à 1/3.

D'après ces résultats c'est la concentration en calcium qui influe directement la stabilité des agrégats de *K. lactis*.

II.3.3. INFLUENCE " DIRECTE " DES IONS STRONTIUM (Sr^{2+})

Nous avons constaté (Chapitre III) que l'addition de strontium dans le milieu de culture au cours de la croissance inhibe la floculation et affecte la croissance pour des concentrations supérieures à 0,5mM. L'effet direct de cet élément a été testé sur des levures après floculation.

Après 48 heures de croissance en milieu de sabouraud le pourcentage de floculation est de 50% ; les levures sont récupérées par centrifugation, lavées à l'EDTA puis à l'eau

distillée et remises en suspension dans le milieu de culture ou dans le tampon acétate (pH 4.5), contenant des concentrations en SrCl_2 variables. La figure 74 montre que l'addition de 0.3mM et 0.5mM respectivement dans le tampon acétate de Helm et dans le milieu de culture inhibe complètement la floculation. Il semble donc que le strontium ait un effet à la fois "direct" et "indirect".

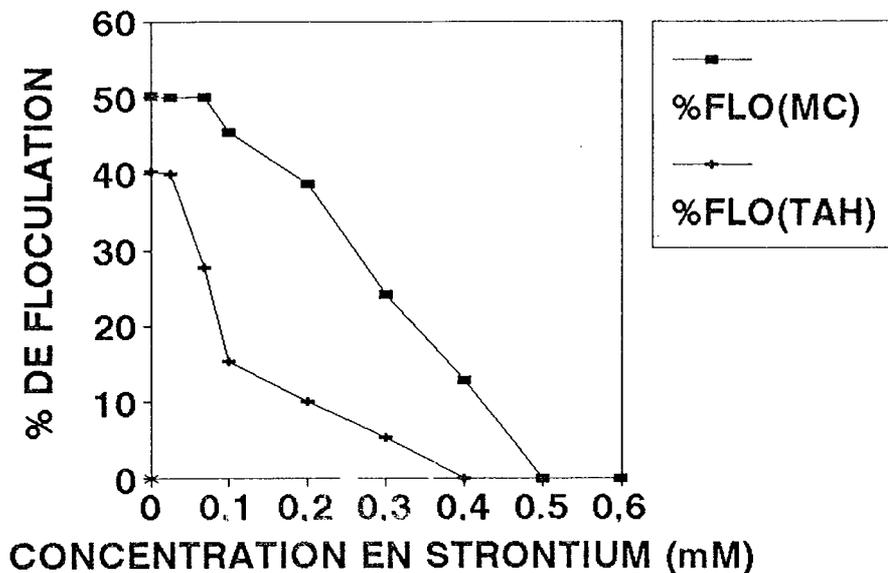


Fig. 74: Effet "direct" des ions Sr^{2+} sur la floculation de *K. lactis* en milieu de culture (MC) et Tampon acétate de Helm (TAH) (pH 4.5) en présence de CaCl_2

II.3.4. INFLUENCE "DIRECTE" DES IONS BARYUM (Ba^{2+})

Le baryum comme le strontium a été cité comme antagoniste des ions calcium. l'effet défloculant des ions Ba^{2+} sur les agrégats cellulaires de *K. lactis* est observé dès une concentration de 0.1mM (figure 75).

Pour une concentration de 0.4 mM le pourcentage de floculation n'est plus que de 10% et 5% pour les levures dans le milieu de culture et dans le tampon acétate. Selon ces mêmes

résultats l'effet dispersif des ions Ba^{2+} est plus prononcé en tampon acétate. Comparativement, les ions Sr^{2+} sont plus actifs que les ions Ba^{2+} .

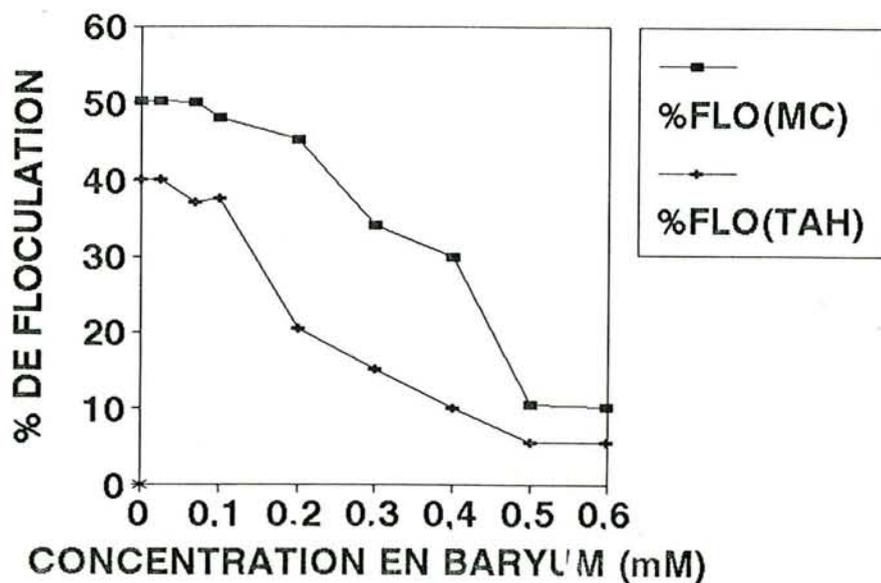


Fig. 75: Effet "direct" des ions Ba^{2+} sur la floculation de *K. lactis*, en milieu de culture (MC) et en tampon acétate de Helm (TAH) (pH 4.5) en présence de $CaCl_2$

II.3.5. INFLUENCE "DIRECTE" DES IONS POTASSIUM (K^+) ET SODIUM (Na^+)

C'est STEWART et GORIN (1976) qui ont montré que les ions Na^+ et K^+ se comportent comme des inducteurs de la floculation à de faibles concentrations mais comme des inhibiteurs à de fortes concentrations.

En faisant varier la concentration de ces ions dans le milieu de floculation par addition de KCl ou de NaCl, il apparaît que l'effet inhibiteur de Na^+ est plus prononcé que celui de K^+ (figures 76 et 77). En effet pour une même concentration (soit 10mM) la baisse du pourcentage de floculation est respectivement de 25 et 10% en milieu de culture et tampon acétate pour Na^+ et K^+ . Cette baisse est moins prononcée en milieu de culture.

II.3.6. INFLUENCE "DIRECTE" DES IONS Mg^{2+} ET Mn^{2+}

L'effet des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} sur la stabilité des agrégats cellulaires a été évalué en faisant varier leurs concentrations de 0,1 à 10mM dans le milieu de floculation. Les résultats indiquent qu'en milieu de culture (présence de Ca^{2+}), ces ions n'ont pratiquement aucun effet sur les agrégats cellulaires pour des concentrations inférieures à 5mM. Aux concentrations supérieures, nous observons un effet dispersif (figure 78). lorsque les levures en état de floculation sont remises en suspension dans le tampon acétate de Helm (pH 4,5, en absence de calcium, les ions Mn^{2+} n'induisent pas de floculation, en revanche les ions Mg^{2+} entraînent, dans les mêmes conditions, une agrégation des cellules dont l'intensité maximale est obtenue pour une concentration de 2mM (figure 77bis). Ces résultats montrent clairement que seuls les ions Mg^{2+} peuvent se substituer partiellement aux ions calcium; cette observation a été faite, par ailleurs, pour d'autres souches de levures floculantes (MANGUNWIDJAJA, 1988).

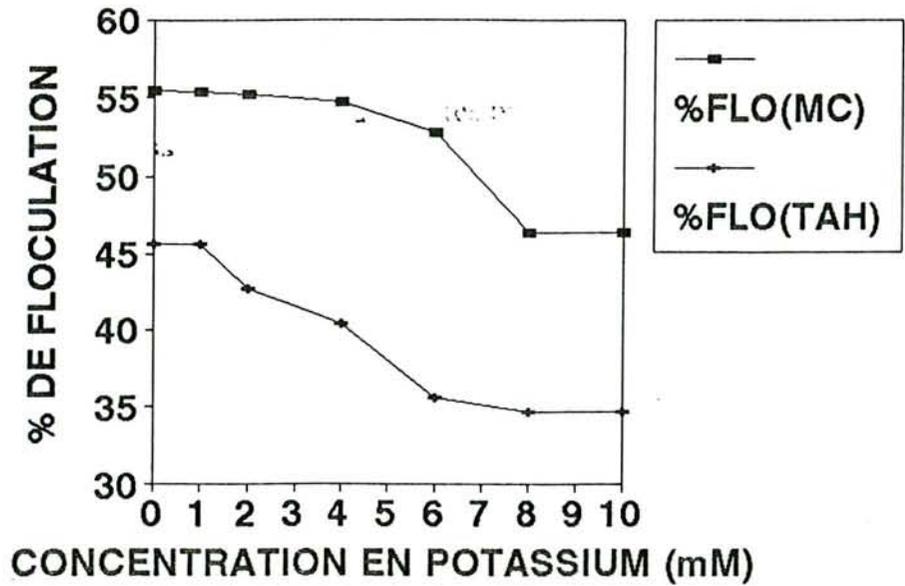


Fig. 76: Effet "direct" des ions K^+ sur la floculation de *K. lactis* en milieu de culture (MC) et en tampon acétate de Helm (TAH) (pH 4,5) en présence de $CaCl_2$

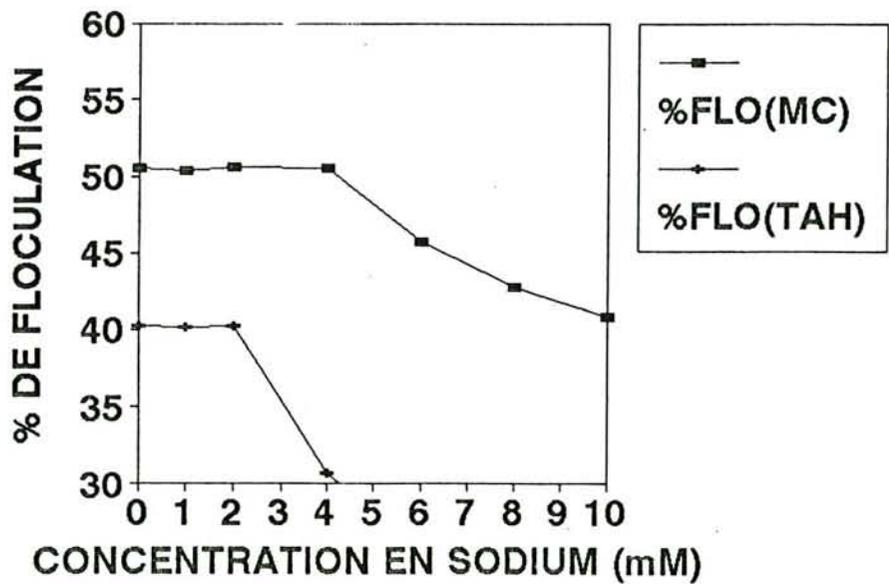


Fig. 77: Effet "direct" des ions Na^+ sur la floculation de *K. lactis* en milieu de culture (MC) et en tampon acétate de Helm (TAH), (pH 4,5) en présence de $CaCl_2$

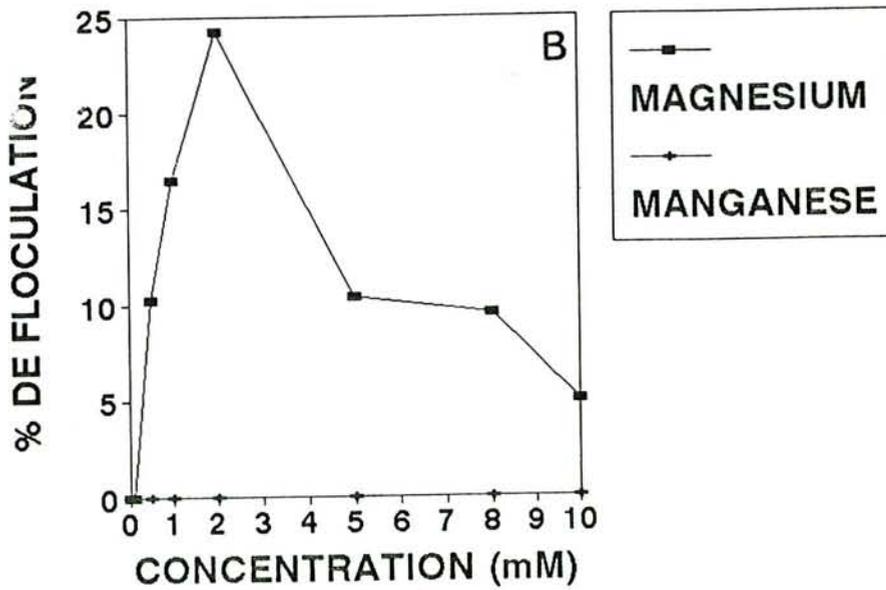
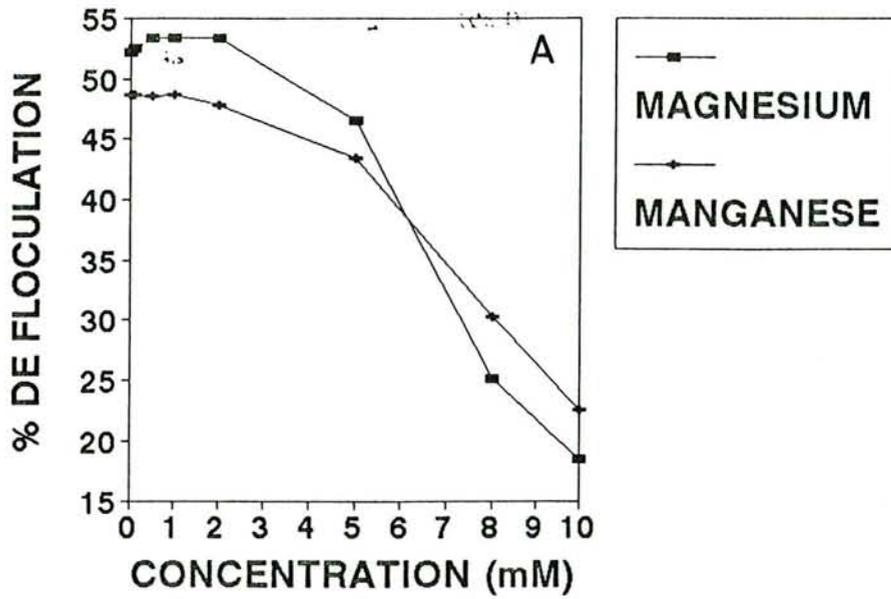


Fig. 77bis: Effet "direct des ions Mg^{2+} et Mn^{2+} sur la flocculation de *K. lactis* en milieu de culture (a) et en tampon acétate de Helm (pH 4,5) en présence de $CaCl_2$ (b)

II.4. INFLUENCE DE COMPOSES GLUCIDIQUES

Les oses, monosaccharides en particulier, ont une action sur la stabilité des levures au cours de la floculation. Suivant les levures et sa nature, le sucre a un effet spécifique.

Les résultats illustrés sur les figures 78 et 79 attestent que les agrégats de *K. lactis* sont dispersés particulièrement par le galactose et le fucose. Ils indiquent également que seules les structures glucidiques ayant un groupement galactose du côté terminal non réducteur, se comportent comme des inhibiteurs dont l'effet est plus ou moins important (Tableau 15).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur d'autres levures *Kluyveromyces* par d'autres auteurs (HUSSAIN, 1983; AL MAHMOOD, 1987; MANGUNWIDJAJA, 1988). Rappelons par ailleurs que pour les levures du genre *Saccharomyces* ce sont surtout le mannose et dérivés qui sont actifs (SAHLI, 1986).

II.5. INFLUENCE D'AGENTS CHIMIQUES

De nombreux agents chimiques ont été décrits comme agents dispersifs d'agrégats cellulaires de levures. Ces agents provoquent des modifications de structure des protéines pariétales. Leur action dépend des souches de levure et des conditions expérimentales.

Nous avons testé l'influence de quelques agents chimiques couramment décrits. Les résultats indiqués dans le tableau 16, montrent que la quantité nécessaire à la défloculation totale varie selon la nature de l'agent.

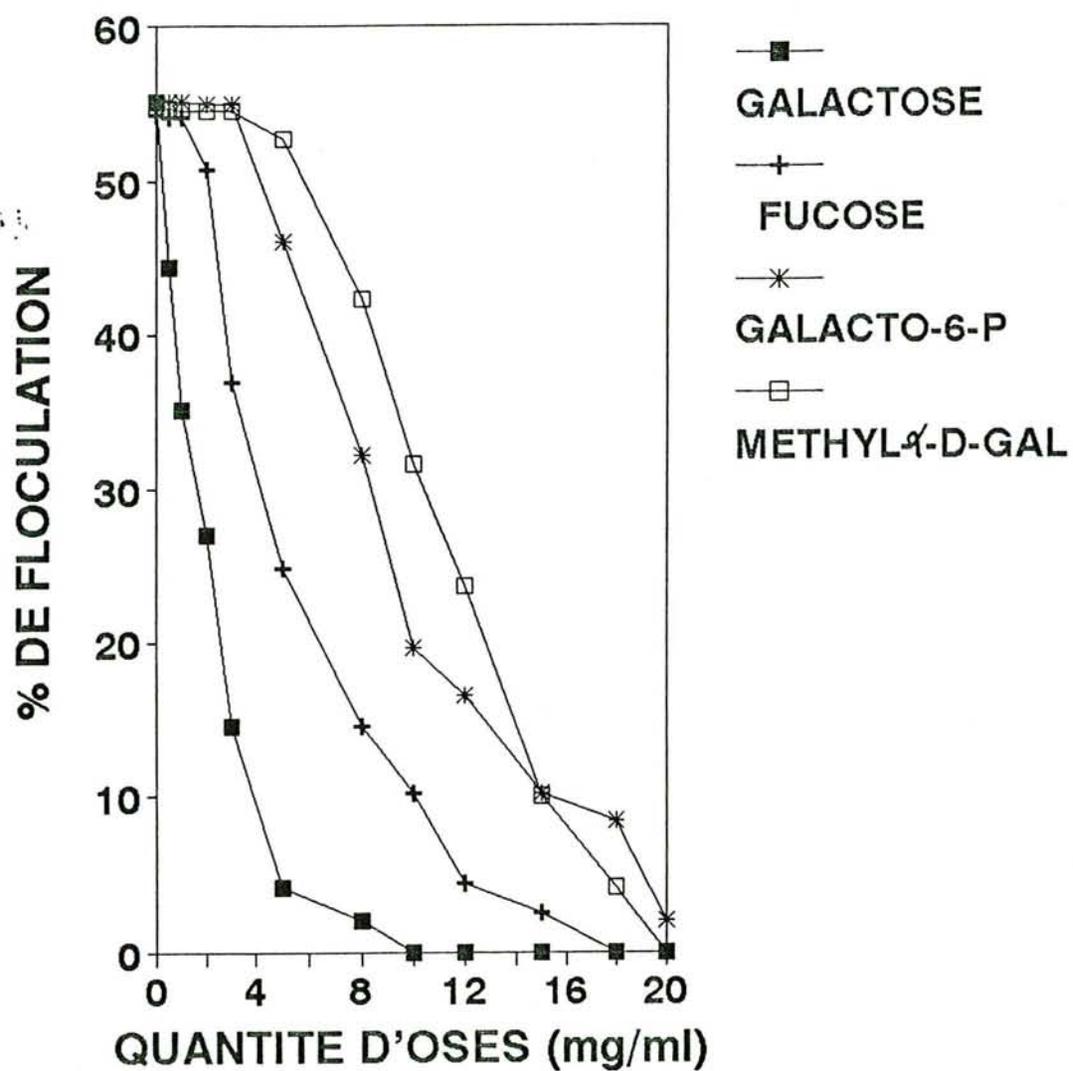


Fig.78: Variation du pourcentage de floculation de *K. lactis* en fonction de la concentration en oses et d \acute{e} riv \acute{e} s (inhibiteurs)

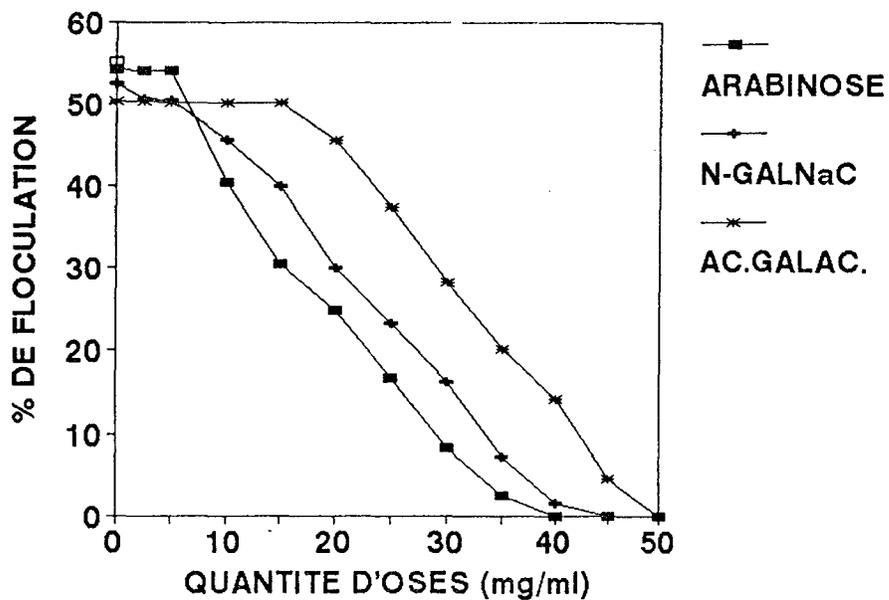
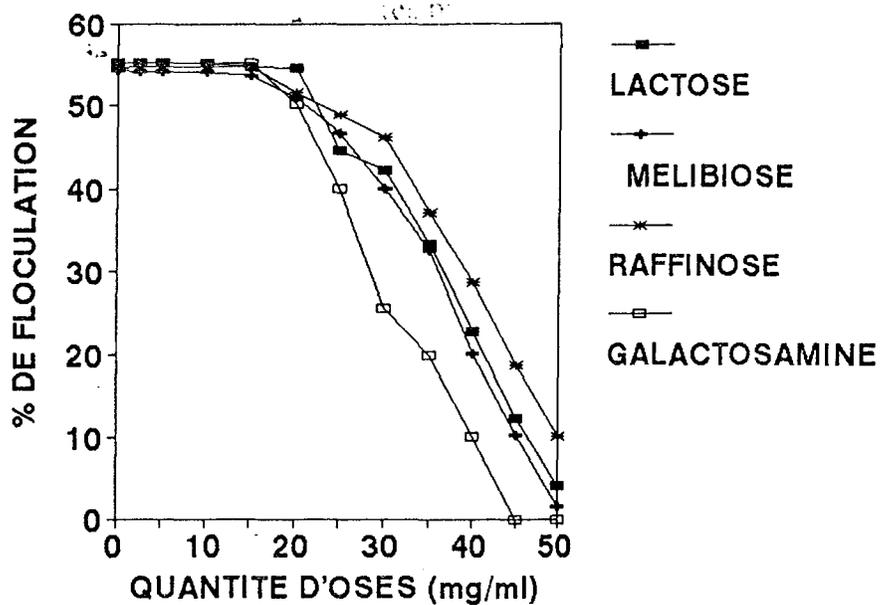


Fig. 79: Variation du pourcentage de flocculation de *K. lactis* en fonction de la concentration en oses et dérivés (faiblement inhibiteurs)

Tableau 15: Classification des oses et dérivés glucidiques selon leur effet défloculant sur les agrégats de *K. lactis*

Inhibiteurs X < 20mg/ml	Faiblement inhibiteurs 20mg/ml < x < 50mg/ml	Non inhibiteurs x > 100 mg/ml
D-galactose	D- lactose	D- mannoside
D-fucose	D- Mélibiose	D- glucose
D-galactose -6- phosphate	D- Raffinose	D- glucosamine
métlyl α D- galactopyra- nisides	D- Galactosamine	D- mannosamine
O-Nitrophényl X-D-galacto- pyraposide	N-Acétyl-D-galactosamine	D-glucose-6- phosphate
P-Nitrophényl D-Galactopy- ranoside	L- Arabinose	Métyl β -D-galactopyra- noside.

X = quantité en mg/ml nécessaire pour une défloculation totale

Tableau 16: Effet d'agents chimiques sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis*

MILIEUX DE FLOCCULATION	MILIEU DE CULTURE	TAMPON ACETATE
AGENTS		
Thiodiglycol (V/v)	7.5	6.5
Acide thiodiglycolique (V/v)	4.6	3.4
Ethylglycol (V/v)	10	10
Mercapto-éthanol (V/v)	8.0	7.1
Urée (M)	5.7	4.8
Formamide(V/v)	15.3	10.1
Anhydride succinique (M)	4.0	3.2
Carbidimide (M)	5.1	2.8
Chlorydrate de guanidine (M)	2.1	1.5

(Résultats exprimés en quantité nécessaire à une dispersion totale)

Par ailleurs, la cinétique de défloculation par l'urée le formamide et l'éthylglycol a été suivie en ajoutant à des suspensions de levures des quantités croissantes. Dans le cas du formamide, des solutions de KCl 0.1M ou NaCl 0.1M ont été additionnée simultanément aux suspensions de levures. Les figures 80, 81 et 82 indiquent les résultats qui permettent de faire les observations suivantes:

- L'urée déflocule totalement les levures pour des concentrations supérieures à 4 M; ces concentrations varient légèrement selon que les levures soient en suspension dans le milieu de culture ou en tampon acétate de Helm.

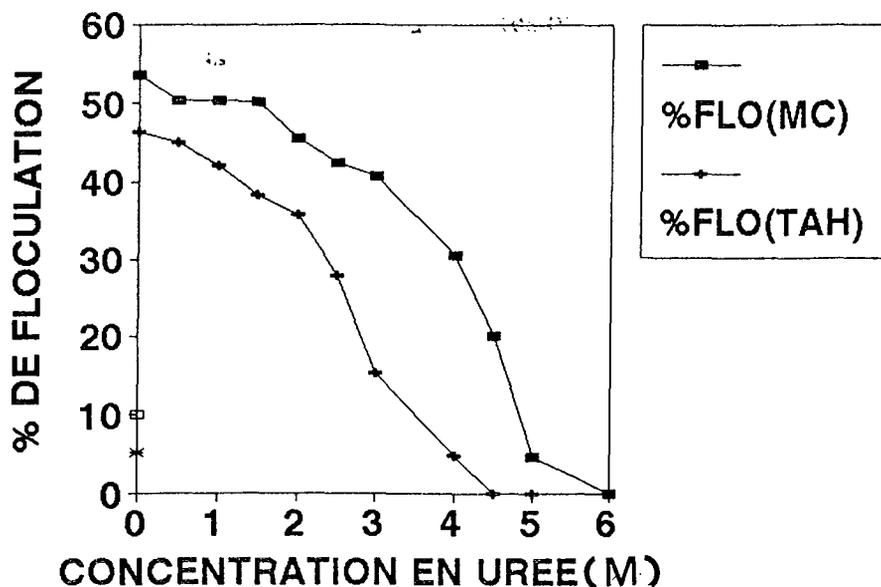


Fig. 80: Variation du pourcentage de floculation (% FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration en urée dans le milieu de culture (MC) et dans le tampon acétate de Helm (TAH)

- Le formamide a un effet dispersif à partir de 6%. Toutefois la dispersion totale est observée pour des concentrations supérieures à 15%. L'action défloculante du formamide est faiblement inhibée par addition de NaCl 0,1M ou KCl 0.1M (fig 81).

II.6. ACTION D'ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

L'action des enzymes sur le comportement floculant des levures est attribuée à la nature des protéines pariétales spécifiques selon le type de gènes qui gouverne la floculation (HODGSON et al., 1985).

Des cellules de levures floculantes ont été traitées par la pronase, la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. La cinétique d'action de ces enzymes a été suivie en évaluant le pourcentage de floculation. la figure 83 montre que le traitement

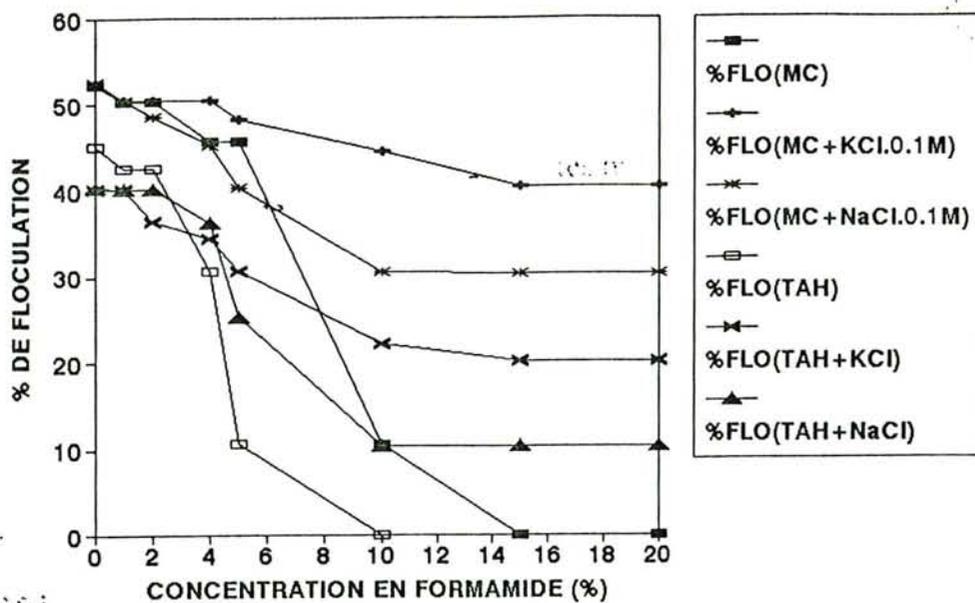


Fig. 81: Variation du pourcentage de floculation de *K. lactis* en fonction de la concentration en formamide, dans le milieu de culture (MC) et dans le tampon acétate de Helm (TAH) en présence de KCl et NaCl (0,1M)

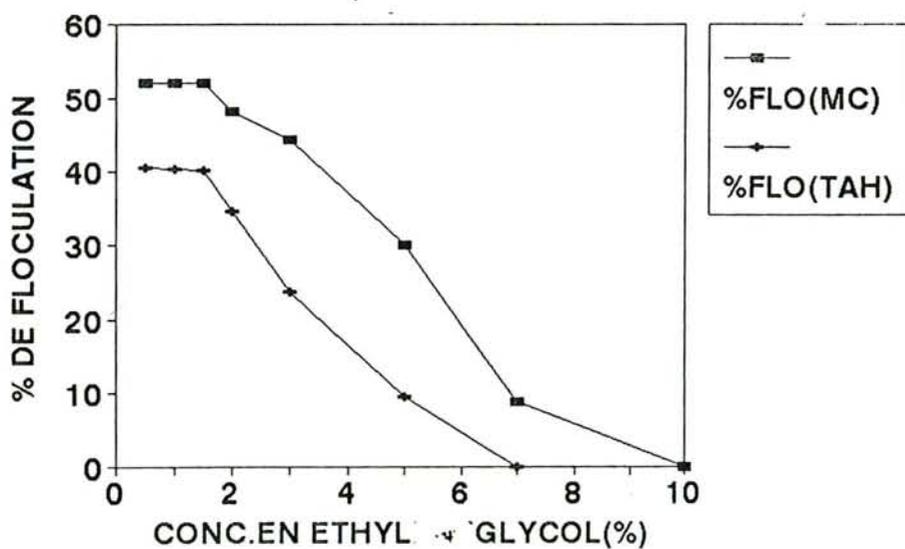


Fig. 82: Variation du pourcentage de floculation (%FLO) de *K. lactis* en fonction de la concentration en éthylglycol dans le milieu de culture (MC) dans le tampon acétate de Helm (TAH)

enzymatique entraîne une perte ou une forte baisse du pouvoir floculant. Cependant, pour un même temps d'action la diminution de la floculation dépend du type d'enzymes.

Dans nos conditions expérimentales la pronase est plus active. Nos résultats concordent, dans une certaine mesure, avec ceux de HODGSON et al., (1985) qui ont étudié l'influence d'un traitement enzymatique et thermique sur le pouvoir floculant de *Saccharomyces cerevisiae*. Selon ces auteurs les effets de tels traitements dépendent du type de gènes qui gouvernent l'expression de la floculation (FL01 et FL05). Ainsi le caractère floculant gouverné par le gène FL01 est affecté par un traitement enzymatique (chymotrypsine) mais stable vis des traitements thermiques; en revanche, lorsque l'expression phénotypique de la floculation est gouvernée par le gène FL05, elle est inhibée par la chymotrypsine et stable vis à vis de la chaleur.

Il apparaît donc que l'expression phénotypique de la floculation gouvernée par ces deux gènes distincts selon JOHNSTON et READER, (1983), conduit à l'élaboration, par la cellule de différentes protéines pariétales au moment de la floculation, selon le type de gène.

Toutefois, ces auteurs indiquent que l'action simultanée des 2 gènes FL01 et FL05 est possible notamment chez des levures haploïdes floculantes.

D'après ces hypothèses, chez les levures *K. lactis* haploïdes l'expression phénotypique de la floculation serait vraisemblablement gouvernée par le gène type FL01 puisque les cellules floculantes de *K. lactis* perdent leur pouvoir floculant lorsqu'elles sont traitées par des protéases et par la chaleur.

II.7. EFFET DE LA RÉGÉNÉRATION DES PAROIS

Les protoplastes constituent un matériel de choix pour l'étude de la synthèse des parois cellulaires. Ils fournissent un système expérimental simple pour examiner la relation entre la composition de la paroi et les changements morphogénétiques qui ont lieu et qui peuvent être associés avec les changements dans le modèle ou l'équilibre de synthèse des polymères (REYSSET et al., 1987).

Ainsi pour tenter de mettre en évidence la relation possible entre la floculation cellulaire et la biosynthèse de la structure pariétale susceptible d'induire la floculation nous avons traité les cellules de *K. lactis* par la cytohélicase.

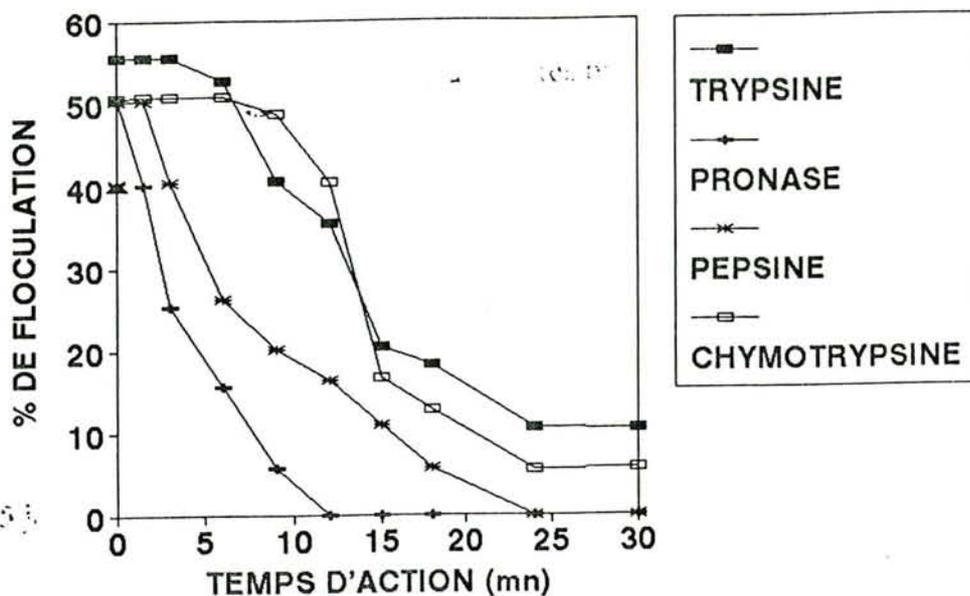


Fig. 83: Influence de traitement enzymatique sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis*

Après régénération, les cellules sont remises en suspension dans le milieu favorable à la floculation nous avons, alors, évalué leur aptitude à la floculation et à la cofloculation.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 17) nous pouvons retenir:

- La production de protoplastes est influencée par divers facteurs notamment l'âge des cellules et le mode d'obtention. Cette observation a été faite par de nombreux auteurs (TEMEYER, 1987; OTIS et DAY 1987; BOURNE et DANCER, 1987).

- Les souches floculantes présentent une résistance à l'attaque enzymatique par rapport aux souches non floculantes, ce qui laisse supposer que des structures particulières sont élaborées par les parois au moment de la floculation.

- Après régénération, seule les souches initialement floculantes s'agrègent et refloculent. Nous n'observons pas par ailleurs, de cofloculation contrairement à ce qui est rapporté pour d'autres levures (NISHIHARA et al., 1987).

Au cours de cette expérience nous avons constaté qu'un traitement préalable des cellules au dithiothréitol, accélère la production de protoplastes par l'attaque enzymatique; cependant les protoplastes ainsi obtenus régénèrent lentement et de manière inachevée, ce qui serait dû vraisemblablement à des perturbations dans la biosynthèse de la nouvelle paroi. En effet, les cellules régénérées à partir de protoplastes de cellules non traitées au dithiothréitol se développent et flocculent en reproduisant les caractères des souches " mères"; en revanche les cellules régénérées après traitement au dithiothréitol ne flocculent pas.

TABLEAU 17 : Régénération des parois et flocculation des cellules régénérées en milieu liquide et solide

		MRL		MRS	
		Sans CaCl ₂	Avec CaCl ₂	Sans CaCl ₂	Avec CaCl ₂
KLF	T.I.M	20	20	10	10
	T.R	15	15	25	25
	F	a/ +	+	+	+
		b/ +	+	+	+
KLNF	T.I.M	10	15	5	5
	T.R	30	30	45	45
	F	a/ -	-	-	-
		b/ -	-	-	-
Cofloculation		N	N	N	N

- MRS : Milieu de régénération solide
- MRL : Milieu de régénération liquide
- TIM : Temps d'incubation minimum (mn)
- TR : Taux de régénération (%)
- F : Flocculation
- (+) : Flocculation positive
- (-) : Flocculation négative
- N : Cofloculation négative
- (a) : Flocculation en milieu de culture
- (b) : Flocculation en tampon acétate de Helm (PH 4.5)

Rappelons par ailleurs, que l'assemblage des constituants pariétaux est fortement influencé par les conditions de culture (CARBONELL, 1973; KOPECKA et FARKAS, 1979; NECAS et SVOBODA, 1980; ELORZA et al., 1987). Une meilleure régénération est obtenue en milieu solide (OTIS et DAY 1987) et elle se déroule en 2 étapes: il se forme d'abord la couche de glucanes qui permet l'arrangement ordonné d'autres polymères tels que les complexes mannoprotéiques, en second lieu, les complexes mannoprotéiques qui constituent la matrice amorphe. Selon certains auteurs l'incorporation des mannoprotéines exige la formation concomittente de glucanes auxquels se lient probablement les mannanes (BACON, 1980; ROGERS et PERKINS 1980; ELORZA et al., 1987).

D'après NECAS et SVOBODA (1980) l'assemblage des éléments pariétaux au cours de la régénération n'est pas sous contrôle génétique comme chez la cellule "mère". Le signal génétique contrôlant la morphologie spécifique des espèces n'est opérationnel uniquement chez les cellules revertantes mais l'expression n'est complète qu'au bout de la 3ème ou 4ème génération qui devient ainsi identique à celle de la souche "mère"

III. D I S C U S S I O N

Parmi les agents physico-chimiques qui influencent la stabilité des agrégats cellulaires, le pH et la température ont été étudiés dans plusieurs cas de levures différentes.

Lorsqu'on fait varier le pH du milieu, la floculation maximale est observée dans l'intervalle de pH compris entre 4.5 et 5.5. De tels résultats ont été obtenus pour d'autres levures (MILL. 1964 (a); PORTER et al., 1965; HUSSAIN, 1983; SALHI, 1986).

En 1953 LINDQUIST a rapporté que la floculation des souches de levures de fermentation basse se produit entre pH 3 et pH 8, tandis que pour les souches de levures de fermentation haute, la floculation se produit entre pH 3 et pH 6.

Selon TAYLOR et ORTON, (1978) l'action de KOH 0.05M pendant 15 minutes, inhibe la floculation, alors que HCl 2M à 40°C pendant 15 minutes diminue que faiblement la floculation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

D'après les résultats de HUSSAIN (1983) la floculation des cellules de *Kluyveromyces bulgaricus* est stable dans un intervalle de pH de 3 à 10 à température ambiante; et lorsque le

pH est inférieur à 3 ou supérieur à 10, l'agrégation cellulaire est totalement dispersée, alors que l'intensité maximale de la floculation est observée entre pH 4.5 et 6.5.

L'action du pH sur la stabilité des agrégats cellulaires est souvent expliquée par la rupture des liaisons intercellulaires ce qui indique que la floculation dépend, en outre, du degré d'ionisation des groupements à la surface des cellules pour un pH voisin de 4.5; ceci suppose alors que les groupements carboxyliques sont impliqués; cette hypothèse est vérifiée, notamment, par l'action d'agents estérifiants sur les cellules floculantes.

Au pH optimal (4.5) on observe une dispersion des agrégats cellulaires en fonction de la température. Ainsi un traitement à 60°C pendant 10 minutes entraîne une défloculation totale; cependant cette défloculation est réversible. Une défloculation totale et irréversible est obtenue à 70°C pendant 10 minutes. L'effet défloculant de la température peut s'expliquer par la rupture de liaisons secondaires notamment les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les cellules; suite à des changements conformationnels des peptides pariétaux qui interviennent dans l'agrégation cellulaire.

D'après HODGSON et al., (1985) l'action de la température sur la floculation des levures dépend du calcium et varie selon la souche. Cette action s'explique par la dénaturation des protéines superficielles de la paroi dont la biosynthèse serait liée à un type de gène (FLO) qui gouverne l'expression phénotypique de la floculation. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae* haploïde dont les agrégats cellulaires sont stables à de hautes températures, la floculation est gouvernée simultanément par FLO1 et FLO5; ce dernier gène serait responsable de la biosynthèse d'une protéine superficielle thermorésistante.

Les sels minéraux tiennent une place importante dans le phénomène de floculation. MILL (1964 et 1966) a été le premier à proposer que les ions Ca^{2+} ont un effet direct sur la floculation en formant des ponts ioniques entre deux groupes carboxyliques (ou phosphates) situés sur la surface des cellules.

D'autres travaux ont montré par la suite que les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} pourraient remplacer le calcium cependant l'intensité de la floculation induite est toujours faible alors que ions Ba^{2+} et Sr^{2+} se conduisent comme des inhibiteurs de la floculation de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'effet "direct" des ions Ca^{2+} sur la floculation de *K. lactis* est plus prononcé en tampon acétate de Helm et faible en

milieu de culture. De même le rapport Ca^{2+}/K^+ ne semble pas déterminant pour la stabilité des agrégats cellulaire de *K. lactis*; alors que ce rapport semble moduler la floculation de *Saccharomyces uvarum* d'après AMRI et al., (1982). Par ailleurs, les travaux de MASSCHELEIN et al., (1963) et par la suite ceux de LYONSET HOUGH (1970 et 1971) ont montré que les levures floculantes absorbent des quantités de calcium plus élevées que les levures non floculantes. Selon PORTER et MAC CAULEY (1965) l'effet du calcium dépend étroitement du pH du milieu de floculation.

L'addition d'ions Ba^{2+} et Sr^{2+} dans le milieu entraîne une défloculation aussi bien en milieu de culture qu'en tampon acétate de Helm à pH 4.5. Ce résultat est obtenu chez d'autres levures; cependant les doses inhibitrices varient beaucoup d'une souche à une autre.

Les ions monovalents K^+ et Na^+ ajoutés dans le milieu de floculation provoquent une baisse de l'intensité de floculation plus prononcée pour les ions Na^+ et aux concentrations relativement élevées; mais ils n'ont pratiquement aucun effet aux faibles concentrations.

L'action défloculante des sucres fût observée par BURNS (1937) lorsqu'il ajouta du moût frais à une suspension de levures floculantes dans un moût fermenté. De nombreux auteurs entreprirent, par la suite, l'étude de l'action spécifique des sucres sur la floculation. Certains sucres semblent plus actifs que d'autres dans la dispersion des agrégats de levures floculantes selon la souche. Ainsi, d'après nos résultats, les sucres se comportant comme des inhibiteurs de la floculation des levures *Saccharomyces* n'ont aucun effet sur les agrégats de *K. lactis*, le même résultat est observé pour *K. bulgaricus* (HUSSAIN, 1983; AL MAHMOOD, 1987). La défloculation par les sucres aurait pour mécanisme d'action généralement admis, la combinaison de certaines structures, de nature glycoprotéique, différentes d'une souche à l'autre, en agissant par compétition. Cependant selon TAYLOR et ORTON (1978) l'effet dispersif des sucres pourrait s'expliquer soit par une action directe sur le mécanisme de floculation (inhibition compétitive des mannanes) ou par induction d'une réponse physiologique de la cellule. Les travaux de SHARON (1983) permettent d'admettre que l'action des sucres sur les agrégats cellulaires se ferait selon un mécanisme du type lectinique. Cette hypothèse est vérifiée pour certaines levures telles que *K. bulgaricus*. (AL MAHMOOD et al., 1987).

Les sucres dispersant les agrégats cellulaires de *K. lactis* ont tous une structure "D-galactose" non réductrice terminale. Lorsque la fonction alcool primaire est modifiée, l'efficacité dispersive du composé glucidique diminue.

L'action d'agents chimiques dénaturants les structures superficielles impliquées dans la floculation est irréversible ce qui laisse supposer que ces structures pariétales sont détruites par ces traitements. Cette action peut-être rapprochée de l'effet observé lorsque les cellules floculantes ont subi un traitement thermique ou enzymatique entraînant des modifications ou une extraction de ces structures protéiques pariétales; ce point n'a pas été précisé ici.

Par ailleurs, l'action de ces agents sur les groupements ionisables à la surface des cellules participe à la dispersion des agrégats cellulaires. De nombreux travaux relatifs au blocage de ces groupements, notamment les groupements carboxyliques ont été réalisés (AMRI et al., 1982; KAMADA et MURATA, 1984; MANGUNWIDJAJA, 1988). Ces groupements ont pour rôle de maintenir une structure conformationnelle favorable à la floculation des levures. Leur blocage provoque une baisse ou une dispersion totale de la floculation, probablement suite à des changements de structure stéréochimique des protéines superficielles de la cellule.

L'effet variable des enzymes protéolytiques observé sur le comportement floculant est attribué à la spécificité d'action de ces enzymes sur les constituants protéiques pariétaux. Selon HODGSON et al., (1985) ces protéines pariétales indispensables à la floculation, dont la biosynthèse est gouvernée par le gène FL01, ont des sites accessibles reconnus par la chymotrypsine alors que chez le phénotype FL05, ces sites n'existent pas (ou inaccessibles). D'après ces auteurs la vitesse d'action des enzymes est liée au phénotype (FL01 et FL05) et que l'expression de la floculation dépend du type de protéines pariétales et des gènes qui gouvernent leur synthèse. Cependant ces mêmes auteurs ont montré, par d'autres traitements, que les phénotypes gouvernés par FL01 et FL05 ont certains caractères communs en regard du mécanisme possible impliquant les glucides et les protéines pariétaux et selon le modèle préconisé par MIKI et al., (1980 et 1982).

Lorsque les levures *K. lactis* floculantes et non floculantes sont traitées à la cytohélicase, on obtient des protoplastes à des vitesses variables, qui nous ont permis de régénérer, leurs parois. L'évaluation du pouvoir floculant des cellules régénérées montre que seules les souches initialement floculantes, refloculent dans le milieu de culture et en tampon acétate. Ceci confirme que la souche désignée KLF a une potentialité floculante génétiquement acquise.

CHAPITRE V

ISOLEMENT ET ETUDE COMPAREE DE LA COMPOSITION

CHIMIQUE DES PAROIS DE K. LACTIS FLOCCULANTE

ET NON FLOCCULANTE:

INFLUENCE DE LA PHASE DE CROISSANCE

I. INTRODUCTION

Les mécanismes de floculation, encore mal définis, font intervenir les parties externes des parois cellulaires. La paroi constitue en effet le siège préférentiel de contacts intercellulaires au moment de la floculation.

Il a été montré que des parois isolées de levures floculantes, reproduisent les mêmes caractères de floculation que les cellules "mères" dont elles sont issues. De même, au moment de la floculation, la paroi subit un important remaniement chimique.

Des études génétiques ont également confirmé que le potentiel génotypique de la floculation est exprimé au niveau de la structure pariétale et que les variations des complexes mannoprotéiques expliquent les fluctuations du degré de floculation des levures (BALLOU, 1974).

Par ailleurs, il est souvent admis, que les états de floculation et de non floculation sont en relation directe avec les variations de polymères composant la couche externe de la paroi. Cependant, les observations et les hypothèses émises sont, dans de nombreux cas très controversées.

les parois des levures forment des édifices dans lesquels les constituants sont associés par des liens plus ou moins solides, la couche externe, de nature phosphopeptidomannane est considérée comme responsable du caractère floculant ou non floculant de la levure. Elle a fait l'objet de plusieurs études (DAY et al., 1975; MARFEY et al., 1977; AMRI et al., 1981).

La première approche de l'étude du mécanisme de floculation consiste à comparer quantitativement et qualitativement, la composition et la structure des parois de levures floculante et non floculante.

Dans ce chapitre, nous allons étudier la composition chimique globale comparée des parois isolées, à partir de levures floculante et non floculante, après broyage mécanique des cellules

Les résultats relatifs au degré de floculation obtenus dans le chapitre III ont montré que l'intensité de la floculation varie selon la phase de croissance; c'est pourquoi nous avons voulu comparer la composition des parois isolées de cellules en phases exponentielle et stationnaire.

II. ISOLEMENT DES PAROIS ET COMPOSITION CHIMIQUE

II. 1. CONDITIONS D'OBTENTION ET RENDEMENTS RELATIFS EN PAROIS

L'isolement des parois nécessite la rupture des cellules qui peut-être obtenue par divers modes. Nous avons isolé les parois de *K. lactis* par broyage mécanique suivi immédiatement d'un traitement à l'acétone et la trypsine pour dénaturer les enzymes susceptibles de dégrader ces structures.

Le tableau 18 indique les rendements pondéraux relatifs en parois pour chaque souche. On remarque que ces rendements varient de 15% à 18% et de 12% à 16% respectivement pour les souches floculante et non floculante en phases exponentielle et stationnaire.

TABLEAU 18: Conditions d'obtention et rendements relatifs en parois après broyage mécanique de cellules de *K. lactis*

	KLF		KLNF	
	PE	PS	PE	PS
Temps de culture (h)	24	48	24	48
Biomasse (g/l)	1.2	2.4	1.4	2.6
% FLO	30.6	50.4	0.0	0.0
Rendement en parois (%)	15.5	18.3	12.6	16.8

PE = Phase exponentielle

PS = Phase stationnaire

Ces résultats montrent, d'une part, que le rendement en parois des cellules en phase stationnaire est légèrement plus élevé par rapport à celui des cellules en phase exponentielle (augmentation de 3 à 4%); d'autre part, on note une faible augmentation en parois des cellules floculantes (2à3%).

Si on admettait une signification à cette faible différence, elle s'expliquerait par la synthèse de composants responsables de la floculation par la levure floculante. Ces observations ne sont pas en contradiction avec celles faites

lors de l'étude des variations du pourcentage de floculation en fonction de la phase de croissance.

II.2. ANALYSE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES

Les oses ont été libérés sous forme de monomères par hydrolyse des parois à l'aide d'acide chlorhydrique 2N à 105°C, en tubes scellés sous vide. Les conditions optimales de ce traitement ont été choisies après établissement des courbes cinétiques de libération des oses (figure 86). Les oses ainsi libérés sont dosés par la méthode de DUBOIS.

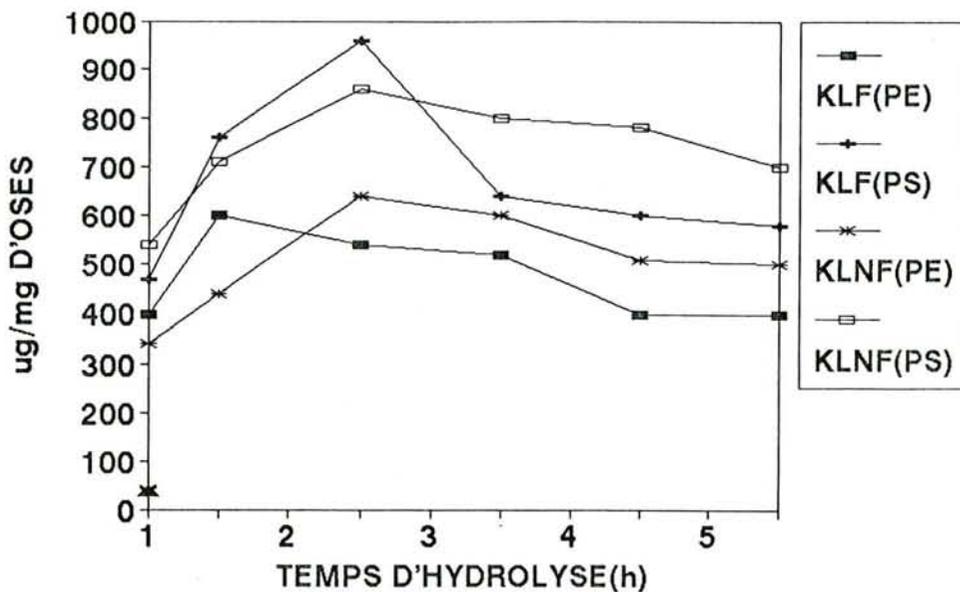


Fig. 86: Cinétique de la libération des oses par hydrolyse HCl 2N des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

Les résultats portés dans le tableau 19 montrent que le maximum d'oses libérés par hydrolyse acide varie de 61 à 75% respectivement pour la souche non floculante et la souche floculante.

La teneur en oses dans les parois de la souche floculante est supérieure à celle des parois de la souche non floculante. Cette teneur varie également selon la phase de croissance.

L'analyse qualitative des oses libérés a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse après transformation en acétates d'alditols. Préalablement, la chromatographie sur papier WATMAN, nous a permis d'identifier les différents oses des hydrolysats. Le chromatogramme (figure 87) met en évidence la présence de mannose et de glucose dans un rapport qui varie dans le même ordre que la teneur totale en oses.

Le tableau 19 montre des rapports Man /Glc de 1.22 et 0.96 respectivement pour la souche floculante et la souche non floculante. On constate ainsi que la paroi de la souche non floculante contient plus de glucose que la paroi de la souche floculante et inversement pour le mannose.

TABLEAU 19 : Teneurs en hexoses des parois de *K. Lactis* floculante et non floculante à différentes phases de croissance

Souches	Phase de croissance	Hexoses (% MS)	R.M. (Man /Glc)
KLF	P.E	70.6	1.1
	P.S	75.3	1.2
KLNF	P.E	60.4	0.92
	P.S	61.1	0.96

M.S. : matière sèche
R.M. : rapport molaire
P.E. : phase exponentielle
P.S. : phase stationnaire

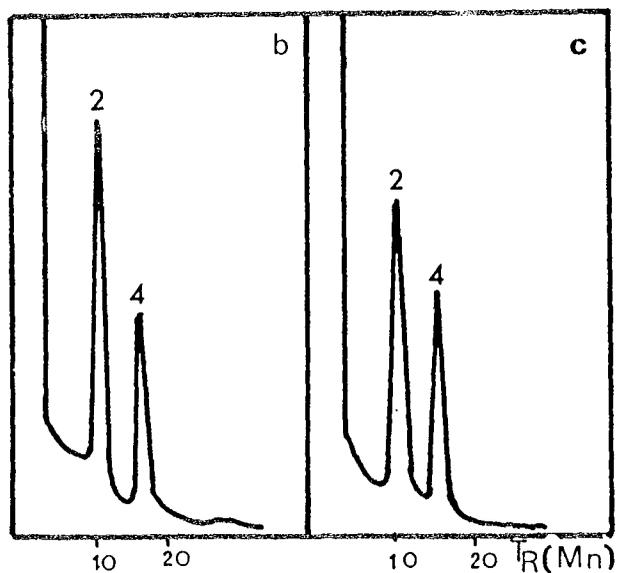
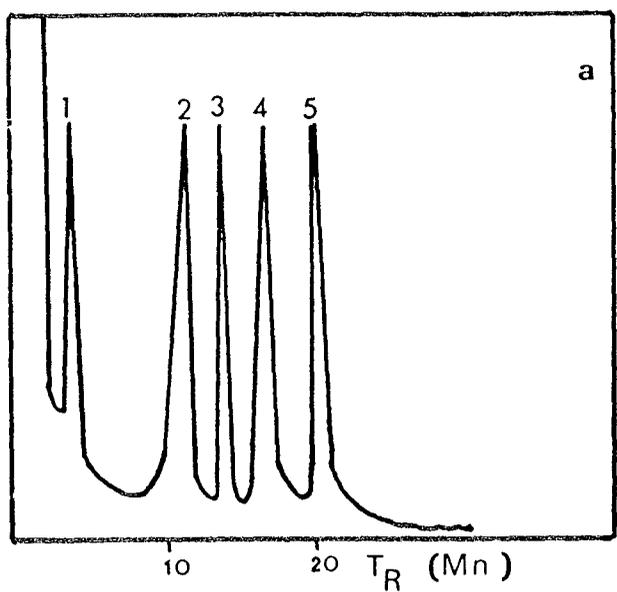


Fig. 87: Chromatogramme des acétates d'alditols des témoins
 (a):(1)fucose, (2) mannose, (3) galactose,(4) glucose
 (5) inositol; et des parois de *K. lactis* flocculante
 (b) et non flocculante(c)

II.3. ANALYSE DES HEXOSAMINES

La libération des hexosamines, oses aminés, nécessite une concentration plus élevée en acide chlorhydrique. La cinétique de libération réalisée avec HCl 6N révèle que le maximum d'hexosamines est obtenu au bout de 4 heures d'hydrolyse (figure 88). L'hydrolyse acide des hexosamines met en évidence le phénomène de dégradation accentué; nous avons, alors pour comparaison, effectué des essais d'hydrolyse enzymatique à la cytohélécasse (suc digestif d'*Helix pomatia*) des mêmes échantillons (figure 89). Les hexosamines libérées, dans les deux cas, sont dosées par la méthode d'ELSON MORGAN.

Les résultats sont indiqués sur le tableau 20; ils montrent qu'à l'inverse des oses, les parois de levures non floculantes ont une teneur en hexosamines supérieure à celle des parois de levures floculantes pour une même phase de croissance. En effet les teneurs obtenues en phase stationnaire sont respectivement de 2.43 et 2.61% pour la souche floculante et de 3.82 et 4.05% pour la souche non floculante, selon le type d'hydrolyse. Ces mêmes résultats indiquent une légère augmentation des teneurs en hexosamines en phase stationnaire pour les deux souches, et que la souche floculante contient environ 30% de moins que la souche non floculante. Signalons que le taux d'hexosamines, pour d'autres espèces de levures cultivées dans des conditions très diverses, varie de 2 à 3% (CHATTAWAY et al., 1968; NOVAES et al., 1970).

TABLEAU 20 : Teneurs en hexosamines des parois de *K. lactis* floculante et non floculante après hydrolyse acide et enzymatique, à différentes phases de croissance

		HEXOSAMINES (% / M.S)	
Souches	Phase de croissance	(a) Hydrolyse acide	(b) Hydrolyse enzymatique
KLF	PE	2.04	2.13
	PS	2.43	2.61
KLNF	PE	3.25	3.88
	PS	3.82	4.05

P.E:Phase exponentielle .(a):résultats exprimés en % de GLcN
P.S:Phase stationnaire. (b):résultats exprimés en % de GLcNaC

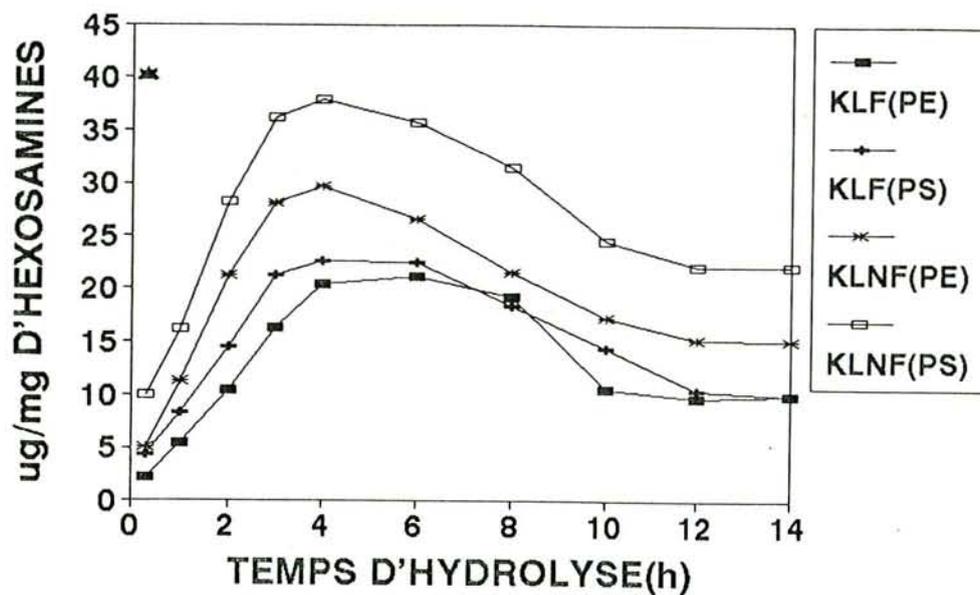


Fig. 88 : Cinétique de la libération des hexosamines par hydrolyse HCL 6N des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

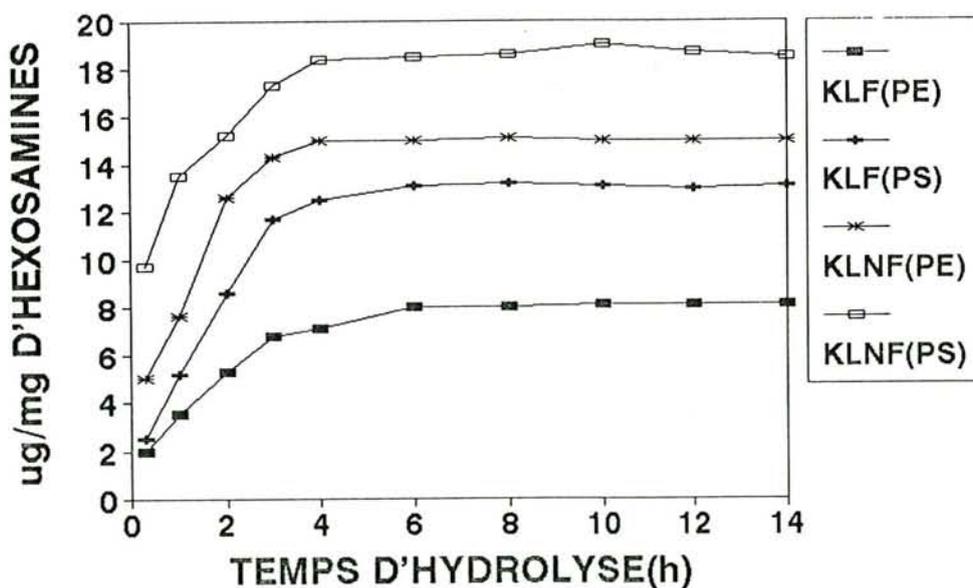


Fig.89: Cinétique de libération des N- acétyl-glucosamines par hydrolyse avec le suc digestif d'*Helix pomatia*, des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (S)

II.4. ANALYSE DES ACIDES AMINES

La cinétique de libération des amino-acides a été établie par hydrolyse acide (HCl 6N) des parois. Le maximum de libération est obtenu après 12 heures d'hydrolyse (figure 90).

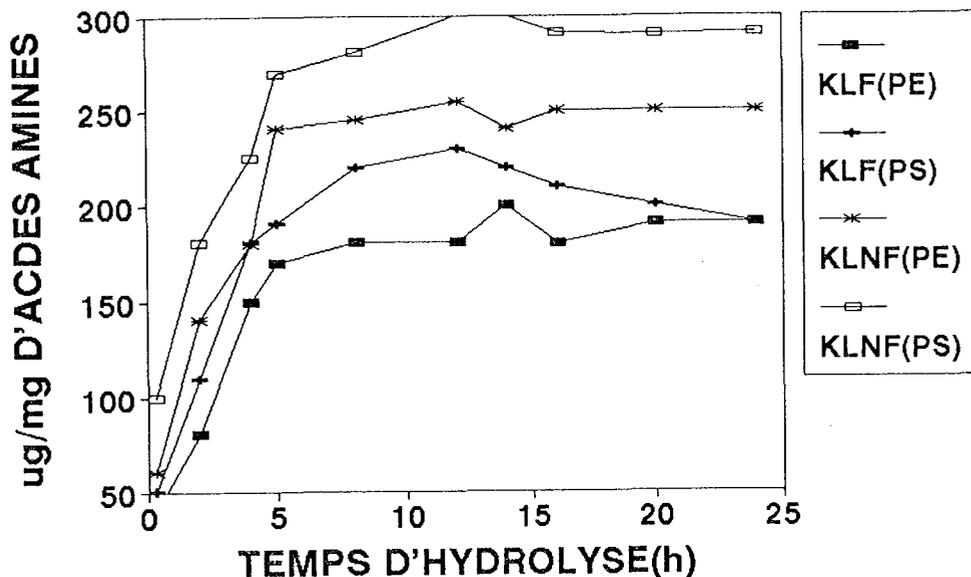


Fig. 90: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse HCl 6N des parois de *K. lactis* flocculante et non flocculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

Les groupements aminés libres présents dans les hydrolysats chlorhydriques ont été d'abord estimés par le dosage au DNFB et comparés aux teneurs en protéines obtenues par le dosage de l'azote dans les parois selon la méthode de KJELDAHL.

La comparaison des résultats (Tableau 21) met en évidence des différences de teneurs exprimées en protéines totales selon la méthode de détermination; ce qui signifie que l'hydrolyse chlorhydrique effectuée dans nos conditions expérimentales, dégrade certains acides aminés notamment le tryptophane et les acides aminés soufrés.

TABLEAU 21 : Teneurs comparées en azote des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

Souches	Phases de croissance	N Protéique	N glucosamine	N total	N total KJELDAHL
KLF	PE	2.35	2.67	2.02	2.99
	PS	2.63	2.63	3.38	3.50
KLNF	PE	3.16	0.89	4.05	4.18
	PS	3.61	1.03	4.64	4.59

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

L'analyse des acides aminés après hydrolyse est réalisée à l'aide d'un auto-analyseur technicon. D'après les résultats (Tableaux 22 et 23; histogrammes 1 et 2), nous remarquons que la teneur en acides aminés totaux des parois de la souche non floculante est relativement plus élevée que celle de la souche floculante pour la même phase de croissance. Les différences du taux en acides aminés observées entre la phase exponentielle et la phase stationnaire sont faibles pour la même souche. D'une manière générale les parois des souches floculantes contiennent moins de protéines que les parois des souches non floculantes, quelle que soit la phase de croissance. Les résultats révèlent également que les parois de *K. lactis* sont particulièrement riches en acide aspartique, acide glutamique, en thréomine et en sérine qui représentent à eux seuls 47,75% et 51,75% respectivement pour les parois des souches non floculante et floculante, en phase exponentielle. Nous constatons par ailleurs, que le pourcentage de ces acides aminés est plus élevée dans les parois de la souche floculante. Cette particularité est liée au fait que ces acides aminés interviennent dans les liaisons N-glycosidiques et O-glycosidiques, ce qui explique l'hypothèse selon laquelle les protéines des parois jouent un rôle important dans les liaisons avec les polysaccharides impliqués dans le mécanisme de la floculation.

La répartition des acides aminés indique que les parois de la souche floculante ont une teneur faible en acides aminés basiques, mais en revanche, une teneur élevée en acides aminés hydroxylés par rapport aux parois des souches non floculantes.

TABLEAU 22 :Composition en acides aminés des parois
de *K. lactis flocculante* en phases
exponentielle et stationnaire

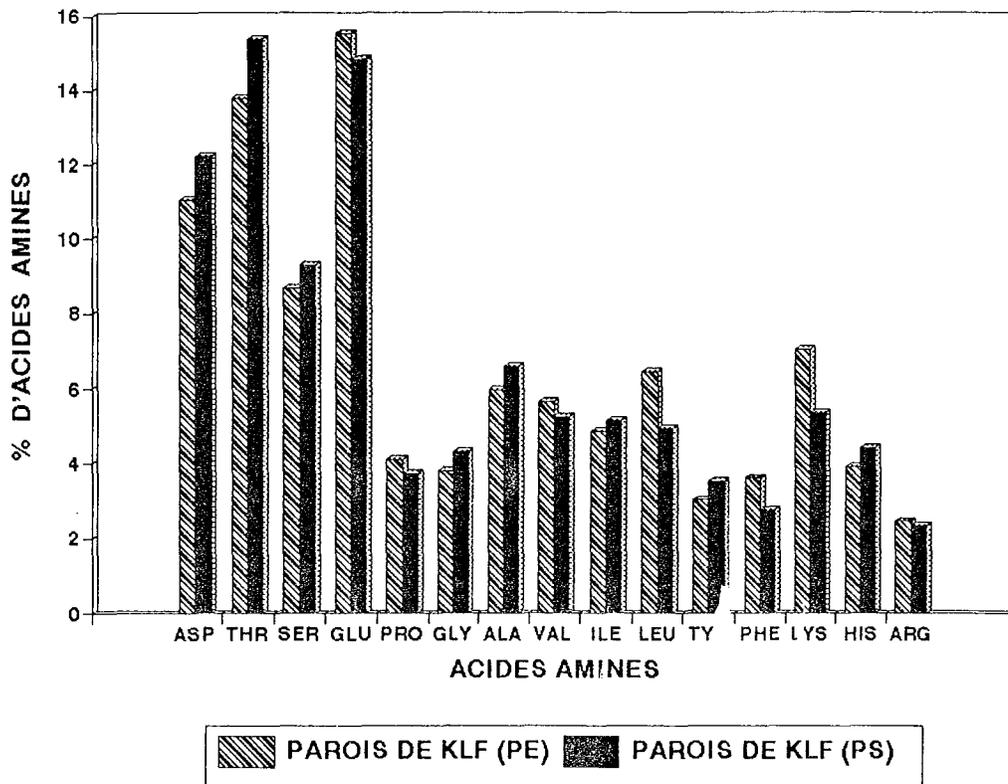
AA	PHASE EXPONENTIELLE		PHASE STATIONNAIRE	
	µg/mg	% AA	µg/mg	%AA
Asp	11.3	11.04	12.1	12.23
Thr	14.1	13.78	15.2	15.36
Ser	8.9	8.69	9.2	9.30
Glu	15.9	15.54	14.7	14.86
Pro	4.2	4.10	3.7	3.74
GLy	3.9	3.81	4.3	4.34
Ala	6.1	5.96	6.5	6.57
Val	5.8	5.66	5.2	5.25
Ile	5.0	4.88	5.1	5.15
Leu	6.6	6.45	4.9	4.95
Tyr	3.1	3.03	3.5	3.53
Phe	3.7	3.61	2.7	2.73
Lys	7.2	7.03	5.3	5.35
His	4.0	3.91	4.2	4.24
Arg	2.5	2.44	2.3	2.32
Total	102.3	99.93	98.9	99.92

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

II.5. TENEUR EN PHOSPHORE DES PAROIS

Le taux de phosphore dans les parois a été déterminé par la méthode de MC CLARE, (1971), après minéralisation des éléments cellulaires à 170°C pendant 48 heures.

STEWART et BALLOU (1968) ainsi que MC LELLAN et al., (1970) ont prouvé l'existence de liaisons phosphodiester dans les mannanes isolés des parois de *Saccharomyces cerevisiae*. Bien qu'il ne soit pas certain que la totalité du phosphore soit engagée dans ce type de liaisons, les autres rôles que ce composé peut jouer au sein de la paroi ne sont pas toujours élucidés.



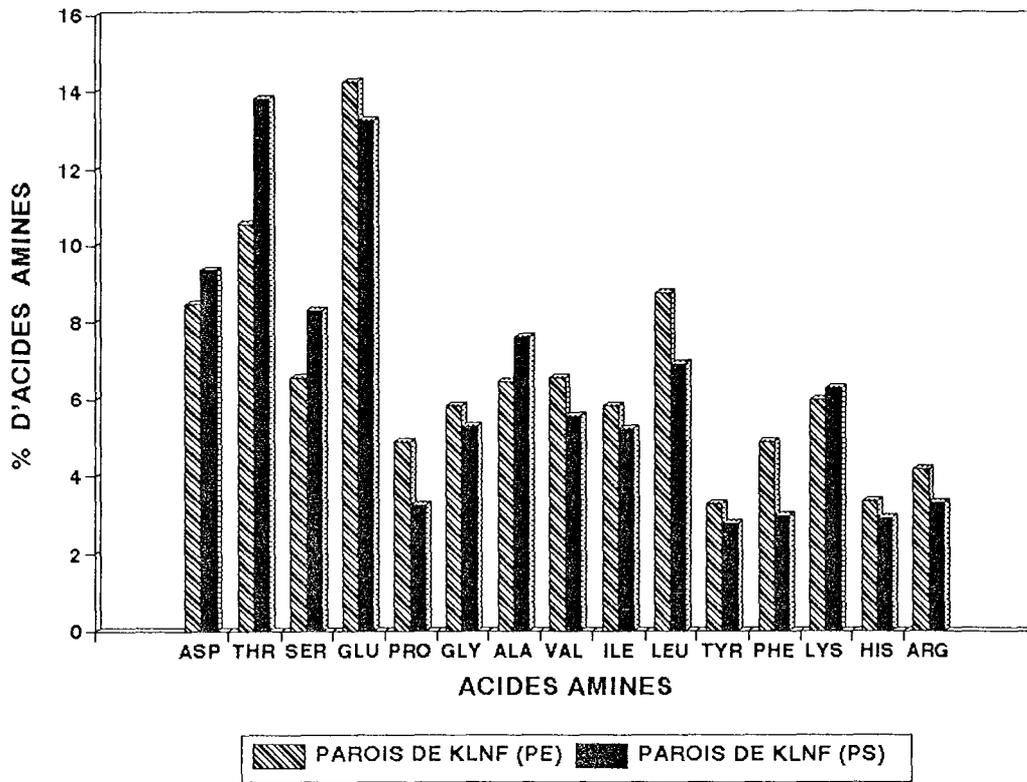
HISTOGRAMME 1: Variation de la teneur en acides aminés des parois de *K. lactis* flocculante en phase exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

TABLEAU 23: Composition en acides aminés des parois de *K. lactis* non flocculante en phases exponentielle et stationnaire

AA	PHASE EXPONENTIELLE		PHASE STATIONNAIRE	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	10.9	8.48	11.8	9.36
Thr	13.6	10.59	17.4	13.8
Ser	8.4	6.54	10.5	8.33
Glu	18.3	14.25	20.5	16.26
Pro	6.3	4.90	4.1	3.35
Gly	7.5	5.84	6.7	5.31
Ala	8.3	6.46	9.6	7.61
Val	8.4	6.54	7.0	5.55
Ile	7.5	5.84	6.6	5.23
Leu	11.3	8.80	8.7	6.9
Tyr	4.2	3.27	3.5	2.77
Phe	6.3	4.90	3.8	3.01
lys	7.7	5.99	7.9	6.26
His	4.3	3.34	3.7	2.93
Arg	5.4	4.20	4.2	3.33
Total	128.4	99.94	126.0	99.90

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Les résultats du tableau 24 font apparaître que les parois de levures flocculantes contiennent environ 2 fois plus de phosphore que les parois de levures non flocculantes pour une même phase de croissance.



HISTOGRAMME 2: Variation de la teneur en acides aminés des parois de *K. lactis* non flocculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

TABLEAU 24 : Teneur en phosphore des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

SOUCHES	PHASES DE CROISSANCE	PHOSPHORE TOTAL
KLF	PE	2.52
	PS	2.83
KLNF	PE	1.11
	PS	1.25

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

II.6. TENEUR EN OLIGO-ÉLÉMENTS

La teneur en oligo-éléments des parois a été déterminée par spectrophotométrie de masse. Les résultats indiqués dans le tableau 25 montrent que les parois des levures floculantes sont plus riches en éléments bivalents (Ca et Mg). En revanche, les parois de levures non floculantes contiennent plus d'éléments monovalents (K et Na).

III. D I S C U S S I O N

Les parois des levures constituées de chaînes polysaccharides liées covalentiellement à des chaînes peptidiques représentent 6 à 27% du poids total cellulaire. Leur composition chimique diffère d'une espèce à l'autre et peut varier suivant les conditions de culture (Mc WILLIAM, 1970; LUERS et al., 1971).

Le rendement relatif pondéral obtenu par broyage mécanique concorde avec celui généralement indiqué pour d'autres levures (10 à 20%). Ainsi AL MAHMOOD (1988) obtient 18,1% et 17% respectivement pour des levures floculantes et non floculante de *K. bulgaricus*; alors que MRAWALA (1990) observe le même rendement pour des levures floculantes et peu floculantes de *P. pastoris* IFP 206.

TABLEAU 25: Teneur en éléments minéraux des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phases exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

SOUCHE	PHASE DE CROISSANCE	Ca (422.7nm)	Mg (285.2nm)	K (766.5nm)	Na (589nm)
KLF	PE	0.59	0.40	0.12	0.23
	PS	0.62	0.44	0.10	0.25
KLNF	PE	0.28	0.19	0.16	0.30
	PS	0.30	0.23	0.13	0.36

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Dans le cas de *K. lactis* les résultats mettent en évidence une augmentation relative de la teneur en parois au moment de la floculation et en phase stationnaire. Cette augmentation concorde avec celle du pourcentage de floculation constatée en phase stationnaire.

L'examen des cinétiques de libération des divers constituants au cours d'hydrolyse acide, ne montre pas de différences appréciables de vitesses d'hydrolyse entre les parois de la souche floculante et celles de la souche non floculante.

L'analyse quantitative et qualitative des oses fait apparaître une teneur plus élevée en oses totaux dans les parois de la levure floculante. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour d'autres levures floculantes telles que *S. Uvarum* (AMRI et al., 1982) et *K. bulgaricus* (HUSSAIN et al., 1986; AL MAHMOOD 1988). Ces mêmes résultats indiquent, par ailleurs, que les parois des levures floculantes contiennent plus de mannose (rapport Man/Glc plus élevé); Ceci est lié au fait que les oses pariétaux interviennent qualitativement et quantitativement dans le phénomène de floculation. Ce serait en effet la structure et

la disposition des chaînes latérales des oligosaccharides dans la molécule des mannanes qui porteraient ou formeraient les sites permettant l'agrégation cellulaire. La perte de l'aptitude à la floculation chez des souches mutantes pourrait s'expliquer par exemple, par la perte d'unités α -D-mannopyranosyl-phosphate de la chaîne latérale d'oligosaccharides, déterminants immunologiques dans les parois de levures floculantes.

De nombreux auteurs ont proposé que l'état de floculation et de non floculation correspond à des fluctuations de deux polymères composant la couche pariétale externe: les phosphomannanes et les protéines.

Selon MASSCHELEIN et al., (1963) la période de floculation correspond à la synthèse des mannanes. La durée de cette phase dépend de la vitesse de synthèse et de dégradation des mannanes et par conséquent elle est liée au rapport Mannanes/Protéines de la paroi cellulaire.

Par la suite, STEWART (1975) et STEWART et RUSSEL(1981) ont montré, qu'en général, les parois de levures floculantes renferment plus de glucides totaux que celles des levures non floculantes. Cependant, dans le cas de *K. lactis* le taux de glucanes (d'après le rapport Man/Glc) des parois de levures non floculantes est supérieur à celui des parois de levures floculantes.

Cette observation n'est pas générale; en effet, JAYATISSA et ROSE (1976) ont montré que les parois d'une souche floculante de *S. Cerevisiae* contenait 36.5% de glucanes contre 44.5% de mannanes. Récemment MBAWALA (1990) a trouvé des résultats inverses pour *P. pastoris* IFP 206 (soit environ 72% de glucanes contre 27% de mannanes pour la souche floculante).

Malgré toutes les controverses, l'ensemble des résultats suggère que la floculation est régie par un facteur inhérent aux mannanes plutôt qu'à la teneur globale des polymères glucidiques des parois.

L'analyse de la composition en acides aminés des parois fait apparaître également des différences significatives: globalement les parois de la souche non floculante ont une teneur en acides aminés totaux plus élevée que les parois de la souche floculante quelle que soit la phase de croissance. Dans les deux cas nous constatons que les parois sont plus riches en acides glutamique et aspartique, la sérine et la thréonine; toutefois la teneur en ces acides aminés est relativement plus élevée dans le cas de la souche floculante.

Ces résultats concordent notamment avec ceux de SENTANDREU et NORTHCOTE (1969) qui expliquent cette richesse par le rôle que jouent ces acides aminés dans la liaison avec les polysaccharides (synthèse de glycoprotéines) impliqués dans la floculation.

En revanche, selon PHAFF (1971) les parois des levures sont caractérisées par une richesse en alanine, valine glycine et acide glutamique; et pauvres en proline et en acides aminés aromatiques ou diaminés.

Par ailleurs, il est bien connu que l'assemblage des acides aminés dans l'espace des formes tertiaires est déterminant pour la fonction de la protéine. Dans une structure peptidique, certains acides aminés sont orientés vers l'intérieur de la molécule et d'autres vers la surface.

Les éléments situés dans la profondeur de la molécule sont en majorité non polaires; les acides aminés aliphatiques à chaînes ramifiées (valine, leucine, isoleucine...) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine). Ces éléments non polaires sont inaccessibles aux réactifs et ont pour rôle d'assurer la stabilité des molécules. Par contre, les éléments en surface sont polaires et facilement accessibles à des réactifs, ils permettent d'établir des liaisons électrostatiques, hydrogènes, ponts disulfures ou salins. Ce sont ces acides aminés polaires à la surface qui peuvent intervenir par leurs charges dans les interactions cellulaires; ce qui explique les hypothèses de formation de ponts salins entre les ions bivalents et les groupements carboxyliques libres des mannoprotéines à la surface des parois de levure.

La teneur élevée en acides aminés chargés des parois de la souche floculante tend à montrer l'effet éventuel de ces acides aminés sur la diminution de la charge négative nette de la surface des cellules, ce qui induit leur agrégation.

L'analyse de la composition minérale des parois de *K. lactis* fait apparaître une teneur élevée en phosphore dans les parois de la souche floculante; ceci étaye les hypothèses selon lesquelles le phosphore est impliqué dans la floculation. En effet, les ions phosphates interviennent dans la formation des macromolécules de phosphopeptidomannanes responsables de la floculation, sous forme de liaisons phosphodiester ou monophosphoester (STEWART et BALLOU, 1969; THIEME et BALLOU, 1971).

Selon plusieurs auteurs, la floculation semble dépendre de la présence, dans les parois de groupements anioniques, ce qui suggère l'implication des groupements phosphodiester en plus

des groupements carboxyliques, et dans une certaine mesure, la capacité des levures à flocculer est liée à la densité des groupements phosphates dans la couche superficielle des parois, ce qui explique en outre, le degré de phosphorylation élevé des mannanes des parois des souches flocculantes (LYONS et HOUGH, 1970). Toutefois la faible teneur en phosphore des parois de souches non flocculantes est vraisemblablement liée à la perte de groupements α -D-mannopyranosyl phosphates impliqués dans les chaînes latérales des mannanes.

Les mêmes résultats montrent également que les parois des souches flocculantes sont plus riches en calcium et en magnésium; en revanche, leur teneur en potassium et en sodium est inférieure à celle des parois de la souche non flocculante.

Rappelons que les teneurs en calcium des parois varient selon les espèces et les conditions de culture. Ainsi AMRI et al., (1982) ont constaté que la teneur en calcium et en magnésium dans les parois de *S. uvarum*, diminuait en phase stationnaire. Ces mêmes auteurs ont, cependant, observé que les parois de levures flocculantes fixent plus de calcium que les parois de levures non flocculantes.

L'augmentation du taux de magnésium dans les parois de levures flocculantes, confirme le rôle de cet élément dans les mécanismes de flocculation. En effet NISHIHARA et al., (1976) ont montré que le magnésium était indispensable dans le milieu de culture pour que la levure *S. cerevisiae* acquiert l'aptitude à flocculer. Le magnésium intervient comme inducteur de la biosynthèse des facteurs responsables de la flocculation.

En conclusion, la composition globale (Tableau 26) des parois de *K. lactis* flocculante et non flocculante permet de retenir que la flocculation se traduit par un remaniement chimique des parois que l'on peut résumer par les points suivants:

- Une augmentation du taux des oses totaux, du rapport Man/Glc, et de la teneur en phosphore et en calcium

- Une diminution des acides aminés totaux et des hexosamines.

- A l'état flocculant, les différences quantitatives et qualitatives des divers constituants entre la phase exponentielle et stationnaire varient selon le type de composés considérés.

Rappelons cependant que ces observations sont divergentes, en effet MASSCHELEIN et al. (1963) ont trouvé des variations dans la teneur des mannanes pariétaux; alors que MILL (1964) MARFEY et al., (1977) ont surtout noté une fluctuation des protéines de la paroi. LYONS et HOUGH (1970) ont estimé que seules les teneurs en groupements phosphorylés de la paroi varient en relation avec la floculation. Enfin AMRI et al., (1981) ont constaté que les ions minéraux augmentent d'une façon significative au moment de la floculation alors que le taux de protéines baisse dans les parois de *S. uvarum*.

Tableau récapitulatif 26: Composition chimique globale des parois de *K. lactis* floculante et non floculante en phase exponentielle (PE) et stationnaire (PS)

PHASE DE CROISSANCE CONSTITUANTS		KLF		KLNf	
		PE	PS	PE	PS
Oses totaux		70.6	75.3	60.4	61.1
Hexosamines	(a)	2.04	2.43	3.25	3.82
	(b)	2.13	2.61	3.88	4.05
Acides aminés totaux (-NH ₂)		10.20	9.98	12.84	12.6
Phosphore (P)		2.52	2.83	1.11	1.25
Calcium		0.59	0.62	0.28	0.30
Magnésium		0.40	0.44	0.19	0.23
Man/GLC		1.1	1.2	0.92	0.96
Oses/AA		6.92	7.54	4.70	4.84
Oses/P		28.01	26.60	54.41	48.8
AA/P		4.04	3.52	11.56	10.08

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

(a) résultats exprimés en GlcN

(b) résultats exprimés en GlcNaC

AA: acides aminés

CHAPITRE VI

ETUDE DES FRACTIONS PARIETALES

OBTENUES APRES ACTION DE:

- L'ETHYLENEDIAMINE
- LA CYTOHELICASE

I. I N T R O D U C T I O N

le fractionnement des parois permet d'isoler des constituants qui apparaissent déterminants dans le phénomène de floculation.

L'isolement de macromolécules complexes des parois de levures a été réalisé dans la plupart des cas par des traitements chimiques utilisant des solutions de NaOH (NORTHCOTE, 1963), de KOH (MC MURROUGH et ROSE, 1967; AMRI et al., 1981) ou par autoclavage de cellules entières dans des tampons citrates (PEAT et al., 1961).

Des traitements enzymatiques mettant en oeuvre la papaine (TEZUKA, 1969), la pronase (CAWLEY et HARRINGTON, 1972), des glucanases (EDDY et LONGTON, 1969; SHIBATA et al., 1983; PASTOR et al., 1984), ont été également appliqués au fractionnement des parois de levures.

les traitements généralement appliqués présentent des inconvénients. Ainsi les traitements chimiques, notamment l'action des alcalis, NaOH ou KOH, provoquent la rupture des liaisons O-glycosidiques.

Certains auteurs affirment aussi que les autoclavages, par les températures mises en jeu, peuvent entraîner des phénomènes d'altérations irréversibles des macromolécules.

Au cours de notre étude nous avons comparé diverses méthodes d'obtention des constituants impliqués dans le mécanisme de floculation.

Dans une première étape nous avons utilisé l'éthylène-diamine agent alcalin préconisé par KORN et NORTHCOTE (1969), comme agent de fractionnement des parois isolées des souches *K. lactis* floculante et non floculante. Bien que le mode d'action de cet agent chimique ne soit pas toujours connu, de nombreux auteurs l'ont utilisé pour l'étude des parois de levures (LYONS et HOUGH, 1971; MOULKI et al., 1972; LELEU et al., 1977; AL MAHMOOD, 1987). En effet, pour isoler les constituants des parois sous forme hautement polymérisés, ce traitement est beaucoup moins sévère que l'action des acides ou bases.

Dans une seconde étape nous avons traité les parois à la cytohélicase. Cette préparation enzymatique permet en effet d'obtenir des polymères de haut poids moléculaire tout en évitant leur dénaturation. Rappelons que cette enzyme est composée en grande partie de β -(1-3) glucanase et peut contenir d'autres enzymes selon son degré de purification. Elle est largement utilisée pour la production de protoplastes (BACON, 1973).

II. ETUDE DES CONSTITUANTS EXTRAITS
DES PAROIS TRAITÉES A L'ETHYLENEDIAMINE

II.1. RENDEMENTS RELATIFS EN DIFFÉRENTES FRACTIONS

Le fractionnement des parois par l'éthylènediamine aboutit à l'obtention de trois fractions que l'on peut classer selon leur caractère de solubilité:

- La fraction A est soluble dans l'éthylènediamine et dans l'eau .
- La fraction B est soluble dans l'éthylènediamine mais elle est insoluble dans l'eau .
- La fraction C est insoluble aussi bien dans l'éthylènediamine que dans l'eau.

Les quantités respectives de chacune des fractions issues de ce traitement sont rapportées dans le tableau 27. Les teneurs des fractions A et C sont plus élevées que celles de B aussi bien dans les parois de levures floculantes que dans celles des levures non floculantes. Il ressort également de ce tableau que le pourcentage des fractions A des parois de levure floculantes (56%) est supérieur à celui des levures non floculantes (45%); alors que les rendements en fractions B et C ne diffèrent pas de manière significative chez les 2 levures. Les résultats laissent penser alors qu'il y a une biosynthèse accrue de macromolécules hydrosolubles au moment de la floculation

TABLEAU 27: Rendements relatifs en différentes fractions issues des parois de *K. lactis* par traitement à l'éthylènediamine

FRACTIONS	FRACTION A	FRACTION B	FRACTION C
SOUCHES			
KLF	56,3	10,2	32,1
KLNF	45,8	12,4	34,7

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

II.2. ANALYSE BIOCHIMIQUE COMPAREE DES DIFFERENTES FRACTIONS

II.2.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE.

La composition chimique globale de chaque fraction a été obtenue après hydrolyse acide dans des conditions optimales préalablement déterminées.

Nous avons rassemblé dans le tableau 28 les teneurs des constituants des fractions pariétales.

Les résultats montrent que les protéines et les oses totaux sont particulièrement dominants dans les fractions A et B. En revanche, les fractions C renferment plus d'hexosamines. De même, les teneurs en phosphates sont plus élevées dans la fraction A; ces teneurs varient peu entre les fractions B et C.

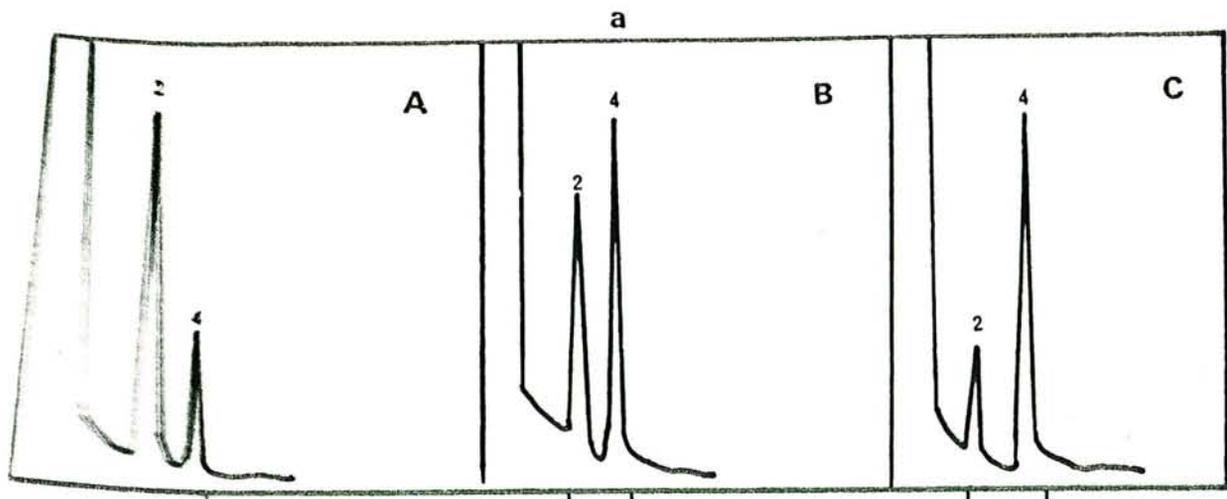
La composition chimique globale des différentes fractions fait surtout apparaître que seule la fraction A présente une corrélation avec la floculation. En effet, les constituants de ces fractions varient dans le même sens que ceux des parois dont elles sont issues.

A l'examen de ces résultats il est vraisemblable que les éléments impliqués dans la floculation sont les constituants de cette fraction A, ceux-ci feront l'objet d'une étude détaillée

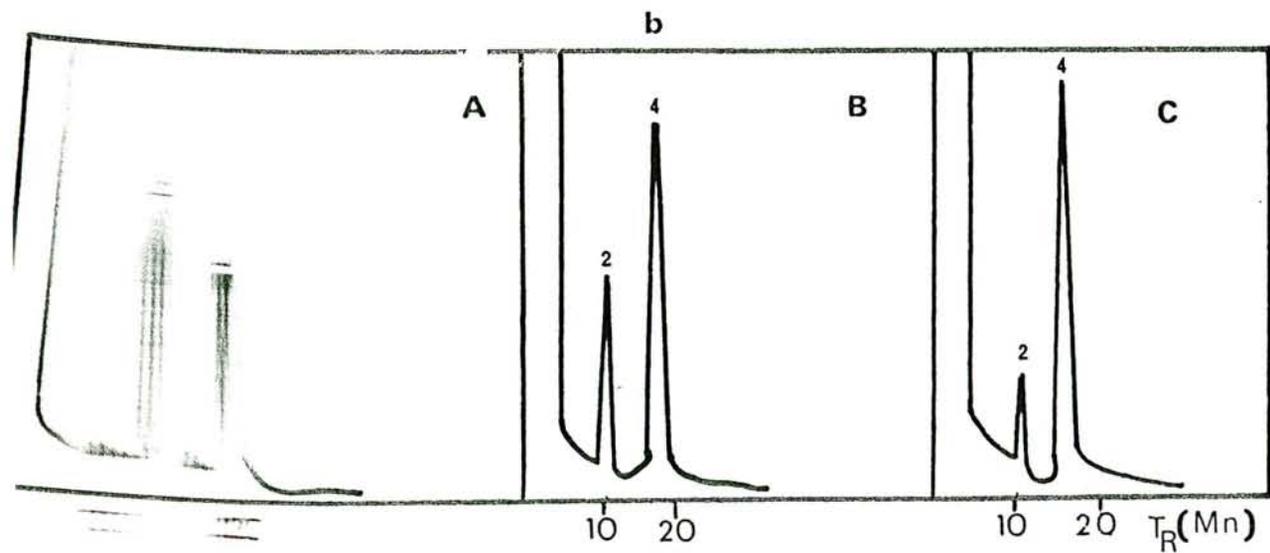
II.2.2. ANALYSE QUALITATIVE DES OSES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PARIÉTALES (A, B, C)

L'analyse des profils obtenus après séparation des oses sous forme d'acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse met en évidence essentiellement du mannose et du glucose dont les rapports varient selon la fraction considérée (figures 91a et b).

Les rapports Man/Glc, calculés à partir des chromatogrammes, sont indiqués dans le tableau 28. Nous constatons que les fractions B et C renferment plus de glucose que de mannose et il n'y a pas de différences significatives en relation avec la floculation; ce qui laisse supposer que ces deux fractions ne subissent pas de variations au moment de la floculation. En revanche, le rapport Man/Glc est plus élevé dans la fraction A de la souche floculante. ce résultat vient à l'appui de celui obtenu sur les parois entières et permet d'admettre dans une certaine mesure, que l'état de floculation



2 = Man
4 = Glc



Chromatogramme des acétates d'alditols des fractions A..B.C obtenues par fractionnement à l'éthylènediamine des parois de *K. lactis* flocculante (a) et non flocculante (b)

de *K. lactis* se traduit par un enrichissement de sa paroi en polymères du type mannane, solubles dans l'eau et de structure apparemment analogue à celle des mannanes des parois de *K. lactis* non flocculante.

II.2.3. ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINÉS ET TENEUR EN HEXOSAMINES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PARIÉTALES

Nous avons rassemblé dans les tableaux 29 et 30 les teneurs en acides aminés et en glucosamine déterminées, par autoanalyseur, dans les hydrolysats des différentes fractions pariétales.

La détermination des acides aminés révèle, dans les fractions A et B, la présence de tous les acides aminés identifiés dans les parois totales dont elles sont issues. En revanche, la fraction C ne contient qu'une très faible concentration d'acides aminés dont on note la prédominance des mêmes acides aminés que les fractions A et B à savoir: les acides aspartique et glutamique, la thréonine et la sérine. Nous n'avons pas mis en évidence, dans la fraction C, certains acides aminés la proline, la leucine, la tyrosine, la phénylalanine, l'histidine et l'arginine et ce quelle que soit la souche (histogrammes 3 et 4).

L'examen de la composition montre également qu'il n'y a pas de variations significatives des teneurs en acides aminés des fractions B et C en relation avec le caractère flocculant. Par contre, on note une corrélation entre les variations en acides aminés dans la fraction A et le caractère flocculant.

Les teneurs en glucosamine déterminées à l'aide de l'auto-analyseur varient dans le même sens que celles obtenues par la méthode chimique.

II.2.4. ESTIMATION DE LA CHITINE

La plupart des levures contiennent un taux variable de chitine dans la paroi (BACON et al., 1966; CABIB et BOWERS, 1971 et 1975).

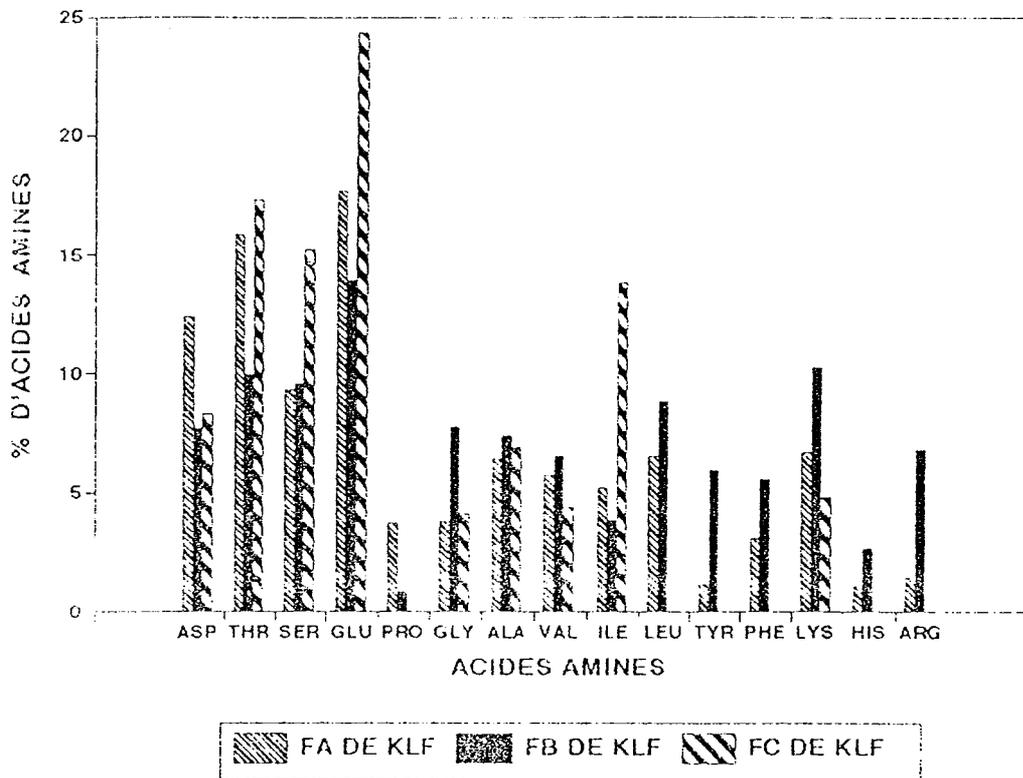
TABLEAU 28 :Composition globale des fractions pariétales, de *K. lactis* floculante et non floculante, obtenues par traitement à l'éthylène diamine

FRACTIONS	CONSTITUANTS	KLF	KLNF
A	Hexoses	75,1	60,4
	Hexosamines	0,73	1,12
	Acides aminés(AA)	11,26	15,49
	phosphore (P)	2,37	1,23
	Man/Glc	2,70	1,50
	Oses/AA	6,66	3,89
	Oses/P	31,68	48,10
	AA/P	4,75	12,59
B	Hexoses totaux	40,16	40,98
	Hexosamines	1,85	2,21
	Acide aminés	6,63	8,78
	Phosphore	0,35	0,38
	Man/Glc	0,61	0,69
	Oses/AA	6,05	4,66
	Oses/P	114,74	107,84
	AA/P	18,94	23,10
C	Hexoses totaux	20,52	20,81
	Hexosamines	3,95	4,07
	Acides aminés(AA)	4,31	4,26
	Phosphore (P)	0,43	0,45
	Man/Glc	0,1	0,09
	Oses/AA	4,76	4,88
	Oses/P	47,72	46,24
	AA/P	10,02	9,46

TABLEAU 29: Composition en acides aminés et en glucosamine des fractions pariétales (A,B,C) de *K. lactis* floculante, obtenues par traitement à l'éthylènediamine

AA	FRACTION A		FRACTION B		FRACTION C	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	10,2	12,33	5,87	7,73	0,72	8,30
Thr	13,1	15,84	7,57	9,97	1,50	17,30
Ser	7,7	9,31	7,30	9,61	1,32	15,22
Glu	14,6	17,65	10,56	13,90	2,11	24,33
Pro	3,1	3,74	0,66	0,86	-	-
Gly	3,11	3,76	5,90	7,77	0,36	4,15
Ala	5,3	6,40	5,6	7,37	0,60	6,92
Val	4,7	5,68	4,95	6,52	0,38	4,38
Ile	4,3	5,19	2,95	3,88	1,20	13,84
Leu	5,4	6,52	6,72	8,85	-	-
Tyr	1,0	1,20	4,53	5,96	-	-
Phe	2,6	3,14	4,20	5,53	-	-
Lys	5,5	6,65	7,80	10,27	0,42	4,84
Hist	0,9	1,08	2,01	2,64	-	-
Arg	1,2	1,45	5,2	6,84	-	-
TOTAL	82,7	99,94	75,92	107,7	8,67	99,28
GlcN	7,90		15,2		40,3	

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

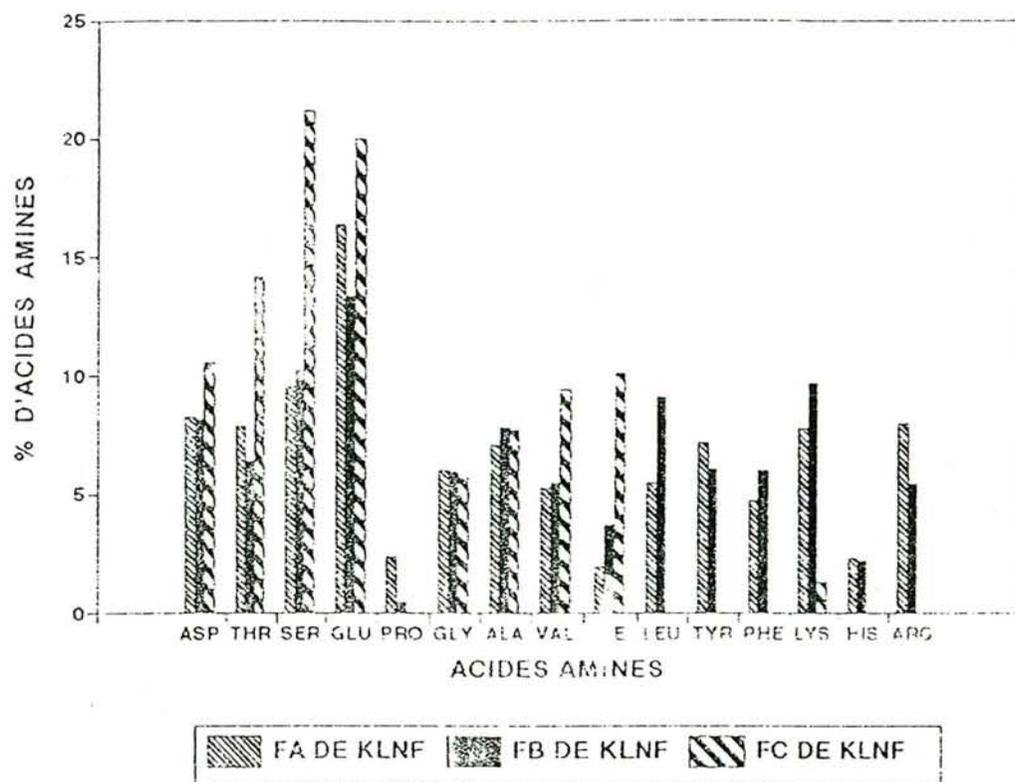


HISTOGRAMME 3: Variation de la teneur en acides aminés des fractions (A, B et C) des parois de *K. lactis* flocculante traitées à l'éthylènediamine

TABLEAU 30: Composition en acides aminés et en glucosamine des fractions pariétales (A,B,C) de *K. lactis* non floculante, obtenues par traitement à l'éthylènediamine

AA	FRACTION A		FRACTION B		FRACTION C	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	8,09	8,24	6,44	8,14	0,90	10,57
Thr	7,75	7,90	5,02	6,35	1,2	14,10
Ser	9,33	9,51	8,09	10,23	1,82	21,15
Glu	16,05	16,36	10,56	13,36	1,7	19,97
Pro	2,31	2,35	0,33	0,41	-	-
Gly	5,89	6,0	4,72	5,97	0,48	5,64
Ala	6,95	7,08	6,20	7,84	,066	7,75
Val	5,16	5,25	4,30	5,44	0,80	9,40
Ile	1,86	1,89	2,92	3,69	0,86	1,10
Leu	5,33	5,43	7,21	9,12	-	-
Tyr	7,05	7,18	4,78	6,04	-	-
Phe	4,60	4,68	4,77	6,03	-	-
Lys	7,64	7,78	7,67	9,70	0,11	1,29
Hist	2,26	2,30	1,75	2,21	-	-
Arg	7,82	7,97	4,28	5,41	-	-
Total	98,09	99,92	79,04	99,94	8,51	99,97
GlcN	18,55		23,5		46,33	

(Résultats exprimés en % de matière sèche)



HISTOGRAMME 4: Variation de la teneur en acides aminés des fractions (A, B et C) des parois de *K. lactis* non flocculante traitées à l'éthylènediamine

La chitine est un homopolymère constitué de molécules de N-acétylglucosamine liées en β - (1 \rightarrow 4). Elle présente une très grande résistance à l'action de la plupart des agents chimiques. Ceci amène naturellement à penser qu'après traitement des parois par l'éthylènediamine, la chitine se retrouve essentiellement dans la fraction C.

Nous avons tenté d'estimer la teneur de ce constituant et pour cela les fractions C ont été soumises à des traitements successifs par HCl 3 % puis NaOH 3% (cf matériel et méthodes). On obtient les fractions Ct purifiées. Nous avons dosé la N-acétyl-glucosamine, à la fois dans la fraction C, la fraction Ct (considérée comme étant la chitine) et dans la paroi totale. Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans le tableau 31.

Tableau 31: Teneur en N-acétyl-glucosamine des fractions C, C_t et des parois de *K. lactis* floculante et non floculante

	fraction C	Chitine	Parois	% de GlcNaC ^(*)
Souches				
KLF	2,97	1,89	2,63	71,86
K1NF	3,03	2,46	3,58	68,71

(*): % de GlcNaC sous forme de chitine dans les parois
(Résultats exprimés en % de matière sèche)

L'examen de ce tableau met en évidence que 68% et 71% de N-acétyl-glucosamine de la paroi de *K. lactis* floculante et non floculante, respectivement, sont polymérisés sous forme de chitine. Ceci indique qu'une partie de la N-acétyl-glucosamine des parois est donc perdue, lors des différents traitements, sous forme de petits polymères solubles. Cependant, il faut également tenir compte du fait qu'une partie de la N-acétyl-glycosamine se trouve engagée dans des liaisons avec des complexes glycoprotéiques (LELEU et al., 1977). Ces dernières pourraient donc représenter la fraction C éliminée au cours de la dernière purification de la chitine. Signalons que l'identification rigoureuse de la chitine est rendue difficile par son insolubilité dans tous les solvants ainsi cette estimation ne permet pas de conclure.

II.3. ETUDE DES FRACTIONS A

L'analyse globale des différentes fractions issues du traitement des parois par l'éthylènediamine, nous a permis de montrer que seuls les constituants des fractions A, de nature glycoprotéique, présentent des variations qui évoluent en corrélation avec le caractère flocculant des souches. Ces fractions ont été purifiées et leur structure étudiée.

II.3.1. PURIFICATION DES FRACTIONS A

Pour vérifier l'homogénéité des fractions A, nous avons appliqué la technique classique de filtration sur gel. En effet, les fractions A sont solubles dans l'eau et ce mode de purification, pour une première étape, convient.

Les fractions A sont d'abord filtrées sur gel Trisacryl GF 2000 dont la zone de fractionnement est comprise entre 10.000 et 20.000.000 daltons. Le produit est collecté en une seule fraction correspondant à un seul pic inclu aussi bien pour la fraction A issue des parois de la souche flocculante que celle issue des parois de la souche non flocculante. Les volumes d'élution sont très voisins pour les deux fractions (figure 92).

Les produits obtenus sur gel Trisacryl ont été filtrés ensuite sur colonne d'ultrogel ACA 22. Les figures 93 et 94 illustrent les profils d'élution. Cette filtration permet d'obtenir deux sous-fractions (A1 et A2) incluses. Sur une partie aliquote des éluats provenant de la filtration nous avons effectué à la fois une réaction au DNFB et au phénol sulfurique.

Il a été établi pour chaque séparation deux courbes d'élution correspondant l'une à la teneur en groupements aminés et l'autre en groupements osidiques.

La présence de glycoprotéines se traduit par la concordance des pics appartenant aux 2 courbes (figures 93 et 94). Les différentes fractions ont été récupérées et lyophilisées. Nous avons d'abord estimé le rendement pondéral de chaque fraction puis leur masse moléculaire.

II.3.2. ESTIMATION DES MASSES MOLECULAIRES DES SOUS-FRACTIONS A1 ET A2

La filtration des fractions A sur ultrogel ACA 22 permet d'obtenir deux sous-fractions (A1 et A2) suffisamment séparées

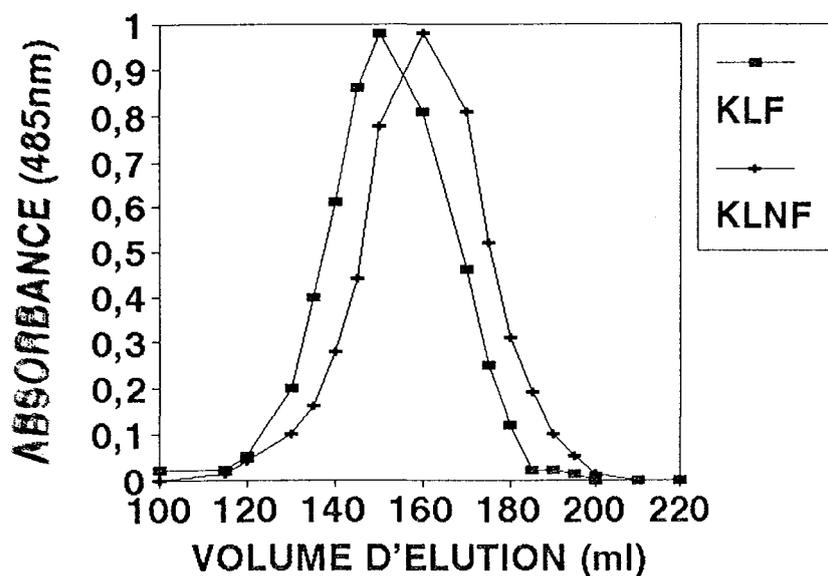


Fig. 92 Profil d'élution sur gel Trisacryl GF 200 des fractions A de *K. lactis* floculante et non floculante obtenues, par traitement des parois à l'éthylènediamine

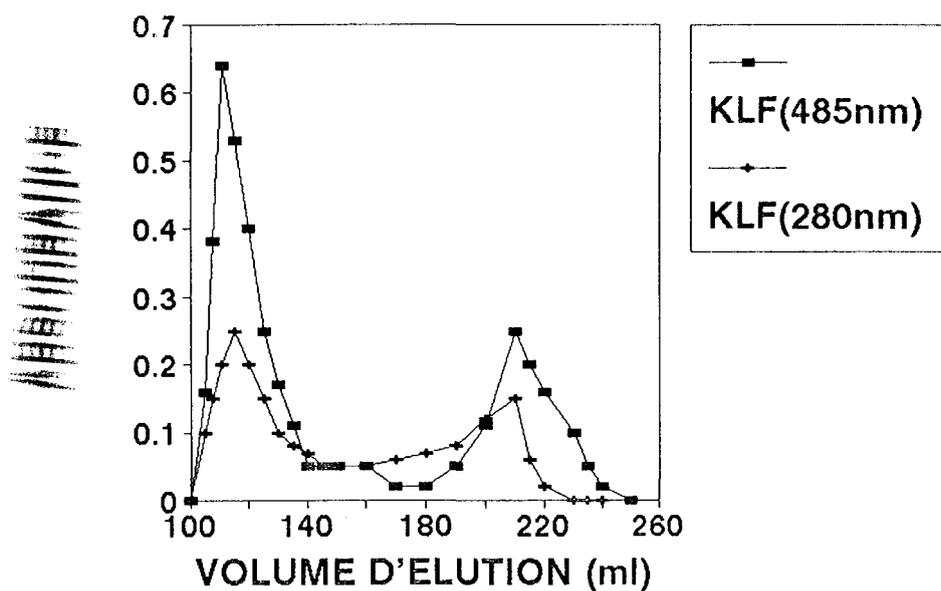


Fig. 93 Profil d'élution sur Ultrogel ACA 22 de la fraction des parois de *K. lactis* floculante.

Hexoses (ABS à 485 nm)
Groupements aminés (NH₂), (ABS à 280 nm)

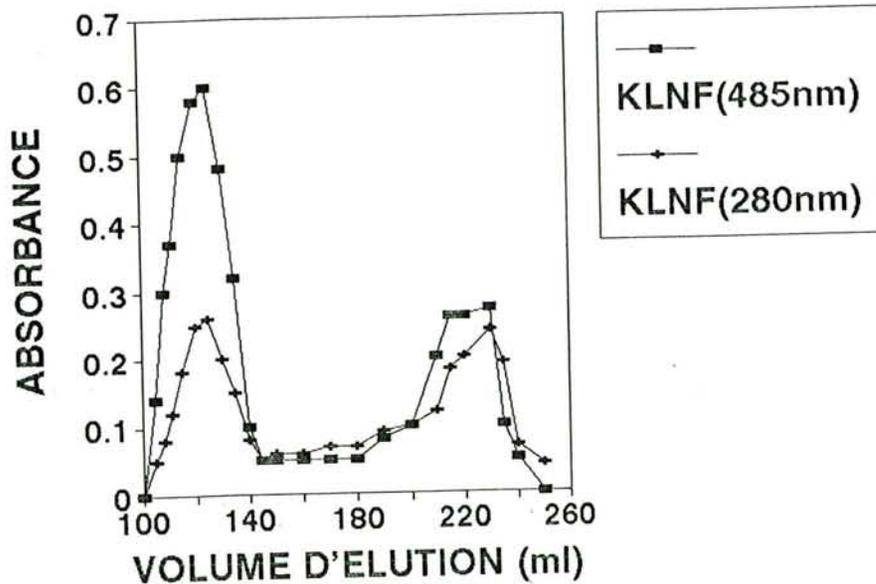


Fig 94: Profil d'élution sur Ultrogel ACA 22 de la fraction A des parois de *K. lactis* non flocculante

Hexoses (ABS à 485 nm)

Groupements aminés (NH_2), (ABS à 280 nm)

les sous-fractions A1 représentent 75 % et 80 % de la fraction initiale pour la souche flocculante et non flocculante; alors que les sous fractions A2 ne représentent que 12 et 10% respectivement (tableau 32).

Les masses moléculaires des différentes sous-fractions (A1 et A2) ont été estimées à l'aide d'une courbe étalon (figure 95 et 96).

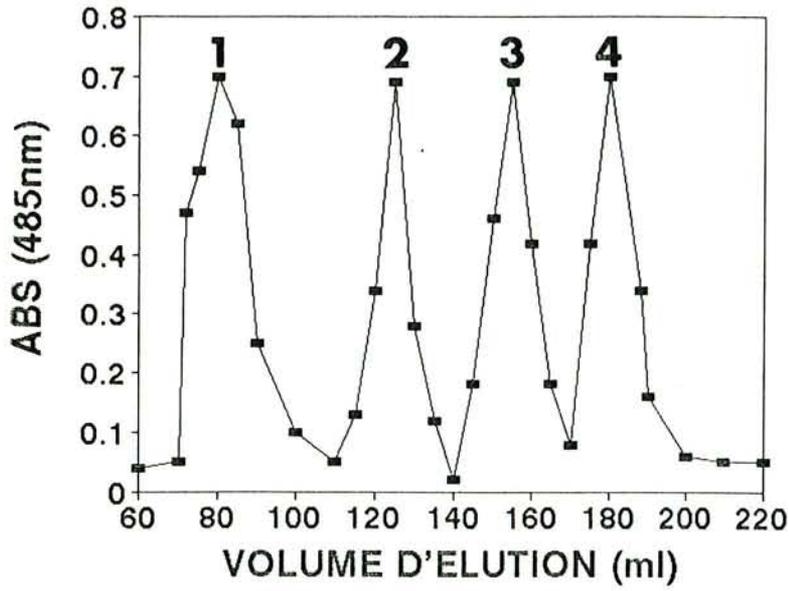


Fig. 1. Profil d'élution sur Ultrogel ACA 22 des produits
 colorés: Dextran, (1) $2 \cdot 10^6$, (2) $465 \cdot 10^3$, (3) $70 \cdot 10^3$,
 (4) $9 \cdot 10^3$ daltons

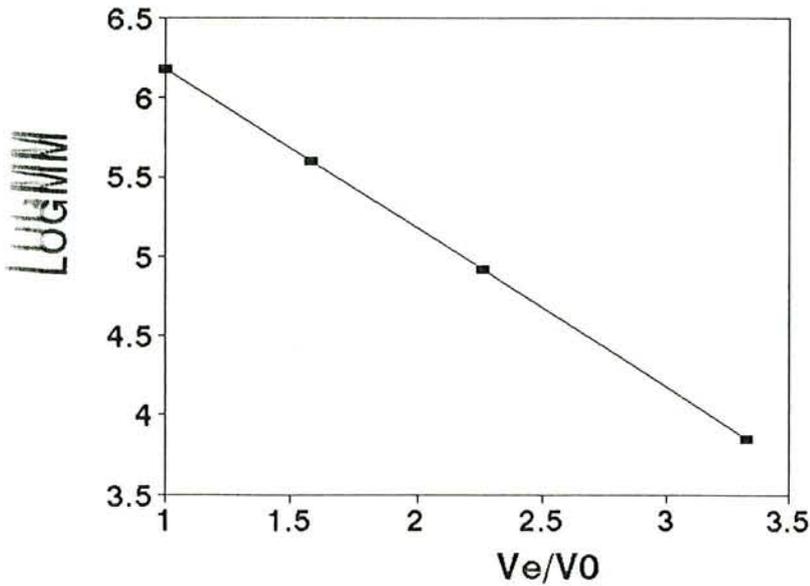


Fig. 2. Courbe d'étalonnage de la colonne
 Ultrogel ACA 22

TABLEAU 33: Rendement et masses moléculaires des sous-fractions obtenues par filtration sur Ultrogel ACA 22 de la fraction A des parois de *K. lactis* floculante et non floculante

SOUCHES	SOUS-FRACTION (A1)		SOUS-FRACTION (A2)	
	R	MM ($\times 10^3$ daltons)	R	MM ($\times 10^3$ daltons)
KLF	75	340	12	10
KLNF	80	310	10	9,5

R : rendement pondéral en % de la fraction initiale
MM : masse moléculaire

Les résultats indiqués dans le tableau 32, montrent que les sous-fractions (A1) des parois de levures floculantes ont une masse moléculaire légèrement plus élevée que celles des parois de levures non floculantes, les masses moléculaires de ces fractions (A1) majeures sont respectivement de $340 \cdot 10^9$ daltons et $310 \cdot 10^9$ daltons. Les sous-fractions mineures (A2) des parois de levures floculantes et non floculantes ont des masses moléculaires voisines (10.000 et 9.500 daltons respectivement).

Les sous-fractions (A1) éléments majeurs, ont été ensuite analysées. Préalablement leur homogénéité a été vérifiée par électrophorèse sur papier qui met en évidence une seule bande. Cependant, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS révèle plusieurs bandes (figure 97) qui sont attribuées à l'effet du SDS sur les sous unités des glycoprotéines (YAMADA et al., 1985).

L'apparition de ces bandes a été signalée pour des manno-protéines d'autres levures (YAMADA et al., 1983; ELORZA et al., 1985). Les séparations électrophorétiques illustrées par la figure 97 montrent par ailleurs des diagrammes électrophorétiques différents. En effet, le nombre de bandes mis en évidence dans les sous-fractions A1 des parois de *K. lactis* flocculante est plus élevée que celui des sous-fractions A1 des parois de *K. lactis* non flocculante, ceci indiquerait que les sous-fractions A1 de la souche flocculante sont plus complexes.

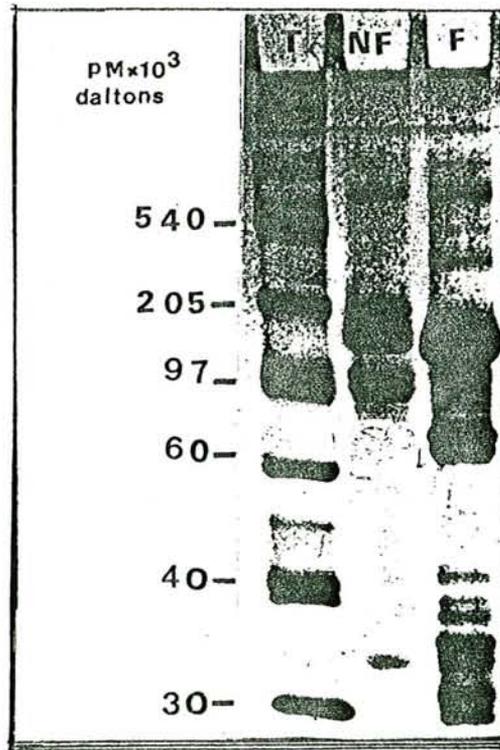


Fig. 97: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des fractions A1 de *K. lactis* flocculante et non flocculante

II.3.3. ETUDE COMPAREE DES SOUS-FRACTIONS A1

II.3.3.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES SOUS-FRACTIONS A1

Pour obtenir leur composition chimique, les sous-fractions A₁ sont soumises à une hydrolyse acide (HCl). Les conditions optimales de libération des constituants ont été déterminées à l'aide de courbes cinétiques (figures 98, 99 et 100).

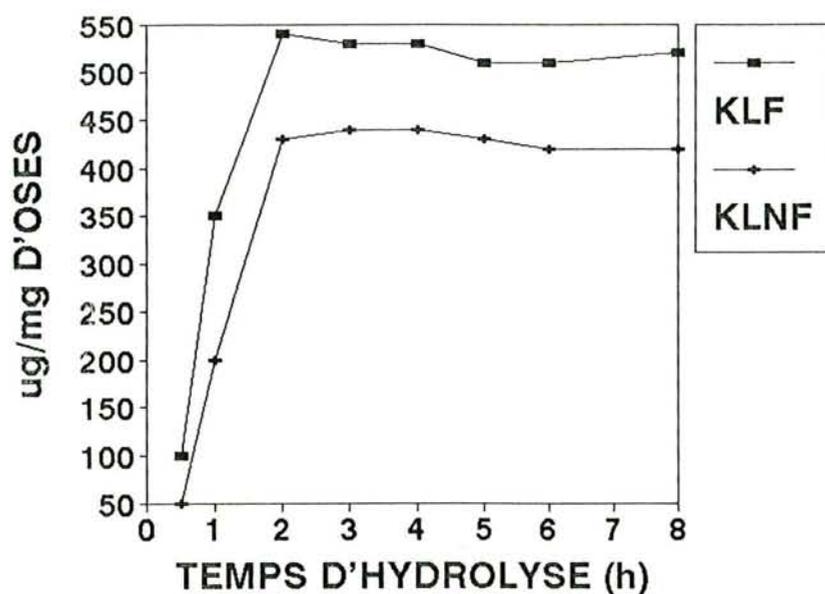


Fig. 98: cinétique de libération des oses par hydrolyse HCl 2N des sous-fractions (A1) des parois de *K. lactis* flocculante (KLF) et non flocculante (KLNf)

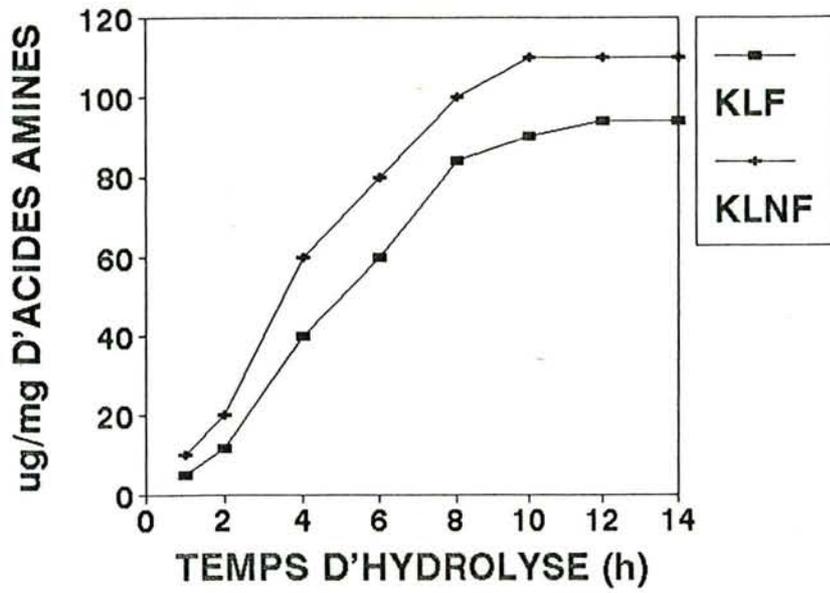


Fig. 99: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse HCl6N des sous-fractions (A1) des parois de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf).

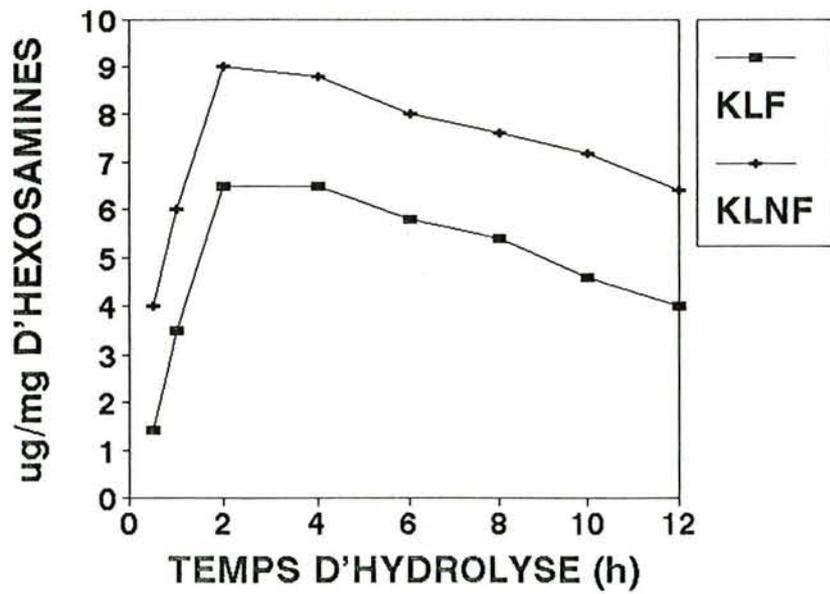


Fig. 100: Cinétique de libération des hexosamines par hydrolyse HCl 6N des sous-fractions (A1) des parois de *K. lactis* floculante et non floculante

Les résultats des analyses chimiques des constituants des sous-fractions (A1) sont rapportés dans le Tableau 33.

TABLEAU 33: Composition chimique globale des sous-fractions (A1) issues des parois de *K. lactis* floculante et non floculante, traitées à l'éthylènediamine

SOUCHES	KLF	KLNF
CONSTITUANTS		
oses totaux	85,71	72,53
Hexosamines	0,63	1,23
Acides aminés totaux (AA)	10,17	15,50
Phosphore (P)	2,07	0,98
Man/Glc	4,20	2,13
Hexoses/AA	8,43	4,68
Hexoses/P	41,40	74,01
AA/P	4,91	15,82

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

L'examen de la composition globale des sous-fractions(A1), montre qu'elle est pratiquement semblable à celle des fractions initiales. En effet, nous observons des variations des principaux constituants entre les sous-fractions de la souche floculante et de la souche non floculante qui vont dans le même sens que celles des fractions initiales.

L'analyse qualitative des hexoses par chromatographie en phase gazeuse, met en évidence comme pour les fractions initiales, la présence de mannose et du glucose dont la teneur est faible par rapport à celle des fractions initiales (figure 100bis).

En effet, on note une augmentation du rapport Man/Glc aussi bien dans les sous-fractions issues des souches floculante que non floculante.

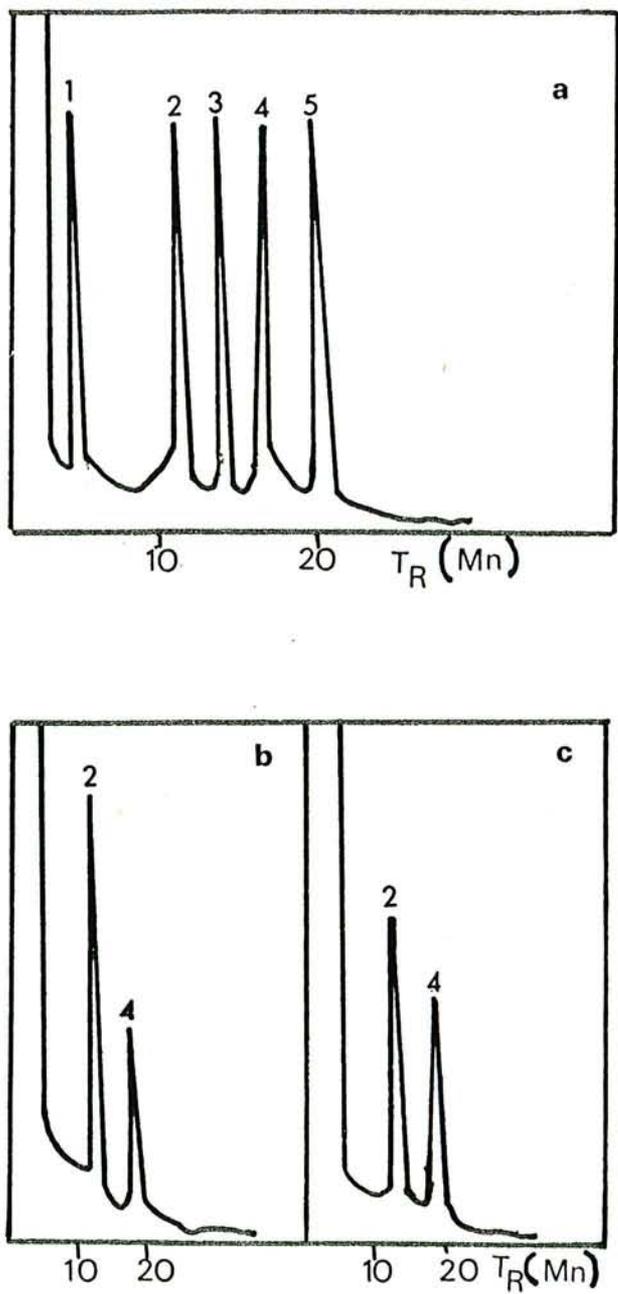


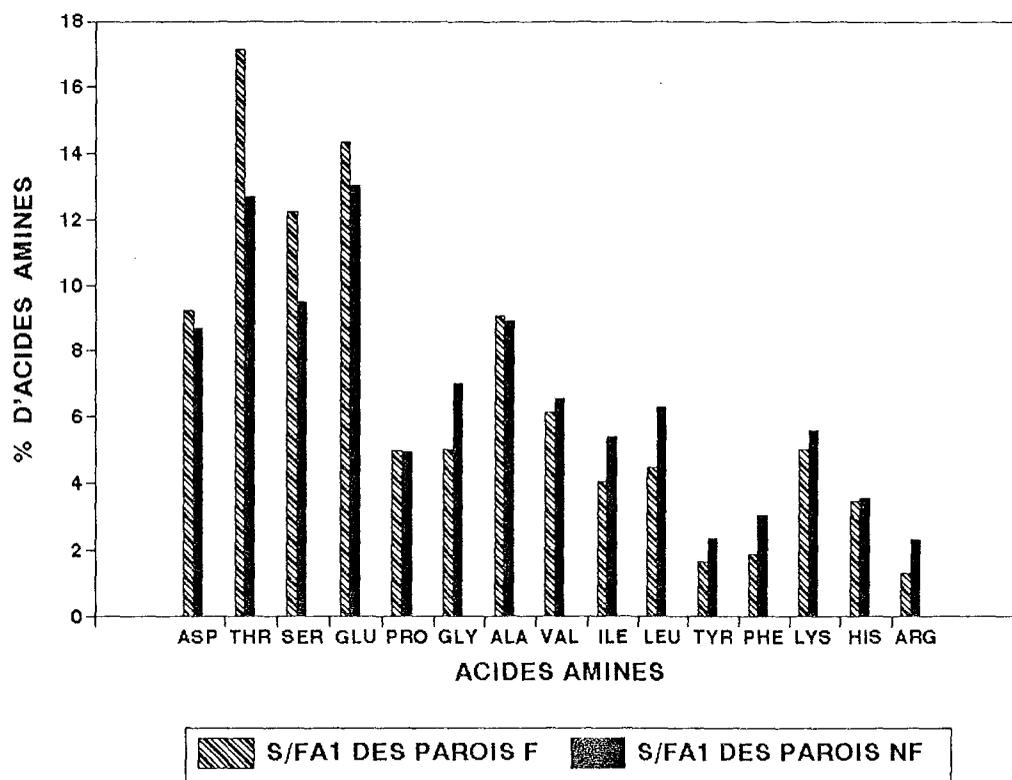
Fig. 100bis: Chromatogramme des acétates d'alditols des témoins (a): (1) fucose, (2) mannose, (3) galactose (4) glucose (5) inositol, et des produits d'hydrolyse des sous-fractions (A1) des parois de *K. lactis* flocculante (b) et non flocculante (c)

Par ailleurs, la composition en acide aminés des sous-fractions (A1) indique la présence de tous les acides aminés identifiés dans les fractions initiales (Tableau 34 et histogrammes 5) dont on remarque la prédominance des acides aspartique et glutamique, de la thréonine et de la sérine. Notons toutefois que les teneurs en tyrosine et l'arginine subissent une forte baisse en particulier dans les sous-fractions (A1) de la souche non floculante.

TABLEAU 34: Composition en acides aminés des sous-fractions (A1) des parois de *K. lactis* floculante et non floculante, traitées à l'éthylènediamine

AA	KLF		KLNF	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
ASP	9,49	9,23	10,42	8,68
Thr	17,61	17,13	15,24	12,69
Ser	12,57	12,22	11,36	9,46
Glu	14,75	14,34	15,69	13,07
Pro	5,12	4,98	5,95	4,95
Gly	5,16	5,01	8,45	7,02
Ala	9,32	9,06	10,71	8,92
Val	6,23	6,10	7,86	6,54
Ile	4,17	4,05	6,47	5,39
Leu	4,62	4,49	7,56	6,29
Tyr	1,70	1,65	2,85	2,37
Phe	1,93	1,87	3,65	3,04
Lys	5,16	5,01	6,74	5,61
His	3,59	3,49	4,29	3,57
Arg	1,33	1,29	2,78	2,31
Total	102,8	99,83	120,02	99,91

(Résultats exprimés en % de matière sèche



HISTOGRAMME 5: Variation de la teneur en acides aminés des sous-fractions A1 des parois de *K. lactis*, traitées à l'éthylènediamine

II.3.3.2 ACÉTOLYSE DES SOUS-FRACTIONS (A1)

Les sous-fractions (A1) purifiées par filtration sur Ultrogel sont soumises à une acétolyse selon la méthode de KOCOUREK et BALLOU (1969). Ce traitement permet la libération d'oligosaccharides de faibles poids moléculaires.

Les acétolysats obtenus sont séparés par filtration sur Biogel P2. Sur une partie aliquote des éluats nous avons effectué le dosage des oses et des protéines.

La figure 101 (a et b) illustrent les spectres d'acétolyse des sous-fractions (A1) obtenues. Elle montrent que les spectres d'acétolyse des sous-fractions (A1) des souches floculante et non floculante présentent une similitude. En effet, dans les deux cas nous obtenons six pics dont un est exclu.

Le dosage des protéines contenues dans les acétolysats, effectué par UV à 280nm, fait apparaître un profil constitué de cinq pics essentiels ne correspondant pas aux cinq pics mis en évidence par le dosage des oses totaux.

Les masses moléculaires des différents composés séparés sont estimées à l'aide d'une courbe étalon (figures 102 et 103).

Par une évaluation de la surface des pics obtenus par filtration sur Biogel P2 des produits d'acétolyse, nous avons déterminé, par rapport au mannose, le taux des différents oligosaccharides séparés (Tableaux 35 et 36).

TABLEAU 35: Composition chimique des sous-fractions issues de l'acétolyse des fractions (A1) de *K. lactis* floculante

CONSTITUANTS	MM	RM	OSSES	ACIDES AMINES	P	GlcN
FRACTIONS						
I	181	1	++	-	-	-
II	348	1,1	+++	-	-	-
III	529	1,5	++++	-	-	-
IV	682	1,4	++++	-	+	-
V	730	0,4	+	T	T	+

MM: masse moléculaire

p : phosphore

RM: rapports estimés en considérant le nombre de moles de mannose

GlcN: glucosamine

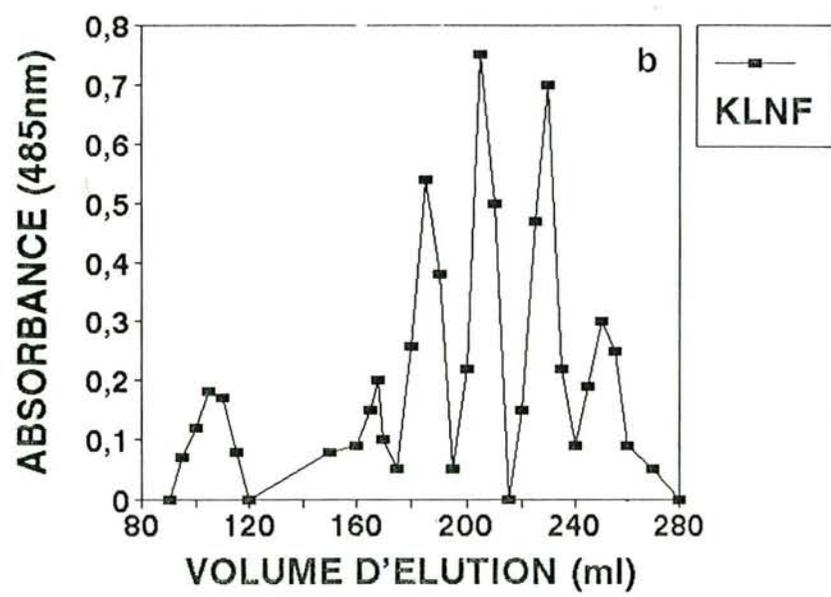
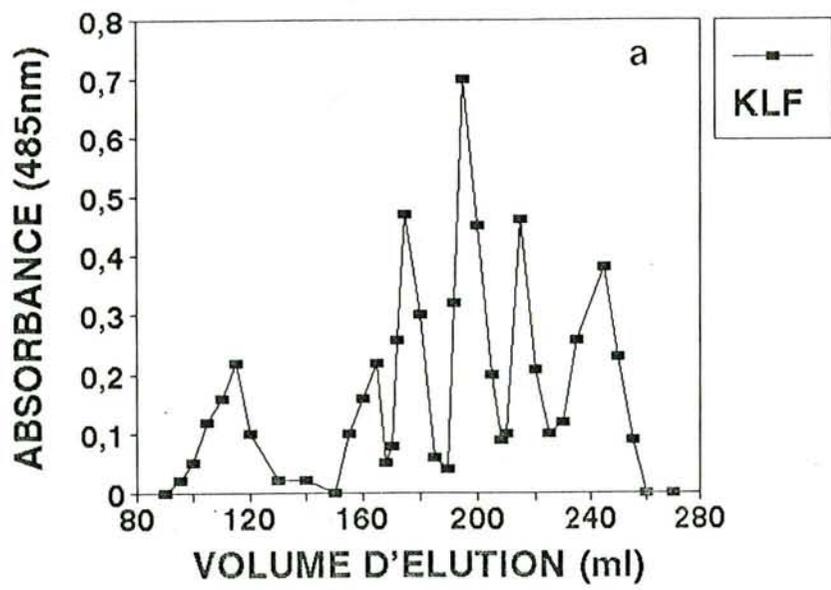


Fig. 101(a et b): Profil d'élution sur biogel P2 des produits d'acétolyse des sous-fractions (A1) pariétales de *K. lactis* flocculante(KLF) et non flocculante(KLNf)

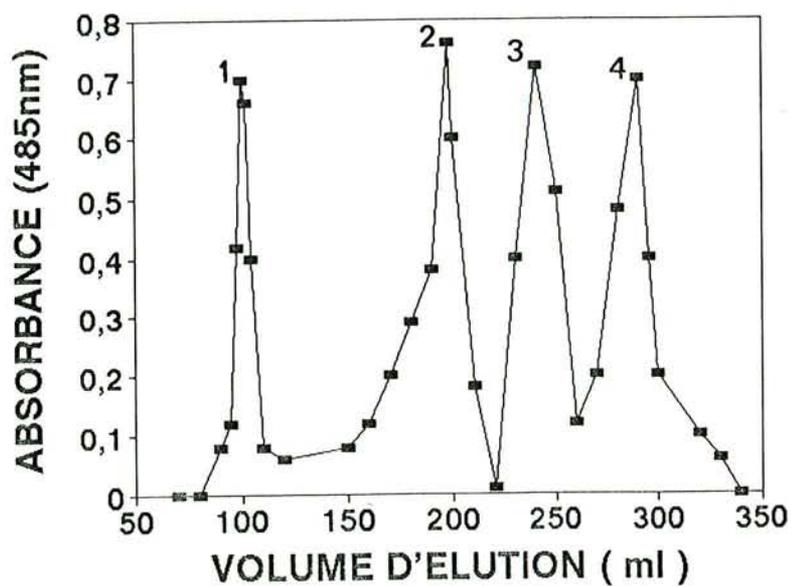


Fig. 102: Profil d'éluion des étalons sur Biogel P2
 (1) Dextran (9.300 daltons), (2) Raffinose (540 daltons), (3) Saccharose (342 daltons), (4) Mannose (180 daltons)

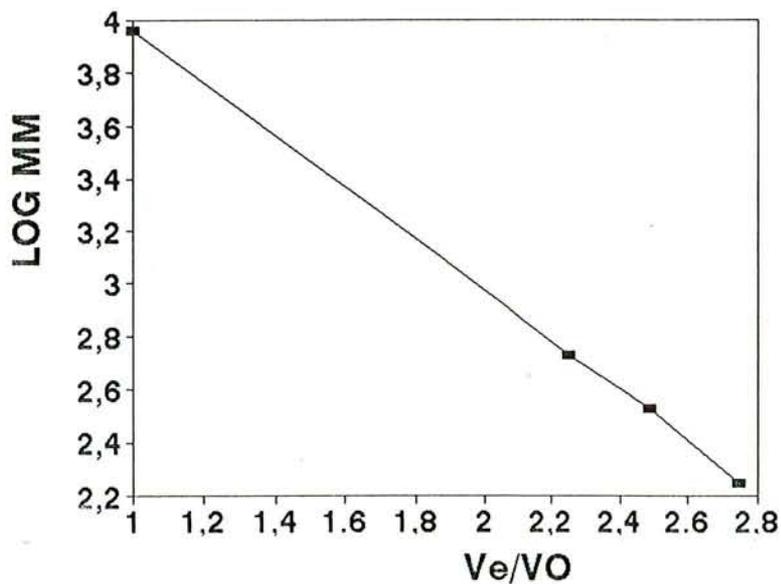


Fig. 103 : Droite d'étalonnage de la colonne de Biogel P2

TABLEAU 36: Composition chimique des sous-fractions issues de l'acétolyse des fractions (A1) de *K. lactis* non floculante

CONSTITUANTS	MM	RM	OSSES	ACIDES AMINES	P	GlcN
FRACTIONS						
I	178	1	++	-	-	-
II	334	1,9	+++	-	-	-
III	520	1,2	++++	-	-	-
IV	670	1,05	++++	-		-
V	730	0,3	+	T	T	+

(MM) : Masse moléculaire

(RM) : Rapports estimés en considérant le nombre de moles de mannose

(T) : Traces

(-) : Non détecté par l'analyse chimique

D'après les résultats, il ressort que les sous-fractions I, II et III correspondent respectivement aux pics des mono, di et trisaccharides. La sous-fraction IV est constituée d'un manotétraose (phosphate). En effet la présence de phosphore a été mise en évidence bien que sa concentration soit faible. D'après sa masse moléculaire, la sous-fraction V correspondrait à un pentasaccharide, en fait il s'agit d'un trisaccharide lié à une molécule de N-acétyl-glucosamine (Man3 GlcNac); cette dernière est révélée par le dosage chimique. D'autre part, l'analyse chimique de cette fraction (V) fait apparaître la présence, à l'état de trace, d'acides aminés qui peuvent provenir très probablement d'une contamination.

Si l'on compare la composition des différentes fractions séparées après acétolyse, en relation avec le caractère floculant, il apparaît une différence de structure entre les glycoprotéines des parois de la souche floculante et celles de la souche non floculante. En effet les sous-fractions (A1) issues des parois de la souche floculante sont plus riches en

tétrasaccharides que celle de la souche non floculante qui, en revanche, contiennent plus de disaccharides; ceci permet d'admettre que la glycoprotéine de la souche floculante est plus ramifiée.

Afin de vérifier les résultats obtenus par filtration sur Biogel P2, les différentes fractions ont été soumises à une chromatographie sur couche mince et identifiées par rapport à des témoins. Les rapports frontaux des différents constituants confirment les résultats obtenus par identification à partir des masses moléculaires (Tableau 37).

TABLEAU 37: Rapports frontaux (RF) des oligosaccharides temoins et des sous-fractions issues de l'acétolyse des fractions (A1) des parois de *K. lactis* floculante et non floculante

TEMOINS		KLF		KLNf	
COMPOSES	RF	FRACTIONS	RF	FRACTIONS	RF
Mannose	0,73	I	0,70	I	0,71
Mannobiose	0,56	II	0,55	II	0,57
Mannotriose	0,45	III	0,43	III	0,44
Mannotétraose	0,36	IV	0,34	IV	0,35
Mannopentose	0,20	V	0,42	V	0,40
Dextrane MM>MM pentose	0,08	VI	0,1	VI	0,09

CCM : butanol /éthanol/eau :5/3/2 (v/v)

II.3.3.3. REACTION DE B-ELIMINATION ET ANALYSE DES PRODUITS OBTENUS

L'étude de la structure des mannoprotéine pariétales nécessitent la détermination de la composition des parties glucidiques, protéiques et leur point d'attache.

La mise en évidence des liaisons O-glycosidiques et principalement basée sur la réaction de B-élimination a été établi par MONTREUIL et al., (1967).

KORN et NORTHCOTE (1969) ont extrait des parois de levures de boulangerie, traitées par l'éthylènediamine, des glycopeptides contenant du mannose et la réaction de B-élimination, à laquelle ils les ont soumis, leur a permis de montrer la présence de liaisons osidiques entre mannose, sérine et thréonine.

Nous avons soumis les sous-fractions (A1) à la réaction de B-élimination et analysé les produits issus. En principe la comparaison des teneurs en sérine, thréonine et alanine avant et après la réaction de B-élimination permettra de déterminer la nature de l'acide aminé impliqué.

Préalablement, nous avons déterminé le temps optimal de la réaction de B-élimination. La figure 104 illustre la courbe de cinétique de la réaction dont l'optimal est de 30 heures.

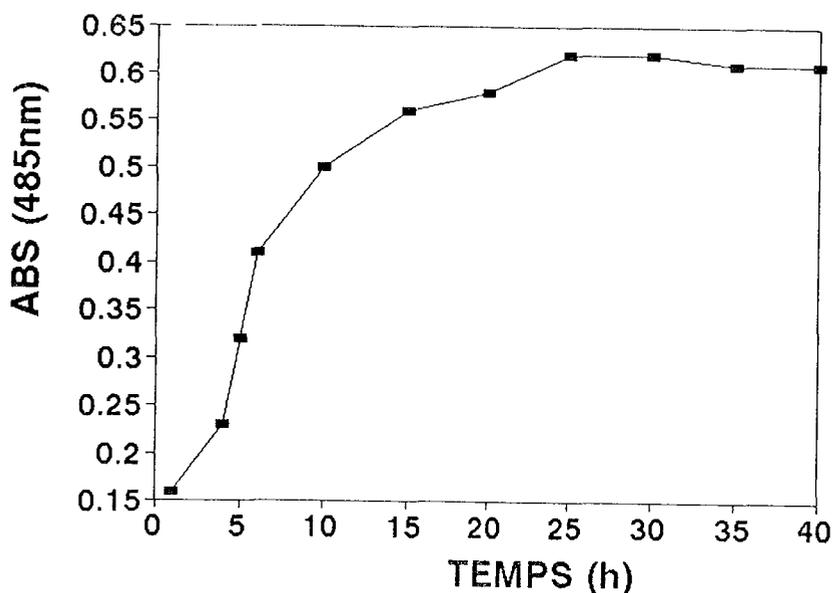


Fig. 104: Cinétique de la réaction de B-élimination

Les composés libérés par B-élimination sont séparés sélectivement par filtration sur colonne de Biogel P2, ils sont ensuite caractérisés par le réactif au phénol sulférique.

La figure 105 illustre le profil d'éluion des produits de la réaction de B-élimination. Nous observons trois fractions dont l'une est exclue. D'après leurs masses moléculaires les fractions incluses F2 et F3 correspondraient au mannobiose et mannose. Elles représentent respectivement, environ 15 et 5 % . Nous remarquons, par ailleurs, que les teneurs de ces fractions sont légèrement plus élevées lorsque la souche est floculante. La fraction exclue (F1) est quantitativement la plus importante (80% environ).

Les différentes fractions sont récupérées, lyophilisées et analysées.

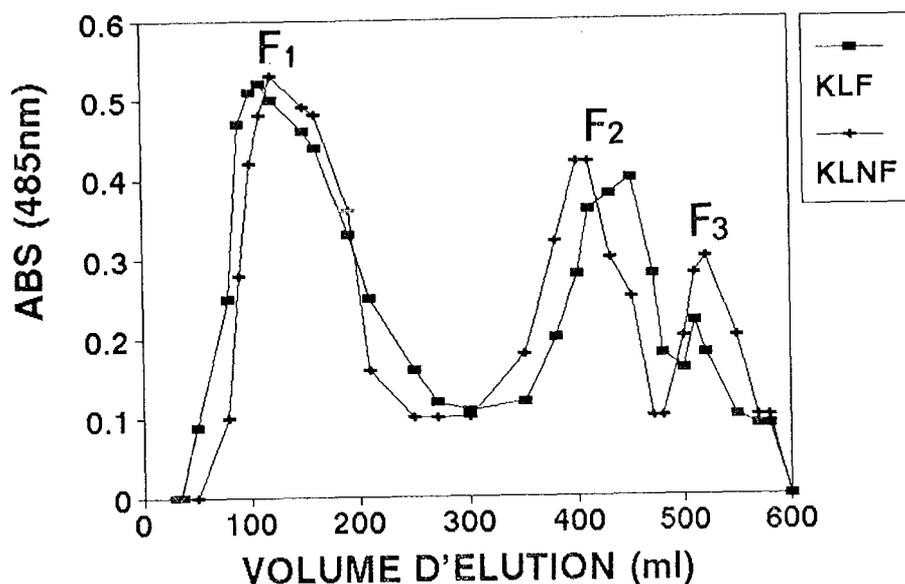


Fig. 105: Profil d'éluion sur Biogel P2 des produits obtenus par B-élimination des fractions(A1) de *K. lactis* floculante (KLF) *K. lactis* non et non floculante (KLNF)

II.3.3.3.1. ANALYSE DES FRACTIONS F1

La composition chimique globale des fractions F1 obtenues par B-élimination et filtration sur Biogel P2 est rapportée dans le tableau 38.

TABLEAU 38:Composition chimique globale des fractions F1 exclues du Biogel P2 obtenues par réaction de B-élimination

SOUCHES	KLF	KLNf
CONSTITUANTS		
Hexoses totaux	77,55	70,6
Hexosamines	0,92	1,19
acides aminés totaux (AA)	9,45	12,70
Phosphore	1,58	0,83
Hexoses/AA	8,21	5,56
Hexoses/p	49,08	85,06
AA/P	5,98	15,03

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Il ressort de ce tableau, d'une manière générale, que la fraction F1 est de nature glycoprotéique comme la sous-fraction A1 initiale.

L'analyse qualitative des acides aminés de la fraction F1 met en évidence un profil similaire à celui de la sous-fraction A1, à l'exception de la sérine dont on note une baisse importante, après B-élimination, de l'ordre de 61% et 66% respectivement pour les fractions issues des parois de *K. lactis* floculante et non floculante. Ce résultat indique que la sérine participe à la liaison O-glycosidique.

De même, la réaction de B-élimination entraîne une baisse relativement faible de la thréonine (10,68% et 11,74%) et de la tyrosine (5,88 et 5,48%) (tableau 39) et ceci indique qu'il

n'est pas exclu qu'un faible pourcentage de thréonine soit impliqué dans la liaison O-glycosidique. Cependant, la réaction de B-élimination appliquée aux PPM d'autres levures telles que *S. cerevisiae*, *K. apiculata*, entraîne une perte en différents acides aminés entre autres l'acide glutamique, la glycine, l'alanine, la leucine, l'isoleucine.... (CHARPENTIER, 1979).

L'analyse des oses, de la fraction F1, après hydrolyse, sous forme d'acétates d'alditols, par chromatographie en phase gazeuse, ne révèle que la présence de mannose (figure 106a et b).

D'après YAMADA et al., (1983) qui ont étudié les produits de B-élimination des mannoprotéines de *Mucor rouxii*, ces mannoprotéines sont constituées de chaînes d'oligosaccharides liées à la protéine "core" par l'intermédiaire de résidus asparagine par liaison O-glycosidique labile.

II.3.4.3.2 ACTION DE LA PRONASE SUR LA FRACTION F1

L'analyse de la fraction F1, après rupture des liaisons O-glycosidiques, montre encore la présence de N-acétyl glucosamine et de mannose qui peuvent être engagés dans des liaisons N-glycosidiques.

La fraction F1 a été soumise à un traitement par la pronase qui permet de rompre les liaisons peptidiques de la chaîne protéique à l'exclusion de la liaison acide aspartique-N-acétyl-glucosamine. Ce traitement conduit à l'obtention de glycoaminoacides dont on détermine ensuite la composition.

Après digestion enzymatique, l'enzyme est précipitée par l'acide trichloracétique (TCA) et éliminée. Après passage sur résines échangeuses d'ions DOWEX 50wx 8 et Duolite A102D, les solutions sont concentrées et filtrées sur Biogel P2. On obtient une fraction F'1 exclue (Figure 107).

La composition chimique des fractions F'1 se distingue de celle des fractions F1 par une augmentation de la teneur en mannose en particulier dans la fraction issue des parois de la souche flocculante.

TABLEAU 39: Pourcentage de perte de différents acides aminés au cours de la réaction B-élimination sur les fractions F1 de *K.lactis* floculante et non floculante

AA	KLF			KLF		
	% Avant B-élimination	% Après B-élimination	% Pertes	% Avant B-élimination	% Après B-élimination	% Pertes
Asp	9,23	9,29	0,0	8,68	8,8	0,0
Thr	17,13	15,3	10,68	12,69	11,20	11,74
Ser	12,22	4,70	61,53	9,46	3,18	66,38
Glu	14,34	14,56	0,0	13,07	13,20	0,0
Pro	4,98	5,20	0,0	4,95	5,70	0,0
Gly	5,01	5,30	0,0	7,02	7,32	0,0
Ala	9,06	10,51	0,0	8,92	9,10	0,0
Val	6,10	6,80	0,00	6,54	6,82	0,0
Ile	4,05	4,25	0,0	5,39	5,70	0,0
Leu	4,49	5,18	0,0	6,29	6,85	0,0
Tyr	1,65	1,60	5,88	2,37	2,24	5,48
Phe	1,87	1,98	0,0	3,04	3,10	0,0
Lys	5,010	5,17	0,0	5,61	5,70	0,0
His	3,49	3,53	0,0	3,57	3,66	0,0
Arg	1,29	1,36	0,0	2,31	2,42	0,0
TOTAL	99,83	94,97	78,09	99,91	94,99	83,60

Résultats exprimés en % de matière sèche

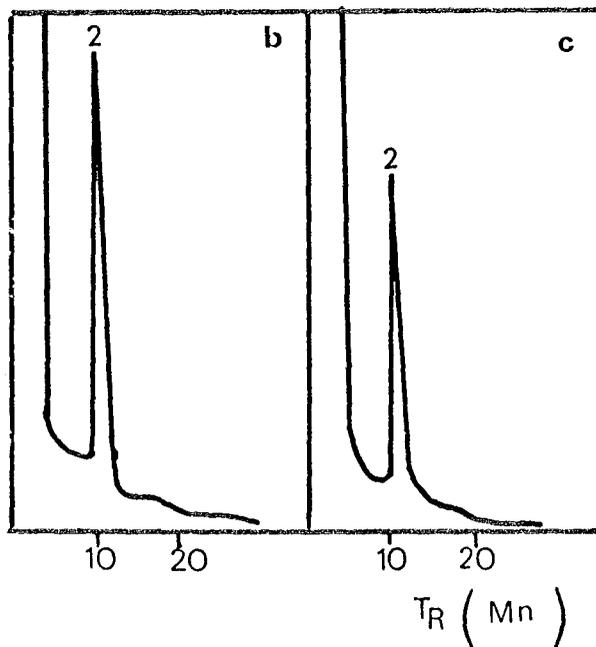
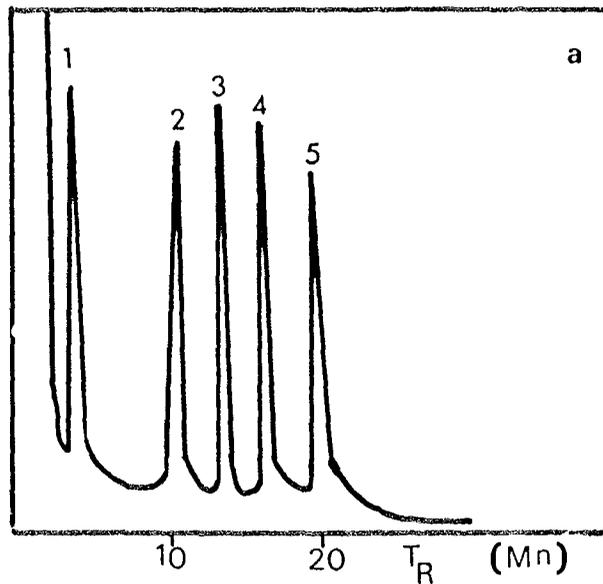


Fig. 106: Chromatogramme des acétates d'alditols des produits témoins (a) (1) fucose, (2) mannose, (3) galactose, (4) glucose, (5) inositol; et des produits d'hydrolyse de la fraction F1 de *K. lactis* floculante (b) et non floculante (c), obtenues après B-élimination

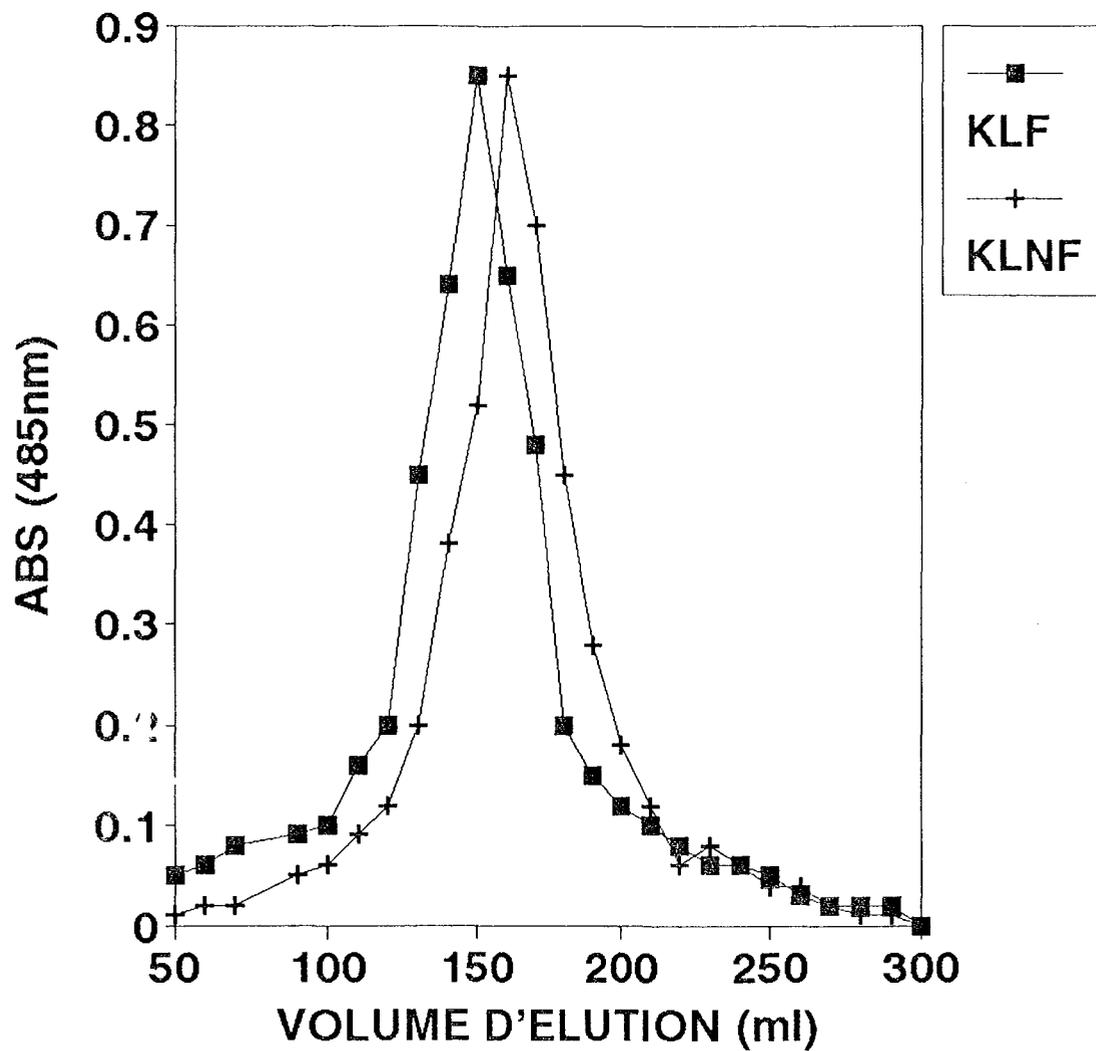


Fig. 107: Profil d'élution sur Biogel P2 des produits obtenus par action de la pronase sur les fractions F1 des parois de *K. lactis* flocculante (KLF) et non flocculante (KLNF)

L'analyse des acides aminés par auto-analyseur met en évidence la présence prépondérante de l'acide aspartique et de la glucosamine dans un rapport (Asp/GlcN) de 4.19 et 2.77 respectivement pour les fractions issues des parois de levures floculante et non floculante (Tableau 40).

TABLEAU 40: Teneur en acide aspartique, glucosamine mannose et phosphore des fractions (F'1) de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNF)

FRACTIONS	F'1 de KLF	F'1 de KLNF
CONSTITUANTS		
Oses (Mannose)	75.23	72.35
ASP	21.50	25.24
GlcN	5.12	9.10
Phosphore	0.90	0.35
ASP/GlcN	4.19	2.77
Man/GLCN	16.64	9.04

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

ASP: acide aspartique

GlcN: glucosamine

Man : Mannose

Cette analyse indique par ailleurs la présence en faible teneur de sérine, thréonine et acide glutamique qui proviendrait d'une hydrolyse partielle de la pronase.

L'analyse des oses, sous forme d'acétates d'alditols, par chromatographie en phase gazeuse indique la présence exclusive du mannose (figure 108).

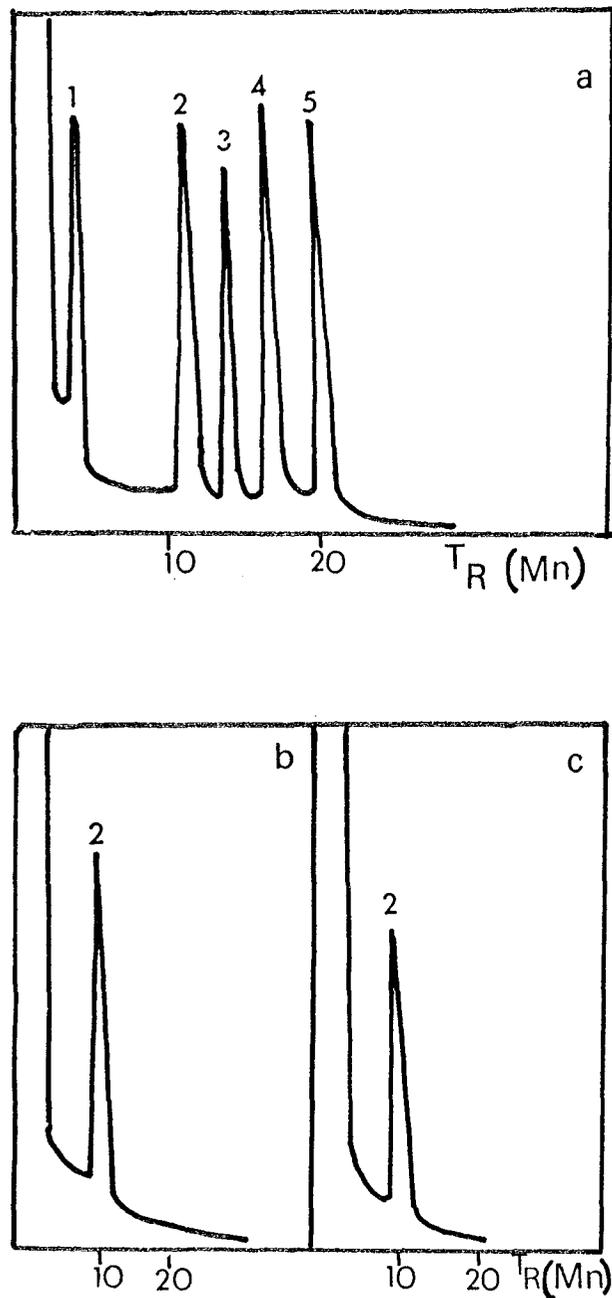


Fig. 108: Chromatogramme des acétates d'alditols des
 témoins (a) : (1) fucose, (2) mannose, (3)
 galactose, (4) glucose, (5) inositol;
 et des produits d'hydrolyse des
 fractions (F'1) des parois de *K. lactis*
 floculante (b) et non floculante (c)

II.4. DISCUSSION

Le traitement à l'éthylènediamine des parois de *K. lactis* floculante et non floculante nous a permis de recueillir trois fractions (A,B,C).

L'analyse chimique globale de ces trois fractions a montré que seule la fraction (A), de nature glycoprotéique, présente une corrélation avec la floculation.

En effet, dans les fractions (A) des parois des levures floculantes, il y a une augmentation notable de la teneur en oses neutres par rapport à celle obtenue dans la fraction (A) des parois de levures non floculantes.

Par contre, le taux des oses neutres dans les fractions (C) des deux types de parois sont voisins; cette observation confirme les résultats obtenus dans l'analyse globale des parois: augmentation du taux des oses neutres dans les parois des levures floculantes ceci serait, en toute évidence, en relation avec une synthèse accrue de polymères à base de mannose dans les parois de levures floculantes (AMRI et al., 1982)

L'analyse chimique globale des trois fractions montre, par ailleurs, que la fraction (A) est plus riche en phosphore que les autres fractions. Cette même analyse met en évidence que la teneur en phosphore de la fraction (A) des parois de *K. lactis* floculante est plus élevée que celle de la fraction (A) des parois de *K. lactis* non floculante. Ceci indique que les parois de *K. lactis* floculante ont des teneurs plus élevées en mannanes qui sont davantage phosphorylés.

L'estimation de la chitine, polymère à base de N- acétyl glucosamine dans les fractions (C) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la teneur des parois de *K. lactis* floculante et celle des parois de *K. lactis* non floculante; en revanche, dans les fractions (A) des parois des levures floculantes le taux en hexosamine est nettement inférieur à celui des fractions (A) des parois de levures non floculantes. Ce résultat laisse clairement apparaître que la baisse de la teneur en hexosamine dans les parois de levures floculantes est due à la quantité d'hexosamines impliquées dans la structure du complexe peptidomannane responsable du phénomène de floculation.

L'analyse détaillée de la fraction (A) de *K. lactis* floculante et de *K. lactis* non floculante après purification, a permis d'identifier une glycoprotéine, constituant majeur, dont les masses moléculaires sont estimées à 340.10^3 et 310.10^3 daltons respectivement pour la glycoprotéine des parois de KLF et celle de KLNf. D'une manière générale, les variations des

principaux constituants de ces glycoprotéines vont dans le même sens que celles des fractions (A) brutes et celles des parois entières.

L'étude des différentes fractions séparées après acétolyse fait apparaître une différence de structure en relation avec le caractère floculant; en effet les glycoprotéines issues des parois de la souche floculante sont plus riches en tri et tétrasaccharides par rapport à celles issues des parois de la souche non floculante qui, en revanche, sont plus riches en disaccharides; ceci implique que la glycoprotéine de la souche floculante est, à priori, plus ramifiée.

Les glycoprotéines purifiées, isolées des parois de *K. lactis* floculante et non floculante ont été soumises à la réaction de β -élimination qui met en évidence la présence de liaisons osidiques entre le mannose et la sérine. Ce résultat confirme ceux de plusieurs auteurs entre autres NAKAJIMA et BALLOU (1974), COLONNA et LAMPEN (1974), LELEU (1977), YAMADA et al., (1983).

Parmi les oligosides obtenus par β -élimination, le mannobiose est le plus important et constitue vraisemblablement les nombreuses petites chaînes du mannane de *K. lactis*. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par divers auteurs pour le peptidomannane de *S. cerevisiae*.

La présence d'un polysaccharide contenant de 1 glucosamine, résistant à la réaction de β -élimination indique que ces composés sont liés aux protéines par liaison N-glycosidique; cette observation confirme celle de YAMADA et al., (1983) qui ont soumis une mannoprotéine de *Mucor rouxii* à la réaction de β -élimination, selon ces auteurs, la biosynthèse de mannoprotéines chez *M. rouxii*, serait contrôlée par des (1 \rightarrow 2) ou (1 \rightarrow 6) α -D-mannosyltransférases. De leur côté; NAKAJIMA et BALLOU (1974) ont montré pour les peptidomannanes de *S. cerevisiae* soumis à la β -élimination et l'acétolyse, l'intervention des mêmes mannosyltransférases au cours de la synthèse des oligosides liés à la sérine et à la thréonine et au cours de celle du mannane proprement dit.

L'action de la pronase, sur les peptidomannanes issus de la réaction de β -élimination a mis en évidence la liaison entre N-acétyl-glucosamine et l'acide aspartique ce résultat concorde avec celui de NAKAJIMA et BALLOU (1974) qui ont apporté la preuve de l'existence de telles liaisons dans le peptidomannane de *S. cerevisiae*, obtenu par β . élimination et soumis à un chauffage en présence de soude et de borhydrure de sodium. Ces auteurs ont par ailleurs précisé la structure de la région de fixation entre le polysaccharide et la protéine par dégradation

enzymatique du peptidomannane de *S. cerevisiae*. Sous l'action d'une endo α (1 \rightarrow 6)-mannase et d'une endo- β -N-acétyl-glucosamidase, ce peptidomannane libère un fragment constitué d'unités mannose et d'une seule mole de glucosamine située à l'extrémité non réductrice.

Enfin CHARPENTIER (1979) a indiqué un rapport acide aspartique/glucosamine égal à 1 pour le peptidomannane de *S. cerevisiae*. Ce rapport varie avec l'espèce de levure puisque LELEU (1977) obtient pour les mannanes de *C. tropicalis* un rapport égal à 0.5. Dans le cas des levures *K. lactis* ce rapport varie de 2 à 4 selon le degré de floculation de la souche. Lorsque la levure est floculante ce rapport est 2 fois plus élevé. Ceci confirme les résultats précédents indiquant la richesse des parois de levures non floculantes en glucosamine. De plus, il est admis actuellement que 2 molécules de GlcNaC interviennent dans les liaisons N-osidiques.

III. ETUDE DES PHOSHOPEPTIDOMANNES (PPM) OBTENUS PAR ACTION DE LA CYTOHELICASE SUR LES PAROIS DE *K. lactis* FLOCULANTE ET NON FLOCULANTE

III.1. ISOLEMENT DES PPM

L'isolement des constituants pariétaux peut-être effectué par diverses méthodes à partir de parois isolées ou de cellules entières.

EDDY (1958) a soumis les parois de *S. cerevisiae* à l'action de la papaine et a précipité à partir du digestat additionné de liqueur de Fehling une mannoprotéine

CAWLEY et al., (1972) ont utilisé la pronase qui libère à partir des parois de *S. cerevisiae* un PPM qui est isolé par chromatographie sur DEAE-cellulose ou précipitation au borate de cétavelon.

BAUER et al. (1972) ont isolé un mannane des parois de levures de boulangerie par action de la β -glucanase. Les β -glucanases sont particulièrement utilisées pour la production de protoplastes (BACON, 1973; BISEAU et al., 1973). Ces enzymes ont été utilisées également pour l'extraction de peptidomannanes des parois de levures (EDDY et LONGTON, 1969; SHIBATA et al., 1974; PASTOR et al., 1984). L'emploi des glucanases présente l'avantage de permettre l'obtention de molécules de masse moléculaire élevée tout en évitant leur dénaturation.

Afin de comparer avec les PPM obtenus par voie chimique, nous avons fractionné les parois de levures *K. lactis* floculante et non floculante, par un traitement à la cytohélicase. Cette préparation enzymatique est composée en grande partie par des β -(1 \rightarrow 3) glucanases et peuvent contenir d'autres enzymes contaminantes telles que les protéases, estérases et mannaes, selon leur degré de purification.

III.2. ETUDE DES PPM ISOLES DES PAROIS DE *K. lactis* PAR LA CYTOHELICASE

III.2.1. RENDEMENTS PONDÉRAUX

Le fractionnement des parois de *K. lactis* floculante et non floculante par la cytohélicase a été effectué selon le protocole décrit dans "Matériel et Méthodes".

L'action de la cytohélicase sur les parois permet de recueillir après centrifugation deux fractions: l'une soluble dans l'eau (A) et l'autre insoluble (R).

Les rendements pondéraux représentent 95,9% et 96,1% pour la fraction (A) et 3,2% et 2,8% pour la fraction (R), respectivement pour les parois de *K. lactis* floculante et non floculante.

La fraction (R) représente un faible pourcentage et résulterait d'une action incomplète de la cytohélicase.

III.2.2. PURIFICATION DES FRACTIONS OBTENUES PAR ACTION DE LA CYTOHELICASE SUR LES PAROIS

La fraction (A) a été d'abord filtrée sur colonne de gel Trisacryl GF 2000. Nous obtenons un produit élué en une seule fraction (figure 109).

Les produits obtenus ont été ensuite filtrés sur Ultrogel ACA 22. Les produits de filtration sont d'abord caractérisés par un dosage des oses. Le profil d'élution fait apparaître, pour les deux souches, deux pics inclus (figure 110).

Le profil d'élution caractérisé par le dosage des protéines est semblable à celui des oses; nous observons en effet deux pics inclus pour les fractions issues, aussi bien, des parois de la souche floculante que de la souche non floculante. Cependant, le dosage du phosphore dans les fractions séparées montre un seul pic correspondant au pic 1 révélé par le dosage des oses (figure 112).

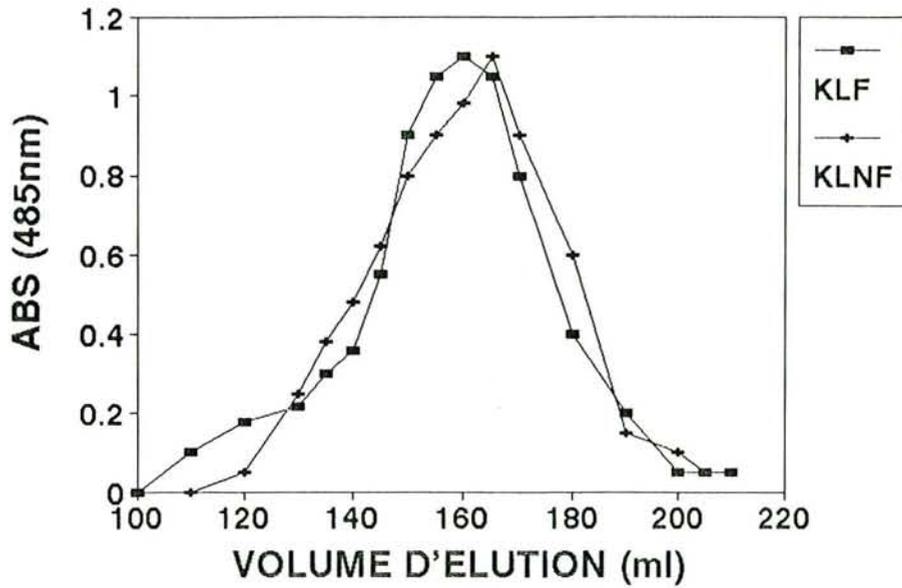


Fig. 109: Profil d'élution sur gel Trisacyl GF 2000 des PPM des parois de *K. lactis* flocculante (KLF) non flocculante (KLNf), après action de la et cytohélicase

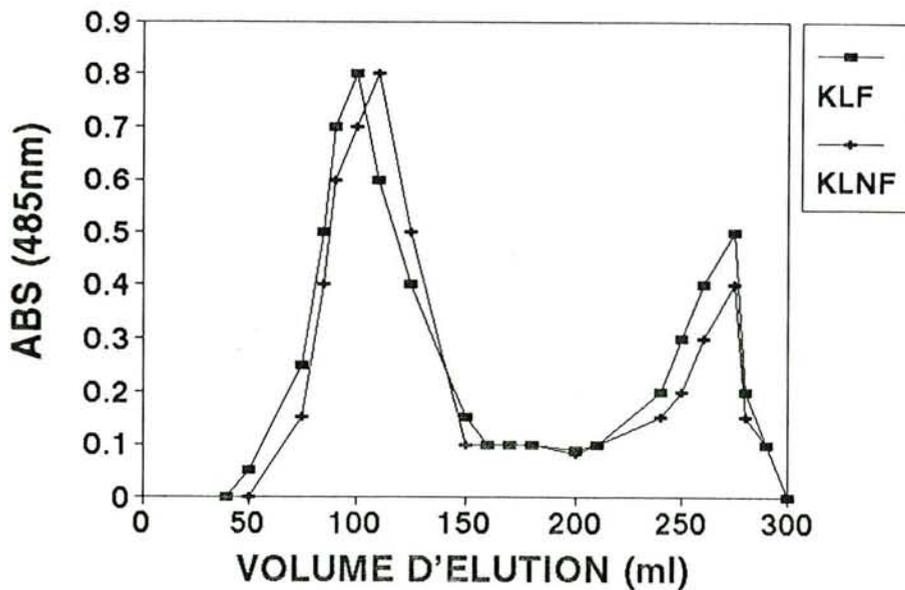


Fig. 110: Profil d'élution sur Ultrogel ACA 22 des PPM des parois de *K. lactis* flocculante (KLF) et non flocculante (KLNf) obtenus après action de la cytohélicase (Dosage des oses)

Nous avons, par ailleurs, caractérisé les éluats par un dosage des protéines à 280 nm, et du phosphore. Les profils obtenus sont illustrés par les figures 111 et 112.

Pour localiser les pics correspondant à l'enzyme utilisée (cytohélicase), nous avons vérifié son profil par filtration d'une solution de l'enzyme et de la paroi non hydrolysée. L'enzyme est alors éluée par un volume correspondant à celui du pic 2.

A l'aide de la courbe étalon (figure 96), nous avons estimé les masses moléculaires des fractions (A) à 350.10^3 daltons et 320.10^3 daltons respectivement pour les fractions issues des parois de la souche floculante et non floculante.

Afin de vérifier l'homogénéité des fractions (A), nous avons d'abord réalisé une chromatographie sur papier qui révèle une seule bande. Cependant, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS fait apparaître plusieurs bandes (figure 113) qui proviendraient des sous-unités

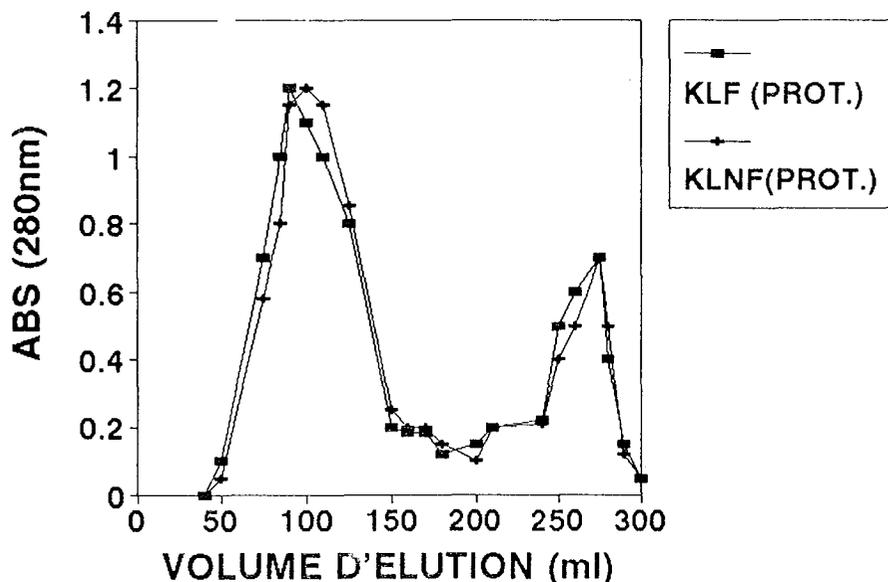


Fig. 111: Profil d'élution sur Ultrogel ACA 22 des PPM des parois de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf) obtenus après action de la cytohélicase (Dosage des protéines)

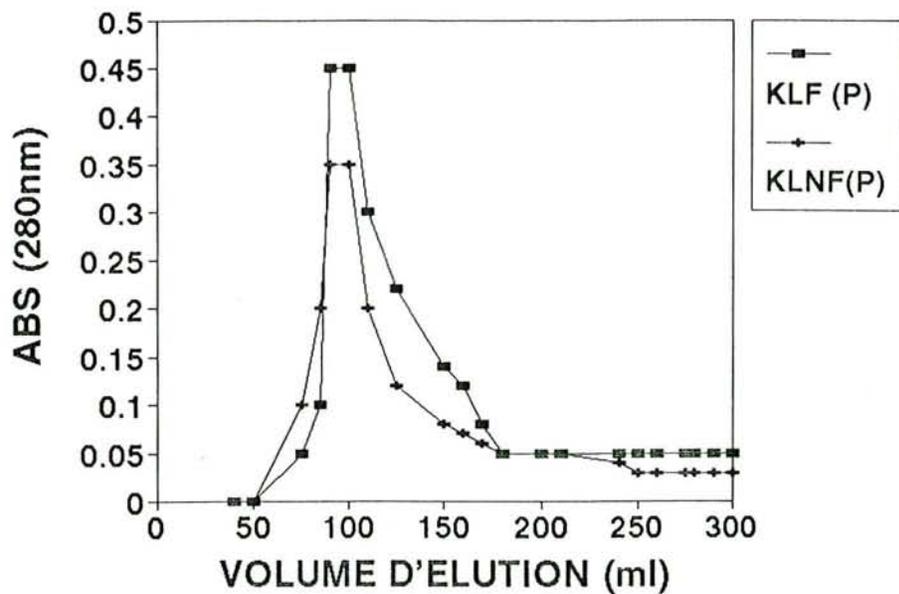


Fig. 112: Profil d'élution sur Ultrogel ACA22 des PPM des parois de *K. lactis* flocculante (KLF) et non flocculante (KLNf) obtenus après action de la cytohélécasse (dosage du phosphore)

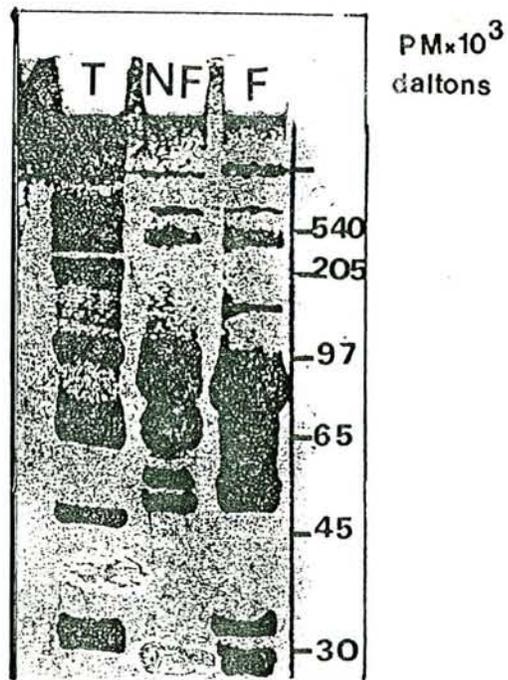


Fig. 113: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des fractions A obtenues après action de la cytohélécasse sur les parois de *K. lactis* flocculantes (F) et non cflocculante (NF)e

constituant les glycoprotéines isolées. Le profil électrophorétique montre une légère différence entre les fractions de *K. lactis* floculante et non floculante. Il met en évidence la présence de bandes de faibles masses moléculaires plus nombreuses dans les fractions de la souche floculante, ceci confirmerait les hypothèses selon lesquelles les glycoprotéines des parois de *K. lactis* floculante seraient plus ramifiées.

Les fractions (A) ont été ensuite concentrées, lyophilisées et analysées.

II.2.3. ANALYSE DES FRACTIONS (A) OBTENUES PAR ACTION DE LA CYTOHÉLICASE SUR LES PAROIS DE *K. lactis* FLOCULANTE ET NON FLOCULANTE

III.2.3.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE

Les extraits ont été d'abord soumis à l'hydrolyse HCl pour déterminer les conditions optimales de libération des différents constituants.

Les figures 114, 115 et 116 illustrent les cinétiques de libération des oses, des hexosamines et des acides aminés.

La composition chimique globale des fractions est indiquée dans le tableau 41.

Il ressort de cette analyse que l'action de la cytohélicase aboutit à l'isolement de fractions de nature phosphopeptidomannane, caractérisées par la teneur élevée en oses. Les teneurs en différents constituants varient pour les deux souches dans le même sens que les parois. En effet, les acides aminés sont en quantité plus élevée dans la fraction des parois de la levure non floculante; inversement, les oses, le phosphore et le calcium sont plus abondants dans la fraction des parois de la levure floculante. Cependant, la comparaison des compositions en acides aminés des deux fractions montre que ces différences sont moins marquées (Tableau 42 et histogramme 6).

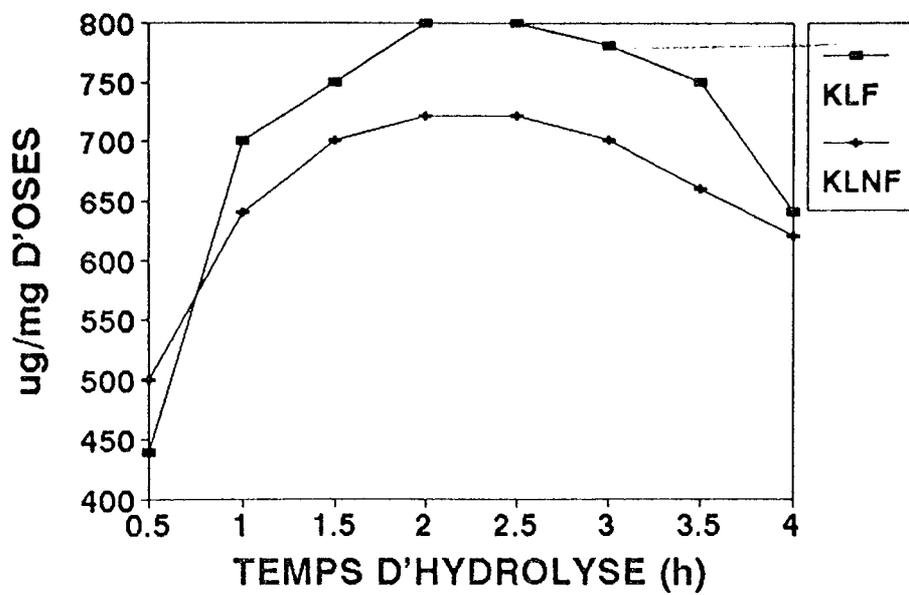


Fig. 114: Cinétique de libération des oses par hydrolyse HCl 2N des fractions (A) obtenues après action de la cytohélécasse sur les parois de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf)

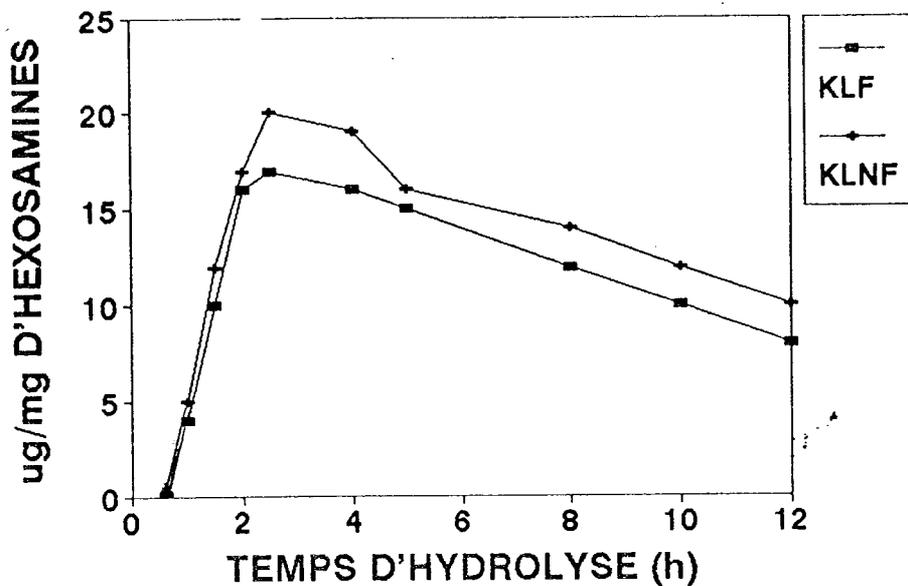


Fig. 115: Cinétique de libération des hexosamines par hydrolyse HCl 6 N des fractions (A) obtenues après action de la cytohélécasse sur les parois de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf)

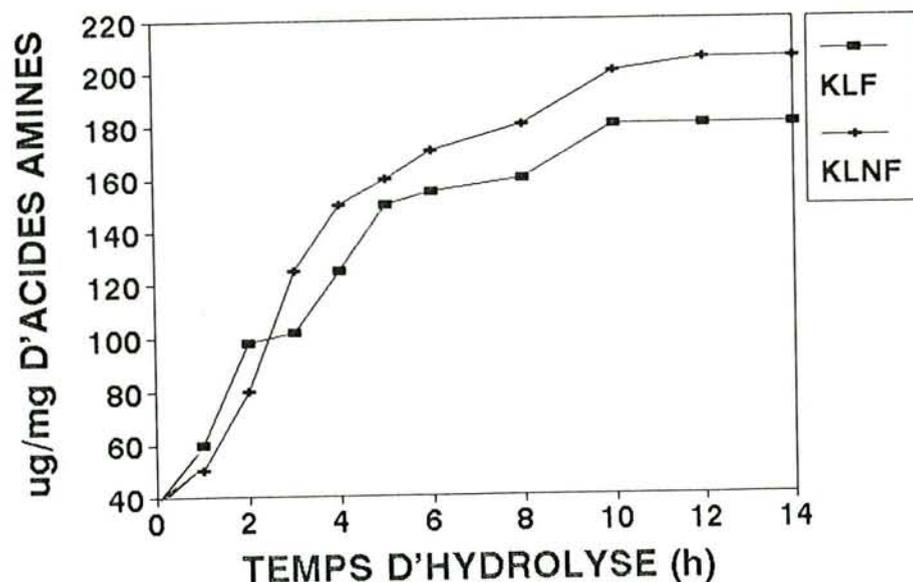


Fig. 116: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse HCL 6N des fractions (A) obtenues après action de la cytohélécise sur les parois de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf)

TABLEAU 41: Composition chimique globale des fractions (A) extraites des parois de *K.lactis* floculante et non floculante par action de la cytohélécise

SOUCHES	FRACTION DE KLF	FRACTION DE KLNf
CONSTITUANTS		
Oses neutres	80.92	75.65
Hexosamines	0.28	0.53
Acides aminés totaux (AA)	12.47	15.39
Phosphore (P)	1.36	0.92
Calcium	0.02	0.012
Man/Glc	12.16	10.22
Oses /AA	6.48	4.91
Oses/P	59.5	82.22
AA/P	9.16	16.72

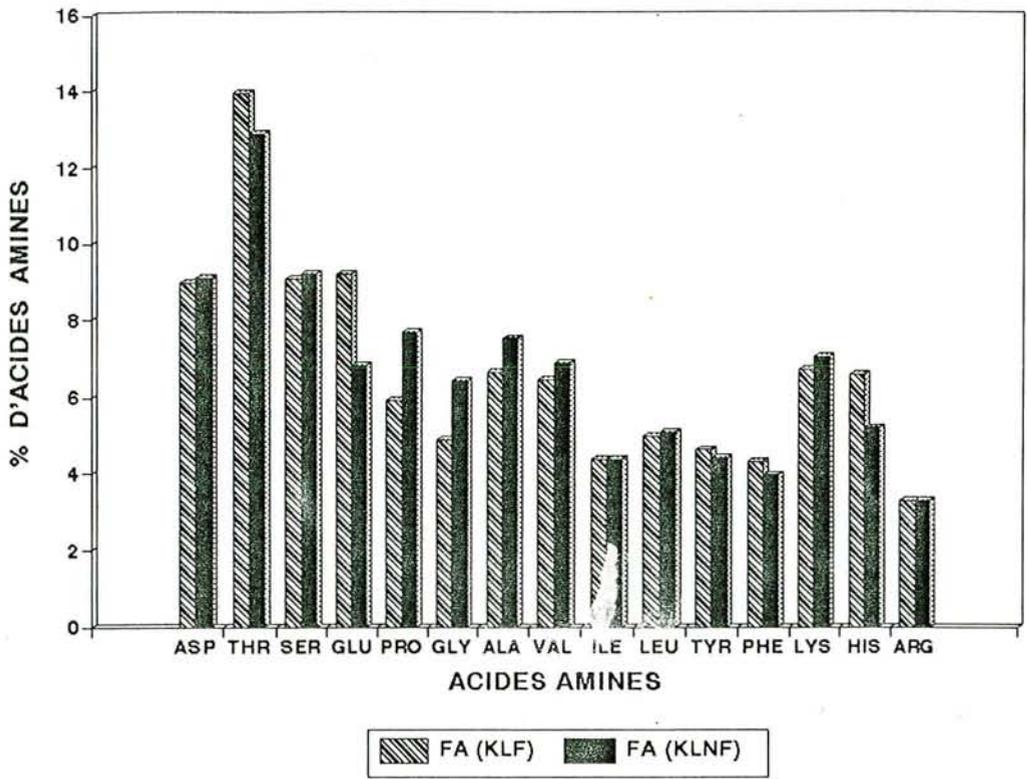
(Résultats exprimés en % de matière sèche)

TABLEAU 42: Composition en acides aminés des fractions
(A) Obtenues après action de la cytohélicase
sur les parois de *K. lactis* floculante et
non floculante

AA	KLF		KLNF	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	10.57	8.96	11.08	9.11
Thr	16.44	13.93	15.70	12.91
Ser	10.70	9.07	11.20	9.21
GLU	10.85	9.20	8.30	6.82
Pro	6.99	5.92	9.34	7.68
Gly	5.79	4.90	7.82	6.43
Ala	7.86	6.66	9.17	7.54
Val	7.61	6.45	8.36	6.87
Ile	5.18	4.39	5.32	4.37
Leu	5.88	4.98	6.18	5.08
Tyr	4.46	4.63	5.36	4.41
Phe	4.08	4.31	4.83	3.97
Lys	7.93	6.72	8.60	7.07
His	7.76	6.58	6.34	5.21
Arg	3.87	3.28	4.0	3.29
Total	117.97		121.60	

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

L'identification des sucres par chromatographie en phase gazeuse, sous forme d'acétates d'alditols, montre une prédominance du mannose, toutefois nous notons la présence du glucose, en faible quantité mais, relativement plus importante dans la fraction de la souche non floculante (Figures 117 et 118).



HISTOGRAMME 6: Variation de la teneur en acides aminés des PPM obtenus par action de la cytohélicase sur les parois de *K. lactis* flocculante et non flocculante

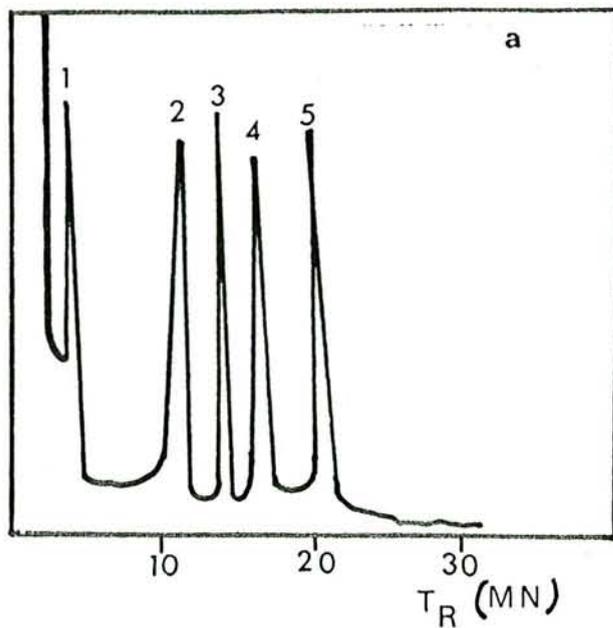


Fig. 117: Chromatogramme des acétates d'alditols des produits temoins:

- (1) Fucose, (2) Mannose, (3) Galactose,
 (4) Glucose, (5) Inositol

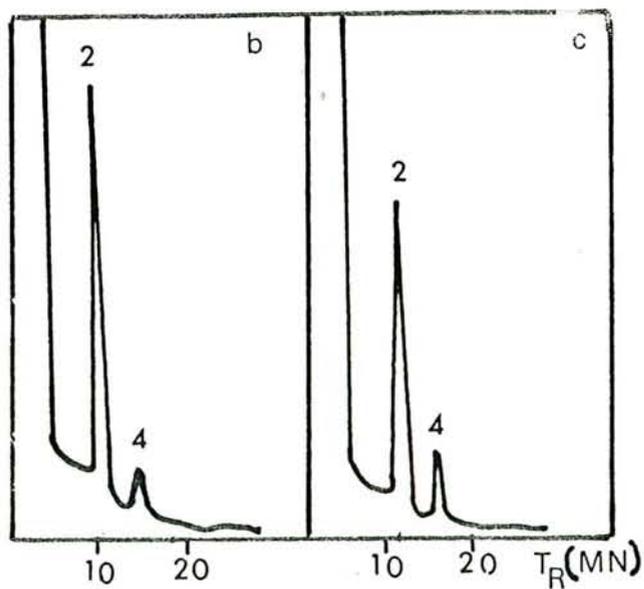


Fig. 118: Chromatogrammes des acétates d'alditols des produits d'hydrolyse des fractions (A) des parois de *K. lactis* floculante (a) et non floculante (b) obtenues après action de la cytohélicase

III.2.4. ETUDE DE L'ACTIVITE DES PPM ISOLES DES PAROIS APRES ACTION DE LA CYTOHELICASE

Le phosphopeptidemannane extrait à partir des parois de levures floculantes aurait vraisemblablement, au niveau de la paroi, un rôle inhérent dans le mécanisme de la floculation. Après l'avoir séparé de son site, nous avons réalisé une série de tests afin de rechercher une éventuelle activité de liaison, particulièrement du type lectinique.

III.2.4.1. TESTS DE DEFLOCULATION ET DE REFLOCULATION

Des quantités croissantes de phosphopeptidomannanes (10 à 160 mg/ml) ont été ajoutées à des suspensions de levures floculantes dans 10ml de milieu de culture ou de tampon acétate de Helm contenant environ 2mg de matière sèche par ml. Après agitation et 30 minutes de repos, nous n'observons pas de défloculation.

L'action sur des cellules dispersées a été testée. Après défloculation des cellules par le galactose, le phosphopeptidomannane est ajouté à différentes concentrations. Nous observons alors une refloculation des levures en suspension aussi bien dans le milieu de culture que dans le tampon acétate de Helm, sous l'action de PPM. Le maximum de refloculation est obtenu avec une concentration en PPM de 100mg/ml (figure 119). Le galactose, à une concentration de 15mg/ml reverse cette floculation.

Les mêmes tests réalisés avec les PPM extraits des parois de levures non floculantes, se sont révélés négatifs aussi bien sur les cellules potentiellement floculantes que sur les cellules non floculantes.

III.2.4.2. TESTS DE PRECIPITATION DES PPM PAR LA CONCANAVALINE A (CON A)

Les phosphopeptidomannanes mis en contact avec la con A, réagissent en formant un trouble. Les turbidités obtenues et comparées à celles du témoin montrent que l'interaction avec les PPM des parois de levures floculantes est plus grande par rapport à celles observées avec les PPM des parois de levures non floculantes (figure 120). L'interaction des PPM des parois de levures floculantes avec la con A est inhibée par addition de 10mg /ml de galactose dans le milieu alors qu'une addition de 100mg/ml de mannose n'a aucun effet.

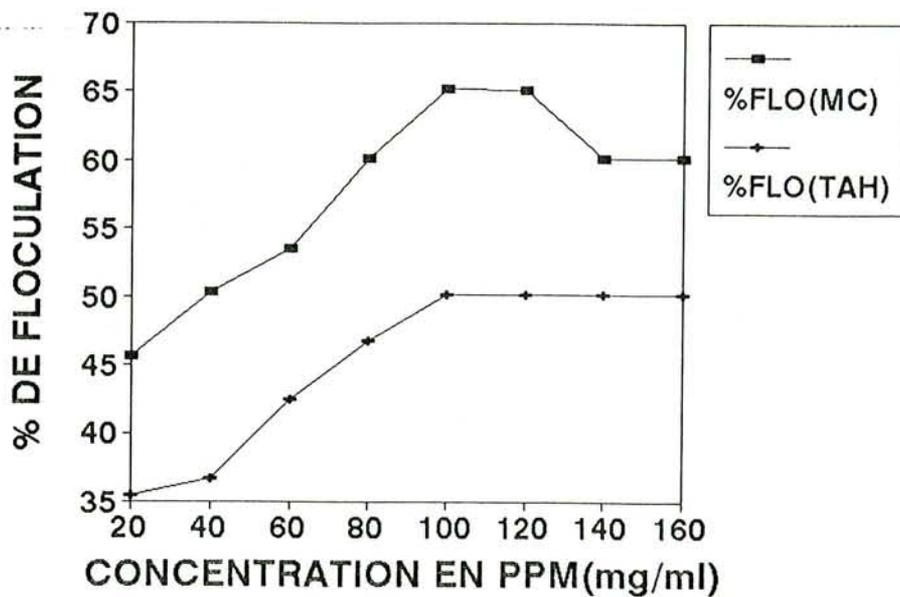


Fig. 119: Influence de la concentration en PPM sur le pourcentage de floculation de *K. lactis* en milieu de culture (MC) et en tampon acétate de Helm (TAH)

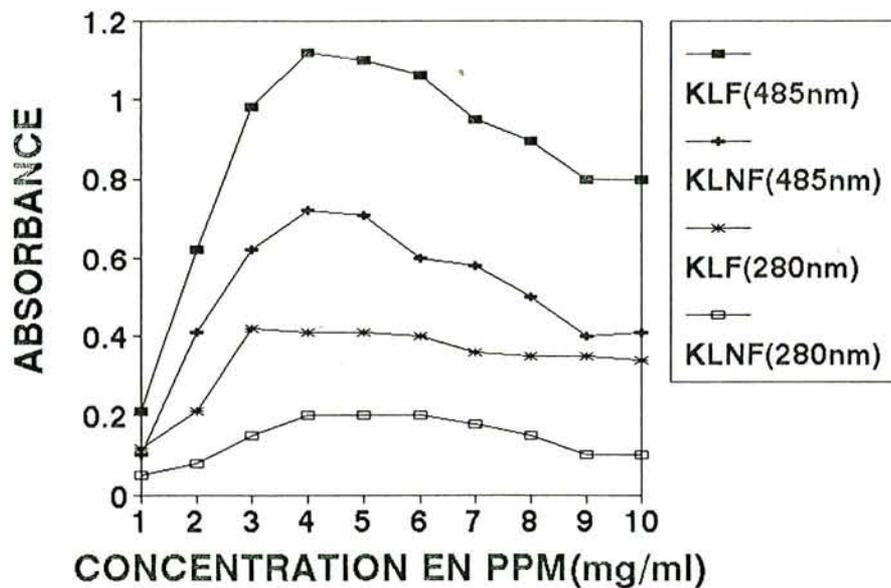


Fig 120: Courbes de précipitation par la con A des PPM pariétaux de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNF) obtenus après action de la cytohelicase.

III.2.5. ACÉTOLYSE DES PPM OBTENUS PAR ACTION DE LA CYTOHELICASE SUR LES PAROIS DE *K. lactis*

Les PPM ont été soumis à une acétolyse selon la méthode de KOCOUREK et BALLOU (1969).

La filtration de l'acétolysat sur Biogel P2 donne les spectres indiqués par la figure 121 (a,b,c) qui met en évidence la présence de six pics dont un exclu, pour les PPM des parois des deux souches de levure.

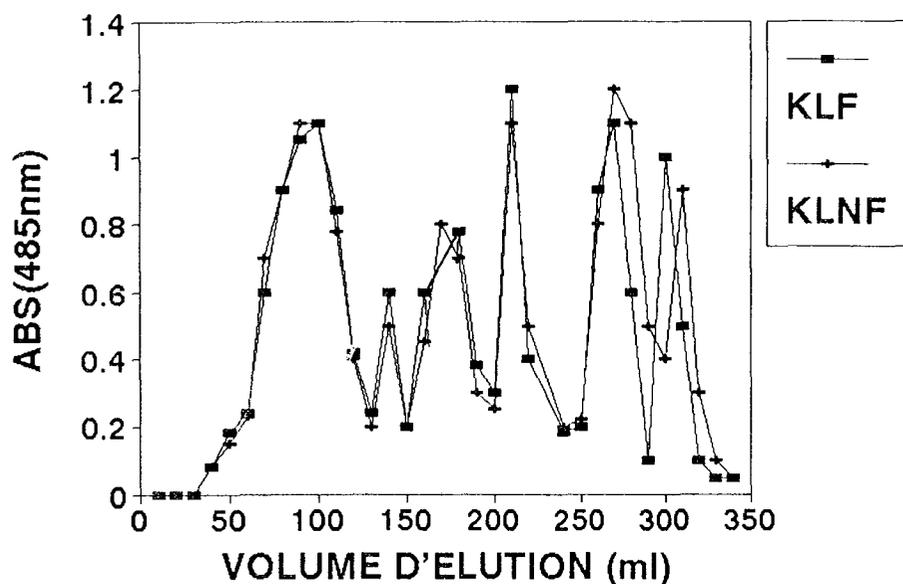


Fig. 121: Profil d'élution sur Biogel P2 des produits d'acétolyse des PPM obtenus après action de la cytohélicase sur les parois de *K. lactis* flocculante (a) et non flocculante (b).

La composition chimique des différentes fractions obtenues par filtration sur Biogel P2, est déterminée par le dosage des oses neutres, des acides aminés, d'hexosamines et du phosphore.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 43 et 44. Les masses moléculaires des composés des différentes fractions sont estimés à l'aide d'une courbe étalon (figure 103).

TABLEAU 44: Composition chimique des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM obtenus après action de la cytohélicase sur les parois de *K. lactis flocculante*

CONSTITUANTS S/FRACTIONS	MM	R	OSSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GLUCOSAMINE
FI	182	1	++	-	-	-
FII	350	1.4	+++	-	-	-
FIII	546	2.46	++++	-	-	-
FIV	668	2.60	++++	-	-	-
FV	695	0.6	++++	-	T	±
FVI	>1800	/	+	+	+	+

MM : masse moléculaire

R : rapports estimés en considérant le nombre de moles de mannose

(T): traces.

(-): non détecté par l'analyse chimique.

D'après les masses moléculaires estimées et les volumes d'élution, les fractions I, II et III correspondent respectivement à un mono, di et trisaccharide. La fraction IV contient du phosphore et serait constituée d'un tétrasaccharide phosphate. Le degré de phosphorylation est plus élevé dans les fractions des PPM des parois de levures flocculantes.

L'analyse des fractions V met en évidence la présence de glucosamine et de traces de phosphore; elles seraient donc, constituées d'oligosaccharides faiblement phosphorylés correspondant aux pentasaccharides, ou liés à une molécule de N-acétyl-glucosamine et correspondrait à des trisaccharides (Man₃ GlcNaC) avec présence de tétrasaccharides phosphorylés (Man₄ P).

TABLEAU 45: Composition chimique des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM obtenus par action de la cytohélicase sur les parois de *K. lactis* non floculante

CONSTITUANTS S/FRACTIONS	MM	R	OSÉS NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GLUCOSAMINE
FI	183	1	++	-	-	-
FII	345	2.05	+++	-	-	-
FIII	550	1.22	++++	-	-	-
FIV	670	1.51	++++	-	±	-
FV	710	0.3	++++	-	T	±
FVI	>1800	/	+	+	+	+

MM : masse moléculaire

R : rapports estimés en considérant
le nombre de moles de mannose

(T): traces.

(-): non détecté par l'analyse chimique.

(+++): constituants majeurs

(++) : constituants dominants

(+)(±): détectable par l'analyse chimique

La fraction VI représente les produits ayant des masses moléculaires supérieures à 1800 daltons. L'analyse de ces fractions indiquent qu'elles ont une composition chimique similaire à celle du PPM dont elles sont issues. Elles renferment en effet, des oses neutres, des acides aminés, des hexosamines et du phosphore.

D'après certains auteurs (YAMADA et al., 1983) ces fractions résistent à l'acétolyse car elles seraient constituées d'oligosaccharides composés d'unités mannose liés entre elles par des liaisons 1 → 2 et 1 → 3. Les acides aminés de cette fraction ont pour origine la partie protéique des phosphopeptidomannanes, alors que la glucosamine correspondrait aux unités N-acétyl-chitibioses qui sont restées liées à l'asparagine de la partie protéique du PPM (NAKAJIMA et BALLOU 1974).

L'examen des rapports molaires des produits d'acétolyse exprimés par rapport aux monosaccharides indiquent que les PPM des parois de levures floculantes sont plus riches en tri et tétrasaccharides que ceux des levures non floculantes, qui renferment plus de disaccharides. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les mannoprotéines extraites des parois par l'étylènediamine.

Pour vérifier les résultats de l'acétolyse et de la filtration sur biogel P2, nous avons identifié les constituants des acétolysats par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice. Les résultats indiqués sur le tableau 46 confirment l'identification établie sur la base des masses moléculaires et des volumes d'élution.

TABLEAU 46: Rapports frontaux (Rf) des oligosaccharides temoins et des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM de *K. lactis* floculante

TEMOINS		PRODUITS D'ACETOLYSE DES PPM DE KLF		PRODUITS D'ACETOLYSE DES PPM DE KLNf	
Composés	R F	SOUS- FRACTIONS	R F	SOUS- FRACTIONS	R F
Mannose	0.68	FI	0.60	FI	0.64
Mannobiose	0.52	FV	0.50	FII	0.53
Mannotriose	0.41	FVIII	0.38	FIII	0.36
Mannotétraose	0.30	FVIV	0.28	FIV	0.29
Mannopectose	0.19	FV	0.26	FV	0.25
Dextrane MM>MM pentose	0.09	FVI	0.18	FVI	0.11

III 3 D I S C U S S I O N

Les parois des levures floculantes et non floculantes soumises à l'action de la cytohélicase libèrent un complexe de nature phosphopeptidomannane représentant la fraction majeure, de masses moléculaires estimées par filtration sur Ultrogel ACA 22 à 350 et $310 \cdot 10^3$ daltons respectivement pour les PPM extraits des parois de levures floculante et non floculante.

Les variations de la composition chimique globale des PPM obtenus reflètent assez bien celles des parois et des mannoprotéines obtenues par l'éthylènediamine. La détermination du phosphore et du calcium démontre que ces deux éléments pariétaux se trouvent localisés en grande partie dans ces fractions.

Lorsque les PPM obtenus par action de la cytohélicase sur les parois sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, la présence de plusieurs bandes laissent supposer que les fractions mannoprotéiques isolées sont constituées de sous-unités dissociées sous l'action du SDS. Les résultats confirment ceux obtenus par certains auteurs (MATSUI et al., 1985; SALHI, 1986) pour les PPM d'autres levures.

Comme dans le cas des glycoprotéines obtenues par traitement des parois à l'éthylènediamine, les teneurs en différents constituants des PPM varient en relation avec le caractère floculant de la levure.

L'analyse qualitative des oses neutres, sous forme d'acétates d'alditols, par chromatographie en phase gazeuse met en évidence une faible teneur en glucose, ce qui indiquerait, selon SHIBATA et al., (1983) et PASTOR et al., (1984) la présence de liaisons covalentes entre les unités mannanes et glucanes ou à l'emprisonnement du peptide par le réseau de glucane.

Les différents tests de réactivité effectués à l'aide de la glycoprotéine obtenue après action de la cytohélicase attestent que celle-ci possède une partie osidique intacte qui lui permet de se fixer sur les sites actifs de la con A d'une part et d'entraîner une floculation des levures potentiellement floculantes, mais en état de dispersion, d'autre part. Par ailleurs, cette glycoprotéine s'est avérée inactive sur des cellules potentiellement non floculantes.

L'extraction de cette glycoprotéine pariétale a nécessité la présence d'un réactif à la fonction thiol c'est-à-dire le mercaptoéthanol qui, par coupure des ponts disulfures permet l'accès aux glucanes par la β -glucanase; il est donc possible que la réduction des ponts disulfures, entraîne la libération de certaines parties de la molécule qui aurait éventuellement un rôle dans la floculation. Cette dernière hypothèse n'a pas été vérifiée ici.

CHAPITRE VII

ETUDE DES CONSTITUANTS EXTRAITS

A PARTIR DE CELLULES ENTIERES DE

K. LACTIS FLOCCULANTE ET NON FLOCCULANTE

I. I N T R O D U C T I O N

La floculation des levures est un phénomène lié à la surface cellulaire. Des études, réalisées sur les parois, ont montré que la couche externe responsable du caractère floculant est de nature mannoprotéique (DAY et al., 1975; STEWART et RUSSEL, 1981).

Des études ont également confirmé que les parois des levures floculantes contiennent plus de mannanes que celles des levures non floculantes. Ces mêmes études font apparaître que les mannanes seraient davantage phosphorylés lorsque les levures sont floculantes (MASSCHELIN et al., 1963; LYONS et HOUGH, 1970; JAYATISSA et ROSE, 1976). Elles mettent en évidence, par ailleurs, qu'au moment de la floculation il y a une augmentation de phosphopeptidomannanes (PPM) et diminution des protéines (AMRI et al., 1981).

Les méthodes d'isolement des PPM, les plus couramment utilisées sont le fractionnement à partir des parois et l'extraction à partir de cellules entières.

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié des fractions pariétales obtenues par traitement chimique et enzymatique des parois de *K. Lactis* floculante et non floculante. Ces traitements ont permis d'isoler et de purifier des fractions de nature phosphopeptidomannane de masses moléculaires élevées.

D'après les résultats des analyses, la composition de ces fractions varie en relation avec l'état de floculation. Les variations portent essentiellement sur les glucides qui augmentent et les protéines qui diminuent au moment de la floculation.

L'étude structurale de ces fractions pariétales notamment par acétolyse associée à la chromatographie montre des différences notables entre les levures floculantes et les levures non floculantes.

Dans le but de confirmer des observations faites sur les constituants obtenus par fractionnement des parois, nous avons étudié dans ce chapitre les polymères (PPM) isolés après autoclavage des cellules entières dans un tampon citrate pH 7,0 selon la méthode de PEAT et al., (1961) modifiée.

II. ISOLEMENT ET ANALYSE DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM)

II. 1. RENDEMENTS RELATIFS EN PPM EXTRAITS DES CELLULES ENTIERES FLOCULANTES ET NON FLOCULANTES

Les phosphopeptidomannanes ont été extraits, selon la méthode de PEAT et al., (1961) modifiée, à partir de cellules floculantes et non floculantes, après 48 heures de croissance,

Les conditions d'obtention et les rendements sont indiqués dans le tableau 46.

TABLEAU 46:: Conditions d'obtention et rendements relatifs en PPM extraits selon la méthode de PEAT et al., (1961) modifiée

SOUCHES	KLF	KLNF
PARAMETRES		
Taux de croissance (h ⁻¹)	0,30	0,31
% FLO	56	0
Rendement en biomasse (g/l)	4,0	4,16
Rendement en PPM (% MS)	17	12

(% MS) : pourcentage de matière lyophilisée par rapport à la biomasse sèche.

Les quantités de PPM "bruts" extraits des cellules floculantes et non floculantes sont de 17% et 12% respectivement. Il y a une augmentation relative de 5% du taux de PPM lorsque la levure est floculante. De telles observations ont été faites pour d'autres levures par HUSSAIN, (1983) et AL MAHMOOD (1987) pour *K. bulgaricus*; SALHI (1986) pour *S. uvarum*; MANGUNWIDJAJA (1988) pour *K. lactis*. Ces auteurs ont extrait, par la même méthode, des quantités de PPM plus élevées à partir de levures floculantes.

Il faut, cependant, signaler que ces observations ne sont pas générales, en effet MBAWALA (1990) a extrait des PPM de levures floculantes et peu floculantes de *Pichia pastoris*, et a

constaté que les levures peu floculantes élaborent plus de phosphopeptidomannanes.

Il semble donc que le rendement d'extraction dépend non seulement du caractère floculant mais également du type de levure et des conditions de culture. En effet, MANGUNWIDJAJA (1988) a observé une baisse de rendement en PPM lorsque des levures de *K. lactis* très floculantes sont cultivées dans des conditions qui provoquent une baisse du degré de floculation

II.2. ANALYSE CHIMIQUE DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM) "BRUTS"

Pour établir la composition chimique des PPM à partir des cellules entières, nous avons préalablement effectué une dialyse pendant 48 heures contre de l'eau distillée.

Les conditions optimales de libération des divers constituants des PPM par hydrolyse acide ont été fixées d'après les courbes cinétiques de libération illustrées par les figures 122, 123 et 124.

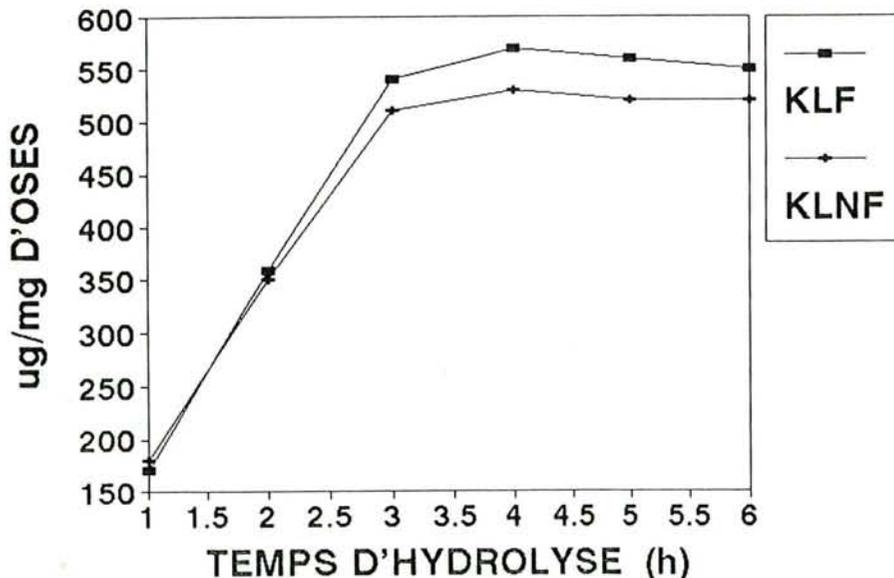


Fig. 122: Cinétique de libération des oses par hydrolyse HCl 2 N des PPM de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNF)

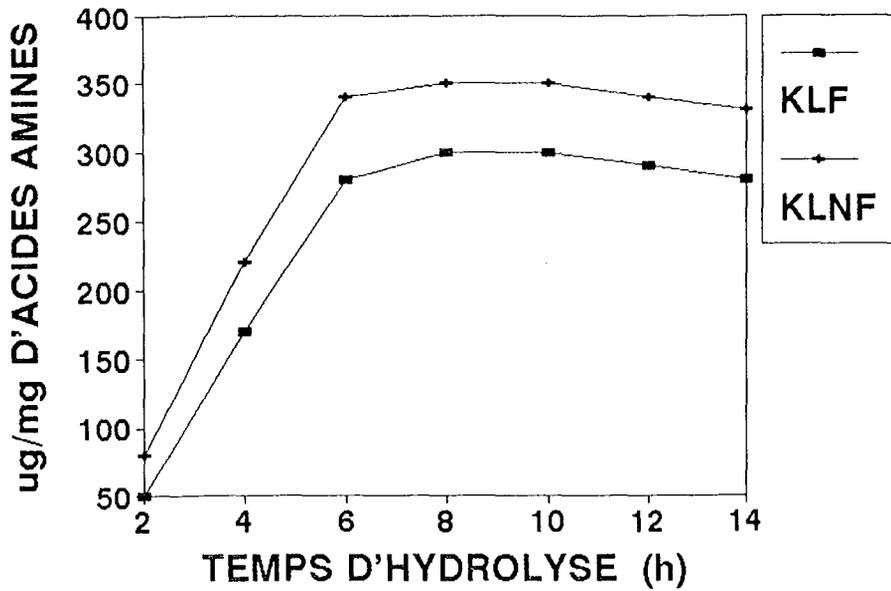


Fig. 123: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse HCl 6N des PPM de *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf)

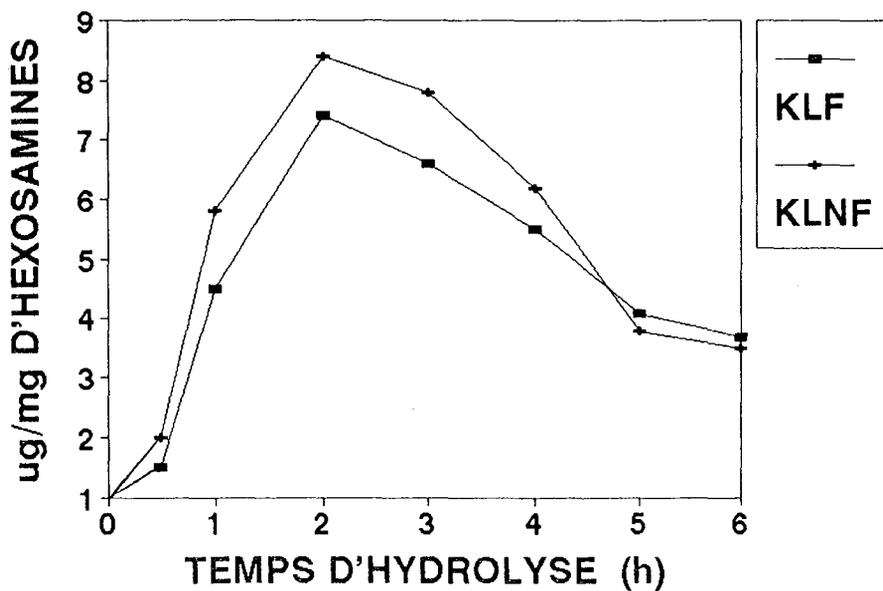


Fig. 124: Cinétique de libération des hexosamines par hydrolyse HCl 6N des PPM *K. lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNf)

II.2.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PPM "BRUTS" DIALYSÉS

les résultats de l'analyse chimique des extraits PPM "bruts" dialysés sont rassemblés dans le tableau 47.

TABLEAU 47: Composition chimique globale des PPM "bruts" dialysés, extraits des cellules entières de *K.lactis* floculante et non floculante selon la méthode de PEAT

SOUCHES	PPM DE KLF	PPM DE KLNF
CONSTITUANTS		
Oses neutres	85,80	70,71
Hexosamines	0,92	1,25
Acides aminés totaux	12,65	16,39
Phosphore	1,21	0,91
Calcium	0,04	0,02
Man/Glc	11,37	7,62

(Résultats exprimés en % de matière sèches)

De la composition chimique des PPM, nous retiendrons une augmentation des oses totaux (15% environ) et de la teneur en phosphore chez la levure floculante. En revanche, les teneurs en protéines et hexosamines diminuent.

La détermination de la teneur en calcium montre que les PPM des levures floculantes contiennent 2 fois plus de calcium par rapport à ceux de la levure non floculante.

L'ensemble de ces observations confirment globalement celles faites lors de l'étude des parois entières et des fractions pariétales obtenues par traitement chimique et enzymatique.

Il semble que les glycoprotéines extraites des parois isolées ou de cellules entières ont une composition chimique qui évolue en rapport avec le caractère floculant quelle que soit la méthode d'isolement

Par ailleurs, nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus pour les PPM de diverses levures flocculantes: *S. cerevisiae* (LYONS et HOUGH 1971; RUSSEL et al., 1973); *S. uvarum* (SAHLI, 1986); *K. bulgaricus* (AL MAHMOOD, 1987); *K. lactis* (MANGUNWIDJAJA, 1988).

II.2.2. ANALYSE QUALITATIVE DES OSES

L'analyse chromatographique effectuée sur les hydrolysats des PPM "bruts" dialysés montre que le mannose est l'ose essentiel, la teneur en glucose est relativement faible (figure 125). Les rapports Man/Glc sont de 11,37 et 7,62 respectivement pour les PPM des levures flocculantes et non flocculantes.

Signalons toutefois que les variations du rapport Man/Glc dépend également de l'espèce de levure et des conditions d'extraction des PPM. Ainsi MBAWALA (1990) trouve des rapports Man/Glc plus élevés dans le cas des PPM de la levure *P. pastoralis* peu flocculante; alors que pour *K. bulgaricus* le rapport Man/Glc des PPM de la souche flocculante est 2 fois plus élevé par rapport à celui des PPM de la souche non flocculante (AL MAHMOOD 1987).

Pour les PPM extraits des levures entières *K. lactis* par la même méthode, MANGUNWIDJAJA (1988) n'a pas mis en évidence la présence du glucose.

I.2.3. ANALYSE DES ACIDES AMINES ET DES HEXOSAMINES

Le dosage des groupements aminés par le technique au DNFB, démontre que la teneur totale en acides aminés des PPM des levures non flocculantes est supérieure à celle des PPM des levures flocculantes (16% contre 11% de la matière sèche).

L'analyse chromatographique des hydrolysats de la partie protéique des PPM met en évidence les mêmes acides aminés identifiés dans les parois et les fractions pariétales. La composition en acides aminés des PPM est donnée dans le tableau 48 et par histogramme 7.

Les profils en acides aminés des PPM se caractérisent par une prédominance de la thréonine, de la sérine et des acides aspartique et glutamique, qui représentent 52% et 43% environ et respectivement pour les PPM des levures flocculantes et non flocculantes.

TABLEAU 48: Composition en acides aminés et en glucosamine des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* floculante et non floculante

AA	PPM (KLF)		PPM (KLNF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	17,6	14,02	18,54	11,38
Thr	15,12	12,05	14,75	9,05
Ser	11,83	9,43	14,13	8,67
Glu	21,73	17,31	23,60	14,48
Pro	5,72	4,56	13,85	8,50
Gly	8,47	6,75	11,07	6,79
Ala	10,30	8,21	14,89	9,14
Val	5,56	4,43	8,46	5,19
Ile	2,75	2,19	5,81	3,56
Leu	4,11	3,27	8,01	4,91
Tyr	2,33	1,86	1,58	0,97
Phe	3,22	2,56	4,92	3,01
Lys	6,57	5,23	12,14	7,45
His	2,65	2,11	1,02	0,62
Arg	7,51	5,98	10,49	6,44
Total	125,47	99,96	162,92	100,16
GlcN	10,72		15,59	

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

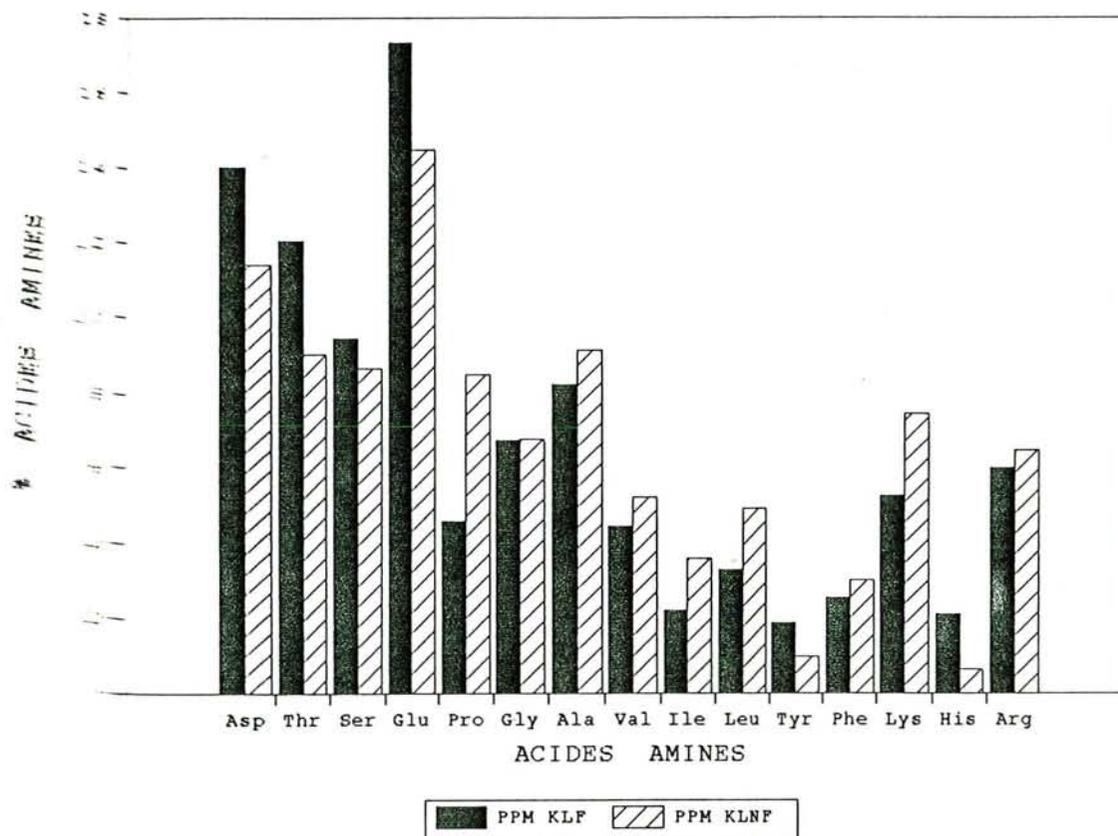


FIGURE 7: Variation de la teneur en acides aminés des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* flocculante et non flocculante

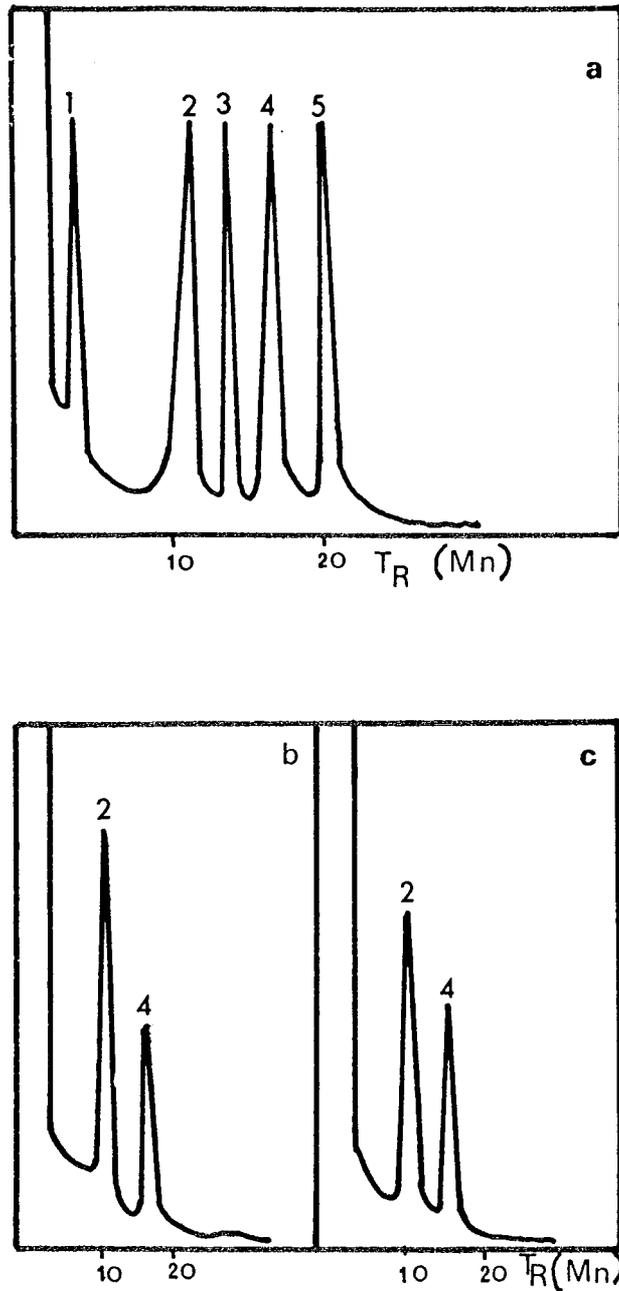


Fig. 125: Chromatogramme des acétates d'alditols des oses témoins (a): (1) fucose, (2) mannose, (3) galactose, (4) glucose, (5) Inositol; et des produits d'hydrolyse des PPM "bruts" dialysés extraits selon la méthode de PEAT, des cellules de *K. lactis* floculante (b) et non floculante (c).

Si nous admettons une signification aux différences des teneurs déterminées, nous constatons que les teneurs des 4 acides aminés augmentent légèrement avec le caractère floculant. En revanche les PPM des levures non floculantes sont plus riches en proline (8,5% contre 4,5%). De même les teneurs en alanine, lysine et arginine sont légèrement plus élevées dans les PPM de la souche non floculante. Cette analyse laisserait apparaître que la partie protéique des PPM extraits des cellules de *K. lactis* floculante est plus hydrophile que celle des PPM de *K. lactis* non floculante.

Au cours de l'analyse des acides aminés à l'autoanalyseur nous avons également identifié dans tous les échantillons de la glucosamine dont la teneur est plus élevée dans les PPM de la souche non floculante. Notons que la glucosamine se trouve vraisemblablement sous forme de N-acétyl-glucosamine dans le polymère natif (BALLOU, 1970). Elle peut-être un élément de ramification sur le mannane; elle est aussi sous forme de N-acétylchitibiose, le lien entre partie protéique et polysaccharidique (liaison N-glycosidique).

II.2.4. TENEURS EN PHOSPHORE ET EN CALCIUM DES PPM "BRUTS" DIALYSÉS

Les PPM des levures floculantes contiennent environ 2 fois plus de phosphore et de calcium que les PPM des levures non floculantes; ceci suggère que les phosphopeptidomannanes des levures floculantes sont relativement plus phosphorylés ce qui n'est pas en contradiction avec certaines hypothèses selon lesquelles le degré de phosphorylation est déterminant pour l'expression de la floculation (MILL, 1966; LYONS et HOUGH, 1970), bien que ces hypothèses soient sujettes à controverse (BALLOU et al., 1974).

II.3. D I S C U S S I O N

les rendements en PPM "bruts" extraits de levures entières varient selon l'espèce et la méthode d'extraction. Les différents travaux rapportent des teneurs allant de 2% à 20%

Ainsi des taux de PPM "bruts" de 8% à 13% ont été extraits par la méthode de Peat, à partir de souches sauvage et mutante de *S. cerevisiae* (ALHADITY, 1984). Avec la même méthode, MBAWLA (1990) obtient 1,8% et 3,2% de PPM "bruts" respectivement, à partir de levures *P. pastoralis* floculante et peu floculante.

AL MAHMOOD et al., (1987) ont obtenu, par action de la pronase sur des cellules de *K. bulgaricus* floculante et non floculante, des taux de l'ordre de 17% et 14%.

D'une manière générale, la teneur en phosphopeptidomannanes augmente lorsque la levure est floculante.

L'analyse des phosphopeptidomannanes "bruts" dialysés des levures *K. lactis* haploïdes floculantes et non floculantes, extraits par la méthode de Peat permet de retenir les points suivants:

1/ Une augmentation de ces polymères de l'ordre de 5% est observée au moment de la floculation. Sur ce point nos résultats ne concordent pas avec ceux de certains auteurs qui n'observent pas de différences significatives de teneur en PPM en relation avec la floculation (MILL, 1966; GRIFFIN et Mc WILLIAM, 1969; MBAWALA. En revanche, nos résultats confirment ceux de HUSSAIN et al. (1983) pour *K. bulgaricus*; AMRI et al., (1982) et SALHI (1986) pour *S. uvarum*.

2/ Les PPM "bruts" des levures non floculantes présentent une richesse plus marquée en acides aminés et en hexosamines par rapport à ceux des levures floculantes. Cependant l'analyse des profils en acides aminés fait apparaître des teneurs plus élevées en thréonine, sérine et acides aspartique et glutamique dans les PPM des levures floculantes; en revanche nous observons des quantités en proline, alanine et lysine plus élevées, dans les PPM des levures non floculantes. Les résultats indiquent que les parties protéiques des PPM ont des caractères d'hydrophobicité différents selon que la levure est floculante ou non floculante.

3/ La composition chimique globale indique par, ailleurs, que les PPM "bruts" extraits des levures floculantes contiennent environ deux fois plus de calcium et de phosphore que ceux des levures non floculantes. Ce qui laisse supposer que les groupements phosphates, comme l'ont signalé certains auteurs, interviendraient dans le phénomène de floculation.

4/ L'analyse chimique, des PPM "bruts" extraits par la méthode de PEAT à partir de cellules entières floculantes et non floculantes, est en plein accord avec les observations faites pour les parois isolées et les fractions pariétales obtenues par fractionnement chimique ou enzymatique.

III. PURIFICATION DES PPM "BRUTS" ET ETUDE DES FRACTIONS

III.1. PURIFICATION DES PPM "BRUTS" DIALYSÉS

Les phosphopeptidomannanes extraits à partir de cellules entières selon la méthode de PEAT sont solubles dans l'eau, il est donc facile de vérifier leur homogénéité par les techniques classiques de filtration sur gel.

Dans une première étape, ces polymères ont été filtrés sur gel Trisacryl GF 2000. Pour cela, nous solubilisons 50mg de PPM dans l'eau distillée puis la solution est centrifugée à 4000g. Le surnageant est déposé sur une colonne de 400ml. L'éluion des produits est réalisée par l'eau distillée contenant 0,02% d'azide (NaN_3). Les éluats sont détectés par le dosage au phénol sulfurique et celui des protéines à 280 nm.

La filtration sur gel Trisacryl GF 2000 nous a permis de recueillir, pour chaque PPM une seule fraction, correspondant à un seul pic (figure 126). Les volumes d'éluion des fractions PPM des levures floculantes et non floculantes sont voisins; les produits de filtration sont récupérés et lyophilisés.

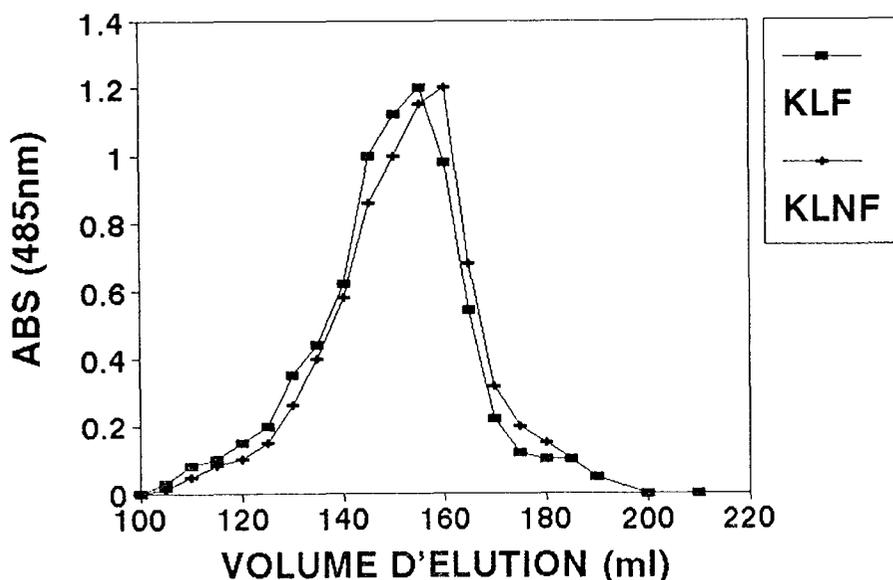


Fig. 126: Profil d'éluion sur gel Trisacryl GF 2000 des PPM de *K.lactis* floculante (KLF) et non floculante (KLNF)

Les produits précédemment obtenus sur gel Trisacryl GF 2000 sont ensuite filtrés sur une colonne de Biogel A5M dont la zone de séparation est comprise entre 10^9 et 5.10^6 daltons.

Les figures 127 et 128 illustrent les profils d'éluion des PPM de levures flocculantes et non flocculantes. nous obtenons pour chaque PPM deux fractions A1 et A2 sélectivement séparées. Les fractions sont récupérées, conservées à l'état lyophilisé, et analysées

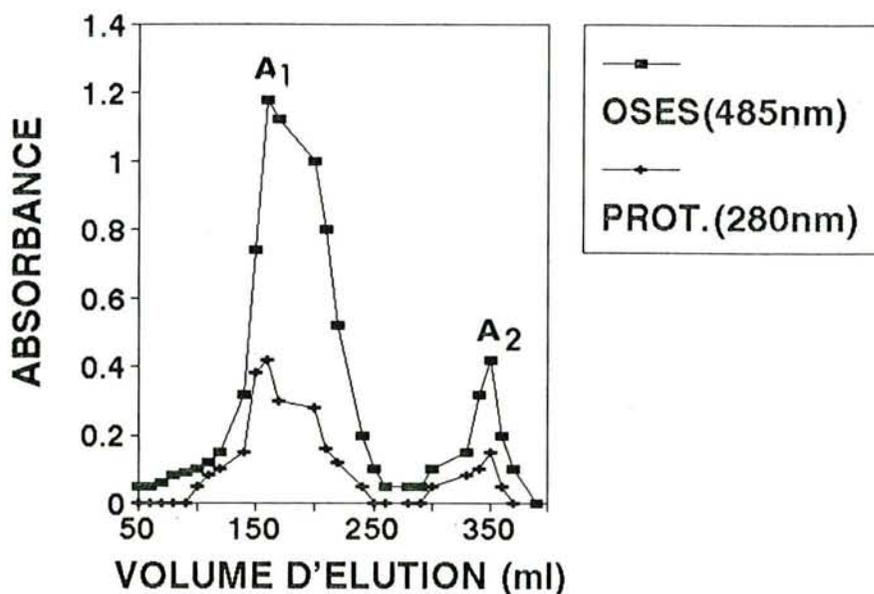


Fig. 127: Profil d'éluion sur Biogel A5M des PPM de *K. lactis* flocculante .

Dosage des oses (485 nm)

Dosage des protéines (280 nm)

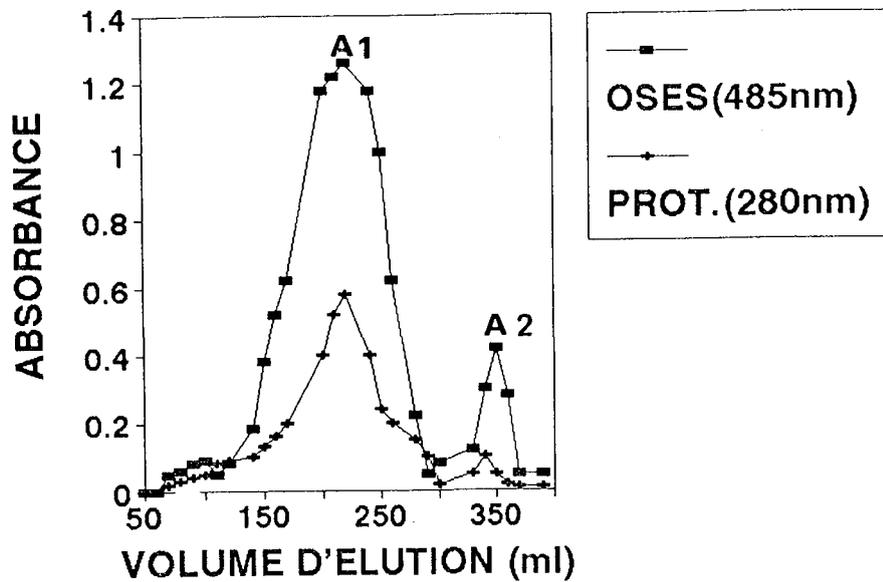


Fig. 128: Profil d'élution sur Biogel A5M des PPM de *K. lactis* non floculante
 Dosage des oses (485 nm)
 Dosage des protéines (280 nm)

III.2. ESTIMATION DES MASSES MOLECULAIRES
 DES FRACTIONS A1 ET A2 ISSUES DES PPM
 DE *K. LACTIS* FLOCULANTE ET NON
 FLOCULANTE

Les masses moléculaires des fractions A1 et A2 séparées sur Biogel A5M ont été estimées à l'aide d'une courbe étalon (figure 129 a et b).

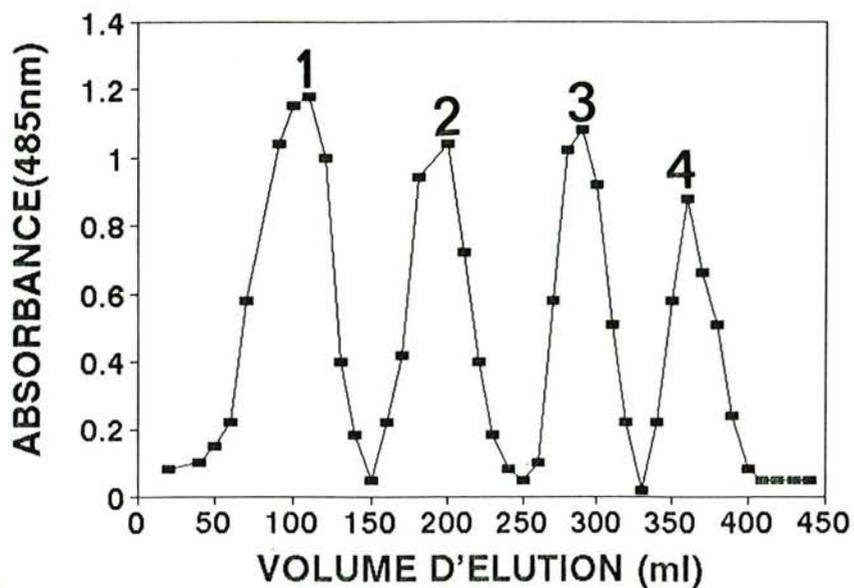


Fig. 129 (a): Profil d'élution sur Biogel A5M des produits temoins (Dextranes)
 (I) 2.000.000 da, (II) 465.000 da,
 (III) 145.000 da, (IV) 40.000 da.

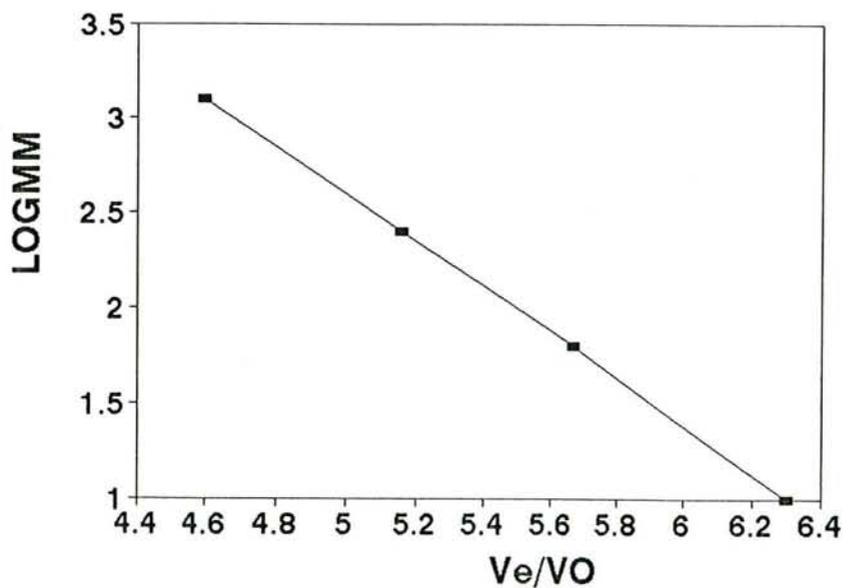


Fig. 129(b): Courbe d'étalonnage de la colonne de Biogel A5M

Les rendements et les masses moléculaires des fractions A1 et A2 sont indiqués dans le tableau 49. Nous constatons que les fractions A1 constituent les éléments majeurs des PPM des levures, aussi bien floculante que non floculante. Elles représentent en effet 87% et 89% respectivement; leurs masses moléculaires respectives sont de 430.10^3 daltons et 405.10^3 daltons.

TABLEAU 49: Masses moléculaires et rendements des fractions obtenues par filtration des PPM "bruts" dialysés sur Biogel A5M

FRACTIONS SOUCHES	A1			A2		
	R(%)	TR	MM	R(%)	TR	MM
KLF	87,2	43,6	430.10^3	6,4	3,2	42.10^3
KLNF	89,1	44,5	405.10^3	4,9	2,5	46.10^3

MM = Masse moléculaire (en daltons)

R = Rendement pondéral (en % de matière sèche)

TR = Taux de récupération (en mg) à partir des PPM "bruts"

L'analyse par électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS, des fractions majeures (A1) fait apparaître en plusieurs bandes. Les électrophorégrammes sont similaires à ceux obtenus pour les fractions pariétales; ils montrent que les fractions (A1) issues des PPM de *K. lactis* floculante se caractérisent par un nombre de sous-unités, de faibles masse moléculaire, plus élevé par rapport à celui des fractions (A1) issues des PPM de *K. lactis* non floculante (Figure 130).

III.3. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES FRACTIONS A1 et A2

L'analyse chimique des fractions A1 et A2 a été effectuée après hydrolyse acide (HCl). Les conditions optimales sont identiques à celles obtenues pour les PPM "bruts" dialysés (figures 122, 123 et 124).

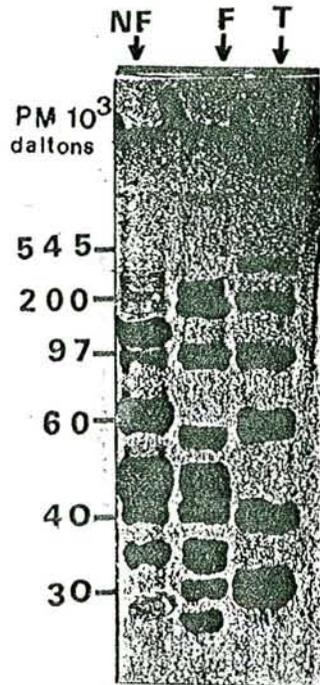


Fig. 130: lectrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS, des témoins(T) et des fractions majeures (A1) issues des PPM extraits des cellules entières de *K.lactis* flocculante (F) et non flocculante (NF)

Les résultats des différentes analyses sont résumés dans le tableau 50.

les résultats indiquent que les fractions A1 sont de nature glycoprotéique dont la composition chimique globale comme les PPM "bruts" dialysés correspondants varie en relation avec le caractère flocculant ou non de la levure. Nous observons, en effet des teneurs en oses totaux, en phosphore et en calcium plus élevés dans les fractions A1 issues de PPM de levures flocculantes par rapport à celles des PPM de levures non flocculantes, qui sont, en revanche, plus riches en acides aminés et en hexosamines.

TABLEAU 50: Composition chimique globale des fractions A1 et A2 issues des PPM "bruts" dialysés après filtration sur Biogel A5M

FRACTIONS CONSTITUANTS	KLF		KLNF	
	A1	A2	A1	A2
Oses totaux	86,2	80,70	75,13	80,30
Osamines	0,8	0,04	1,2	0,06
Acides aminés totaux	12,1	5,46	15,8	5,9
phosphore	1,07	0,01	0,68	0,016
Calcium	0,06	-	0,03	-
Man/Glc	18,6	-	14,4	-

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

La même analyse montre, par ailleurs, que la composition chimique globale des fraction A2 (mineures) ne varie pas en relation avec la floculation; ces fractions sont en majeure partie constituées d'oses (80%). Elles renferment, environ 3 fois moins d'acides aminés que les fractions majeures (A2).

L'analyse qualitative, par chromatographie en phase gazeuse, des oses sous forme d'acétates d'alditols, révèle une prédominance du mannose dans les fractions A1, le glucose est pratiquement à l'état de trace (figure 131, a, b, c).

L'analyse détaillée de la composition en acides aminés montre que le profil est similaire avec celui des PPM "bruts" dialysés. Les acides aminés prédominants pour les deux fractions A1 (de KLF et KLNF) sont les acides aspartique, glutamique, la sérine et la thréonine. La teneur en ces acides est relativement plus élevées dans les fractions (A1) issues des PPM de levures floculantes par rapport à celle des levures non floculantes qui sont plus riches en proline et en lysine (tableau 51 et histogramme 8).

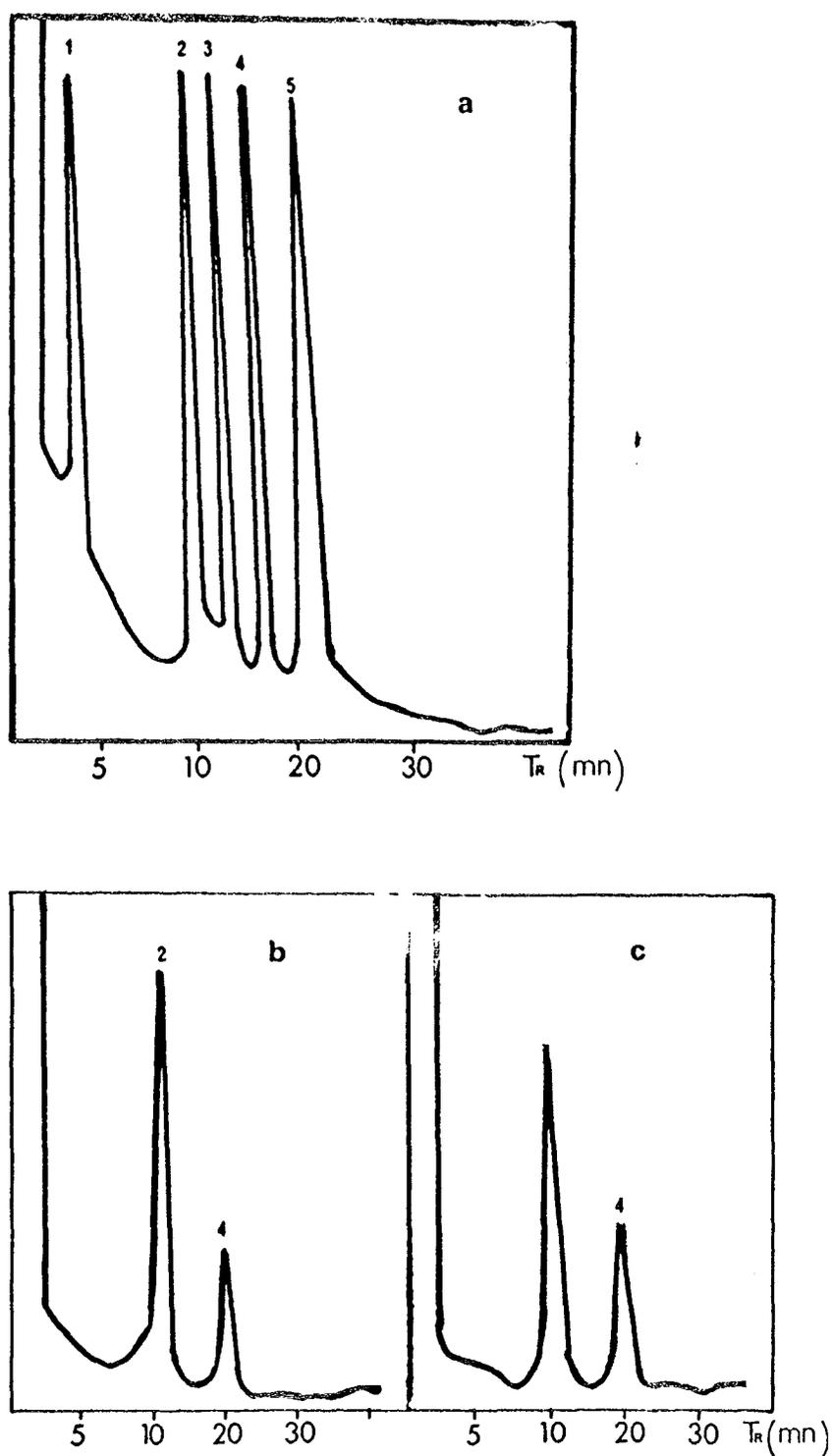
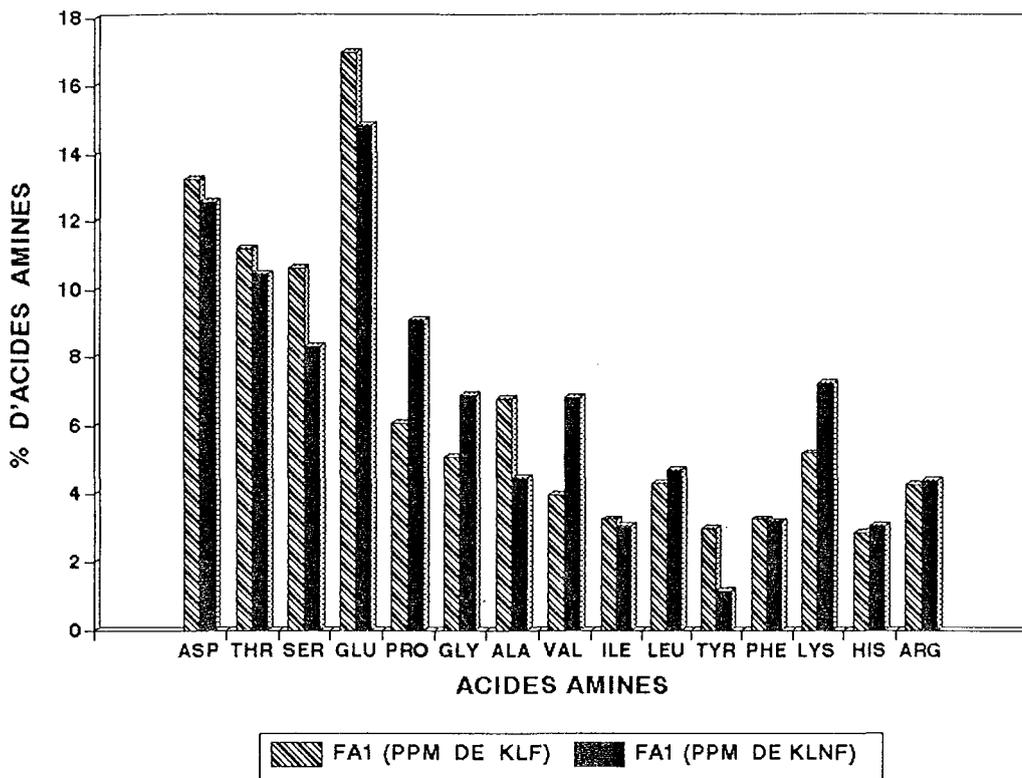


Fig. 131: Chromatogrammes des acétates d'alditols des produits temoins(a):(1)fucose,(2) mannose, (3) galactose (4) glucose,(5) inositol; et des produits d'hydrolyse des fractions (A1) des PPM de *K. lactis* floculante (b) et non floculante (c)

TABLEAU 51 : Composition en acides aminés des fractions
(A1) des PPM de *K. lactis* floculante et
non floculante

	A1 (KLF)		A1 (KLNF)	
AA	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	15,93	13,26	20,19	12,58
Thr	13,44	11,18	16,74	10,43
Ser	12,75	10,61	13,30	8,29
Glu	20,36	16,95	23,82	14,84
Pro	7,23	6,07	14,56	9,07
Gly	6,09	5,07	11,07	6,89
Ala	8,12	6,76	7,15	4,45
Val	4,78	3,98	10,92	6,80
Ile	3,88	3,23	4,83	3,01
Leu	5,14	4,28	7,53	4,69
Tyr	3,56	2,96	1,78	1,10
Phe	3,90	3,24	5,10	3,17
Lys	6,39	5,19	11,60	7,22
His	3,42	2,84	4,88	3,04
Arg	5,13	4,27	7,02	4,37
Total	120,12	99,89	160,49	99,95
GLcN	9,31		12,75	

(Résultats exprimés en % de matière sèche)



HISTOGRAMME 8: Variation de la teneur en acidesaminés des fractions A1 des PPM de *K. lactis* flocculante et non flocculante

III.4. TITRATION DES PPM

L'ensemble des résultats obtenus atteste la présence du phosphore dans toutes les fractions mannoprotéiques et elle est plus marquée dans les fractions issues des levures floculantes.

La forme sous laquelle se trouve le phosphore peut-être modifiée par le mode d'extraction et de purification des PPM. Ainsi les traitements acide ou basique entraînent une dégradation des groupements phosphates labiles faisant passer le phosphate des PPM de la forme diester à la forme monoester (STEWART et BALLOU, 1968).

Nous avons réalisé une titration des PPM par pH-métrie afin de déterminer l'acidité d'une part, et dans une certaine mesure, le type de liaison ester, d'autre part, qui existe dans les PPM des levures floculantes et non floculantes.

Les mannanes sont d'abord filtrés sur une colonne de DOWEX 50 H⁺ et élués avec de l'eau distillée. L'éluant est titré par une solution de NaOH 0,0025 N, le pH est mesuré avec un pH-mètre.

La figure 132 illustre les courbes de titration, qui permettent de conclure que le phosphore est diestérifié. En effet nous n'observons qu'un seul point d'inflexion.

Par ailleurs, la quantité de NaOH nécessaire à la neutralisation des PPM des levures floculantes est supérieure à celle des levures non floculantes; ce qui étaye les résultats précédents indiquant que les PPM des levures floculantes sont plus riches en phosphore.

III.5. PRECIPITATION DES PPM PAR LA CONCAVALINE A (CONA)

L'interaction entre les PPM des levures et la concanavaline A (conA) a été utilisée par certains auteurs pour mettre en évidence d'éventuelles différences de structure de ces polysaccharides (BIELY et al., 1976; OKUBO et SUZUKI, 1978).

La concanavaline A est une lectine capable de réagir avec certains polysaccharides ayant une structure formée de résidus α -glucopyranosyl, α -D-mannopyranosyl, β -D-fructo-furanosyl ou α -D-arabino-furanosyl en position terminale non réductrice.

La réaction de précipitation des fractions (A1) issus des PPM extraits des levures entières, selon la méthode de PEAT modifiée, par la Con A a été réalisée selon la méthode d'OKUBO et SUZUKI (1978).

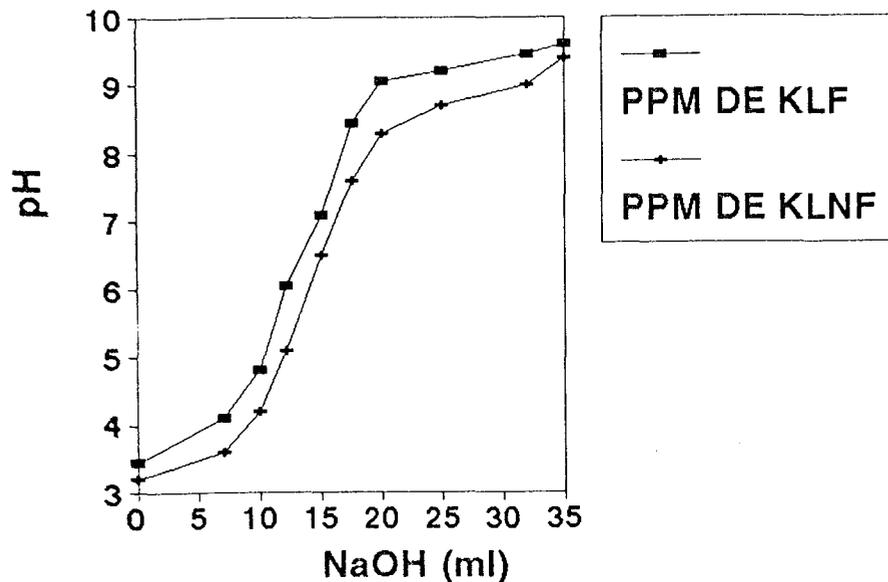


Fig. 132: Courbes de titration des PPM (fraction A1) de *K. lactis* flocculante et non flocculante par NaOH 0,0025N

Après sédimentation pendant 12 heures à température ambiante, le précipité est séparé par centrifugation à 4000 g.

Les quantités de PPM précipitées par la ConA sont évalués par le dosage des oses neutres et des protéines totales dans les précipités obtenus.

Bien que les courbes de précipitations soient similaires pour les PPM de levures flocculantes et non flocculantes nous constatons, toutefois que la Con A a une plus grande affinité pour les PPM issus des levures flocculantes. Ce qui peut s'expliquer par une structure plus ramifiée et une teneur en phosphate plus élevée des PPM de la levure flocculante par rapport à ceux de la levure non flocculante.

Par ailleurs, la figure 133 montre également que les quantités de protéines précipitées par les PPM des levures flocculantes sont plus élevées que celles précipitées par les PPM des levures non flocculantes.

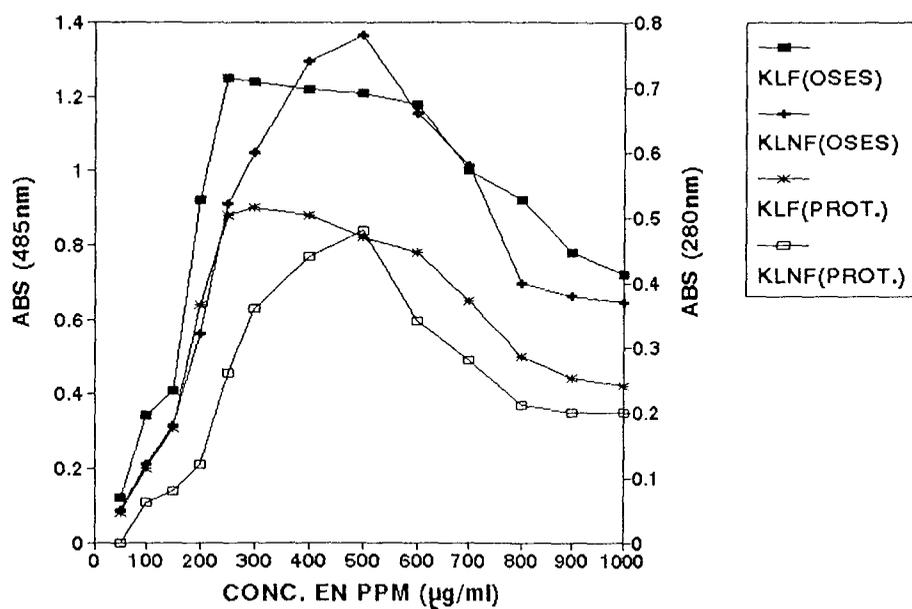


Fig. 133: Courbes de précipitation des PPM (fractions A1) de *K.lactis* flocculante (KLF) et non flocculante (KLNf), par la ConA

Les rapports molaires (oses/protéines) des précipités obtenus avec les PPM de KLF et ceux de KLNf sont respectivement de 2,06 et 3,80. Ils indiquent que les PPM de KLF ont une capacité de fixer et de précipiter la Con A plus élevée que celle des PPM de KLNf.

Comme nous l'avons déjà signalé, selon certains auteurs, l'intensité de la réaction des PPM de *K.lactis* flocculante, avec la Con A est liée à leur degré élevé de ramification (GOLDSTEIN et al., 1973) et de phosphorylation (OKUBO et al., 1978), mais également à leur nombre de groupements pyranoses en position terminale non réductrice (LIS et SHARON, 1986) et à la composition anomérique de la liaison des unités mannose (BALLOU et al., 1974).

D'après ces résultats et ceux de l'analyse chimique globale, il apparaît que les PPM des levures flocculantes se distinguent de ceux des levures non flocculantes au moins par leur degré de ramification et de phosphorylation.

IV. ACETOLYSE DES PPM EXTRAITS DES CELLULES ENTIERES DE LEVURE

IV 1. ANALYSE DES PRODUITS "BRUTS" D'ACÉTOLYSE

Les PPM extraits des cellules entières, dialysés et les PPM purifiés par chromatographie sur Biogel A5M (fractions A1) ont été soumis à une acétolyse. Par chromatographie, sur Biogel P2 des acétolysats des différents PPM, nous avons séparé 6 composés. Les profils d'acétolyse sont indiqués par les figures 134a et 134b.

Nous avons d'abord identifié les différentes sous-fractions par leurs volumes d'élution à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie (figure 135, a et b). Par évaluation de la surface des pics obtenus, nous avons estimé les rapports de chaque fraction par rapport au mannose. Les résultats sont indiqués sur les tableaux 52, 53, 54 et 55.

De l'ensemble des résultats nous déduisons :

- Les profils d'acétolyse des 4 PPM sont similaires

- Les fractions correspondant aux pics I et II sont constituées de mono et disaccharides; ceci est valable aussi bien pour les PPM des levures floculantes que les PPM des levures non floculantes. Ces fractions sont constituées exclusivement d'oses neutres.

- D'après la courbe étalon, les fractions III correspondent à des trisaccharides. Toutefois l'analyse chimique de cette fraction fait apparaître la présence du phosphore dont la teneur est plus élevée dans les PPM des levures floculantes. La glucosamine est à l'état de trace. Cette analyse laisse penser que cette fraction serait vraisemblablement constituée en majeure partie de disaccharides phosphorylés.

- Les fractions IV ont une masse moléculaire correspondant à des tétrasaccharides qui représentent la majeure partie des produits d'acétolyse. La présence de phosphore à l'état de trace indiquerait la présence en faible teneur de tétrasaccharides phosphorylés notamment dans les PPM de levures floculantes. Les fractions IV des levures non floculantes contiennent de la glucosamine et seraient alors constituées en majeure partie de disaccharides liés à la N-acétyl-glucosamine.

- Les fractions V, moins représentatives dans les PPM des levures floculante et non floculante contiennent du phosphore et de la glucosamine; elles seraient alors constituées soit d'oligosaccharides phosphorylés ou liés à de la N-acétyl-glucosamine. Leur masse moléculaire est comprise entre celui des penta et hexasacharides.

- Les fractions VI sont exclues du Biogel P2, leurs masses moléculaires sont donc supérieures ou égales à 1800 daltons. Elles sont constituées d'oses neutres, d'osamines, d'acides aminés et du phosphore.

- Les oses neutres de ces fractions (VI) proviendraient des oligosaccharides liés à la sérine et /ou à la thréonine par des liaisons O-glycosidiques (BALLOU 1976). Ces oligosaccharides sont résistants à l'acétolyse et sont donc composés d'unités mannose liées entre elles par des liaisons (1→2) et (1→3) (YAMADA et al., 1983).

Les acides aminés mis en évidence dans ces fractions représentent la partie protéique des PPM; alors que la N-acétyl-glucosamine correspondrait probablement aux unités N-acétyl-chitibiose restée liée à la partie protéique des PPM (NAKAJIMA et BALLOU, 1970). Dans ces fractions il y a vraisemblablement des éléments constitutifs de l'"inner corr" des PPM.

L'analyse des produits d'acétolyse "bruts" montre que les PPM des levures floculantes referment plus de tri et tétraoses par rapport à ceux des levures, non floculantes, bien que les profils soient similaires. Ce résultat plaide en faveur d'un degré de ramification des PPM de levures floculantes, plus élevé que celui des PPM de levures non floculantes.

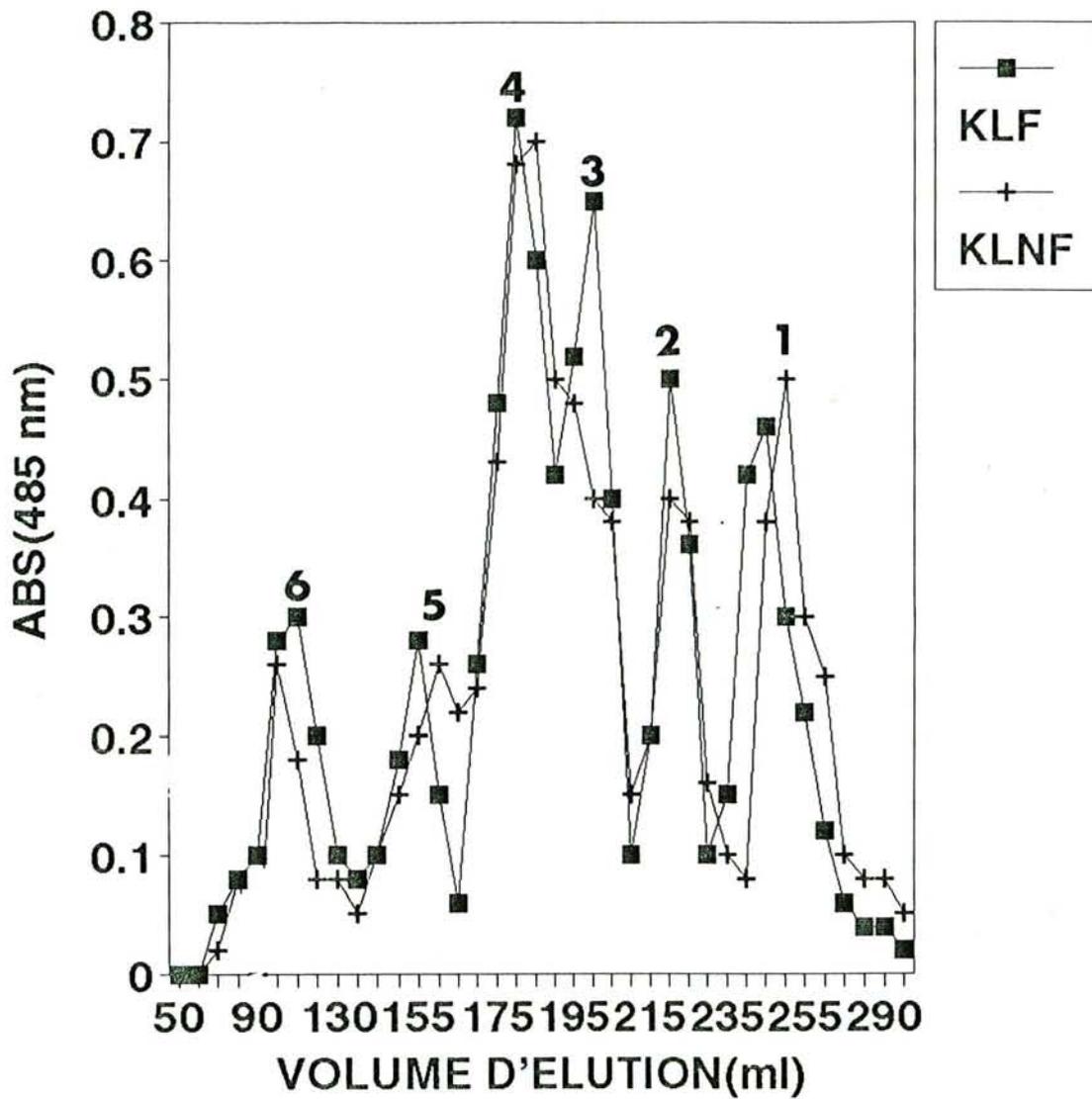


Fig. 134(a): Profil d'élution sur Biogel P2 des produits d'acétolyse issus des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* flocculante(KLF) et non flocculante(KLNF)

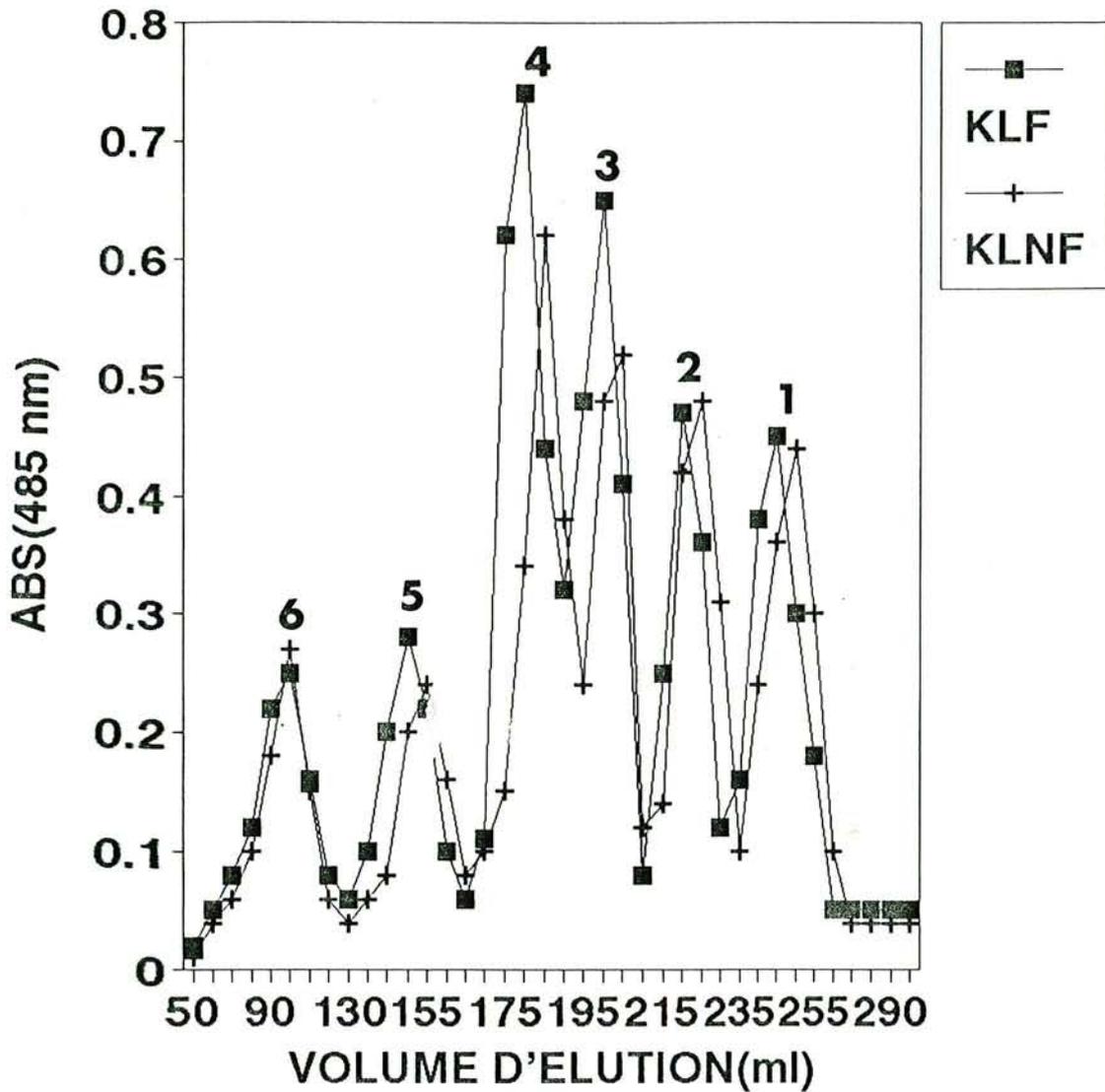


Fig. 134(b): Profil d'élution sur Biogel P2 des produits d'acétolyse issus des PPM purifiés (fractions A1) de *K. lactis* floculante(KLF) et non floculante(KLNF)

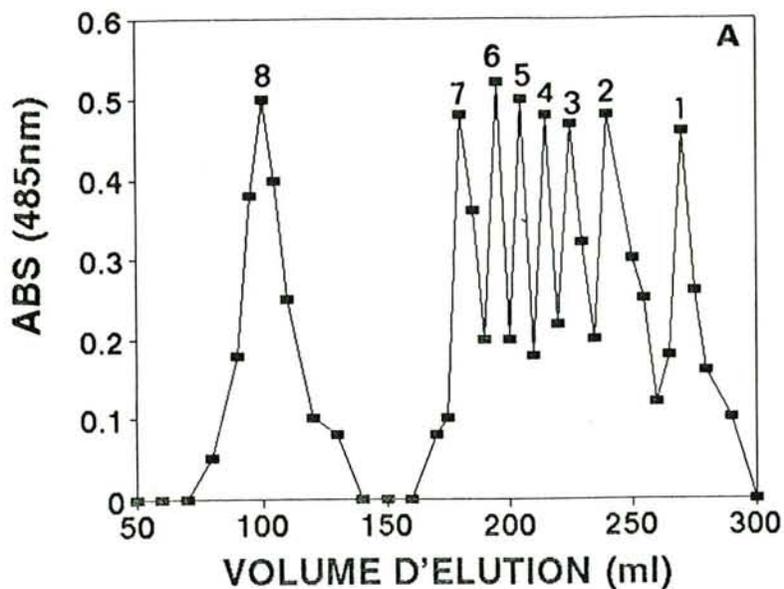


Fig. 135(a): Profil d'élution sur Biogel P2 des étalons:
 (1) mannose, (2) maltose, (3) maltotriose,
 (4) maltotétraose, (5) maltopentose, (6)
 maltohexose, (7) maltohéptanose, (8) dextrane
 (PPM) 9.200)

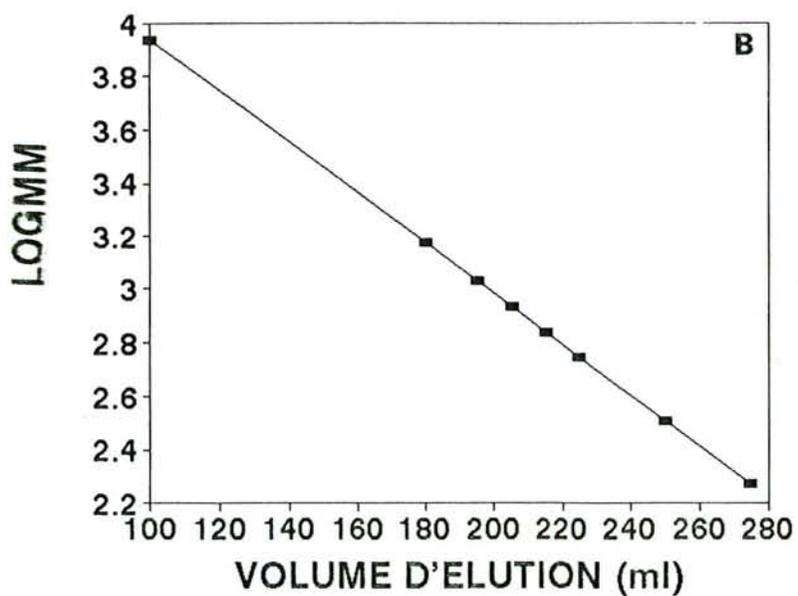


Fig. 135(b): Courbe d'étalonnage de la colonne de Biogel P2

TABLEAU 52 : Composition chimique globale des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM "bruts" dialysés de KLF

CONSTITUANT	MM	R	OSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
SOUS-FRACTIONS						
I	182	1	++++	-	-	-
II	363	1,2	+++	-	-	-
III	536	1,8	++	-	±	T
IV	728	2,4	++	-	±	-
V	940	0,3	++	-	+	-
VI	≥1800	0,7	+	+	-	±

TABLEAU 53: composition chimique globale des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM "bruts" dialysés de KLNf

CONSTITUANT	MM	R	OSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
SOUS-FRACTIONS						
I	185	1	+++	-	-	-
II	367	1,22	+++	-	-	-
III	528	1,1	++	-	T	±
IV	734	1,30	++	-	-	±
V	920	0,36	++	-	T	±
VI	≥1800	0,8	+	+	-	T

- (R) : rapport exprimé en considérant le nombre de moles de mannose
(T) : état de trace
(-) : non détectable par dosage chimique
(+++) : constituants majeurs
(++) : constituants prédominants
(+) (±) : détectable par dosage chimique

TABLEAU 54: Composition chimique globale des sous-fractions issues de l'acétolyse des PPM purifiées (Fraction A1) de *K. lactis* floculante

CONSTITUANTS	MM	R	OSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
SOUS-FRACTIONS						
I	184	1	+++	-	-	-
II	362	1,25	+++	-	-	-
III	532	2,01	++	-	T	T
IV	724	2,5	++	-	±	T
V	950	0,42	++	-	T	T
VI	≥1800	0,84	+	+	-	±

TABLEAU 55: Composition chimique globale des sous-fraction issues de l'acétolyse (fraction A1) des PPM purifiées *K. lactis* non floculante

CONSTITUANTS	MM	R	OSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
SOUS-FRACTIONS						
I	178	1	+++	-	-	-
II	363	1,26	+++	-	-	-
III	520	0,98	++	-	T	±
IV	718	1,4	++	-	-	-
V	930	0,40	++	-	T	±
VI	≥1800	0,86	+	+	-	±

IV.2. ANALYSE DES PRODUITS D'ACÉTOLYSE "NEUTRES" ET "CHARGES" APRES FRACTIONNEMENT SUR DEAE SEPHADEX

Pour vérifier les observations faites sur les fractions des acétolysats "bruts" après filtration sur Biogel P2, Nous avons procédé au fractionnement des acétolysats issus des PPM, sur une colonne de DEAE-Sephadex.

Selon certains auteurs SAKAGUICHI et al., (1967), le fractionnement des mannanes sur DEAE-Sephadex (sous forme d'acétate) donne des mannanes "neutres" et "chargés"; les premiers montrent un seul pic par électrophorèse et par ultracentrifugation, tandis que les seconds contiennent de faibles teneurs en phosphore et en protéines.

STEWART et BALLOU (1968) ont appliqué cette méthode de fractionnement sur les acétolysats de mannanes de levures.

Pour séparer les différents types de polymères, des acétolysats de chaque PPM purifié (fraction A1) de *K. lactis* floculante et non floculante; ont été d'abord filtrés sur une colonne de DEAE Séphédax A-254 (échangeuse d'anions).

Les polymères "neutres" sont élués avec du NH_4HCO_3 0,005M et les polymères "chargés" avec du NH_4HCO_3 0,5 M, selon le protocole préconisé par STEWART et BALLOU (1968) modifié par OKUBA et al., (1978) et décrit par MRAWALA (1990)

Après séparation des acétolysats sur colonne Sephadex A-25, nous avons évalué les quantités de polymères "neutres" et "chargés". Les résultats sont rassemblés dans le tableau 55. Nous constatons que l'acétolyse, des PPM de *K. lactis* floculante ou non floculante, n'est pas complète. En effet 29 et 32 % environ des produits PPM de levures floculante et non floculante respectivement, résistent à l'acétolyse. Cette résistance à l'acétolyse est souvent expliquée par les durées de la réaction d'acétolyse appliquées qui sont insuffisantes (KOBAYASHI et al., 1986).

TABLEAU 55: Rendements en produits issus de l'acétolyse des PPM de *K. lactis* flocculante et non flocculante après filtration sur DEAE-Sephadex

		PRODUITS DISSOUTS PAR ACETOLYSE							PRODUITS RESISTANTS A L'ACETOLYSE	
POLYMERES		"NEUTRES"		"CHARGES"		TOTAL		RAP- PORT		
PPM										
Sou- ches	Quantités totales (mg)	Quan- tités (mg)	%	Quan- tités (mg)	%	Quan- tités (mg)	%	$\frac{N}{C}$	Quanti- tés (mg)	%
KLF	120	60,6	50,5	26,5	22,08	87,10	72,58	2,28	32,9	27,41
KLNF	120	60,2	50,16	21,1	17,58	81,30	67,75	2,85	38,70	32,25

N : neutres
C : chargés

IV.2.1. ANALYSE DES POLYMERES "NEUTRES"

Par chromatographie sur Biogel P2 des polymères "neutres" nous avons obtenu 5 pics dont un est exclu du gel (figures 136 a et b).

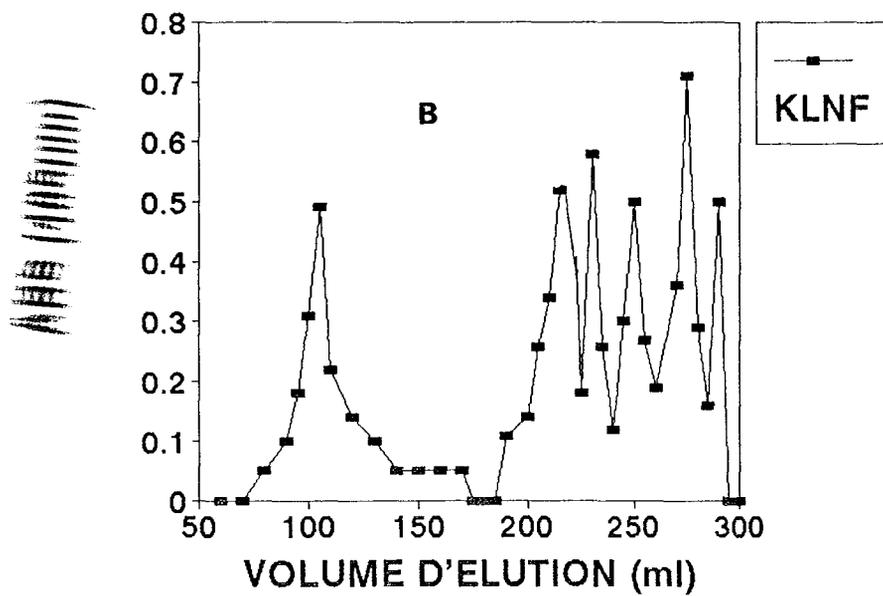
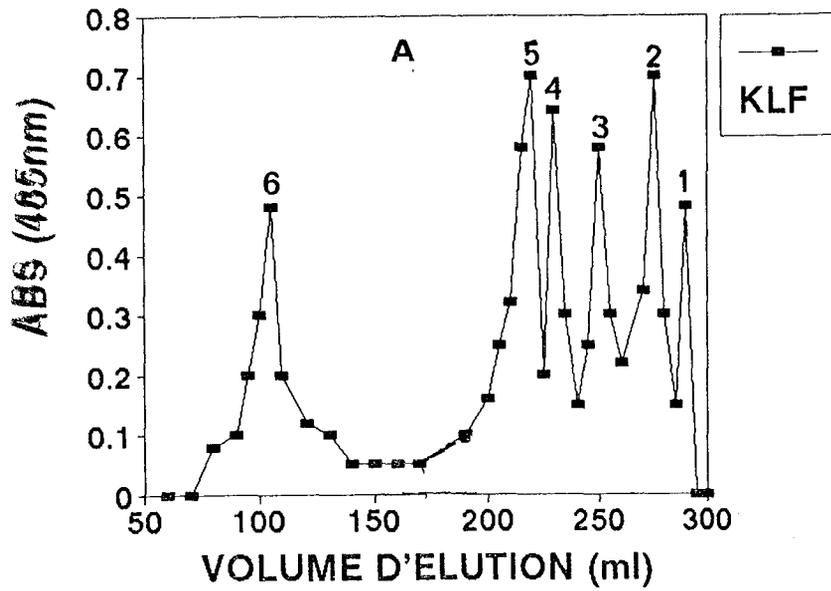
Les spectres d'élution des acétolysats des PPM de levures floculantes et non floculantes sont similaires. Les fractions de polymères "neutres" ainsi obtenues ont été analysées.

Les rapports molaires et la composition chimique des différentes fractions sont indiqués dans le tableau 56. Les résultats font apparaître que le pic exclu du biogel P2 correspond à un polysaccharides de haut poids moléculaire. L'analyse chimique montre que les polymères "neutres" des PPM de la levure floculante se caractérisent par la prédominance des fractions III et IV par rapport à ceux des levures non floculantes.

Les différentes sous-fractions obtenues par filtration sur Biogel P2 ont été ensuite identifiées par chromatographie sur couche mince de gel de silice, à l'aide de témoins étalons. Les rapports frontaux des oligosaccharides témoins et des constituants des différentes sous-fractions sont rassemblés dans le tableau 57.

D'après les résultats de la CCM les polymères "neutres" sont constitués de 6 fractions correspondant aux mono, di, tri et tetrasaccharides. La fraction V peut correspondre soit à un tetrose soit à un pentose ($R_f \approx 0,30$ et $0,29$ respectivement pour les PPM de la levure floculante et non floculante).

Les variations des rapports molaires déterminés après séparation par CCM indiquent la richesse particulière des polymères "neutres" des PPM de KLF en tri et tetrasaccharides; (tableau 58); ceci confirme les résultats précédents.



136: ~~=====~~ profil d'élution sur Biogel P2 des polymères
~~=====~~ "autres" issus des PPM de *K. lactis* flocculante(a)
~~=====~~ non flocculante(b)

TABLEAU 56 : Rapports molaires et composition chimique des sous-fractions de polymères "neutres" issus de l'acétolyse des fractions A1 des PPM de *K. lactis* floculante et non floculante

SOUCHES	SOUS - FRACTIONS	RM	COMPOSITION CHIMIQUE			
			OSSES NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
KLF	I	1,0	++	-	-	-
	II	1,27	++	-	-	-
	III	2,30	++	-	-	-
	IV	3,01	++	-	-	-
	V	0,20	++	-	-	-
KLNF	I	1,0	++	-	-	-
	II	1,26	++	-	-	-
	III	1,12	++	-	-	-
	IV	2,6	++	-	-	-
	V	0,29	++	-	-	-

(++) : composés majeurs ($\approx 100\%$)

(-) : non détecté par l'analyse chimique

RM : rapport estimé en considérant le nombre de moles de mannose

P : phosphore

GlcN : glucosamine

TABLEAU 57: Rapports frontaux des oligosaccharides temoins et des sous- fractions issues des polymères "neutres" des acétolysats des PPM de *K. lactis*; obtenus par CCM

TEMOINS	RF	SOUS- FRACTIONS	KLF	KLNF
			RF	RF
Mannose	0,72	I	0,70	0,73
Mannobiose	0,63	II	0,64	0,61
Mannotriose	0,47	III	0,45	0,44
Mannotétraose	0,36	IV	0,33	0,35
Mannopentose	0,25	V	0,30	0,29
Dextrane PM>1.800	0,1	VI	0,09	0,08

TABLEAU 58: Rapports molaires des sous-fractions des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des fractions A1 des PPM de *K. lactis* après séparation par CCM

SOUS- FRACTIONS	F I	F II	F III	F IV	F V	F VI
	SOUCHES					
KLF	1,0	1,24	2,28	3,10	0,47	0,12
KLNF	1,0	1,20	1,14	2,80	0,54	0,14

IV 2.2 ANALYSE DES POLYMERES "CHARGES"

L'analyse des polymères "chargés" obtenus par fractionnement sur colonne de DEAE-Sephadex et après élution sur colonne de Biogel P2 met en évidence 4 fractions dont l'une est exclue du Biogel (Figure 137 a et b). La fraction IV exclue du Biogel P2 représente la fraction la moins importante aussi bien pour les PPM des levures floculantes que pour ceux des levures non floculantes.

Les différentes fractions des polymères "chargés" ont été analysées et caractérisées par chromatographie sur couche mince. La composition chimique des différentes fractions est indiquée par le tableau 59.

TABLEAU 59: Composition chimique globale des fractions d'acétolysats des polymères "chargés" issus des PPM de *K. lactis* floculante et non floculante

SOUCHES	FRACTIONS	RM	OSÉS NEUTRES	ACIDES AMINES	P	GlcN
KLF	I	1,0	++	-	-	-
	II	0,8	++	-	±	-
	III	0,94	+	-	+	-
	IV	0,27	+	±	±	±
KLNF	I	1,0	++	-	-	-
	II	0,72	++	-	±	-
	III	0,82	+	-	±	
	IV	0,37	+	+	±	±

- RM : Rapport exprimé par rapport au mannose
 (++) : Composé majeur
 (+) : Dosable par la méthode chimique
 (±) : Détectable par la méthode chimique
 (-) : Non détecté par l'analyse chimique

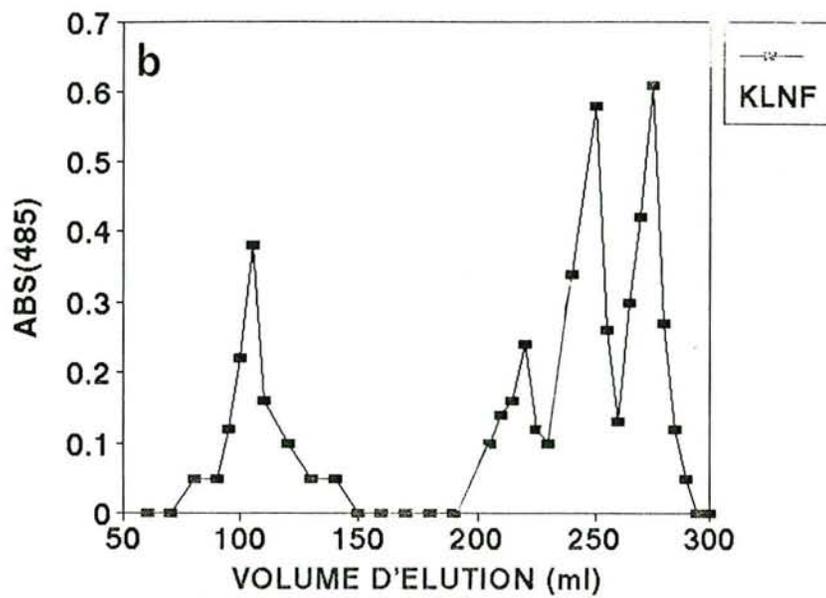
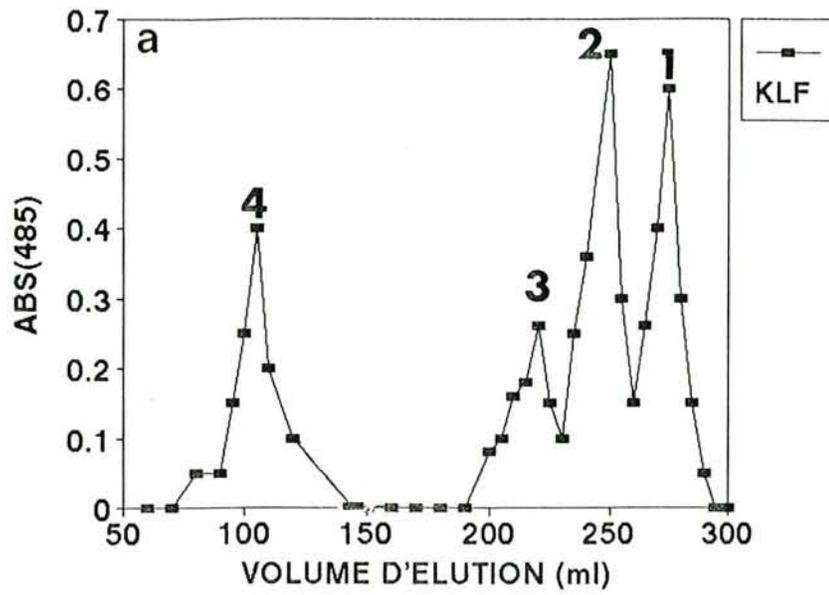


Fig. 1 a,b): Profil d'élution sur Biogel P2 des polymères "chargés" issus des PPM de *K. lactis* flocculante (a) et non flocculante (b)

L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions de polymères "chargés" séparés par filtration sur Biogel P2 permet de retenir les points suivants:

- La fraction IV, de masse moléculaire élevée et exclue de Biogel ne migre pas en CCM. L'analyse chimique révèle la présence de mannose, d'acides aminés, du phosphore et des traces d'hexosamines.

- Les fractions II et III renferment des oses (mannose) et du phosphore. Pour obtenir une bonne migration, elles sont déphosphorylées par traitement à la phosphatase alcaline, préalablement. D'après les résultats, ces fractions sont constituées de disaccharides phospholorylés; ces derniers sont quantitativement plus élevés dans les fractions issues des PPM de levures floculantes. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par l'analyse chimique des acétolysats des PPM "bruts" dialysés.

- Les fractions I sont identifiées aux mannosaccharides. Leur teneur est sensiblement voisine pour les fractions des PPM de levures floculantes et non floculantes.

V. D I S C U S S I O N

L'étude des phosphopeptidomannanes isolés de cellules entières de levures floculantes et non floculantes, cultivées dans des conditions identiques, montre un certain nombre de différences en relation avec le caractère floculant.

Les quantités globales de PPM extraites indiquent une augmentation de 5% environ lorsque la levure flocule. De telles observations ont été faites pour d'autres levures notamment *Saccharomyces cerevisiae* (JEUNEHOMME-RAMOS et al., 1964), *Kluyveromyces bulgaricus* (AL MAHMOOD, 1987); *Saccharomyces uvarum* (AMRI et al., 1982; SALHI, 1986), et *Kluyveromyces lactis* (MANGUNWIDJAJA, 1988). Ces auteurs ont extrait par la même méthode des quantités de PPM plus élevées à partir de levures potentiellement floculantes. Ces polymères seraient donc des agents qui jouent un rôle important en régulant, au moins, l'intensité de la floculation. Cependant, ces observations ne sont pas générales, en effet MILL (1964), GRIFIN et WILLIAM (1969) et plus récemment MBAWALA (1990), n'observent pas de différences significatives entre les quantités de PPM extraites à partir de levures *S. cerevisiae* et *P. pastoralis* floculantes et celles extraites des souches non floculantes.

L'analyse chimique montre que les PPM des levures floculantes contiennent plus d'oses neutres et environ deux fois plus de phosphore et de calcium que les PPM des levures non floculantes qui sont, en revanche, plus riches en acides aminés et en hexosamines. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs notamment LYONS et HOUGH (1971), JAYATISSA et ROSE (1976) AL MAHMOOD (1987).

La teneur élevée, des PPM de la levure floculante en phosphore indiquerait que cet élément est impliqué dans le mécanisme de floculation de *K. lactis*. Selon certains auteurs (STEWART et BALLOU 1968, puis AL MAHMOOD et al. 1987), les rapports molaires (phosphore/mannose) dans les PPM isolés de cellules floculantes de *Saccharomyces*, *Candida* et *Kluyveromyces*, augmentent de 30 à 60 % par rapport à ceux de levures non floculantes du même genre. Le phosphore agirait indirectement sur la floculation c'est-à-dire au niveau du métabolisme de la levure en modifiant la structure de surface; cependant il n'est pas exclu qu'il ait une action directe, notamment dans la formation de pont calcique, puisque sa teneur augmente dans les PPM des levures floculantes.

L'évaluation des teneurs en PPM des levures floculantes s'accompagne d'un enrichissement en calcium dont le rôle dans le mécanisme de floculation a été mis en évidence par de nombreux auteurs (AMRI et al. 1981) STEWART et RUSSEL, (1981).

La variation des teneurs en acides aminés des PPM avec notamment l'augmentation de l'acide glutamique et la diminution de la proline pourrait être l'indice d'une réorganisation structurale de la protéine des PPM. L'état floculant des levures *K. lactis* se caractérise donc par un réarrangement structural des PPM pariétaux.

Les PPM "bruts" dialysés, isolés des cellules entières ont été purifiés par filtration sur colonne de Biogel A5M qui permet d'obtenir, pour chaque PPM, deux fractions dont les plus importantes ont des masses moléculaires estimées respectivement à $430 \cdot 10^3$ et $405 \cdot 10^3$ daltons pour les fractions (A1) des levures floculante et non floculante. Les fractions mineures représentent environ 5 à 6% des PPM totaux et ont des masses moléculaires de 46 et $42 \cdot 10^3$ daltons.

Il résulte de l'analyse chromatographique associée à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS que les fractions impliquées dans le phénomène de floculation de *K. lactis* ont des masses moléculaires élevées.

La titration des PPM par NaOH a permis de constater que le phosphore des PPM de *K. lactis* serait lié sous forme diester.

Toutefois il faut noter que cette forme varie selon la méthode d'extraction; en effet lorsque les PPM sont isolés selon la méthode de THIEME et BALLOU (1970), MBAWALA (1990) a constaté que le phosphate est lié sous forme de monoester dans les PPM de *P. pastoris* floculante. D'une manière générale, le phosphore est présent dans les PPM des levures sous deux formes, soit sous forme phosphomonoester (un groupement phosphate substitué par un résidu palymannosyl) soit sous forme de phosphodiester (un groupement phosphate substitué par deux résidus palymannosyls). Plusieurs auteurs ont montré que le phosphore dans les mannanes des levures notamment *Saccharomyces cerevisiae*, est sous forme de phosphodiester (BALLOU et al., 1974, SHIBATA et al.1983). D'autres travaux ont mis en évidence le rôle du phosphore dans le mécanisme de floculation en participant à la formation de ponts calciques (LYONS et HOUGH, 1971); par la suite CAWLEY et BALLOU (1972) ont montré que le phosphore des mannanes est impliqués dans les structures de type phosphodiester et ne peut donc pas fixer des ions calcium. Par une hydrolyse HCl (10mM) et une filtration sur Biogel P2, AL MAHMOOD et al., (1987) ont constaté que les phosphates dans les mannanes de *K.bulgaricus* floculante sont impliqués dans des structures phosphomonoesters.

Les courbes de précipitation des PPM par la ConA indiquent que les quantités précipitées sont plus élevées pour les PPM des levures floculantes. Les rapports molaires oses/ protéines des précipités obtenus montrent que les PPM de la levure floculante ont une capacité de fixer et de précipiter la ConA qui est 3 fois plus élevée que celle des PPM de la levure non floculante.

Ce résultat suggère que les sites des PPM de levures floculantes diffèrent de ceux des PPM de levures non floculantes, ces derniers seraient caractérisés par la présence d'une structure qui ne reconnaît pas la ConA. En effet, d'après TKACZ et al., (1971); MIKI et al., (1982) l'intervention des PPM dans le phénomène de floculation des levures peut-être confirmée par la capacité de ces polymères à réagir avec la conA. Cependant ces hypothèses semblent contredire les résultats obtenus par CAMPBELL et al., (1968) et CAWLEY et BALLOU (1971) sur des PPM de levures *Saccharomyces cerevisiae*; ces auteurs ont en effet montré que les PPM localisés sur les surfaces de cellules floculantes et non floculantes ont des déterminants antigéniques similaires, donc 2 structures identiques.

Par ailleurs SUZUKI et al., (1971) ont constaté que les comportements des systèmes mannanes- ConA ressemblent de très près à ceux des systèmes antigènes-anticorps représentés par les mannanes et le serum anti-*Candida albicans*. Alors que OKUBA et al., (1978) ont remarqué que la réactivité immunochimique des mannanes de *S.cerevisiae* est proportionnelle à leur teneur en

phosphore aussi bien qu'à leur degré de ramification. Nos observations concordent avec ces derniers résultats.

L'acétolyse effectuée sur les PPM de *K.lactis* floculante et non floculante a permis de mettre en évidence que la chaîne de base est formée de liaisons α (1 \rightarrow 6). Ces résultats ont été souvent obtenus pour les structures des mannanes pariétaux d'autres levures telles que *Saccharomyces*, *Candida* et *Kluyveromyces*. Ainsi ROSENFELD et BALLOU (1974) ont montré que l'acétolyse de disaccharides à D-mannose est plus efficace sur les liaisons α (1 \rightarrow 6). Cette efficacité décroît lorsque les mannanes ont des structures α (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) et α (1 \rightarrow 2); ceci montre que les liaisons (1 \rightarrow 6) sont plus sensibles à l'acétolyse que les autres liaisons constituant les mannanes.

Les profils d'élution des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM de *K.lactis* floculante et non floculantes sur Biogel P2 donnent 5 fractions dont une est exclue du gel. présence de ce polymère exclu du gel montre que l'acétolyse n'est pas complète. Cette observation est expliquée par la durée insuffisante de la réaction d'acétolyse. En effet KOBAYASHI et al., (1986) ont montré que des réactions d'acétolyse de durée plus élevée (36h à 120h) dégradent complètement les liaisons α (1 \rightarrow 6) libérant ainsi des oligosaccharides de faible masse moléculaire. Cependant, de telles conditions dégradent également les chaînes latérales renfermant des liaisons labiles telles que β (1 \rightarrow 2). Les mêmes profils font apparaître 4 fractions de faibles masses moléculaires; il s'agit de mono, di, tri et tétrasaccharides. Nous remarquons que les PPM de la levure floculante se caractérisent par leur teneur élevée en tri et tétrasaccharides, alors que ceux de la levure non floculante par leur teneur en disaccharides. Ceci fait apparaître la structure plus ramifiée des PPM de *K.lactis* floculante; cependant les profils d'acétolyse des PPM des deux souches restent similaires.

Le fractionnement des acétolysats sur DEAE-Sephadex nous a permis de séparer des polymères "chargés" dont le profil d'élution sur Biogel P2 fait apparaître 4 pics dont un exclu, pour les PPM des 2 souches. L'analyse de ces fractions met en évidence un disaccharide phosphorylé abondant dans les PPM de la levure floculante. Un tel résultat a été rapporté par ALMAMOOD et al., (1987) après acétolyse des PPM de la levure *Kluyveromyces bulgaricus*. Toutefois DEWAERD et al., (1989) et MBAWALA et al., (1990) n'observent pas de différences dans les proportions de cet oligosaccharide phosphorylé en rapport avec la floculation des levures *Pichia pastoris*. Ces auteurs ont constaté une diminution de la valeur du déplacement chimique du

proton anomérique du résidu mannose portant le groupement phosphate comparativement au même résidu mannose après déphosphorylation.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la floculation de *K.lactis* fait intervenir des structures pariétales de nature phosphopeptidomannane qui se distinguent de celles des levures non floculantes, au moins, par leur degré de ramification et de phosphorylation.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA FLOCCULATION DES SOUCHES
K. LACTIS OBTENUES PAR CROISEMENT DES
SOUCHES PRECEDENTES (KLF x KLNf)

I. I N T R O D U C T I O N

Afin de préciser si des mécanismes différents interviennent dans chaque cas de floculation des levures, nous avons étudié dans cette seconde partie quatre souches de *Kluyveromyces lactis* haploïdes floculantes ou non floculantes, issues d'un croisement des deux souches précédemment étudiées. Nous avons examiné l'influence de quelques paramètres du milieu sur la croissance et la floculation puis analysé les constituants macromoléculaires impliqués dans l'agrégation cellulaire.

Ces souches ont été obtenues par dissection d'un asque contenant quatre spores désignées par a,b,c,et d; ces lettres sont précédées par un nombre qui représente le numéro d'ordre de l'asque micromanipulé. La dissection d'un asque donne à partir, de spores isolées, des clones haploïdes α et $\bar{\alpha}$ (GALZY, 1984).

Selon NOVOTY et al., (1983), à partir d'un asque, on obtient quatre types de spores possible: $\bar{\alpha}$ et α hétérothalliques et a et α homothalliques. La détermination du signe a ou α et le caractère homo ou hétérothallique, montre qu'il n'y a pas de relation entre, d'une part le signe sexuel et, d'autre part entre le type de spores et le caractère homo ou hétérothallique.

Une étude réalisée sur 40 souches du même type de croisement (KLF X KLNf) a montré qu'il n'existe pas de relation entre la floculation de ces souches et les caractères sexuels (homo ou hétérothallique) et les signes $\bar{\alpha}$ et α (MANGUNWIDJAJA 1988).

Rappelons que chez les levures on distingue la floculation et l'agglutination sexuelle (MIKI et al. 1980; LIPKE et HULLPILBURY, 1984). L'agglutination sexuelle est en fait la reconnaissance entre deux types de cellules sexuellement différentes c'est-à-dire l'une de signe α et l'autre de signe $\bar{\alpha}$

D'après MANGUNWIDJAJA (1988) l'analyse du signe sexuel et de la floculation des souche "filles" obtenues par croisement de 2 souches floculante et non floculante, ayant des caractères différents, permet de déterminer l'expression phénotypique du caractère sexuel ou les signes α et $\bar{\alpha}$; il affirme alors que la floculation des levures *K. lactis* haploïdes n'a aucun caractère d'agglutination sexuelle. Par ailleurs, l'intensité de la floculation des souches "filles" haploïdes, diffère de celle des souches "mères". Ainsi des souches "filles" très floculantes ont été obtenues à partir de souche "mères" modérément floculantes.

Les caractéristiques des souches retenues pour cette seconde partie de notre expérimentation sont indiquées par le tableau 60.

TABLEAU 60: Quelques caractéristiques des levures *Kluyveromyces lactis* haploïdes utilisées

DESIGNATION	N° DE L'ASQUE	SIGNE	CARACTERE SEXUEL	CARACTERE FLOCULANT
KL9a	9	α	Homothallique	Moyennement Floculante (MF)
KL9b	9	a	Homothallique	Faiblement Floculante (FF)
KL9c	9	a	Honothallique	Très floculante (TF)
KL9d	9	α	Homothallique	Non floculante (NF)

C H A P I T R E V I I I

CROISSANCE ET FLOCCULATION DES SOUCHES

K. LACTIS ("HYBRIDES")

INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS

DU MILIEU DE CULTURE

I. CROISSANCE DES SOUCHES SUR DIVERS MILIEUX DE CULTURE

La cinétique de croissance des quatre souches *K. lactis* a été étudiée en fioles de 100 ml dans divers milieux. Les résultats montrent que ces souches se développent de façon analogue sur un même milieu (Tableau 61).

TABLEAU 61: Paramètres de croissance des souches *Kluyveromyces lactis* haploïdes dans différents milieux de cultures

MILIEUX DE CULTURE	Sab (Glc)(1)		Sab (Gal)(2)		YME(Glc) 3		YME (Gal)(4)	
	$\mu(h^{-1})$	% FLO						
KL9a	0.30	45.60	0.29	0.0	0.27	35.40	0.25	0.0
KL9b	0.31	25.30	0.30	0.0	0.28	15.30	0.26	0.0
KL9c	0.29	60.80	0.28	0.0	0.26	50.70	0.23	0.0
KL9d	0.31	0.0	0.30	0.0	0.29	0.0	0.27	0.0

- (1) :Milieu de sabouraud à base de glucose
 (2) :Milieu de sabouraud à base de galactose
 (3) :Milieu de sabouraud à base de l'extrait de levure et de glucose
 (4) :Milieu de sabouraud à base de l'extrait de levure et de galactose
 μ :Taux de croissance népérien (h^{-1})
 %FLO:Pourcentage de floculation.

Le milieu de sabouraud à base de glucose semble le plus favorable pour la croissance. Sur ce milieu les souches non floculantes ou faiblement floculantes ont une croissance légèrement plus élevée que les souches floculantes, toutefois l'allure des courbes de croissance est similaire pour toutes les souches (figure 138).

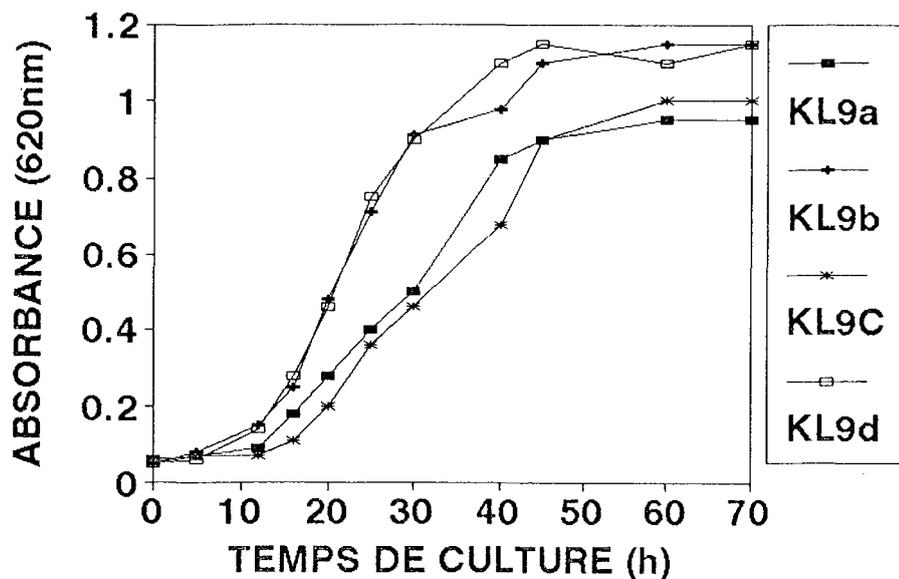


Fig. 138: Cinétique de croissance des souches *K. lactis* floculantes et non floculantes sur milieu sabouraud à base de glucose

II. FLOCCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

II.1. FLOCCULATION DES SOUCHES EN MILIEU DE SABOURAUD

La floculation des souches a été, d'abord, testée en milieu de sabouraud à base de glucose et peptone puis dans le tampon acétate de Helm (pH 4.5). Dans ces conditions nous avons déterminé le pourcentage de floculation en fonction du temps de croissance. Le tableau 62 indique que la floculation maximale est observée en phase stationnaire (après 48 heures de culture) puis on note une baisse après 72 heures de croissance.

TABLEAU 62: Influence du temps de culture sur le pourcentage de floculation des souches *K. lactis* en milieu de sabouraud à base de glucose

TEMPS DE CULTURE	24h		48h		72h	
MILIEU DE FLOCULATION	MC	TAH	MC	TAH	MC	TAH
SOUCHES						
KL9a	24.20	20.57	40.80	32.90	25.30	20.20
KL9b	12.50	10.70	15.43	10.32	10.13	9.10
KL9c	40.20	35.60	57.91	48.90	50.43	40.15
KL9d	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

MC : Floculation mesurée en milieu de culture

TAH : Floculation mesurée en tampon acétate de Helm (pH4.5)

II.2. INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS DU MILIEU SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

A partir du milieu, de sabouraud à base de glucose, qui assure, dans les conditions normales, une bonne croissance et une meilleure floculation, nous avons étudié l'effet de quelques éléments du milieu sur la floculation des souches.

Les essais préliminaires nous ont permis de constater que lorsqu'on remplace le glucose par le galactose, la croissance est faiblement modifiée alors que la floculation disparaît chez les souches potentiellement floculantes (tableau 61).

II.2.1. INFLUENCE DE L'AGITATION ET DE L'AERATION

L'étude de l'influence de l'agitation et de l'aération sur la floculation a été effectuée dans un fermenteur, en faisant varier la vitesse d'agitation et la quantité d'air introduite.

Selon certains auteurs, la floculation de *Saccharomyces cerevisiae* diminue lorsque l'agitation du milieu augmente (AIDA et NAGATANI, 1971; AMRI et al., 1981; BROHAN et MC LOUGHLIN, 1984).

Pour tester l'effet de l'aération sur la floculation de *K. lactis*, les cellules floculantes sont cultivées dans des conditions d'aération et d'agitation variables. Les résultats sont indiqués par les tableaux 63 et 63bis.

TABLEAU 63: Effet de l'aération sur la floculation des souches *K. lactis*

TAUX D'AERATION (P.O ₂ /h)	MILIEU DE CULTURE			TAMPON ACETATE		
	KL9c	KL9a	KL9b	KL9c	KL9a	KL9b
5	0	0	0	0	0	0
10	25	10	0	15	0	0
20	40	25	15	25	20	10
30	60	30	20	40	35	25
40	50	40	35	30	45	30
60	30	20	15	10	25	15

(Résultats exprimés en % de floculation)

TABLEAU 63bis: Influence de l'agitation sur la floculation des souches *K. lactis*

AGITATION (Tpm)	KL9a (MF)	KL9b (FF)	KL9c (TF)	KL9d (NF)
50	0.0	0.0	0.0	0.0
100	10	0.0	30	0.0
150	20	10	50	0.0
200	20	10	50	0.0
300	40	20	65	0.0
400	30	15	50	0.0
500	15	5	40	0.0

- Résultats exprimés en pourcentage de floculation, mesuré en milieu de culture après 48 heures de croissance.

- (Tpm): Tours par minute

Les résultats montrent qu'une augmentation d'aération entraîne une meilleure floculation des cellules, cependant il existe un taux optimal d'aération au-delà duquel la floculation diminue. Ces résultats sont en accord avec ceux de STRATFORD (1989).

Par ailleurs, MIKI et al., (1982 b) ont noté que l'aération induit une meilleure capacité de floculation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans le cas des levures *K. lactis*, nous n'observons aucune induction de floculation chez les souches potentiellement non floculantes quelle que soit l'intensité de l'aération et de l'agitation.

D'après STRATFORD, (1989), l'agitation et l'aération ont un effet sur plusieurs aspects de la floculation des levures. Elles modifient entre autre, les interactions électrostatiques qui s'établissent au niveau des charges de surface cellulaire, ce qui entraîne une diminution de l'intensité de floculation des levures *S. cerevisiae*.

Selon le même auteur, une agitation et une aération continues permettent l'établissement d'un équilibre dynamique entre les cellules libres et les cellules floculées de *S. cerevisiae*

1.2.2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

L'influence de la concentration en glucose sur la croissance et la floculation a été étudiée en milieu de sabouraud.

Les variations du taux de croissance et du pourcentage de floculation sont illustrées par les figures 139 et 140.

Les résultats montrent que les 4 souches sont sensibles aux variations de la concentration en glucose. En effet, une concentration minimale de 0,5% est indispensable pour la croissance et la floculation des levures.

La concentration optimale en glucose pour une floculation maximale en phase stationnaire de croissance est de l'ordre de 2 à 3%. Lorsque la concentration en glucose est inférieure à 2% ou supérieure à 3%, nous observons un ralentissement de la croissance et une baisse de l'intensité de la floculation.

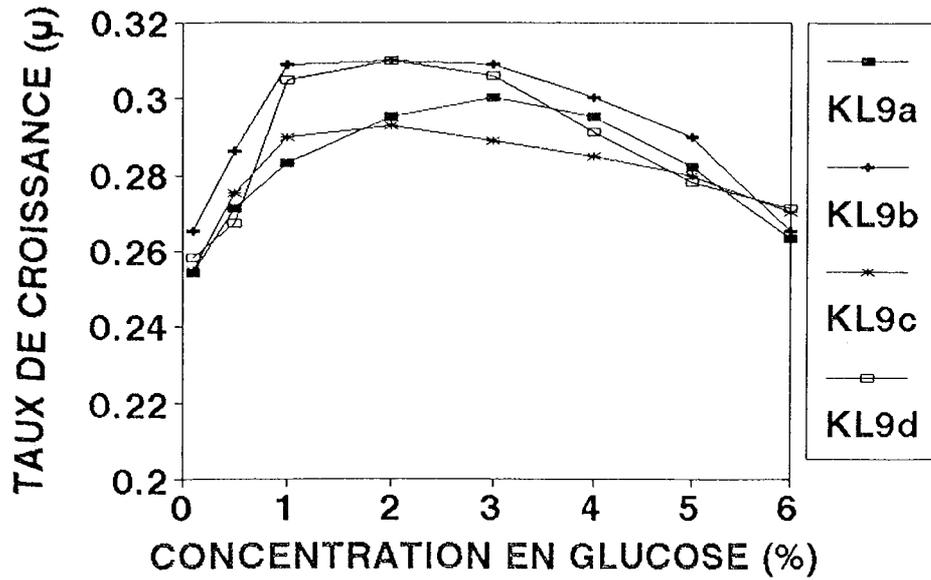


Fig. 139: Variation du taux de croissance des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en glucose dans le milieu de culture

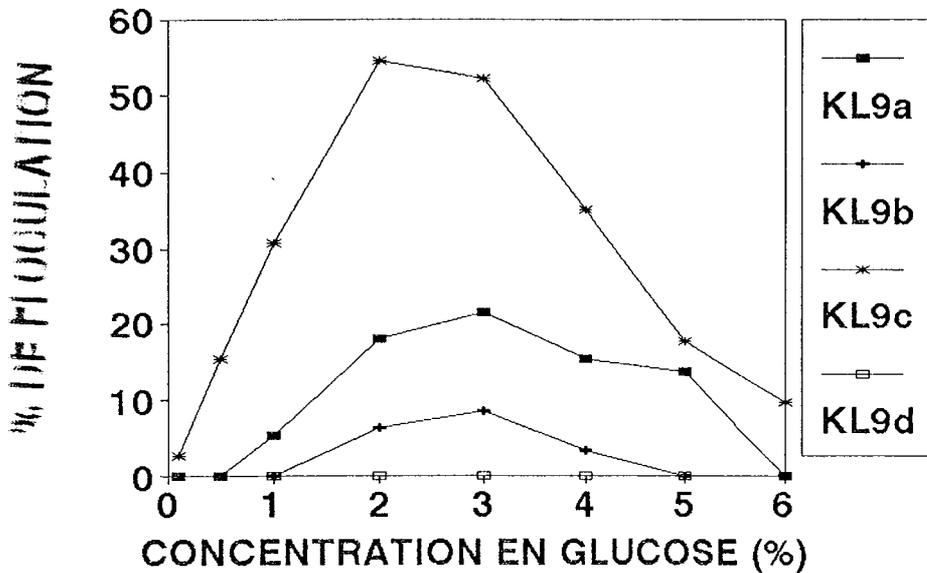


Fig. 140: Variation du pourcentage de flocculation des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en glucose dans le milieu de culture.

II.2.3 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PEPTONE SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

Les travaux portant sur l'influence des éléments du milieu ont mis en évidence l'effet de la nature et de la quantité de la source azotée sur la floculation (STEWART et al., 1973; AMRI et al., 1981). Pour vérifier ces observations dans le cas des souches *K. lactis*; nous avons fait varier la quantité de peptone dans le milieu de culture.

Les courbes de variation du taux de croissance et du pourcentage de floculation sont représentées par les figures 141 et 142.

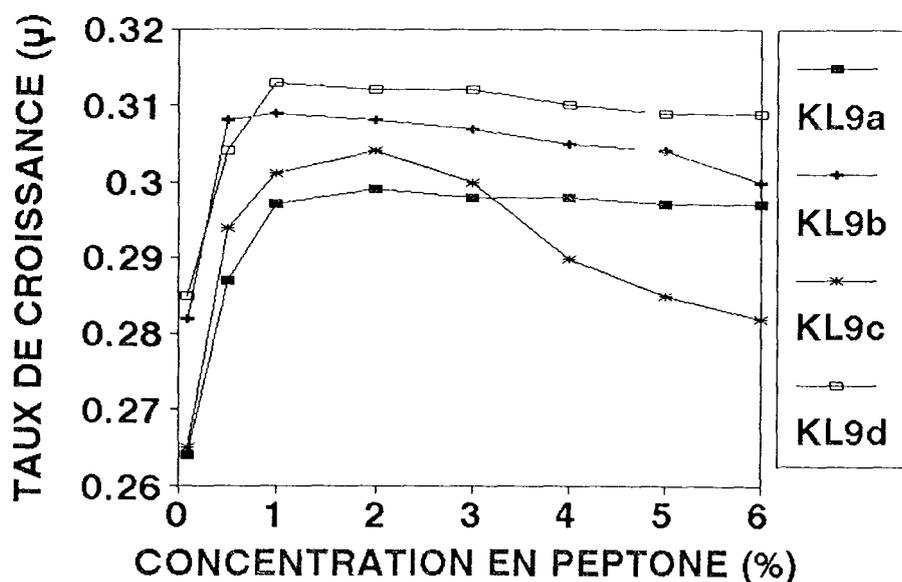


Fig. 141: Variation du taux de croissance des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en peptone dans le milieu de culture.

L'effet de la source azotée est moins marqué que celui de la source carbonée aussi bien sur la croissance que sur l'intensité de la floculation. Les résultats indiquent par ailleurs, que les souches floculantes sont plus sensibles aux variations de la concentration en peptone dans le milieu de culture que les souches non floculantes ou faiblement floculantes.

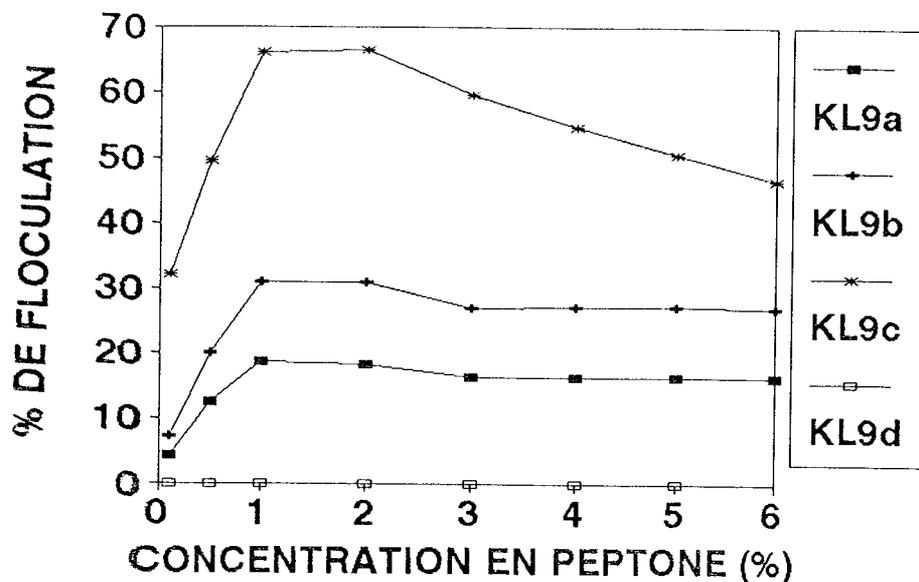


Fig. 2.4: Variation du pourcentage de floculation des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en peptone dans le milieu de culture.

2.4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM SUR LA CROISSANCE ET LA FLOCCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

L'effet des ions calcium sur la croissance et la floculation a été évalué en modulant leur teneur dans le milieu de culture. Les concentrations en calcium, sous forme de CaCl_2 , varient de 0.07mM à 10mM.

La quantité de calcium dans le milieu de culture a une action sur la croissance et la floculation des souches *K. lactis* (figure 143 et 144). D'après les résultats l'addition d'ions calcium dans le milieu de culture entraîne une légère augmentation du taux de croissance des 4 souches. Toutefois on note un effet inhibiteur lorsque la concentration en calcium est supérieure à 3mM. Ce phénomène a été observé pour d'autres levures par KOVAC (1985) pour *Saccharomyces cerevisiae* et LOTAN et al., (1976) pour *Saccharomyces uvarum*.

Lorsque le milieu est enrichi en calcium, l'intensité de floculation augmente. Les résultats indiquent que les souches peu floculantes exigent des concentrations en calcium, plus élevées. Ces mêmes résultats montrent également une baisse de l'intensité de la floculation pour des concentrations supérieures à 5mM. Ces observations mettent en évidence le rôle indirect du calcium dans le phénomène de floculation.

III. ETUDE DE LA REVERSION DE LA FLOCCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

III.1. INFLUENCE DU pH

Au cours de la croissance des souches *K. lactis* le pH du milieu de culture évolue pour atteindre des valeurs comprises entre 4.0 et 4.5, or, il est établi que le pourcentage de floculation varie selon le pH du milieu.

Nous avons vérifié l'effet du pH sur la floculation dans le milieu de culture et en solution tampon acétate de Helm en faisant varier le pH de la suspension de levure par addition de HCl 0.1N ou NaOH 0.1N.

Les résultats sont illustrés par la figure 145(a et b). Ils indiquent que les variations de pH affectent le pourcentage de floculation de façon plus prononcée en solution tampon acétate de Helm.

Par ailleurs, les agrégats cellulaires des levures modérément et faiblement floculantes sont plus sensibles aux variations du pH. En effet, pour les souches KL9a et KL9b, les agrégats cellulaires sont complètement dispersés pour des pH supérieurs à 5,5 et inférieurs à 3.0. Notons toutefois que la défloculation des agrégats cellulaires par le pH est, dans tous les cas, réversible.

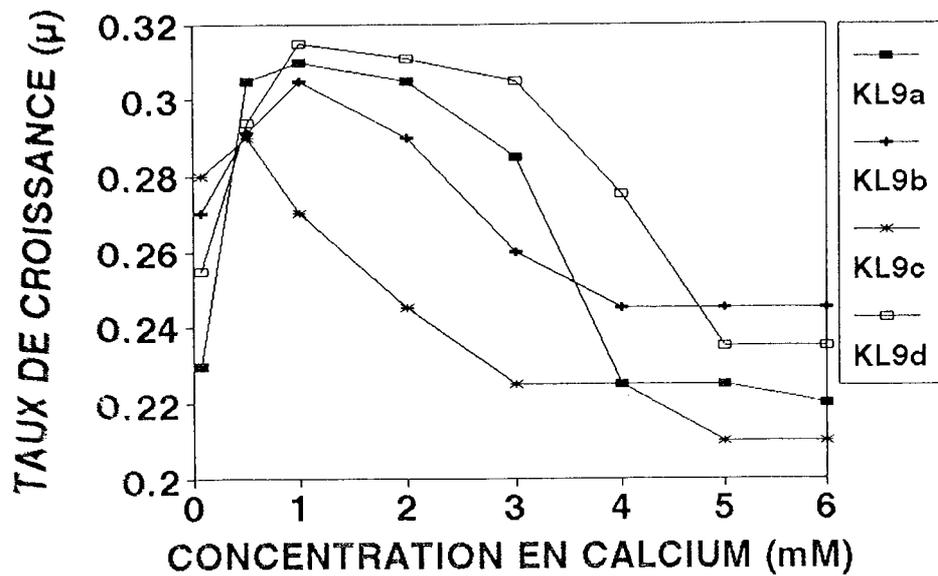


Fig. 1 : Variation du taux de croissance des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de culture

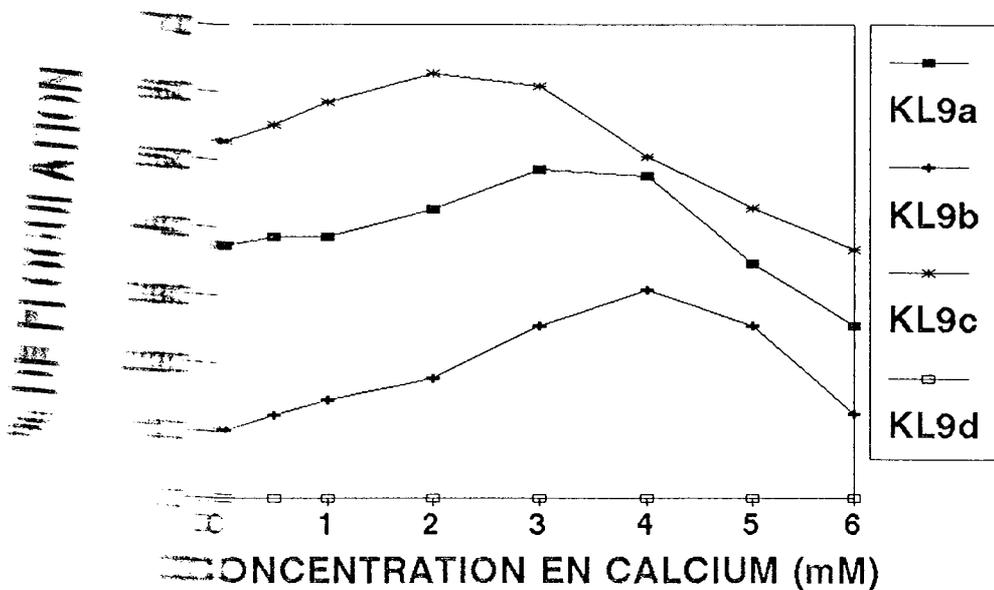
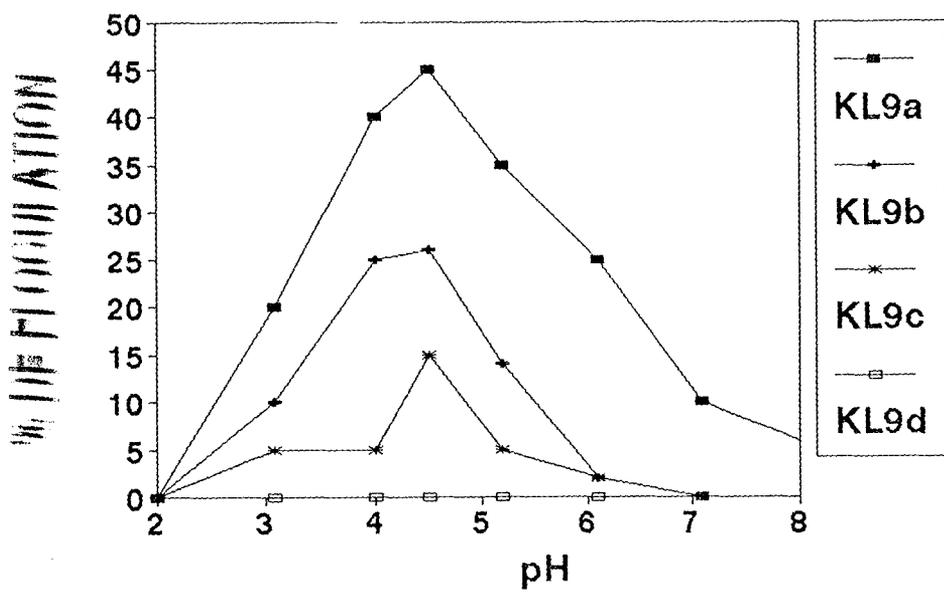
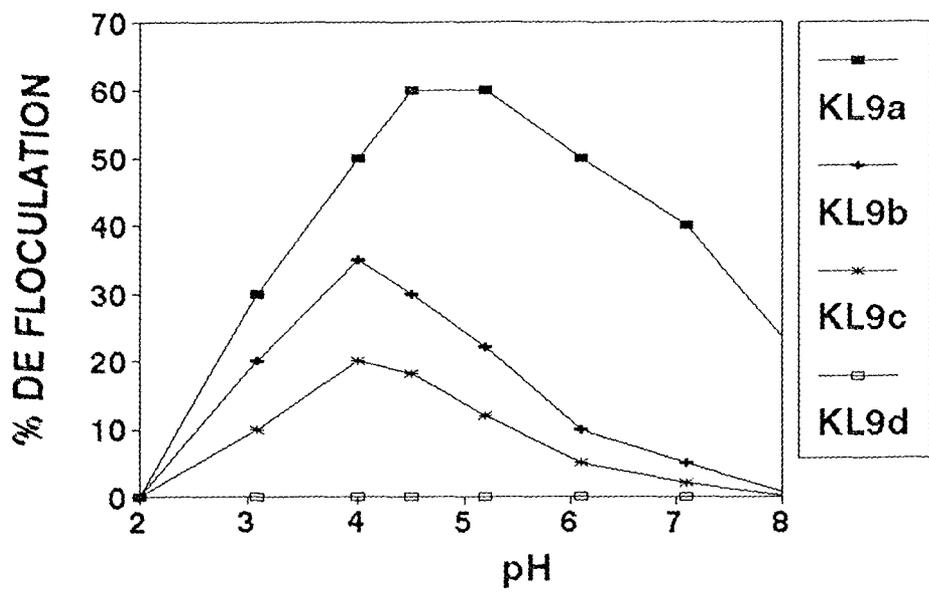


Fig. 2 : Variation du pourcentage de floculation des souches *K. lactis* en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de culture



143 Influence du pH sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K. lactis* en milieu de culture (a) et en tampon acétate (b)

III.2. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'influence de la température sur la stabilité des agrégats cellulaires des levures a été étudiée en présence du milieu de culture à pH 4.5.

Les suspensions de levures, à l'état floculant, sont placées dans un bain-Marie à différentes températures pendant des temps variables. Le pourcentage de floculation a été évalué après refroidissement à 25°C.

Les résultats sont indiqués par la figure 146 (a,b,c). Les agrégats cellulaires des 3 souches, plus ou moins floculantes sont stables pour des températures inférieures à 50°C.

Pour des températures supérieures à 50°C, nous observons une baisse du pourcentage de floculation variable selon le caractère floculant; en effet, les souches faiblement et modérément floculantes sont plus sensibles que la souche très floculante. Dans le premier cas, les agrégats cellulaires sont totalement dispersés pour des températures respectives de 70°C et 60°C au bout de 8 minutes d'exposition; alors que ceux de la souche très floculantes la dispersion totale des agrégats est obtenue à 80°C pour la même durée d'exposition. A ces températures la dispersion des agrégats cellulaires est irréversible.

Ces résultats permettent de suggérer que les constituants impliqués dans le phénomène de floculation sont plus ou moins thermolabiles en fonction du caractère de floculation de la souche; ceci peut signifier que ces constituants ont des structures différentes selon le degré de floculation de la souche.

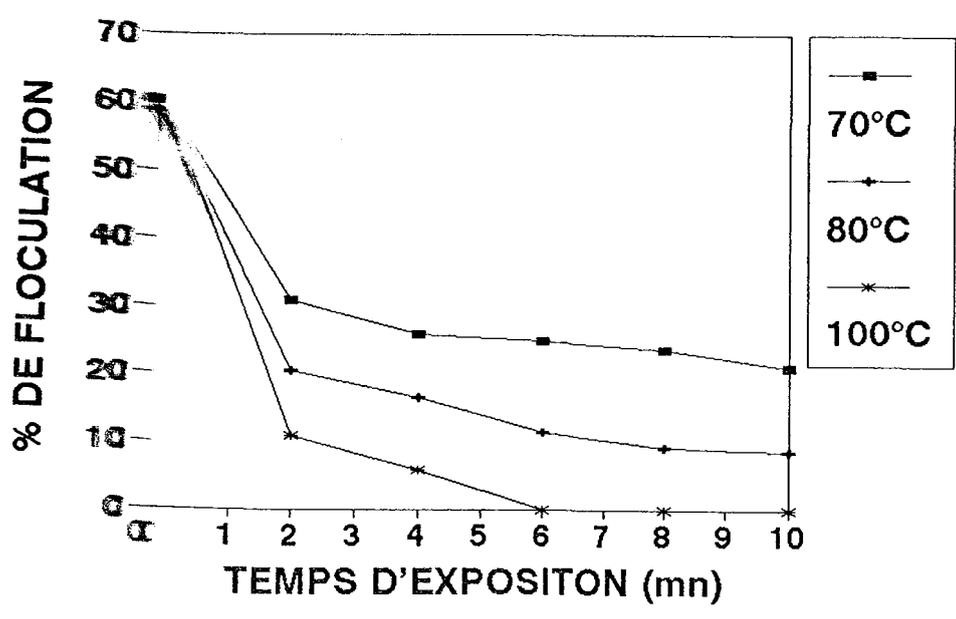
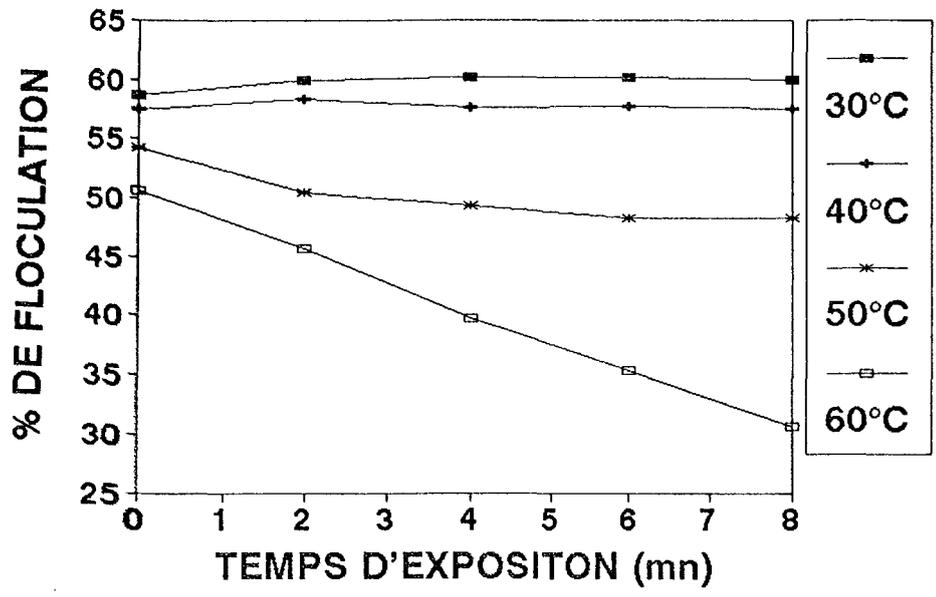


Fig. 146(a) : Influence de la température sur le pourcentage de floculation de *K. lactis* (KL9C, TF)

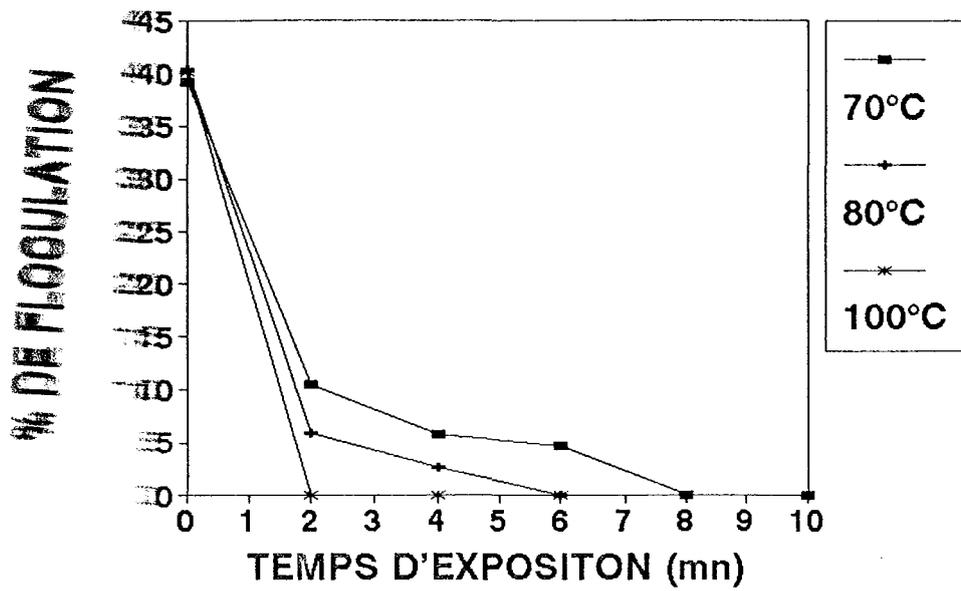
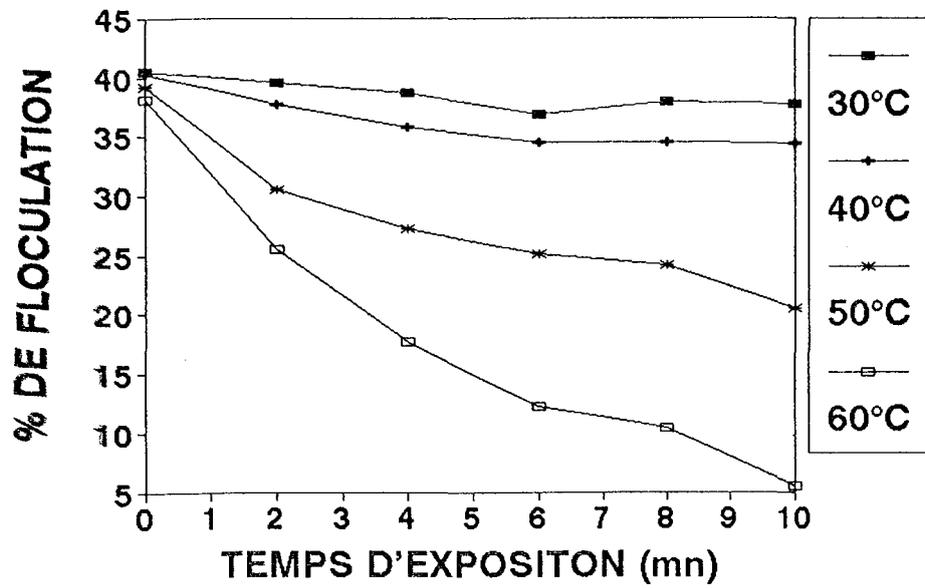


fig. 14 Influence de la température sur le pourcentage de flocculation de *K. lactis*: (KL9a, MF)

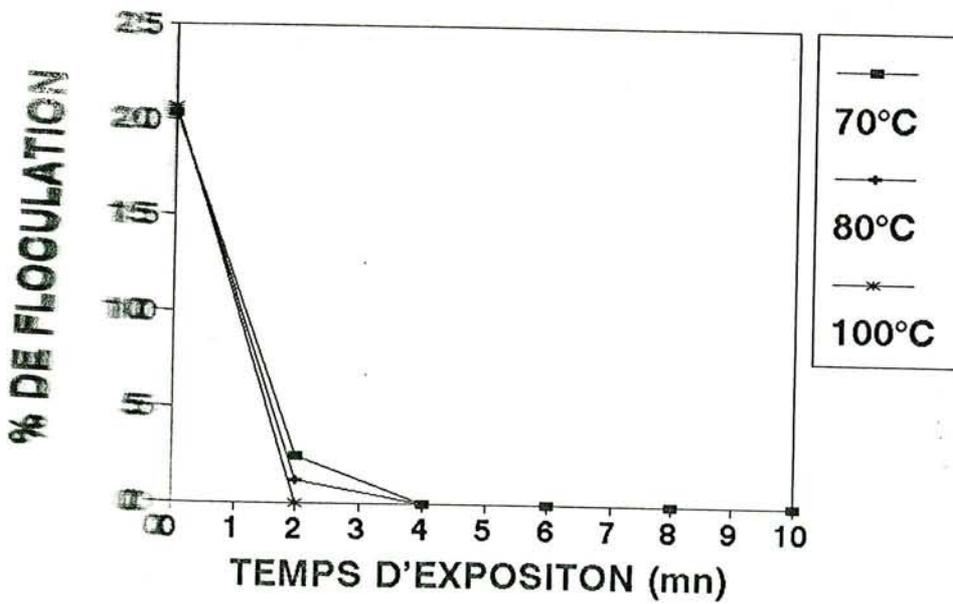
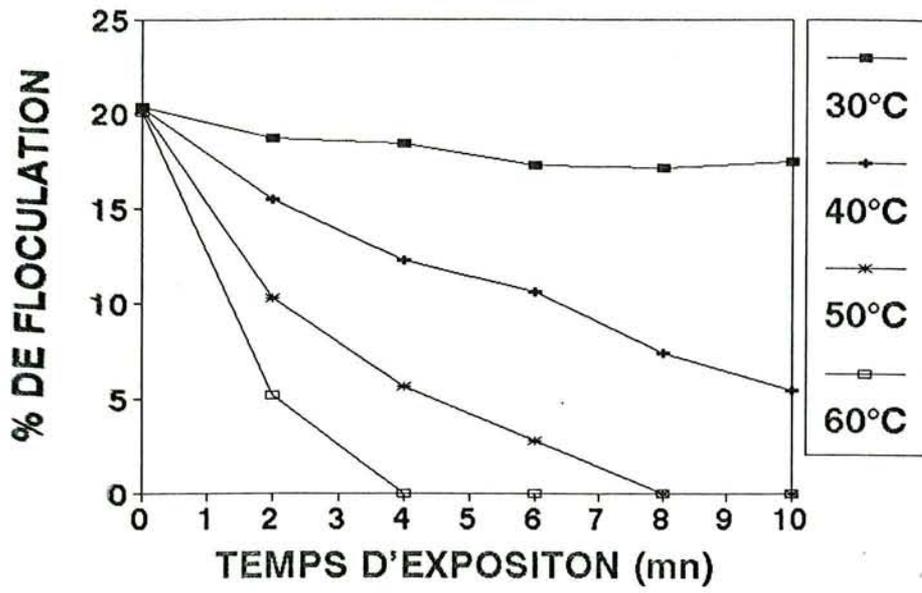


Fig. 146 Influence de la température sur le pourcentage de flocculation de *K. lactis* (KL9b, FF)

III.3. RÉVERSION DE LA FLOCCULATION PAR LES OSES ET DÉRIVÉS

L'influence des oses, notamment des monosaccharides, sur la stabilité des agrégats cellulaires a été étudiée en ajoutant des quantités croissantes d'oses ou dérivés dans des suspensions de levures en milieu de culture à pH 4.5.

Les résultats indiqués par les tableaux 64 et 65 montrent que les structures glucidiques, comme nous l'avons constaté chez la souche "mère", ont un effet plus ou moins marqué sur la dispersion des agrégats cellulaires des 3 souches, selon la nature de l'ose et le pouvoir flocculant des souches.

TABLEAU 64 (a): Réversion des agrégats cellulaires des souches flocculantes *K. lactis* par des oses et dérivés

INHIBITEURS q < 20 mg/ml	FAIBLEMENT INHIBITEURS 20 < q < 50mg/ml	NON INHIBITEURS q > 120mg/ml
D-Galactose	D-lactose	L-Galactose
D-Fucose	D-Mélibiose	L-Fucose
D-Galactose-6-phosphate Méthyl α -D-galactopyranoside	D-Raffinose	D-Mannose
O-Nitrophényl α -D-galactopyranoside	D-Galactosamine	D-Glucose
P-Nitrophényl α -D-galactopyranoside.	N-acétyl-D-galactosamine	L-Glucose
	D-Acide galactorunique	D-Glucosamine
	L-Arabinose	D-Mannosamine
		D-Glucose-6-Phosphate
		D-Mannose-6-phosphate
		Méthyl α -D-glucopyranoside
		2-Déoxy-D-glucose
		Méthyl β -D-galactopyranoside

q: quantité en ose ou dérivé en mg/ml nécessaire à la déflocculation totale des agrégats cellulaires

Les oses les plus dispersants ont tous une structure D-galactose non réducteur terminal. Les souches modérément (KL9a) et faiblement (KL9b) floculantes sont plus sensibles à l'effet dispersif des oses particulièrement au D-galactose; cette observation permet de suggérer que le nombre de cellules agrégées intervient dans la stabilité, (c'est à dire dans les interactions entre les cellules) vis à vis de l'action des oses et dérivés.

TABLEAU 65: Quantités d'oses et dérivés inhibiteurs, nécessaires à la dispersion totale des agrégats cellulaires de *K. lactis*

SOUCHES	KL9c (TF)	KL9a (MF)	KL9b (FF)
OSSES ET DIRIVES			
D- Galactose	8.6	7.2	5.6
D- Fucose	12.4	10.3	7.4
D- Galactose-6-phosphate	5.2	4.8	4.1
Méthyl α -D- galactopyranoside	14.2	13.1	10.5
O- Nitrophényl α -D-galactopyranoside.	8.3	6.5	5.3
P- Nitrophényl α -D- galactopyranoside.	7.3	5.5	4.5

(Résultats exprimés en mg/ml)

TF: Très floculante

MF: Modérément floculante

FF Faiblement floculante.

III.4. EFFETS "DIRECTS" DE QUELQUES IONS MONO ET BIVALENTS SUR LES AGRÉGATS CELLULAIRES DES SOUCHES *K. lactis*

L'étude de l'effet des ions métalliques sur l'agrégation cellulaire de la souche "mère" floculante (KLF) a mis en évidence l'action inductrice ou inhibitrice de la floculation.

L'action "directe" des ions monovalents et bivalents sur l'agrégation cellulaire des 3 souches (KL9a, KL9b et KL9c) a été observée en milieu de culture (pH4.5).

Les résultats sont rapportés dans les tableaux 66, 67 et 68. Ils montrent que les cellules potentiellement floculantes forment des agrégats en présence des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} . Pour de faibles concentrations les ions Na^+ , K^+ n'ont aucun effet. Les ions Sr^{2+} et Ba^{2+} inhibent la floculation dès que leur concentration dans le milieu atteint 0.1mM.

TABLEAU 66 : Influence des ions minéraux sur les agrégats cellulaires de la souche KL9c

CONCENTRATION (mM)	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0	10	15
IONS METALLIQUES							
Na^+	62.3	65.6	66.3	62.4	30.7	10.3	5.5
K^+	60.2	65.4	67.2	58.3	28.2	11.4	6.2
Ca^{2+}	55.6	60.3	66.3	68.2	60.6	20.4	10.7
Mg^{2+}	54.3	58.6	64.5	65.4	57.3	5.6	8.2
Mn^{2+}	56.2	62.2	66.4	65.3	50.6	18.4	5.2
Sr^{2+}	48.2	10.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ba^{2+}	50.1	15.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

TABLEAU 67 : Influence des ions minéraux sur les agrégats cellulaires de la souche KL9a

CONCENTRATION (mM)	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0	10	15
IONS METALLIQUES							
Na ⁺	30.1	35.6	40.2	30.6	10.6	5.2	0.0
K ⁺	31.3	36.2	38.6	35.3	11.2	4.3	0.0
Ca ²⁺	40.5	42.6	43.2	45.2	23.8	7.8	0.0
Mg ²⁺	30.1	35.2	36.4	38.2	18.6	10.0	0.0
Mn ²⁺	30.6	36.2	35.6	36.2	15.3	6.2	0.0
Sr ²⁺	25.4	15.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ba ²⁺	26.4	16.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

TABLEAU 68: Influence des ions minéraux sur les agrégats cellulaires de la souche KL9b

CONCENTRATION (mM)	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0	10	15
IONS METALLIQUES							
Na ⁺	10.5	12.3	12.6	14.3	6.2	0.0	0.0
K ⁺	11.5	13.2	12.3	13.5	5.4	0.0	0.0
Ca ²⁺	12.3	14.2	15.6	20.2	10.3	5.2	0.0
Mg ²⁺	10.4	12.4	16.3	15.4	8.6	5.0	0.0
Mn ²⁺	10.2	12.3	13.5	13.3	6.2	2.5	0.0
Sr ²⁺	5.5	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ba ²⁺	10.2	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

Les ions Ca^{2+} favorisent la floculation. Des concentrations de 1 à 4 mM permettent une augmentation de la pourcentage de floculation, particulièrement chez les souches modérément floculantes et faiblement floculantes (KL9a et KL9b) mais n'affecte pratiquement pas celui de la souche très floculante. Pour des concentrations de Ca^{2+} supérieures à 6mM on observe pour toutes les souches l'effet inverse.

Les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} à de faibles concentrations et en présence de Ca^{2+} n'ont pas d'effet sur le pourcentage de floculation des 3 souches. En revanche les ions Sr^{2+} et Ba^{2+} dispersent totalement les agrégats cellulaires dès que leur concentration dans le milieu est supérieure à 0.1mM. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les souches "mères" (Première partie chap. IV.)

Par ailleurs, nous avons étudié l'inhibition compétitive des ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} par les ions monovalents K^+ et Na^+ . Pour cela, des suspensions de levures dans le tampon acétate de Helm (pH 4.5) contenant 3 à 4 mM de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} , ont été préparées; les ions Na^+ et K^+ sont ajoutés, en suite, à différentes concentrations.

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 69, 70, 71 et 72. Ils indiquent que les fortes concentrations en Na^+ et K^+ inhibent la floculation induite par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Il apparait, d'après ces résultats, que les ions Na^+ et K^+ peuvent agir, à certaines concentrations, comme des antagonistes des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . L'effet des ions K^+ et Na^+ est plus prononcé dans l'agrégation induite par les ions Mg^{2+} , ceci permet de suggérer, alors, que les liaisons dans les cellules floculantes avec les ions Ca^{2+} sont plus spécifiques que celles établies avec les ions Mg^{2+} .

TABLEAU 69: Effet de l'inhibition compétitive des ions Ca^{2+} et K^+ sur les agrégats cellulaires des souches *K. lactis*

SOUCHES			
CONC. EN K^+ (mM)	KL9c	KL9a	KL9b
0	60.5	30.3	15.2
5	35.6	15.2	10.2
10	20.3	10.4	5.3
25	10.0	0.0	0.0
50	0.0	0.0	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

TABLEAU 70: Effet de l'inhibition compétitive des ions Ca^{2+} et Na^+ sur les agrégats cellulaires des souches *K. lactis* (Résultats exprimés en % de floculation)

SOUCHES			
CONC. EN Na^+ (mM)	KL9c	KL0a	KL9b
0	58.2	28.3	16.2
5	40.1	14.1	8.6
10	15.5	8.6	5.3
25	5.4	4.2	0.0
50	0.0	0.0	0.0

(la concentration en Ca^{2+} est de 3mM)

TABLEAU 71: Effet de l'inhibition compétitive des ions Mg^{2+} par les ions K^+ sur les agrégats cellulaires des souches *K. lactis*

(Résultats exprimés en % de floculation)

SOUCHES			
CONC. EN K^+ (mM)	KL9c	KL9a	KL9b
0	50,3	26,5	12,4
5	20	12,6	6,3
10	10	5,3	2,5
25	5,7	0	0
50	0	0	0

(La concentration en Mg^{2+} est 4 mM)

TABLEAU 72: Effet de l'inhibition compétitive des ions Mg^{2+} par les ions Na^+ sur les agrégats cellulaires des souches *K. lactis* (Résultats exprimés en % de floculation)

SOUCHES			KL9c	KL9a	KL9b
CONC. EN Na^{2+} (mM)					
0			45,2	25,4	14,2
5			10,6	5,3	2,2
10			2,1	0	0
25			0	0	0
50			0	0	0

(La concentration en mg^{2+} est de 4 mM)

L'addition simultanée dans le milieu de floculation de Ca^{2+} et K^+ puis Ca^{2+} et Na^+ dans le rapport déterminé met en évidence que les ions Na^+ et K^+ peuvent réduire la floculation des levures très floculantes et empêcher la floculation des levures moyennement et faiblement floculantes (tableau 73 et 74).

TABLEAU 73 : Effet antagoniste des ions K^+ sur la floculation des souches *K. lactis*

SOUCHES			KL9c	KL9a	KL9b
RAPPORT IONIQUE (Ca^{2+}/K^+)					
0.1	Ca^{2+}	K^+	65.1	42.3	15.3
	0.1	0			
0.2	0.2	0.1	68.3	45.4	20.3
0.5	0.1	0.2	40.2	25.3	10.5
1.0	0.1	0.1	20.5	15.2	5.8
10	1.0	0.1	15.5	10.1	5.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

TABLEAU 74: Effet antagoniste des ions Na^+ sur la floculation des souches *K. lactis*

SOUCHES			KL9c	KL9a	KL9b
RAPPORT IONIQUE ($\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$)					
0.1	Ca^{2+}	Na^+	58.2	30.7	20.6
	0.1	0			
0.2	0.2	0.1	65.4	36.8	22.6
0.5	0.1	0.2	50.2	25.1	18.4
1.0	0.1	0.1	40.5	15.3	10.2
10	1.0	0.1	30.6	10.5	5.6

(Résultats exprimés en % de floculation)

Une étude effectuée sur d'autres souches *K. lactis* (MANGUNWIDJAJA, 1988) montre que l'effet positif du Mg^{2+} diminue progressivement lorsque le pH du milieu est inférieur à 4,0 et supérieur à 7,0. Selon cet auteur, les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} peuvent induire la floculation de certaines souches *K. lactis*, à certains pH, mais le degré de floculation reste inférieur à celui obtenu avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Par ailleurs, dans un milieu contenant Mg^{2+} , si l'on augmente la concentration en Ca^{2+} , il s'en suit une augmentation du pourcentage de floculation, ceci suggère que les ions Ca^{2+} restent indispensables pour une floculation maximale.

III.5. EFFET D'UN TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUR LA FLOCULATION DES SOUCHES *K. lactis*

Afin de mettre en évidence, le rôle des structures pariétales de surface impliquées dans la floculation nous avons traité les cellules entières des 3 souches floculantes (KL9a, KL9b, KL9c) par des enzymes protéolytiques: pronase, trypsine, pepsine et chymotrypsine selon le protocole décrit dans matériel et méthodes.

Les résultats présentés dans le tableau 75 indiquent que le traitement des cellules floculantes par des enzymes protéolytiques, provoque une réduction du pouvoir floculant des souches testées. L'action de la pronase est la plus importante. En outre, ce traitement affecte particulièrement les souches KL9a et KL9b (moyennement et faiblement floculantes).

TABLEAU 75: Effet d'un traitement enzymatique sur la floculation des souches *K. lactis*

SOUCHES	KL9c	KL9a	KL9b
ENZYMES			
Temoin	60.5	40.3	20.2
Pronase	10.3	5.4	0.0
Trypsine	20.7	5.6	0.0
Pepsine	15.1	2.5	0.0
Chymotrypsine	20.5	5.8	0.0

(Résultats exprimés en % de floculation)

L'action spécifique des enzymes laisse supposer que les protéines superficielles des parois, impliquées dans le phénomène de floculation, présentent des structures particulières selon le degré de floculation des souches. Selon VAVASEUR, (1985) les sites d'action des protéases sur un peptide (A-B-C-D) est spécifique; en effet la chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques côté carboxyle des acides aminés aromatiques (B), tryptophane, phénylalanine, leucine, tyrosine et à des degrés faibles pour la méthionine, asparagine, histidine; l'hydrolyse est bloquée par la proline en position (C) (BLOW, 1971).

Par contre la trypsine a pour sites d'actions potentiels les liaisons peptidiques côtés carboxyle des acides aminés (B) lysine ou arginine et à un taux faible pour la cystéine, l'hydrolyse est bloquée si la proline est en position (C) et réduite si A et C sont des résidus acides, cependant, des clivages non spécifiques se produisent après une longue incubation.

Selon ANTONOV (1977) la pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques côté NH₂ des acides aminés, si B et /ou C sont hydrophobes: phénylalanine, tyrosine, leucine, tryptophane. Des clivages non spécifiques sont observés pour d'autres acides aminés en position B sauf la proline.

D'après WAXDAL (1971) la pronase hydrolyse les liaisons peptidiques de la chaîne protéique à l'exclusion de la liaison acide aspartique-N-acétyl-glucosamine.

II.I.6. EFFET DES TRAITEMENTS CHIMIQUES SUR LA STABILITÉ DES AGRÉGATS CELLULAIRES DE *K. lactis*

Les traitements chimiques, tout comme les traitements thermiques ou enzymatiques, peuvent modifier la structure des constituants protéiques impliqués dans le mécanisme de floculation des levures.

Certains agents chimiques, telle que l'urée, dénaturent les protéines en provoquant un changement de leurs propriétés chimiques et biologiques (MARTIN et al., 1983).

Pour mettre en évidence les effets de quelques agents chimiques sur la stabilité des agrégats cellulaires des souches *K. lactis*, nous avons traité les cellules à l'état floculant selon le protocole décrit (chap. II).

Après traitement, les cellules sont lavées à l'eau distillée plusieurs fois, puis remises en suspension dans le milieu de floculation et le degré de floculation déterminé.

Les résultats rapportés dans le tableau 76 montrent que les agents chimiques affectent le pouvoir floculant des souches. Les concentrations en agents chimiques correspondant à une perte totale du pouvoir floculant dépendent de la nature de l'agent chimique et du degré de floculation initial des cellules traitées.

Les souches modérément et faiblement floculantes sont plus sensibles à l'action des agents chimiques. Cependant la perte des aptitudes à la floculation, après un traitement chimique, est irréversible pour toutes les souches.

Par ailleurs, lorsque le milieu contenant l'agent chimique ou le milieu de refloculation sont enrichis en ions Ca^{2+} , nous observons une dispersion totale des agrégats cellulaires; les ions Ca^{2+} ne jouent, donc, aucun effet protecteur.

L'action des agents chimiques sur les cellules potentiellement floculantes est analogue à celle des traitements thermiques (aux températures élevées); ceci suggère que la structure protéique de la surface cellulaire est modifiée et elle est responsable, ou du moins, impliquée dans l'agrégation des cellules de *K. lactis*.

TABLEAU 76: Effet d'agents chimiques sur la floculation de *K. lactis*

TRAITEMENT	CONCENTRATION (mM)	S O U C H E S		
		KL9c	KL9a	KL9b
Temoin	0	60.4	38.7	21.3
Urée	5	25.6	5.6	0
Chlorhydrate de Guanidine	5	31.7	15.3	5.4
Formaldéhyde	5	29.8	15.7	7.6
Mercapto éthanol	0.1	15.2	6.7	0.0
Anhydride Succinique	4	30.3	25.2	10.3
Carbodiimide	4	25.5	10.6	5.5

(Résultats exprimés en % de cellules floculées)

KL9c: *K. lactis* Très floculante (TF)

KL9a: *K. lactis* Moyennement floculante (MF)

KL9b: *K. lactis* Faiblement floculante.(FF)

Les changements conformationnels ou la destruction des structures stéréochimiques des protéines pariétales des levures *K. lactis*, provoquent la perte de leurs capacités à floculer. Ces résultats confirment ceux obtenus pour d'autres levures par NISHIHARA et al., (1982) pour *Saccharomyces cerevisiae*; KAMADA et MURATA, (1984 a, b) pour *Saccharomyces uvarum*, et *Saccharomyces bayanus*.

Les nombreux travaux portant sur le rôle des structures protéiques superficielles des parois de levures, dans la floculation ont montré chez les levures floculantes une structure conformationnelle particulièrement adaptée au sein des phosphopeptidomannanes des cellules; il résulte alors qu'une modification ou un réarrangement structural des protéines de surface cellulaire conduit à la formation ou dispersion d'agrégats cellulaires (TAYLOR et ORTON, 1978; AMRI et al., 1982; MIKI et al., 1981a).

IV. D I S C U S S I O N

L'expression des potentialités génétiques est modulée par des facteurs nutritionnels et physico-chimiques liés à l'environnement de croissance des levures.

Les études génétiques entreprises sur la floculation se sont heurtées, d'une part aux difficultés résultant d'une fréquence d'apparition de souches polyploïdes, triploïdes ou haploïdes; et d'autre part, les souches potentiellement floculantes peuvent perdre, dans le temps, leur pouvoir de floculation (PATEL et INGLEDEW, 1975).

Afin de vérifier si les facteurs nutritionnels et physicochimiques interviennent dans tous les cas de floculation, nous avons étudié l'influence de quelques facteurs sur la croissance et la floculation des souches *K. lactis* haploïdes issues d'un croisement de 2 souches l'une floculante et l'autre non floculante, étudiées dans la première partie de notre travail. Les souches issues d'un tel croisement présentent des degrés de floculation variables.

Les résultats obtenus, en faisant varier certains facteurs du milieu de culture, montrent que les 3 souches KL9a (MF), KL9b (FF) et KL9c (TF) floculent dans les mêmes conditions c'est à dire en milieu de culture type sabouraud contenant des quantités optimales en glucose et en peptone respectivement de 2 à 3% et de 1%. la floculation maximale pour les 3 souches se manifeste en fin de phase exponentielle.

La floculation des souches modérément et faiblement floculantes, semble affectée par la concentration en ions Ca^{2+} . En effet, le pourcentage maximal de floculation de ces souches est atteint pour des concentrations en Ca^{2+} de 4mM à 5mM; au delà de ces concentrations, on note une baisse rapide du pourcentage de floculation, d'autant plus importante si la floculation se produit en tampon acétate de Helm (PH 4.5). Il faut signaler, qu'en absence du calcium, en tampon acétate, aucune souche ne flocule.

Les agrégats cellulaires des trois souches sont dispersés par des pH extrêmes de façon réversible. La stabilité des agrégats est obtenue pour des pH compris entre 4,0 et 4,5. de même, des températures supérieures à 70°C provoquent la dispersion totale et irréversible des agrégats cellulaires au bout de 8 minutes d'exposition.

Des études relatives, au rôle des ions métalliques dans la floculation des levures et la stabilité des agrégats cellulaires, ont montré l'importance des ions Ca^{2+} dans

l'induction de l'adhésion cellulaire (NISHIHARA et al., 1982; LIPKE et PILSBURY 1984). Selon certains auteurs, le calcium joue le rôle inducteur de l'activité des facteurs de floculation (MIKI et al., 1982 a) en revanche, d'autres suggèrent que l'effet du calcium est secondaire et consisterait à diminuer les interactions (par répulsion) électrostatiques entre les cellules. Les différences de floculation constatées sont vraisemblablement dues à des différences d'accessibilité des facteurs impliqués dans la floculation (AMRI et al., 1981).

L'étude des modifications quantitative et qualitative dans le milieu de floculation des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ et K^+ révèle des effets antagonistes entre, particulièrement, les ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} chez les levures floculantes.

Particulièrement chez les levures *K. lactis*, l'inhibition par les ions monovalents (Na^+ et K^+) de la floculation induite par les ions Mg^{2+} , révèle que les liaisons intercellulaires dues aux ions Ca^{2+} est spécifique alors que celles dues aux ions Mg^{2+} ne le sont pas (MANGUNWDJAJA, 1988).

D'une manière générale, on admet que dans la fixation, par les groupements carboxyliques des glycoprotéines pariétales, les ions Ca^{2+} ont un rôle important dans la floculation en stabilisant la structure conformationnelle de ces structures protéiques nécessaires à la floculation. Les groupements carboxyliques des chaînes peptidiques ont la propriété d'établir des liaisons avec des ions bivalents en formant des ponts ioniques stables (ROLAND, 1972; STEWART et al., 1975). En principe, les ions Ca^{2+} , dans l'interaction avec les ions carboxyliques peuvent être remplacés par des cations bivalents ayant une taille atomique voisine de celle de Ca^{2+} , or dans le cas de l'adhésion cellulaire des levures, le pourcentage de floculation obtenu avec les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} (ions ayant une taille voisine de celle de Ca^{2+}), est inférieur à celui induit par les ions Ca^{2+} (TAYLOR et ORTON, 1975; MIKI et al., 1982). De plus l'induction de la floculation chez les souches de *K. lactis* par les ions Mg^{2+} est très dépendante du pH, ce qui n'est pas le cas pour les ions Ca^{2+} .

Par ailleurs, les ions bivalents Sr^{2+} et Ba^{2+} dont les rayons ioniques (respectivement 1.25 Å et 1.47 Å) soit supérieurs à ceux de Ca^{2+} , inhibent complètement la floculation des levures *K. lactis* pour des teneurs, dans le milieu de floculation, supérieures à 0.1 Mm.

Certains auteurs, entre autres, JAYATISSA et ROSE (1976) puis AMRI et al., (1982) ont émis l'hypothèse selon laquelle il y aurait une compétition entre la force de répulsion des groupements ioniques et la force d'attraction; l'action

antagoniste des ions K^+ et Na^+ vis-à-vis des ions Ca^{2+} semble confirmer cette hypothèse.

Selon KAMADA et MURATA (1984) la liaison sélective entre les ions Ca^{2+} et les parties protéiques des polysaccharides pariétaux, est favorisée par un arrangement spécifique des groupements Carboxyliques. D'après MIKI et al., (1982 a), les ions Ca^{2+} jouent un rôle activateur notamment pour un changement conformationnel des substances de nature lectinique qui se fixeraient alors aux sucres (récepteurs) présents à la surface des cellules.

La réversion de la floculation par les oses et dérivés est observée pour les 3 souches floculantes (KL9a, KL9b et KL9c). Les agrégats cellulaires sont dispersés, particulièrement, par le galactose en milieu de culture ou en tampon acétate (pH 4.5 en présence de Ca^{2+}), ceci indique que des molécules spécifiques liées à la paroi des levures, interviennent dans la floculation.

Lorsque les souches floculantes sont cultivées en milieu type sabouraud à base de galactose, elles ne floculent plus. Les souches *K. lactis* synthétiseraient donc le facteur de floculation à partir du glucose, mannose, mais cette synthèse est inhibée par le galactose. Ces observations rejoignent celles déjà faites par d'autres auteurs (TAYLOR et ORTON, 1978; MIKI et al., 1981 et MANGUNWIDJAJA, 1988).

Les cellules potentiellement floculantes traitées par des enzymes protéolytiques ou des agents chimiques perdent leur capacité de floculer. Ceci peut s'expliquer par la modification des parties protéiques des glycoprotéines (PPM) ou par la dénaturation irréversible des parties protéiques indispensables à la floculation. La dénaturation ou les modifications chimiques de ces parties protéiques peuvent entraîner un effet sur les caractéristiques d'autres composants protéiques superficiels des cellules.

Récemment, MANGUNWIDJAJA (1988) a isolé et purifié une "lectine" à partir de cellules floculantes de *K. lactis* haploïdes. Cette "lectine" agglutine les hématies de lapin et favorise la floculation des levures floculantes à pH 4.5. Cet auteur, explique le rôle fondamental de cette structure lectinique dans la floculation des levures *K. lactis*; toutefois, il semblerait que la synthèse de cette substance "lectinique" soit spécifique de la souche; en effet, des essais effectués sur les souches étudiées dans le présent travail ne nous ont pas permis d'isoler une telle substance lectinique.

CHAPITRE IX

COMPOSITION CHIMIQUE COMPAREE ET ETUDE
DES STRUCTURES PARIETALES DES SOUCHES K. LACTIS
("HYBRIDES") FLOCCULANTES ET NON FLOCCULANTES

I. ISOLEMENT ET COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS

Comme nous l'avons déjà signalé, la floculation des levures est liée aux parois cellulaires et dépend de leur structure. Afin de tenter d'élucider les mécanismes de floculation des levures *K. lactis* et de vérifier les résultats obtenus dans la première partie de notre étude nous avons réalisé une étude de la composition des parois et des structures pariétales impliquées dans la floculation des souches *K. lactis* issues d'un croisement de 2 souches floculante et non floculante et obtenues par dissection d'un même asque (souches hybrides, haploïdes).

Les résultats de la première partie de notre étude, comme ceux obtenus par d'autres auteurs, ont mis en évidence des différences significatives dans la composition des parois de levures floculantes et non floculantes notamment en ce qui concerne les teneurs en oses totaux neutres, en acides aminés et en phosphore.

I.1. ISOLEMENT DES PAROIS ET RENDEMENT PONDÉRAL

Les parois ont été isolées des cellules après 48 heures de croissance, par broyage mécanique en présence de billes de verre. La quantité de parois recueillies n'indique pas de très grandes variations entre les différentes souches (Tableau 77).

TABLEAU 77: Rendement pondéral en parois et pourcentage de floculation des levures *K. lactis*

SOUCHES	R	% FLO
KL9c (TF)	15.9	60.6
KL9a (MF)	12.8	41.3
KL9b (FF)	13.0	21.4
KL9d (NF)	11.3	0.0

R : Rendement pondéral en parois (% de matière sèche)

%FLO: Pourcentage de floculation après 48 heures de croissance

TF : Très floculante

MF : Moyennement floculante

FF : Faiblement floculante

NF : Non floculante.

I.2. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PAROIS

Les parois isolées sont soumises à des hydrolyses acides qui libèrent, d'une manière générale, des monomères d'hexoses, des hexosamines (glucosamine) et des acides aminés. Les conditions optimales de libération des différents constituants ont été préalablement déterminées.

Les résultats de l'analyse chimique globale après hydrolyse des parois sont rassemblés dans le tableau 78.

TABLEAU 78 :Composition chimique globale des parois de levures *K. lactis* floculantes et non floculantes

SOUCHES	KL9c	KL9a	KL9b	KL9d
CONSTITUANTS				
Oses neutres	80.5	75.9	65.6	64.8
Hexosamines	2.70	2.80	3.70	3.90
Acides aminés (AA)	10.9	11.6	13.8	14.3
Phosphore (P)	2.7	2.6	1.12	1.2
Calcium	0.59	0.6	0.31	0.28
Man/Glc	4.2	3.8	2.6	2.1
Oses/AA	7.38	6.54	4.75	4.53
Oses/P	29.81	29.19	58.57	54.0
AA/P	4.03	4.46	12.32	11.91

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Man: Mannose

Glc: Glucose

I.2.1. ANALYSE DES OSES NEUTRES

Après hydrolyse acide (HCl 2N pendant 3h) des polymères, les oses neutres libérés sont dosés selon la méthode de DUBOIS et al. (1956), puis identifiés par chromatographie sur papier et par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sous forme d'acétates d'alditols.

Les teneurs en oses neutres totaux augmentent environ de 16% et 11% dans les parois de levures très floculante (TF, KL9c) et moyennement floculante (MF, KL9a). Cette augmentation n'est

pas significative entre les teneurs des parois de levures faiblement floculantes (FF, KL9b) et non floculantes (NF, KL9d). Ces résultats indiquent que la biosynthèse des oses neutres dépend de l'intensité de la floculation des levures *K. lactis*.

L'analyse qualitative des oses neutres faite par chromatographie sur papier met en évidence la présence exclusive de mannose et de glucose. Ces résultats sont confirmés par chromatographie en phase gazeuse comme le montre la figure 147.

L'analyse quantitative des oses des parois de *K. lactis* par chromatographie en phase gazeuse donne des rapports molaires mannose /Glucose de 4.2 , 3.8, 2.6 et 2.1 respectivement pour les levures KL9c, KL9a, KL9b et KL9d. Nous constatons ainsi que les levures non floculantes ou peu floculantes renferment plus de glucose par rapport aux levures très floculantes et moyennement floculantes et inversement ces dernières contiennent plus de mannose.

I.2.2. TENEUR EN HEXOSAMINES DES PAROIS

Les hexosamines ont été libérées après hydrolyse HCl6 N pendant un temps optimal de 4 heures. Les dosages mettent en évidence une nette différence au niveau des teneurs entre les parois des levures floculantes et non floculantes. En effet lorsque la levure est très floculante (KL9c), sa paroi contient environ 50% d'hexosamines de moins que la paroi de la levure non floculante (KL9d) (Tableau 78). Toutefois les teneurs en hexosamines des parois des levures faiblement floculantes (KL9b) et celles des parois de levures non floculantes (KL9d) sont voisines; ceci indique que la teneur en hexosamine est liée à l'intensité de la floculation des levures *K. lactis*. Par ailleurs, la détermination des hexosamines par autoanalyseur a révélé dans toutes les parois la présence de glucosamine.

I.2.3. TENEUR EN ACIDES AMINÉS

Quantitativement les teneurs en acides aminés diminuent légèrement lorsque le degré de floculation augmente. Cette observation est vérifiée par la détermination des groupements NH₂, dans les hydrolysats des parois, au DNFB et par l'analyse chromatographique à l'autoanalyseur.

Les parois de levures non floculantes (KL9d) contiennent environ 5% de plus que celles des levures très floculantes (KL9c). Toutefois on ne note pas de différence significative entre la teneur en acides aminés des parois de levures faiblement floculantes (KL9b) et celles des parois de levures non floculantes (KL9d).

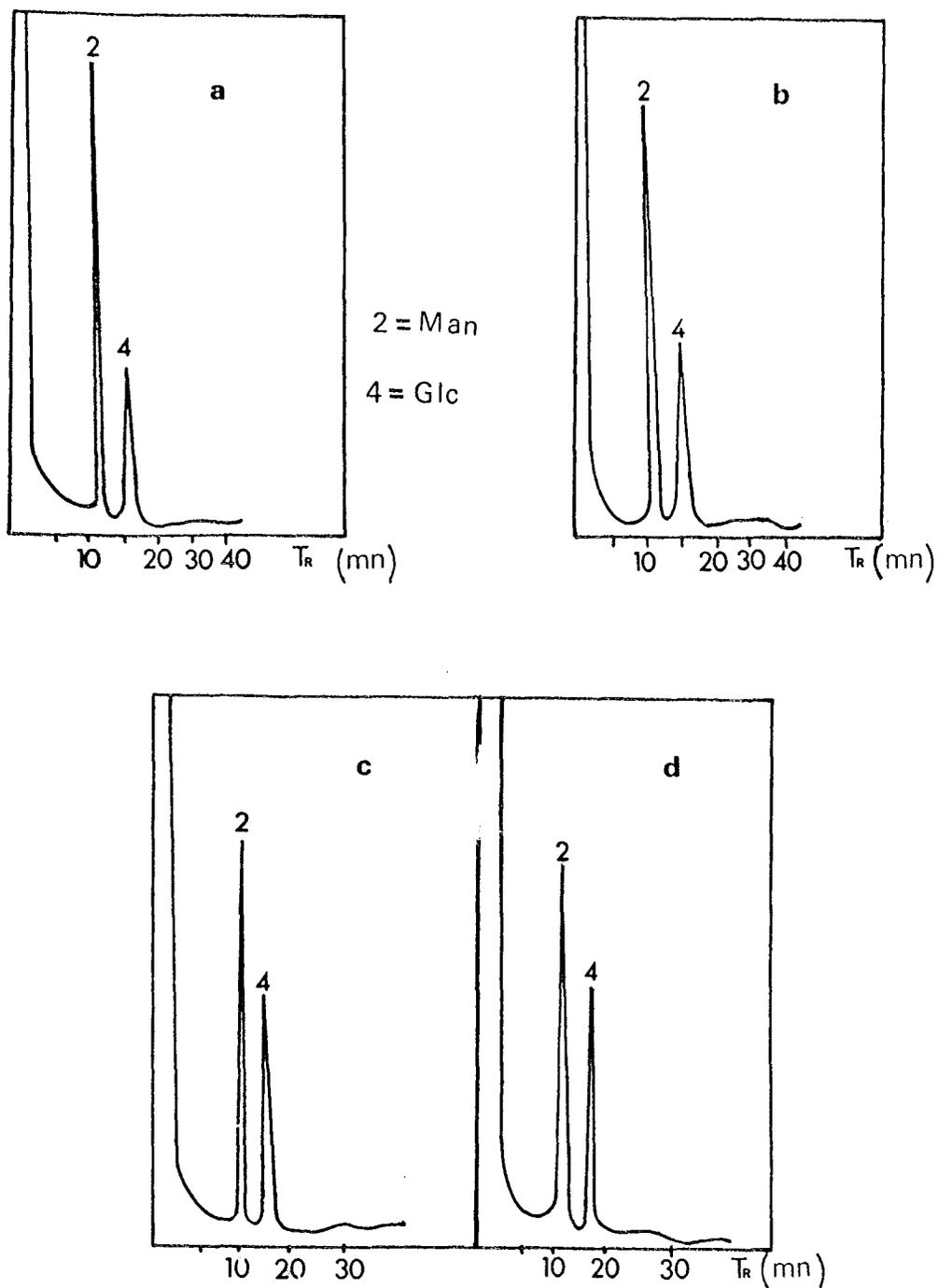


Fig. 147: Chromatogrammes des acétates d'alditols des produits d'hydrolyse des parois de *L. lactis* (a) KL9c (TF); (b) KL9a (MF); (c) KL9b (FF) et (d) KL9d (NF).

Qualitativement, le pourcentage relatif de chaque acide aminé ne varie pas de façon très significative en relation avec le caractère flocculant; cependant la teneur en sérine et thréonine augmente légèrement lorsque la levure est flocculante (Tableau 79 et histogramme 10).

I.2.4. TENEUR EN PHOSPHORE

D'après les résultats des dosages (tableau 78) les parois des levures *K. lactis* flocculantes renferment 2 fois plus de phosphore que les parois de levures non flocculantes.

Les levures étant cultivées dans les mêmes conditions, la teneur élevée en phosphore des parois flocculantes, comme nous l'avons déjà observé dans la première partie, indique que les constituants phosphorylés de la paroi de *K. lactis* sont impliqués dans le phénomène de flocculation. En effet, en comparant la teneur en phosphore des souches différemment flocculantes, nous constatons qu'elle augmente lorsque le degré de flocculation de la souche augmente (tableau 78, KL9c et KL9b). Rappelons cependant, que le rôle des phosphates est sujet à controverse dans le phénomène de flocculation d'autres levures.

I.2.5. TENEUR EN CALCIUM

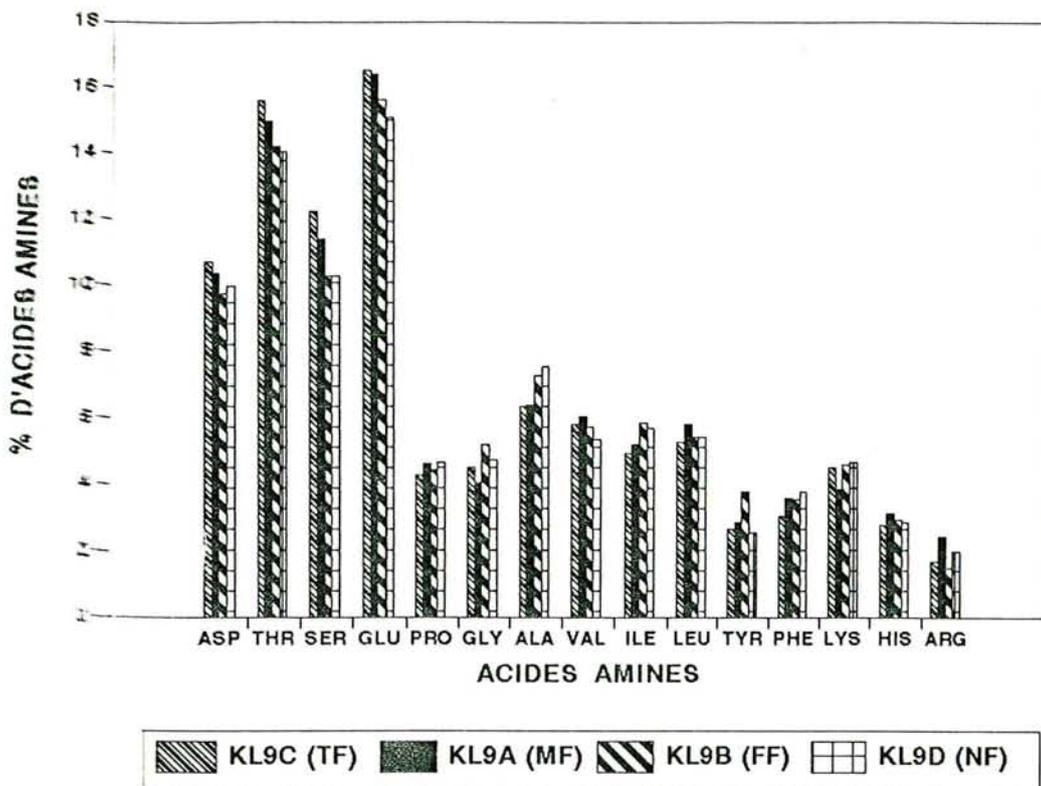
D'une manière générale, les teneurs en calcium des parois de levures sont relativement faibles. Le calcium peut intervenir directement ou indirectement sur la formation des agrégats cellulaires. Les concentrations nécessaires à l'apparition de la flocculation semblent dépendre des souches de levures et des conditions de culture. Dans tous les cas de flocculation une concentration minimale en calcium, dans le milieu de culture est indispensable (AMRI et al., 1981; BALLOU, 1974). Pour *K. lactis*, les parois des levures flocculantes contiennent plus de calcium que celles des levures non flocculantes; ceci indique que cet élément intervient, du moins en partie, dans la flocculation.

TABLEAU 79: Composition en acides aminés des parois de
K. lactis floculantes et non floculantes
(Résultats exprimés en % de matière sèche)

AA	KL9c (TF)		KL9a (MF)		KL9b (FF)		KL9d (NF)	
	µg/mg	% AA						
Asp	11.2	10.67	12.3	10.35	13.6	9.73	14.5	9.96
Thr	15.3	15.58	16.4	13.80	21.9	14.96	21.6	14.84
Ser	12.8	12.20	13.5	11.36	14.3	10.23	14.9	10.24
Glu	16.3	16.53	17.1	14.39	22.5	16.10	22.7	15.61
Pro	4.5	4.28	5.5	4.62	6.2	4.43	6.8	4.67
Gly	3.7	4.52	4.8	4.04	7.3	5.22	6.9	4.74
Ala	6.7	6.38	7.6	6.39	10.	7.30	11.0	7.56
Val	6.1	5.81	7.2	6.06	8.1	5.79	7.8	5.36
Ile	5.2	4.95	7.4	6.22	8.2	5.86	8.3	7.70
Leu	6.6	5.29	8.1	6.81	7.6	5.44	7.9	5.42
Tyr	2.8	2.66	3.4	2.86	3.2	2.29	3.7	2.54
Phe	3.2	3.05	4.3	2.86	3.2	2.29	3.7	2.54
Lys	5.8	4.52	4.6	3.87	6.4	5.58	6.8	4.67
His	2.9	2.76	3.7	3.11	4.1	2.93	4.2	2.88
Arg	1.8	1.71	2.9	2.44	2.1	1.50	2.9	1.99
Total	104.9	99.91	118.8	99.93	139.7	99.93	145.5	99.96

AA : Acides aminés
TF : Très floculante

MF : Moyennement floculante
FF : Faiblement floculante
NF : Non floculante.



HISTOGRAMME 9: Variation de la teneur en acides aminés des parois de *K. lactis* floculante et non floculante

I.3. D I S C U S S I O N

De nombreux travaux ont montré que les teneurs en parois isolées des levures varient en fonction de l'âge des cellules et de leur état floculant ou non.

Ainsi pour les levures du genre *Saccharomyces*, AMRI et al. (1981), puis SALHI (1986) ont constaté une augmentation de la quantité de parois extraites lorsque les cellules passent de l'état non floculant à l'état floculant. De même, pour *Khuyveromyces bulgaricus*, HUSSAIN (1983) a rapporté une augmentation dans le même sens; alors que AL MAHMOOD (1988) n'a pas mis en évidence de différences significatives pour la même levure.

Les taux de parois extraites des levures *K.lactis* varient peu avec le caractère floculant. Nous avons obtenu 15.9% et 11.3% de parois respectivement à partir de cellules très floculantes et non floculantes.

Les études qui ont porté sur la composition des parois s'accordent, en général, à admettre que les variations de la composition des parois de levures floculantes et non floculantes concernent particulièrement les teneurs en oses neutres, hexosamines, acides aminés et en phosphore.

L'étude comparative des parois de *K.lactis*, caractérisées par des degrés de floculation variables, a permis de confirmer ces observations et de mettre en évidence que les variations de la composition pariétale de ces levures au moment de la floculation, sont d'ordre quantitatif, et portent effectivement sur les constituants cités (oses, hexosamines, acides aminés et phosphore). En comparant ces constituants pariétaux, nous constatons que les oses et le phosphore varient nettement en relation avec le degré de floculation de la levure.

L'ensemble des résultats semble confirmer les hypothèses selon lesquelles l'état de floculation des levures se traduit principalement par une augmentation des oses totaux et une baisse des protéines.

Les teneurs élevées en oses totaux dans les parois de levures floculantes sont souvent attribuées à un enrichissement en polymères à base de mannose, c'est à dire les mannanes. Ceci est confirmé par le rapport Man/ Glc plus élevé dans les parois de *K. lactis* floculante.

D'une manière générale, l'augmentation de la teneur en oses dans les parois de levures floculantes, a été constatée par plusieurs auteurs notamment chez *Saccharomyces* et

Kluyveromyces (STEWART et BALLOU, 1968; JEUNEHOMME-RAMOS, 1964; DAY et al., 1975; STEWART et RUSSEL 1981; AMRI et al., 1982; HUSSAIN et al., 1987).

L'augmentation de la teneur en phosphore dans les parois de *K. lactis* floculante est parallèle à celle des mannanes cependant, elle ne serait pas seulement due à l'augmentation de ce polymère à base de mannose phosphorylé, mais également à un degré de phosphorylation plus important des éléments pariétaux en particulier les mannanes (LYONS et HOUGH, 1971). En effet le rapport molaire (HEXOSES/Phosphore) dans les parois des levures floculantes diminue de 25% environ par rapport à celui des parois de levures non floculantes, malgré l'augmentation de la teneur en oses des levures floculantes, observée. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour d'autres levures floculantes (DAY et al., 1975; JAYATISSA et ROSE 1976; STEWART et al., 1981).

La diminution de la teneur pariétale en hexosamines des levures floculantes peut s'expliquer par une baisse du taux de la chitine ou de la teneur en hexosamine impliquée dans la structure des phosphopeptidomannanes. En effet, une unité de di-N-acétyl chitibiose dans les PPM constitue deux molécules de N-acétyl-glucosamine liées entre elles par une liaison β - (1 \rightarrow 4), sert à fixer la partie glucidique à la partie peptidique (NAKAJIMA et BALLOU, 1974). De ce fait, une diminution du taux de N-acétyl-glucosamine, à ce niveau, entraîne une chute de la teneur en oses dans les parois des levures floculantes, ceci serait en contradiction avec les résultats des dosages des oses totaux. Cette observation a été faite par AL MAHMOOD (1987) pour les parois de *Kluyveromyces bulgaricus*. Cet auteur a émis l'hypothèse selon laquelle la paroi des levures floculantes contiendrait plus de phosphopeptidomannanes avec une faible teneur en N-acétyl glucosamine, ce qui semble vérifié pour les levures *K. lactis* floculantes étudiées.

Par ailleurs, selon SMITH et al., (1975) la N-acétyl glucosamine serait liée à une chaîne latérale des mannanes de *K. lactis*; une telle structure serait d'après BALLOU et al., (1974) responsable de l'antigénicité de cette levure.

D'après les différentes analyses effectuées sur les parois de *K. lactis*, la diminution des hexosamines pariétales des levures floculantes est associée à une faible teneur en protéines, ceci caractérise, d'après certains auteurs les parois de levures floculantes (AMRI et al., 1981, HUSSAIN et al., 1986).

L'analyse chimique des parois issues des souches caractérisées par des degrés de floculation variables, montre

que la teneur en calcium est relativement plus élevée lorsque la levure est très floculante, il semble alors que la teneur en calcium dans les parois est liée à celle du phosphore. En effet, d'après (LYONS et HOUGH (1971) le calcium se fixe par l'intermédiaire des groupements phosphates; cependant STEWART et al., (1975) puis JAYATISSA et ROSE (1976) ont indiqué que la fixation du calcium pouvait impliquer également des groupements carboxyliques. Ces deux hypothèses semblent vérifiées dans le cas des parois de *K. lactis* puisque les résultats mettent en évidence, d'une part, une teneur élevée en phosphore dans les parois de levures floculantes et d'autre part, une teneur voisine en acides aminés dicarboxyliques dans les deux types de parois de *K. lactis*.

II. ETUDE DES STRUCTURES PARIETALES OBTENUES PAR ACTION DE LA PRONASE

II.1. INTRODUCTION

Dans l'architecture pariétale les mannanes impliqués dans le phénomène de floculation sont liés aux parties protéiques par des liaisons covalentes. L'action d'enzymes protéolytiques sur ces liaisons permettra de libérer les mannanes de la structure pariétale.

Parmi ces enzymes, la pronase a été la plus utilisée pour extraire les phosphopeptidomannanes des parois de levures LIPKE et BALLOU, 1982; TRONCHIN et al., 1984, (CASSONE et al., 1987;

Les phosphopeptidomannanes extraits, par l'action de la pronase, peuvent être précipités par la liqueur de Fehling (BALLOU et RACHKE, 1974) Par le cetavlon (cétyle-triméthyle-bromure d'ammonium) ou par l'alcool. Selon OKUBO et al., (1981), le dernier mode de précipitation semble le plus intéressant car il permet de conserver les structures fines des mannanes; nous l'avons alors adopté.

II.2. ISOLEMENT DES PPM

Les parois traitées à la pronase permettent d'obtenir deux fractions, l'une hydrosoluble (de nature glycoprotéine) et l'autre insoluble. Les phosphopeptidomannanes ont été précipités à partir des fractions hydrosolubles par l'éthanol.

Les rendements obtenus après précipitation et lyophilisation sont indiqués dans le tableau 80.

TABLEAU 80: Rendement pondéral en PPM obtenus par action de la pronase sur les parois de *K. lactis* floculantes et non floculantes

SOUCHES	PPM EXTRAITS
KL9c (TF)	20.1
KL9a (MF)	18.9
KL9b (FF)	16.8
KL9d (NF)	14.9

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

TF: Très floculante

MF: Moyennement floculante

FF: Faiblement floculante

NF: Non floculante.

D'après le tableau 80, les rendements en extraits PPM varient de 15 à 20% environ, respectivement pour les parois de levures non floculantes et celles des levures très floculantes; soit une augmentation moyenne de 5% lorsque la levure flocule. Cependant les résultats n'indiquent pas de différences significatives entre les teneurs en PPM des parois de levures très floculantes (KL9c) et moyennement floculantes (KL9a). Il en est de même pour les parois de levures faiblement floculantes (KL9b) et non floculantes (KL9d).

II.3. COMPOSITION CHIMIQUE DES PPM EXTRAITS DES PAROIS PAR LA PRONASE

Les extraits pariétaux obtenus par la pronase sont préalablement filtrés sur gel Trisacryl GF 2000. Cette filtration permet d'obtenir pour chaque extrait une fraction récupérée et lyophilisée après dialyse contre de l'eau distillée. Les différentes fractions lyophilisées sont analysées après hydrolyse acide (HCl). Les cinétiques de libération des divers constituants sont indiquées par les figures 148, 149 et 150.

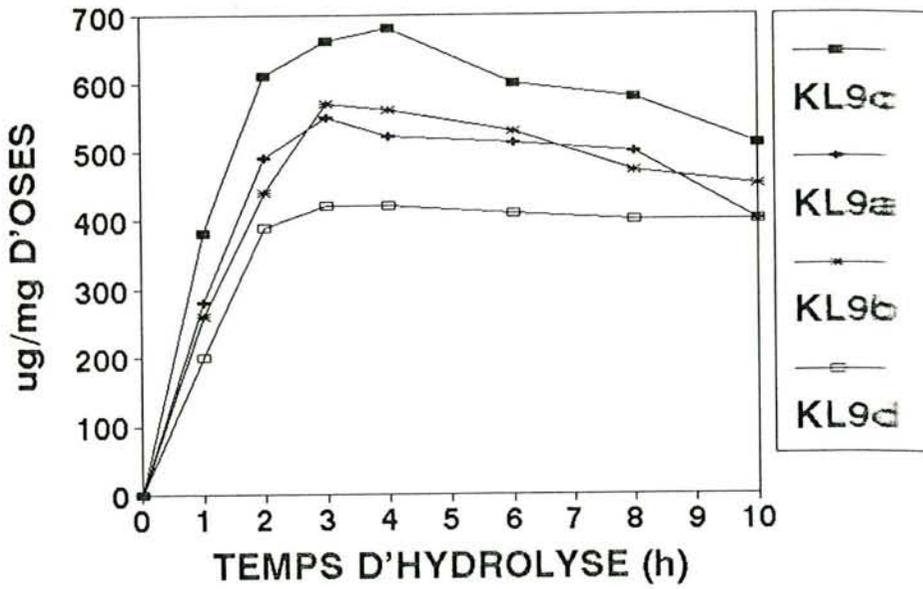


Fig. 148: Cinétique de libération des oses par hydrolyse HCl 2N des PPM extraits des parois après action de la pronase

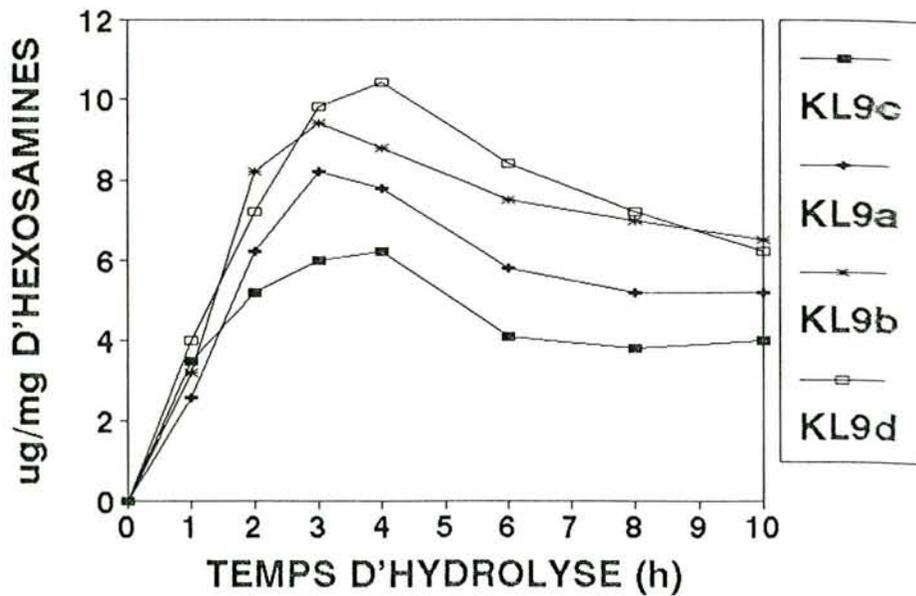


Fig. 149: Cinétique de libération des hexosamines par hydrolyse acide HCL 6N des PPM extraits des parois de *K. lactis* après action de la pronase

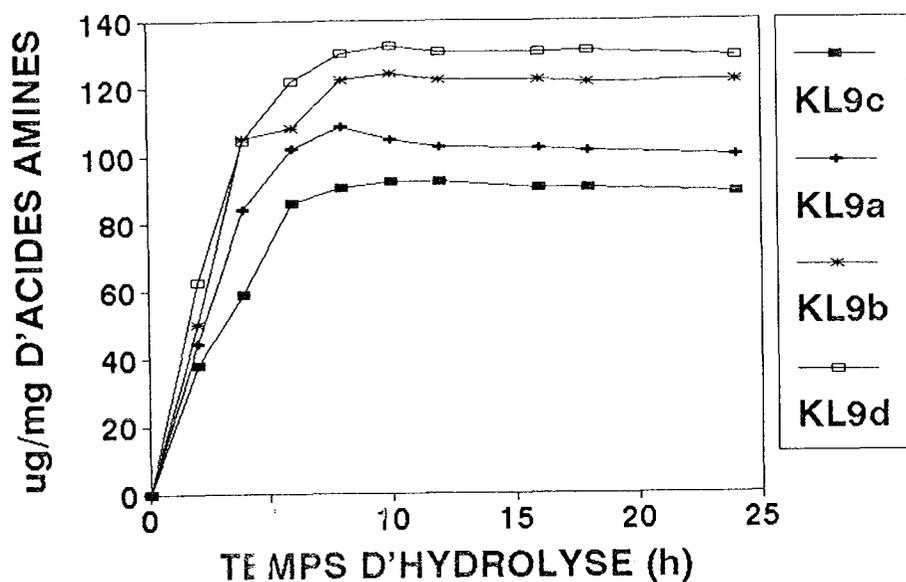


Fig. 150: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse acide (HCl 6 N) des PPM extraits des parois de *K. lactis* après action de la pronase

Le tableau 81, indique la composition chimique globale des PPM extraits des parois des différentes souches. Les résultats de l'analyse chimique montrent que les fractions obtenues sont de nature phosphopeptidomannane et permettent de faire les observations suivantes:

TABLEAU 81: Composition chimique globale des ppm extraits des parois de *K. lactis* après action de la pronase

SOUCHES				
CONSTITUANTS	KL9c	KL9a	KL9b	KL9d
Oses neutres	85.2	83.4	75.3	75.2
Hexosamines	1.6	2.0	2.8	3.5
Acides aminés	11.4	12.6	13.8	14.5
Phosphore	3.2	2.7	1.3	1.4
Man/Glc	10.5	8.5	7.4	6.2
Oses /P	26.62	30.88	57.92	54.42

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Man: Mannose

Glc: Glucose

P : Phosphore

-Le taux en oses dans les PPM des parois augmente lorsque les levures flocculent. Les oses identifiés par chromatographie en phase gazeuse, sous forme d'acétates d'alditols sont composés en majeure partie de mannose (90%) et une faible quantité de glucose (figure 151). Le rapport Man/Glc dépend du degré de floculation et varie en sens inverse.

- Les extraits des parois de levures flocculantes sont plus riches en phosphore qui varie dans le même sens que le degré de floculation. Cependant la teneur en phosphore des PPM des parois de levures faiblement flocculantes et celle des PPM des parois de levures non flocculantes est pratiquement identique.

- L'analyse des acides aminés montre une prédominance, dans tous les extraits de quatre acides aminés (ac. aspartique et glutamique, la thréonine et la sérine). La teneur en ces acides aminés augmente légèrement dans les PPM des parois de levures flocculantes; bien que la quantité totale en acides aminés soit plus élevée dans les PPM des levures non flocculantes (Tableau 82 et histogramme 10). Ce résultat semble général puis qu'il a été obtenu sur les parois isolées.

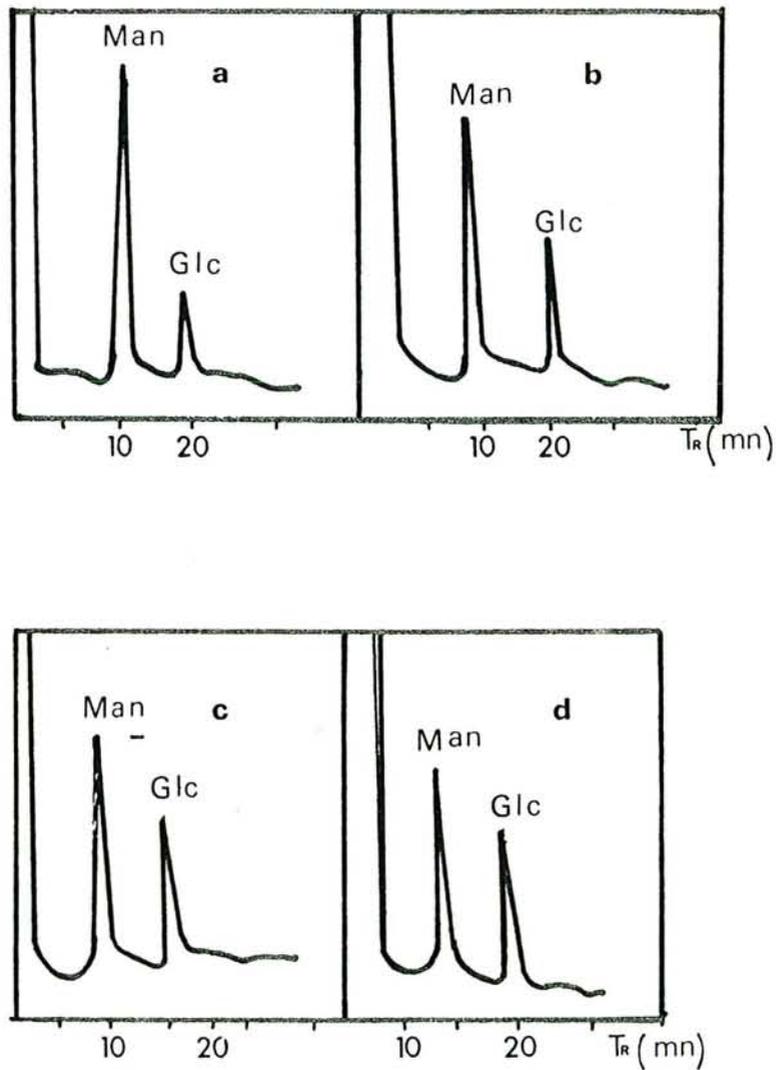


Fig. 151: Chromatogramme des acétates d'alditols des produits d'hydrolyse des PPM extraits des parois de *K. lactis* après action de la pronase (a) KL9c (TF); (b) KL9a (MF); (c) KL9b (FF); (d) KL9d (NF).

TABLEAU 82: composition en acides aminés des extraits (PPM) des parois de *K. lactis* après action de la de la pronase

AA	KL9c (TF)		KL9a (MF)		KL9b (FF)		KL9d (NF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA	µg/mg	%AA
Asp	12.0	10.31	12.9	9.81	13.9	9.55	14.8	9.95
Thr	17.3	14.92	17.1	13.64	21.1	14.48	19.9	13.39
Ser	13.3	11.43	14.1	11.25	14.7	10.11	15.1	10.36
Glu	18.3	15.70	17.6	10.04	22.8	15.68	21.3	14.33
Pro	5.2	4.47	6.1	4.86	6.5	4.47	7.0	4.70
Gly	4.6	3.95	5.3	4.22	7.8	5.36	7.2	4.84
Ala	7.1	6.1	5.5	4.38	10.7	7.36	11.3	7.59
Val	6.8	5.84	8.1	6.46	8.4	5.78	7.9	5.31
Ile	6.2	5.33	7.9	6.30	8.7	5.98	8.6	5.78
Leu	7.3	6.27	8.6	6.86	7.9	5.43	8.2	5.51
Tyr	3.4	2.92	4.1	3.27	3.7	2.54	4.0	2.68
Phe	4.0	3.43	4.8	3.41	5.4	3.71	5.8	4.70
Lys	2.5	2.41	5.3	4.22	6.8	4.67	7.1	4.77
His	2.6	2.48	4.4	3.51	4.6	3.16	5.9	3.95
Arg	2.5	2.14	3.5	2.79	2.4	1.65	4.6	3.09
Total	116.3	99.4	125.3	99.02	145.4	99.93	148.7	99.79

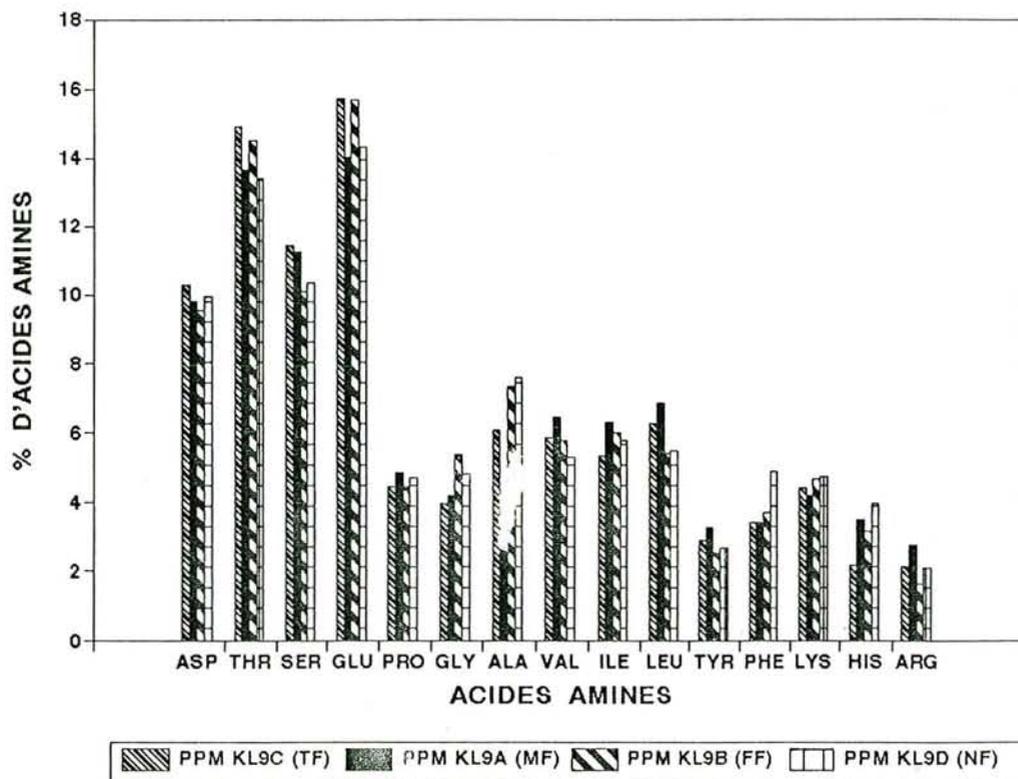
(Résultats exprimés en % de matière sèche)

(TF)= Très floculante

(MF)= Moyennement floculante

(FF)= Faiblement floculante

(NF)= Non floculante



HISTOGRAMME 10: Variation de la teneur en acides aminés des PPM extraits des parois de *K. lactis* floculante et non floculante, après action de la pronase

II.4. EVALUATION DES MASSES MOLECULAIRES DES PPM EXTRAITS DES PAROIS PAR ACTION DE LA PRONASE

Les PPM extraits des parois de *K. lactis* sont d'abord filtrés sur gel Trisacryl GF 2000. Les éluats sont recueillis en une seule fraction et cette filtration a été répétée plusieurs fois pour avoir suffisamment de produits.

Les produits obtenus sur Trisacryl sont dialysés puis lyophilisés et leurs masses moléculaires ont été estimées par filtration sur Biogel A5M.

Les profils d'éluion des PPM sur Biogel sont illustrés par la figure 152(a et b) qui met en évidence pour chaque PPM deux fractions dont les quantités recueillies sont indiquées par le tableau 83.

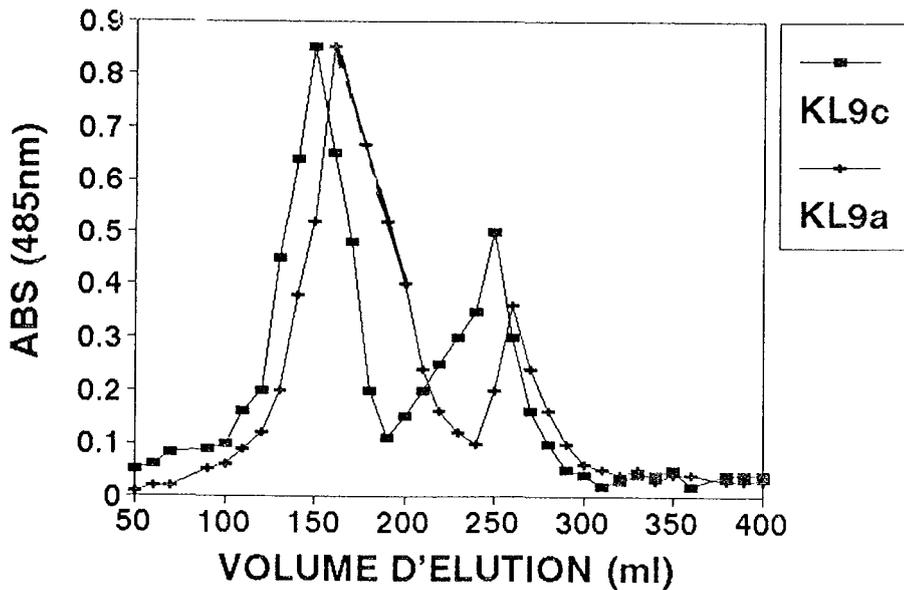


Fig. 152(a): Profil d'éluion sur Biogel A5M des PPM extraits des parois de *K. lactis* par action de la pronase

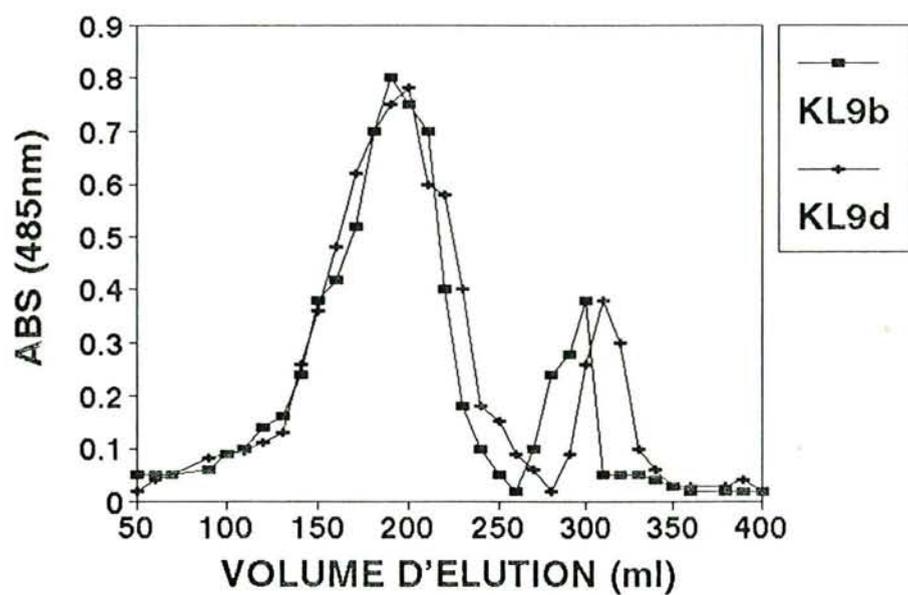


Fig. 152(b): Profil d'élution sur Biogel A5M des PPM extraits des parois de *K. lactis* par action de la pronase

D'après le tableau 83, les quantités des fractions majeures (F1) varient entre 82% et 85%, alors que les fractions mineures (F2) ne représentent que 5 à 10% des quantités initiales de PPM filtrés. De plus, il n'y a pas de différences significatives entre les quantités obtenues à partir des PPM des parois de levures floculantes et celles des parois de levures non floculantes.

TABLEAU 83: Rendement de la filtration sur Biogel A5M des PPM extraits des parois de *K. lactis* par la pronase

FRACTIONS	F1	F2
SOUCHES		
KL9c	85.32	8.72
KL9a	82.80	5.9
KL9b	86.80	10.1
KL9d	85.40	6.50

(Résultats exprimés en % des quantités initiales de PPM)

A l'aide d'une courbe étalon (Figure 129b), nous avons estimé les masses moléculaires des différentes fractions indiquées par le tableau 84.

TABLEAU 84: Masses moléculaires des différentes fractions obtenus par la filtration sur Biogel A5M des PPM extraits des parois de *K. lactis* par la pronase

FRACTIONS	MM DE F1 (daltons)	MM DE F2 (daltons)
SOUCHES		
KL9c (TF)	310.000	41.000
KL9a (MF)	290.000	43.000
KL9b (FF)	250.000	45.000
KL9d (NF)	230.000	40.000

D'après ce tableau, les masses moléculaires estimées des fractions majeures (F1) varient légèrement selon le degré de floculation. En effet, les masses moléculaires des fractions des parois de levures floculantes sont supérieures à celles des fractions de parois de levures non floculantes.

II.5. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES FRACTIONS (F1) OBTENUES PAR ACTION DE LA PRONASE

La composition chimique globale des fractions majeures (F1) est établie après hydrolyse acide. Le temps de libération maximal des oses neutres, des acides aminés et des hexosamines a été déterminé.

Les résultats de l'analyse chimique sont rassemblés dans le tableau 85.

TABLEAU 85: Composition chimique globale des fractions majeures (F1) des parois de *K. lactis*, obtenues après action de la pronase

FRACTIONS	F1 de KL9c	F1 de KL9a	F1 de KL9b	F1 de KL9d
CONSTITUANTS				
Oses neutres	86.4	84.6	72.9	73.3
Hexosamines	1.2	1.9	3.1	3.6
Acides aminés	12.3	12.8	13.4	14.2
Phosphore (P)	3.6	3.1	1.5	1.1
Man/Glc	14.2	10.2	7.6	7.4
Oses/P	24.0	27.29	48.6	66.63

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

D'après l'analyse chimique, l'action de la pronase sur les parois permet d'isoler des fractions de nature phosphopeptidomannane, caractérisées par leur teneur élevée en oses. Les mêmes résultats montrent que la composition des fractions F1 varie en relation avec le degré de floculation. En effet, dans

les fractions extraites des parois de levures floculantes, on note une teneur élevée en oses totaux et en phosphore, alors que les fractions des parois de levures non floculantes renferment plus d'acides aminés et d'hexosamines. Cependant les différences entre les fractions des parois faiblement floculantes et celles des parois non floculantes ne sont pas significatives.

II.6. ACETOLYSE DES PPM (FRACTIONS F1) OBTENUES PAR ACTION DE LA PRONASE

Les fractions mannoprotéiques purifiées sur Biogel A5M sont soumises à une acétolyse qui libère des oligosaccharides de faible masse moléculaire.

Les acétolysats de chaque PPM sont préalablement filtrés sur colonne de DEAE-Séphadex A25 (échangeuse d'anions). Les polymères "neutres" et "chargés" sont élués par NH_4HCO_3 0.005M et 0.5M respectivement, selon le protocole préconisé par STEWART et BALLOU (1988) modifié par OKUBA et al., (1978).

La séparation des acétolysats sur colonne DEAE-Séphadex permet d'obtenir des polymères "neutres" et des polymères "chargés" dans des proportions variables selon le caractère floculant de la souche dont ils sont issus (tableau 86).

II.6.1. ANALYSE DES POLYMERES "NEUTRES"

Les polymères "neutres" des acétolysats des PPM ont été séparés sur colonne de Biogel P2 de 300ml préalablement étalonnée.

Les profils d'éluion sur Biogel P2 des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM des parois de *K. lactis* sont illustrés par les figures 153 (a et b) et 154 (a et b) qui indiquent 5 pics dont un est exclu du Biogel, pour chaque PPM.

les rapports molaires et la composition chimique des sous-fractions obtenues sont rapportés dans les tableaux 87 et 88. D'après les résultats, dans tous les acétolysats, les sous-fractions correspondant aux pics exclus (V) représentent des polymères de masse moléculaire élevée (supérieure à 1800 daltons); leur taux est relativement faible et varie peu avec le caractère floculant de la levure.

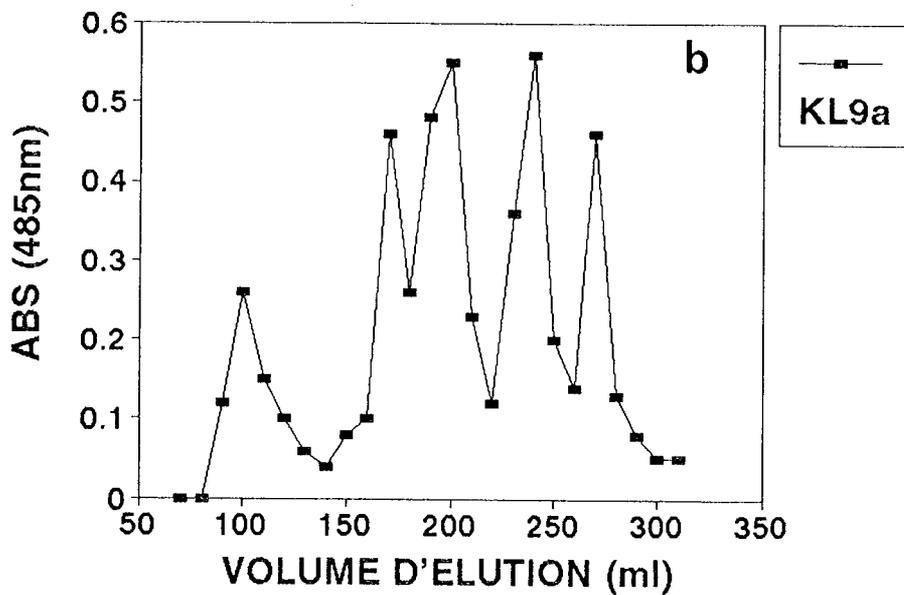
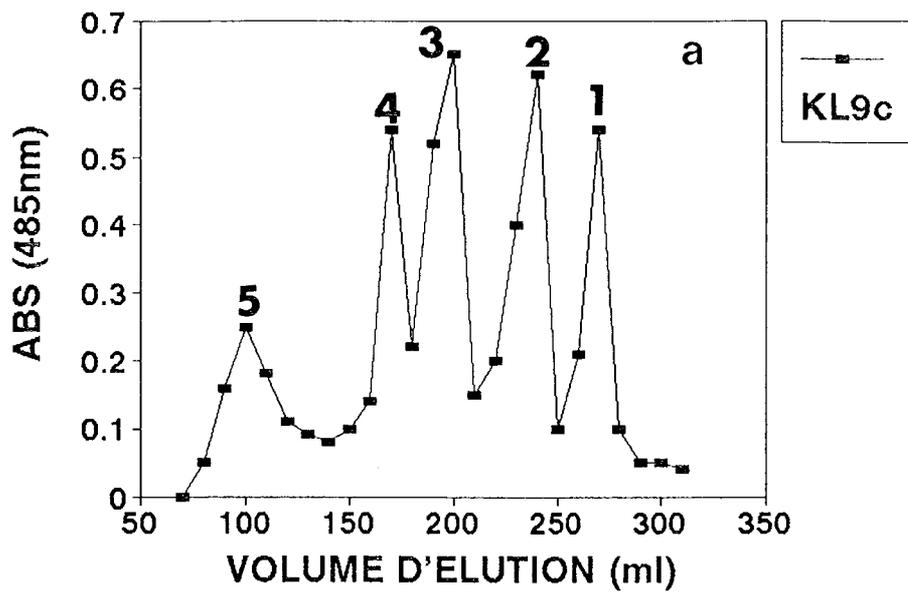


Fig. 153: Profil d'élution sur Biogel P2 des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM extraits des parois de *K. lactis*, [(a) KL9c et (b) KL9a], après action de la pronase

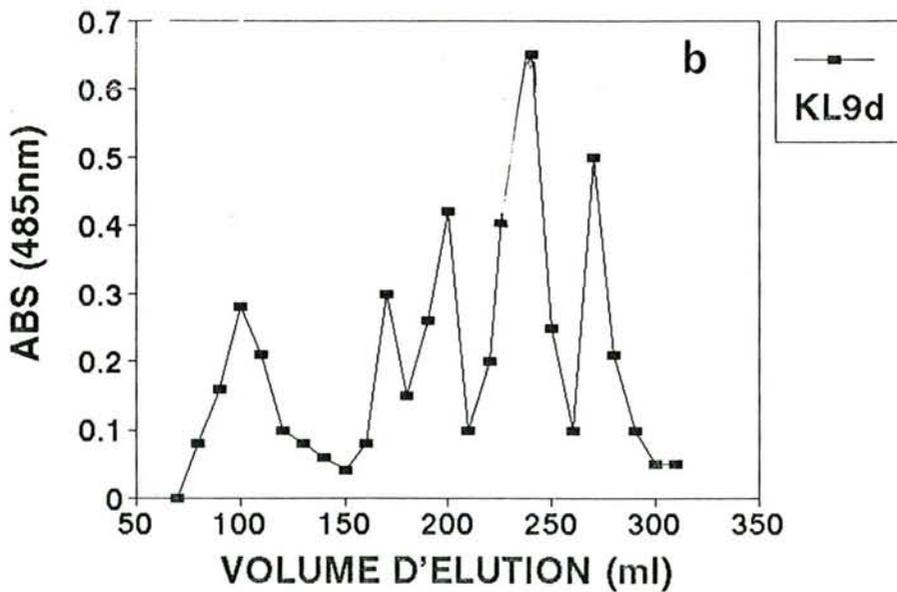
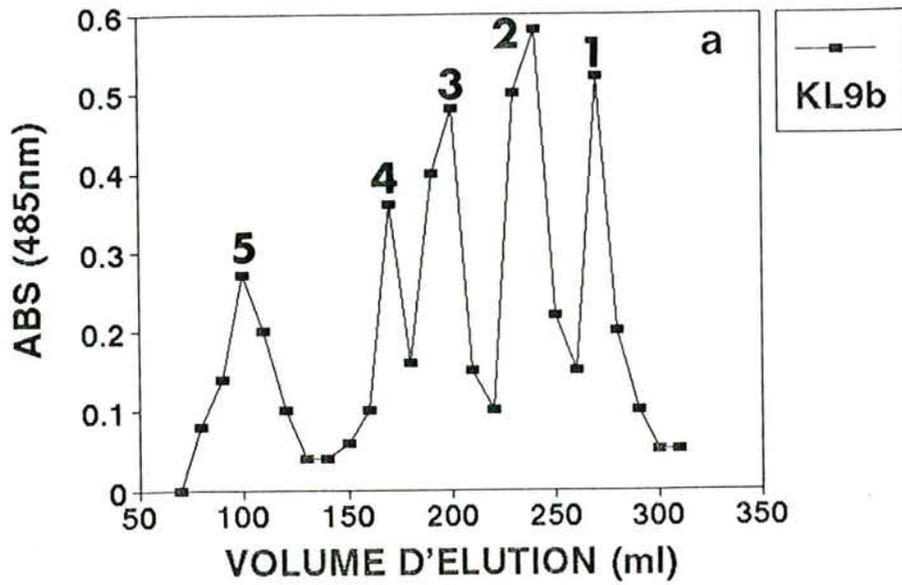


Fig. 154: profils d'élution sur Biogel P2 des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM extraits des parois de *K. lactis* [(a) KL9b, (b) KL9d] après action de la pronase

Tableau 86: Variation des pourcentages de produits bruts
issus de l'acétolyse des PPM de *K. lactis*
floculantes et non floculantes

Souche	Quantité initiale de PPM	Produits d'acétolyse						Produits résistants à l'acétolyse	
		"Neutres"		"Chargés"		Total			
		Quantité(mg)	%	Quantité(mg)	%	Quantité(mg)	%	Quantité(mg)	%
KL9c (TF)	120	68.3	56.91	22.3	18.58	90.6	75.5	29.4	24.5
KL9a (MF)	120	66.9	55.75	21.7	8.08	88.6	78.83	31.4	26.16
KL9b (FF)	120	60.4	50.33	18.4	15.33	78.8	65.66	41.2	34.33
KL9d (NF)	120	61.3	61.3	18.2	15.16	79.5	66.25	40.5	33.75

TF : Très floculante
 MF : Modérément floculante
 FF : Faiblement floculante
 NF : Non floculante

TABLEAU 87: Composition chimique des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM isolés par action de la pronase, des parois de *K. Lactis* (KL9C et KL9a)

SOUCHES	SOUS-FRACTIONS			COMPOSITION CHIMIQUE			
	N°	M M	R	HEXOSES	ACIDES AMINES	Glc NaC	P
KL9c (TF)	I	179	1,0	++	-	-	-
	II	358	1,4	++	-	-	-
	III	543	1,8	++	-	-	-
	IV	726	1,2	++	-	-	-
	V	>1.800	0,7	++	±	T	-
KL9a (MF)	I	182	1,0	++	-	-	-
	II	359	1,6	++	-	-	-
	III	568	1,5	++	-	-	-
	IV	730	1,1	++	-	-	-
	V	>1.800	0,7	++	±	T	-

TF : Très flocculante

MF : Moyennement flocculante

MM : Masse moléculaire

R : Rapport exprimé en considérant le nombre de moles de mannose

T : Traces.

TABLEAU 88: Composition chimique des polymères
 "neutres" issus de l'acétolyse des PPM
 isolés par la pronase des parois de *K. lactis*
 (KL9b et KL9d)

SOUCHES	SOUS-FRACTIONS			COMPOSITION CHIMIQUE			
	N°	M M	R M	HEXOSES	ACIDES AMINES	Glc NaC	P
KL9b (FF)	I	183	1,0	++	-	-	-
	II	362	2,1	++	-	-	-
	III	544	0,7	+	-	-	-
	IV	732	0,6	++	-	-	-
	V	>1.800	0,8	+	±	±	T
KL9d (NF)	I	181	1,0	++	-	-	-
	II	361	2,7	++	-	-	-
	III	546	0,5	++	-	-	-
	IV	728	0,3	++	-	-	-
	V	>1.800	0,9	+	+	±	T

FF : Faiblement flocculante

NF : Non flocculante

MM : Masse moléculaire

R : Rapport exprimé en considérant le nombre
de moles de mannose

T : Traces

Pour identifier les différentes sous-fractions, nous avons réalisé, en plus de l'estimation de leurs masses moléculaires par les volumes d'élution, une chromatographie sur couche mince. Les rapports frontaux (R_f) sont comparés à ceux des témoins chromatographiés dans les mêmes conditions. Les résultats sont indiqués par le tableau 89.

TABLEAU 89: Rapports frontaux (R_f) des sous-fractions des polymères "neutres" issues de l'acétolyse des PPM isolés par la pronase des parois de *K. Lactis*.

N° SOUS-FRACTIONS	I	II	III	IV	V
TEMOINS	0,84	0,75	0,50	0,40	0,01
sous-fractions de KL9c	0,82	0,76	0,51	0,39	0,02
sous-fractions de KL9a	0,83	0,75	0,53	0,41	0,03
sous-fractions de KL9b	0,85	0,77	0,54	0,43	0,01
sous-fractions de KL9d	0,81	0,74	0,52	0,40	0,02

(CCM sur gel de silice)

Témoins : (I) Mannose
 (II) Mannobiose
 (III) Mannotriose
 (IV) Mannotétratosé
 (V) Dextrane

D'après les résultats de la chromatographie sur couche mince, les pics IV et III sont constitués de mannotétraose et de mannotriose; leurs teneurs augmentent lorsque le degré de floculation de la levure augmente, comme l'indiquent les rapports molaires.

Les pics II correspondant à des mannobioses plus abondants dans les parois des levures peu et non floculantes (KL9b et KL9d).

Les pics I représentent des résidus mannose et leur taux ne varie pratiquement pas en fonction du degré de floculation des levures.

L'analyse des polymères "neutres" issus de l'acétolyse des PPM obtenus par la pronase à partir des parois ne révèle, d'une part, que la présence de mannose et indique, d'autre part, que les PPM des parois de levures floculantes se caractérisent par une teneur élevée en tétra et en trisaccharides; en revanche dans les PPM des parois de levures peu ou non floculantes les disaccharides sont prédominants.

II.6.2. ANALYSE DES POLYMERES "CHARGES"

Les polymères "chargés" issus des acétolysats des PPM sont filtrés sur colonne de Biogel P2; l'élution est réalisée avec une solution de NH_4CO_3 0,5M. Les profils d'élution sont illustrés par les figures 155 (a et b) et 156 (a et b) qui mettent en évidence pour chaque PPM 3 pics dont un exclu du Biogel P2.

Les polymères "chargés" séparés sont caractérisés par leur volume d'élution et identifiés par chromatographie sur couche mince. Les rapports molaires et la composition chimique des sous-fractions obtenues sont rassemblés dans les tableaux 90 et 91.

D'après les résultats, les sous-fractions correspondant aux pics IV exclus du gel ont une masse moléculaire supérieure à 1.800 daltons. L'analyse chimique révèle la présence de mannose, d'acides aminés, du phosphore et des traces d'hexosamines. Elles représentent la fraction des PPM résistant à la réaction d'acétolyse; ce sont les sous-fractions les moins importantes de tous les polymères "chargés" obtenus.

Les sous-fractions III renferment du mannose et du phosphore; d'après leurs masses moléculaires estimées par le volume d'élution, elles représentent les sous-fractions les plus importantes des polymères "chargés" et leur teneur augmente lorsque la levure est floculante (tableaux 90 et 91). Pour une bonne séparation en CCM, ces sous-fractions sont soumises à une déphosphorylation par la phosphatase alcaline. D'après les résultats de la CCM, ces sous-fractions correspondent bien aux mannobiose phosphates.

Les constituants des pics II migrent au niveau du mannobiose. Cependant l'analyse chimique révèle des traces de phosphore dans les sous-fractions II des polymères "chargés" issus exclusivement des parois des levures très floculantes (KL9c) ce qui indique la présence en faible quantité de mannobiose phosphate chez cette levure.

II.7. D I S C U S S I O N

L'action de la pronase sur des parois isolées de *K. lactis* permet d'isoler des phosphopeptidomannanes dont les masses moléculaires estimées varient entre 230 et 310. 10³ daltons selon le degré de floculation des levures dont ils sont extraits.

L'étude chimique des constituants des fractions mannoprotéiques obtenues par action de la pronase révèle que leur structure évolue et varie en fonction de la souche et indique que le passage de l'état non floculant à l'état floculant se traduit par des remaniements qui portent à la fois sur la composition glucidique, protéique et minérale.

Ce résultat est comparable à celui obtenu avec les fractions extraites des parois par d'autres méthodes (cf première partie). En effet dans tous les cas, les fractions pariétales des levures floculantes se distinguent de celles des levures non floculantes par:

- Une élévation des oses neutres (rapports molaires mannose/glucose) et du phosphore
- Une baisse de protéines et d'hexosamines

L'analyse des fractions de nature phosphopeptidomannane isolées des parois montre qu'elles reproduisent, par ailleurs, de façon précise les variations observées au niveau des parois totales dont elles sont extraites.

L'acétolyse des fractions isolées des parois par la pronase indique que la chaîne de base est formée de liaisons (1 → 6) les données concordent avec les résultats de notre première partie de l'étude et ceux obtenus pour la structure des mannoprotéines d'autres levures.

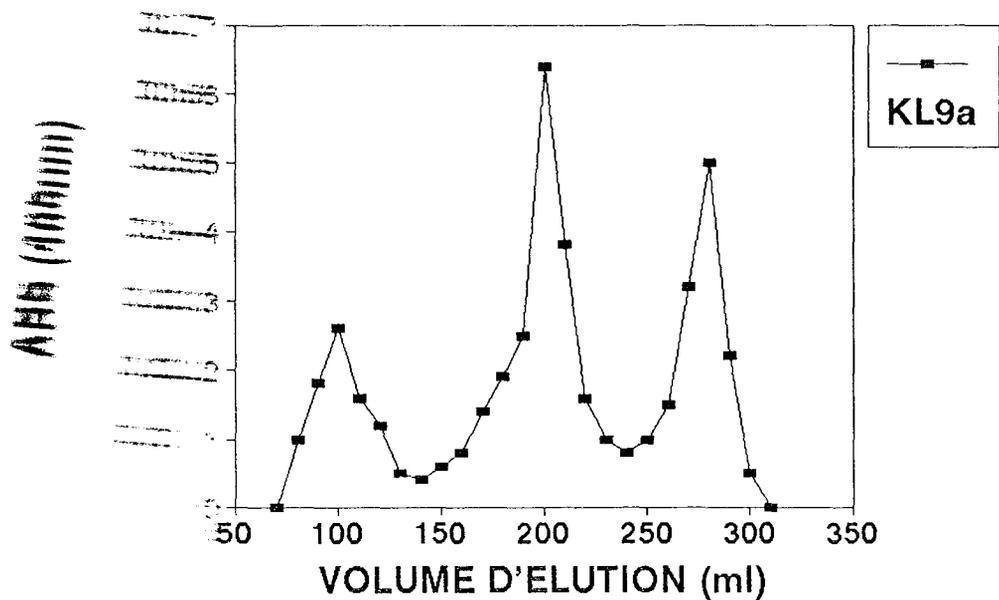
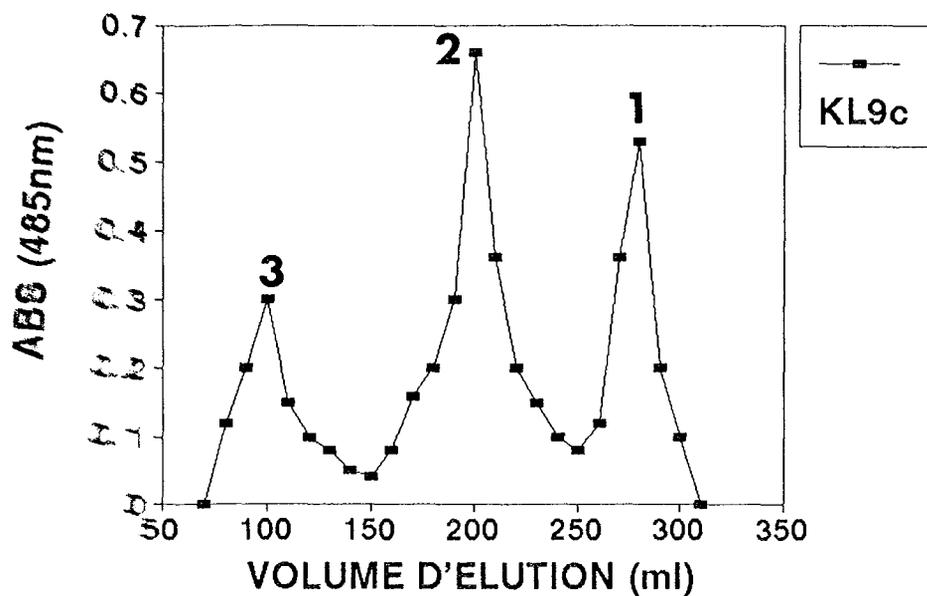
Les profils d'élution sur Biogel P2 des polymères "neutres" et "chargés" sont analogues pour toutes les fractions quelle que soit la souche.

les polymères "neutres" sont constitués de 5 sous-fractions dont l'une exclue du gel a une masse moléculaire relativement élevée, mais peu importante; elle est de nature protéique et représente une partie des extraits pariétaux qui échappent à la l'acétolyse.

L'analyse chimique des polymères "neutres" montre que les parois des levures floculantes sont riches en mannotétraoses et en mannotrioses dont les teneurs augmentent en fonction du degré de floculation. En revanche, les parois de levures peu ou non floculantes contiennent plus de mannobiose; il en découle, à priori, que les mannoprotéines pariétales des levures à l'état floculant sont plus complexes et portent des ramifications plus longues que celles des levures non floculantes.

la filtration des polymères "chargés" sur Biogel P2 donne 3 sous-fractions dont une est de nature mannoprotéique et exclue du gel. La seconde fraction (pic II) est la plus importante des polymères "chargés" des parois des levures floculantes. D'après les résultats de la séparation par CCM, cette sous-fraction correspond à des mannotrioses phosphate. Selon HERNANDEL et al., (1989), le phosphate peut-être présent dans la structure des PPM soit dans le noyau, soit dans la chaîne externe ou encore dans les deux à la fois mais absent dans les oligosaccharides liés à la thréonine ou la sérine de la partie peptidique.

l'analyse chimique des sous-fractions de polymères "chargés", montre, par ailleurs, des traces de phosphore au niveau du mannobiose exclusivement dans les fractions issues des parois de levures très floculantes; La présence de mannobiose phosphate, en quantité faible n'est pas donc exclue et semble être une caractéristique des levures floculantes appartenant au genre *Kluyveromyces*, puisque ALMAHMOOD et al., (1987) ont mis en évidence un phosphodisaccharide dans des proportions importantes chez la levure *K. bulgaricus* floculante.



Profil d'élution sur Biogel P2 des polymères "chargés" issus de l'acétolyse des PPM extraits par la pronase des parois de *K. lactis* (a) KL9c (TF) et (b) KL9a (MF)

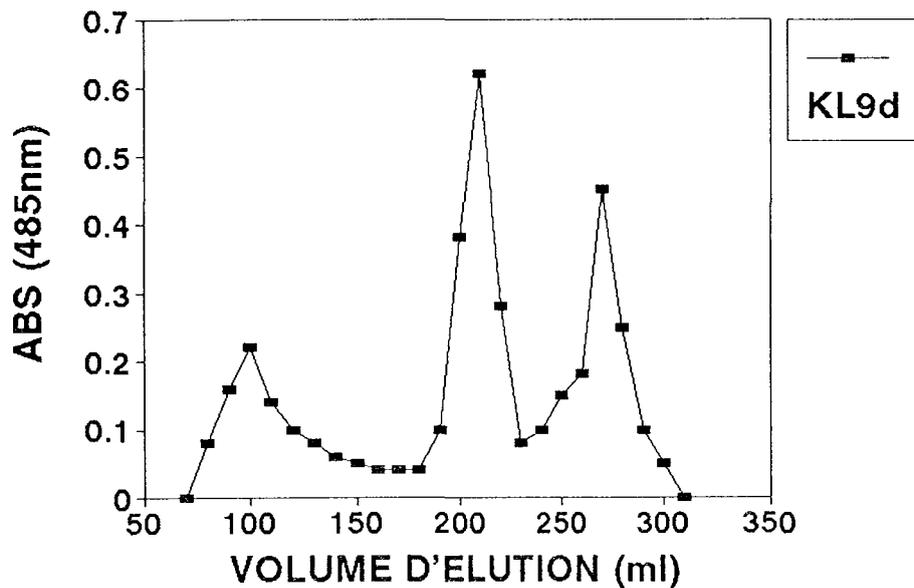
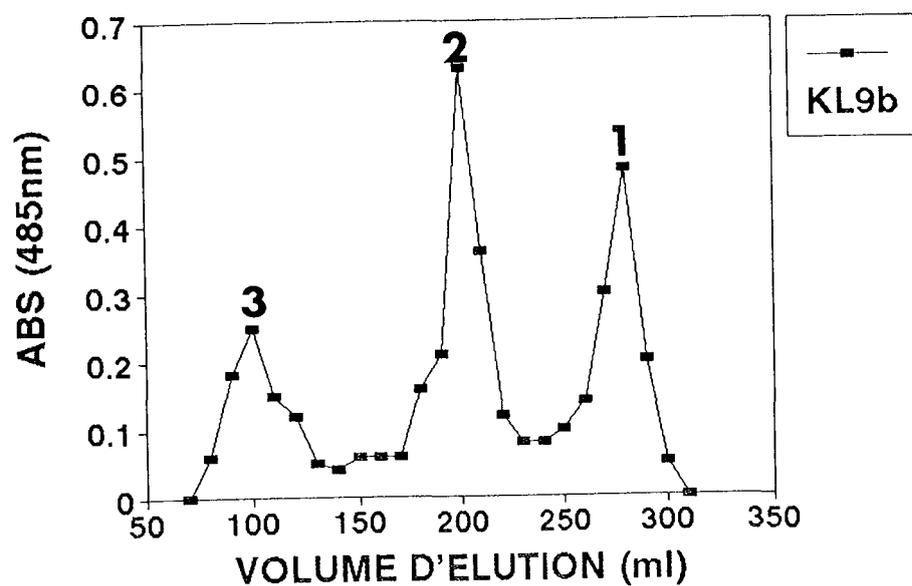


Fig. 156: Profil d'élution sur Biogel P2 des polymères "chargés" issus de l'acétolyse des PPM extraits par la pronase des parois de *K. lactis* (a) KLL9c (TF) et (b) KL9a (MF)

Tableau 90 :Composition chimique des sous-fractions des polymères "chargés" issus de l'acétolyse des PPM extraits par la pronase des parois de *K. lactis* (KL9b et KL9d)

Souches	SOUS-FRACTIONS			COMPOSITION CHIMIQUE			
	N°	M M	R	HEXOSES	ACIDES AMINES	GLc Nac	P
KL9b (TF)	I	185	1,0	++	-	-	-
	II	370	1,83	++	-	-	-
	III	555	0,56	+	±	T	±
KL9d (NF)	I	183	1,0	++	-	-	-
	II	368	1,58	++	-	-	-
	III	554	0,57	+	±	±	T

MM : Masse molaire
R : Rapport molaire
FF : Faiblement flocculante
NF : Non flocculante
T : Traces.

TABLEAU 91:Composition chimique des sous fractions des polymères "chargés" issus de l'acétolyse des PPM extraits par la pronase des parois de *K. lactis* (KL9c et KL9a)

Souches	SOUS-FRACTIONS			COMPOSITION CHIMIQUE			
	N°	M M	R	HEXOSES	ACIDES AMINES	GLUCO-SAMINE	P
KL9b (TF)	I	186	1,0	++	-	-	-
	II	364	1,31	++	-	-	-
	III	553	0,65	+	±	±	T
KL9d (NF)	I	181	1,0	++	-	-	-
	II	361	1,29	++	-	-	-
	III	546	0,52	+	±	±	T

TF : Très flocculante
 MF : Moyennement flocculante
 MM : Masse molaiculaire
 RM : Rapport molaire
 T : Traces.

CHAPITRE X

ETUDE COMPAREE DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES
EXTRAITS DES CELLULES ENTIERES DE K. LACTIS
FLOCULANTES ET NON FLOCULANTES
(KL9C, KL9A, KL9B ET KL9D)

I. ISOLEMENT DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM)

Les phosphopeptidomannanes (PPM) des souches floculantes et non floculante, ont été extraits, après autoclavage des cellules entières dans un tampon citrate PH 7,0 par précipitation à l'éthanol selon la méthode de PEAT et al., (1961) modifiée.

L'isolement des PPM est effectué sur des levures entières après 48 heures de croissance en milieu de sabouraud. Les rendements obtenus sont indiqués sur le tableau 92.

TABLEAU 92: Rendement en PPM et conditions d'obtention

SOUCHES	KL9c	KL9a	KL9b	KL9d
% FLO	60.5	40.3	20.1	0.0
TC(h ⁻¹)	0.29	0.30	0.30	0.31
RP(g/l)	3.5	3.8	4.1	4.3
REM(%)	10.5	8.3	7.2	6.9

% FLO: Pourcentage de cellules floculées

TC : Taux de croissance

RP : Rendement pondéral (biomasse)

REM : Rendement en extrait mannane

Les résultats indiquent que le rendement en extrait mannane augmente légèrement en fonction du degré de floculation.

II. ETUDE COMPAREE DES PHOSPHOPEPTIDOMANNANES (PPM) EXTRAITS

II.1. COMPOSITION CHIMIQUE GLOBALE DES PPM "BRUTS"

Les PPM obtenus par la méthode de PEAT à partir de cellules entières ont été d'abord filtrés sur gel Trisacryl GF 2000, la fraction majeure a été récupérée et dialysée contre l'eau distillée puis lyophilisée et analysée.

Pour établir la composition chimique, les PPM ont été soumis à une hydrolyse acide pour libérer les monomères des constituants. Les conditions optimales ont été fixées à partir des courbes de cinétiques d'hydrolyse (figures 157, 158 et 159).

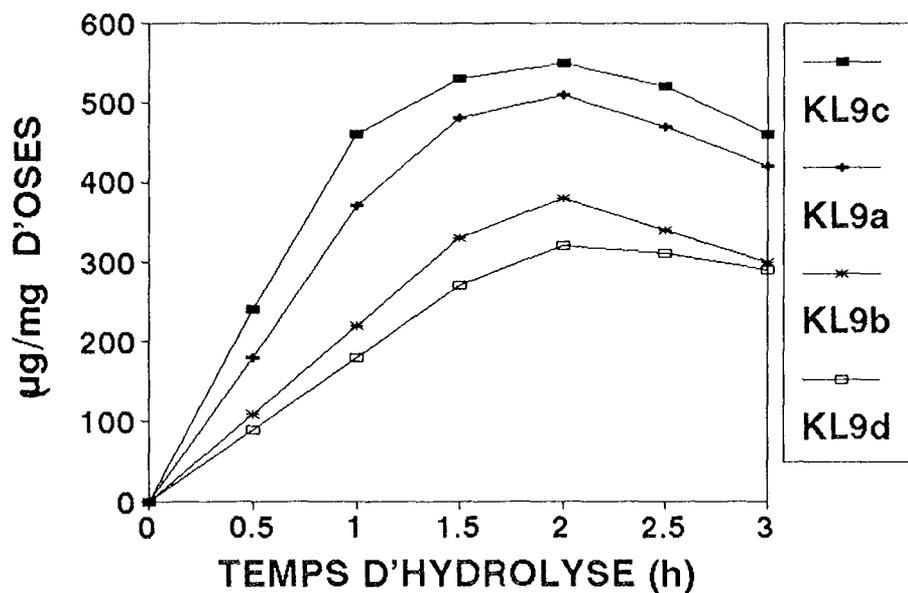


Fig. 157: Cinétique de libération des oses par hydrolyse HCl 2N des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* floculantes et non floculantes

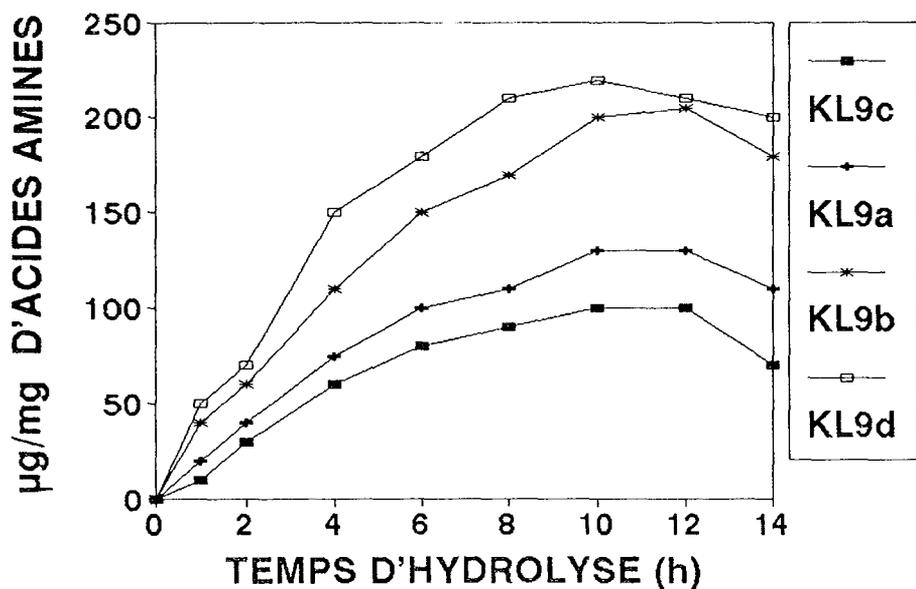


Fig. 158: Cinétique de libération des acides aminés par hydrolyse HCl 6N des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* floculantes et non floculantes

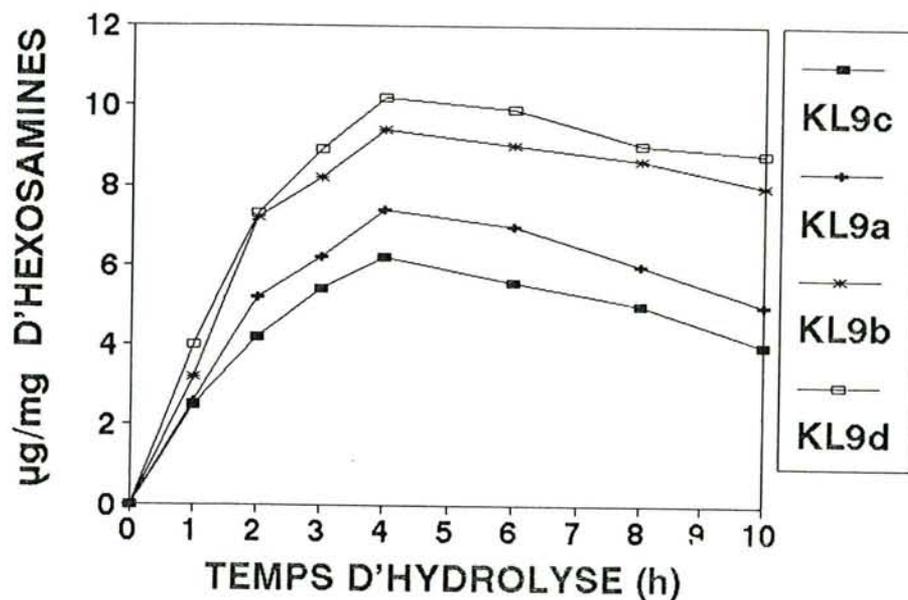


Fig. 159: Cinétique de libération des hexosamines par hydrolyse HCl 6N des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* flocculantes et non flocculantes.

La composition chimique globale des PPM "bruts" dialysés est indiquée par le tableau 93. Les résultats montrent qu'elle varie selon le caractère flocculant des levures.

TABLEAU 93: Composition chimique globale des PPM "bruts" dialysés des levures *K. lactis* floculantes et non floculantes, obtenues par la méthode de PEAT

SOUCHES	KL9c(TF)	KL9a(MF)	KL9b(FF)	KL9d(NF)
% FLO	60.5	40.6	20.8	0
Oses neutres	10.5	12.3	15.7	16.8
Acides aminés totaux	10.5	12.3	15.7	16.8
Hexo-samines	0.71	0.95	1.02	1.5
Phosphore	2.3	2.1	1.8	0.99
Calcium	0.05	0.04	0.025	0.020
Man/ Glc	15.3	13.4	8.5	7.8

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

Les oses totaux, le phosphore et le calcium sont plus importants dans les PPM des levures floculantes. Leurs teneurs augmentent avec le pourcentage de la floculation de la souche. En revanche, les teneurs en acides aminés et en hexosamines sont plus élevées dans les PPM des levures non floculantes. Ces teneurs diminuent lorsque le pourcentage de floculation augmente.

L'identification des oses présents dans les PPM, après transformation en acétates d'alditols et séparation par chromatographie en phase gazeuse montre que les PPM des souches *K. lactis* sont constitués en majeure partie de mannose; on décèle toutefois des traces de glucose dont les teneurs augmentent légèrement quand le pourcentage de floculation des souches diminue (figure 160).

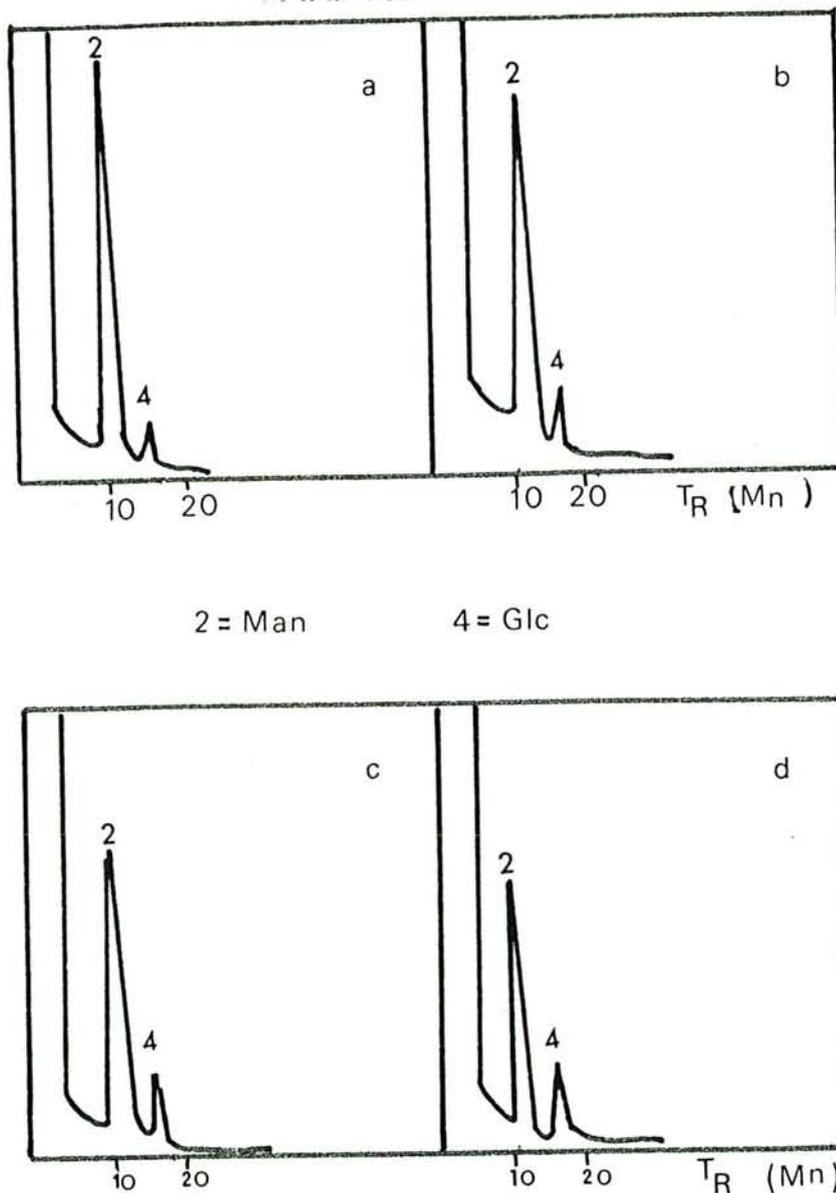


Fig. 160: Chromatogrammes des acétates d'alditols des produits d'hydrolyse des PPM "bruts" dialysés des souches *K. lactis* (a) KL9c(TF); (b) KL9a (MF); (c) KL9b (MF); (d) KL9d (NF)

L'analyse quantitative et qualitative des acides aminés de la partie protéique des PPM montre une prédominance de la thréonine, de l'acide aspartique de l'acide glutamique, de la sérine, de l'alanine et de la glycine dans tous les PPM et qui représentent environ 60 à 70% des acides aminés totaux.

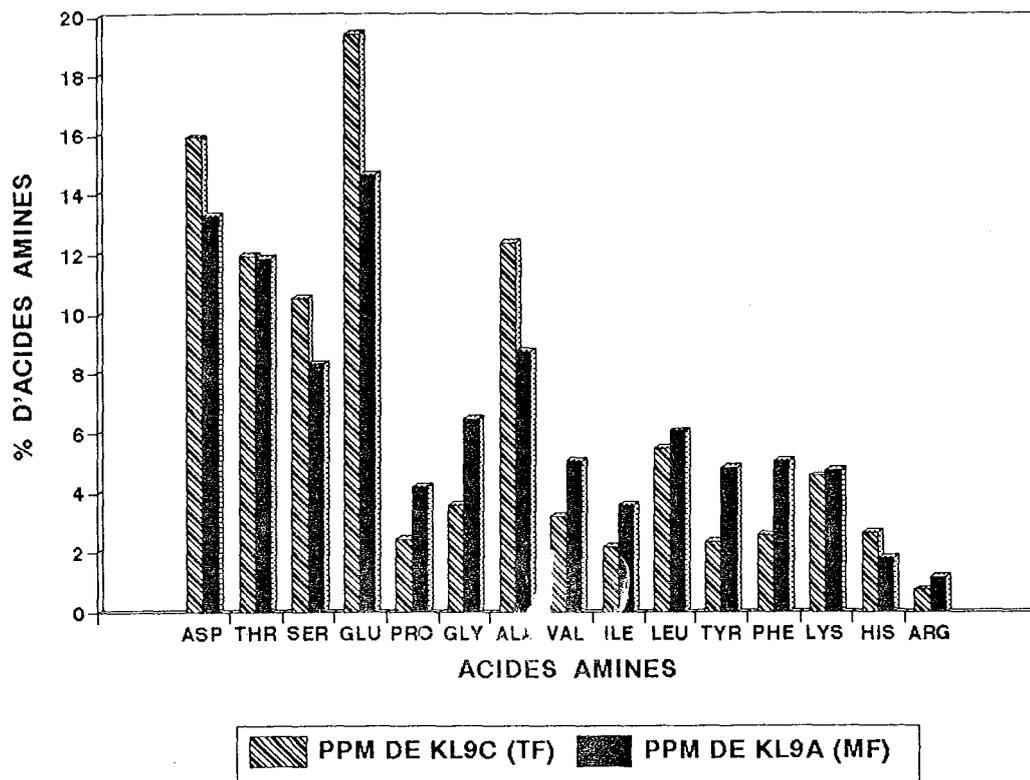
La composition en acides aminés comparée des PPM de levures floculantes et non floculantes fait apparaître que les PPM des souches floculantes renferment plus d'alanine, en revanche les PPM de souches non floculantes se caractérisent par une teneur élevée en proline (tableau 94 et 95 et histogramme 11 et 12).

TABLEAU 94: Composition en acides aminés des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis*

AA	PPM de KL9c (TF)		PPM de KL9 a (MF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	16.8	15.92	17.01	13.28
Thr	12.6	11.94	15.2	11.86
Ser	11.1	10.52	10.7	8.35
Glu	20.5	19.43	18.8	14.67
Pro	2.6	2.46	5.4	4.21
Gly	3.8	3.60	8.3	6.48
Ala	13.1	12.41	11.2	8.74
Val	3.4	3.22	6.5	5.07
Ile	2.3	2.18	4.6	5.07
Leu	5.7	5.48	7.8	6.08
Tyr	2.5	2.37	6.2	4.84
Phe	2.7	2.56	6.5	5.07
Lys	4.8	4.55	6.1	4.76
His	2.8	2.65	2.3	1.80
Arg	0.8	0.76	1.5	1.17
Total	105.5	100.05	128.11	99.98

TF : levure très flocculante

MF : levure moyennement flocculante



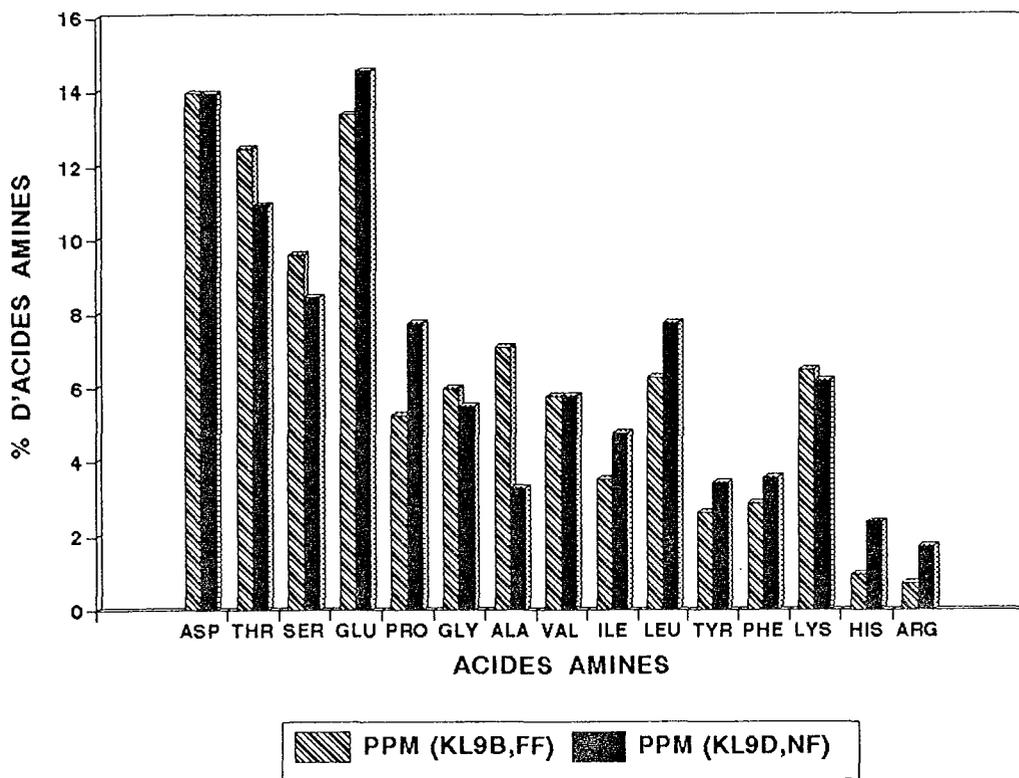
HISTOGRAMME 11: Variation de la teneur en acides aminés des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis* : KL9c (TF) et KL9a (MF)

TABLEAU 95: Composition en acides aminés des PPM "bruts" dialysés de *K. lactis*

AA	PPM DE KL9b(FF)		PPM DE KL9d(NF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	18.5	13.95	22.3	13.94
Thr	16.9	12.48	17.5	10.94
Ser	13.0	9.6	13.5	8.44
Glu	22.2	16.39	23.3	14.57
Pro	7.1	5.24	12.4	7.75
Gly	6.7	4.94	8.8	5.5
Ala	9.6	7.09	5.3	3.31
Val	7.8	5.76	9.2	5.75
Ile	3.4	2.51	7.5	4.75
Leu	8.5	6.27	11.4	7.75
Tyr	3.6	2.65	5.5	3.44
Phe	3.9	2.88	5.7	3.56
Lys	8.8	6.49	9.9	6.19
His	2.6	1.96	3.8	2.37
Arg	1.8	1.37	2.7	1.69
Total	135.4	99.94	159.9	99.95

FF: faiblement flocculante

NF: non flocculante



HISTOGRAMME 12: Variation de la teneur en acides aminés des PPM "brut" dialysés de *K. lactis*: KL9b (FF) et KL9d (NF)

II.2. PURIFICATION DES PPM

La purification des PPM extraits des 4 souches a été réalisée, dans un premier temps, par filtration sur colonne de gel Trisacryl GF 2000. Cette filtration permet de recueillir un produit en un seul pic. Le volume d'élution varie très peu pour les PPM des différentes souches.

Les fractions recueillies sont d'abord lyophilisées puis filtrées à nouveau sur une colonne de Biogel A5M. Cette élution met en évidence 2 fractions, l'une majeure (FA1) et l'autre mineure (FA2) pour tous les PPM (figures 161 et 162).

Les pourcentages des deux fractions obtenues sur Biogel A5M sont rapportés dans le tableau 96.

TABEAU 96: Pourcentage de différentes fractions issues des PPM de *K. lactis* floculantes et non floculantes après filtration sur Biogel A5M

FRACTIONS	FA1 MAJEURE	FA2 MINEURE
SOUCHES		
KL9c	89.4	10.3
KL9a	85	13.7
KL9b	82.7	15.8
KL9d	82.3	16.5

(Résultats exprimés en % de matière sèche)

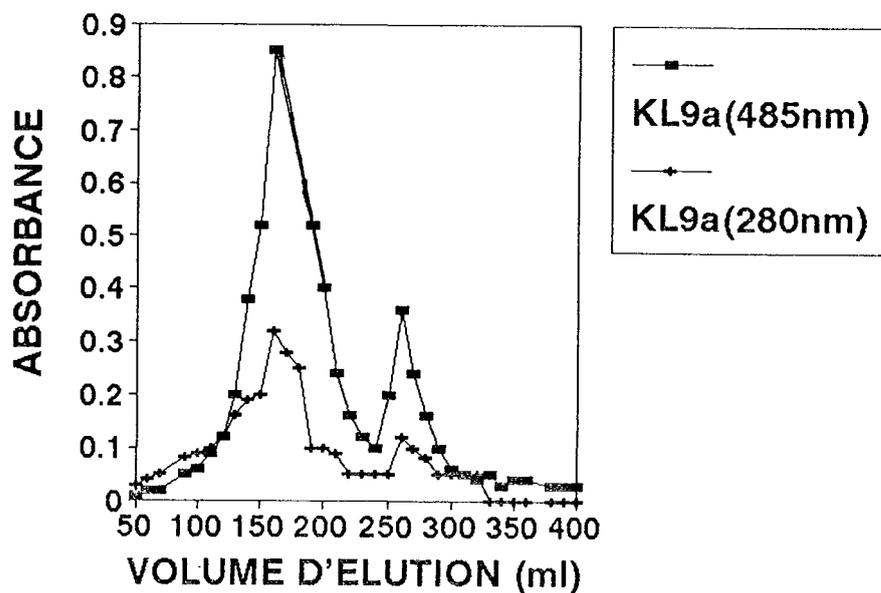
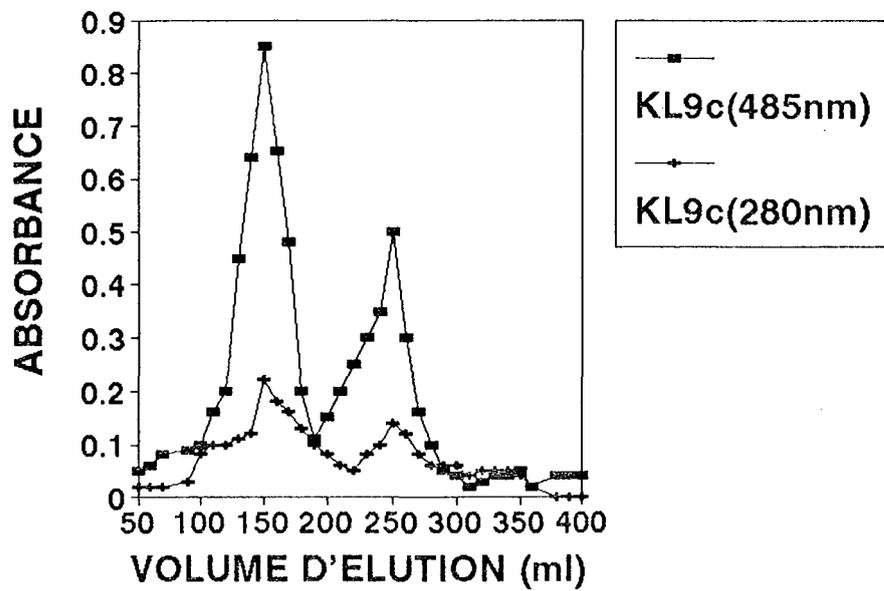


Fig. 161: Profil d'élution sur Biogel A5M des PPM de *K.lactis* (a) KL9c (TF); (b) KL9b (MF)

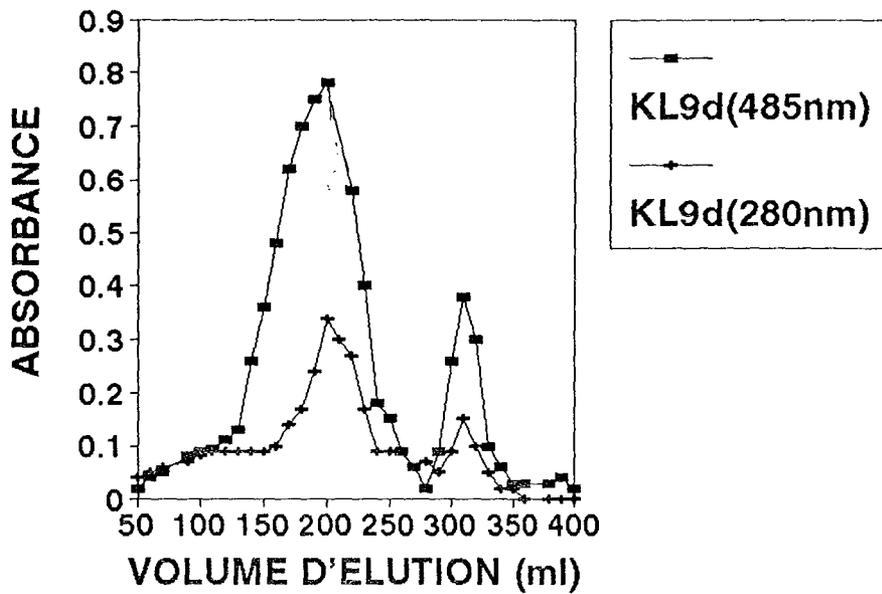
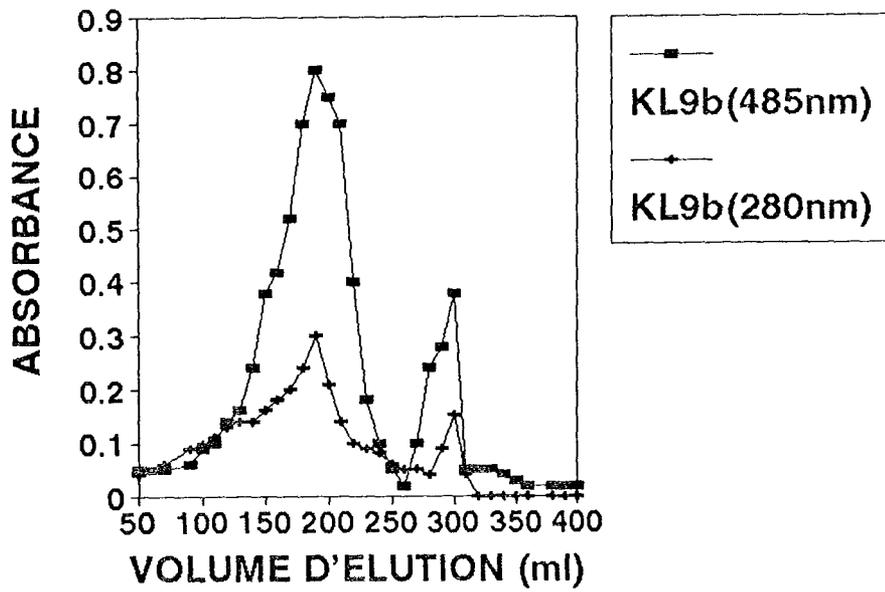


Fig. 162: Profil d'élution sur Biogel A5M des PPM de *K. Lactis* (c)(KL9b (FF) et KL9d (NF)

Nous avons effectué plusieurs filtrations pour obtenir des quantités nécessaires aux analyses ultérieures.

Les masses moléculaires approximatives des fractions ont été estimées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (figure 129b)

Les masses moléculaires approximatives des différentes fractions sont portées dans le tableau 97. Les résultats indiquent que les masses moléculaires des PPM diminuent lorsque le pourcentage de floculation diminue; ceci signifie que les PPM des souches floculantes ont une structure différente de ceux des souches non floculantes.

TABLEAU 97: Masses moléculaires des différentes fractions obtenues par filtration sur Biogel A5M des PPM des souches *K.lactis* floculantes et non floculantes

FRACTIONS	MM DE FA1	MM DE FA2
SOUCHES	(10 ³ daltons)	(10 ³ daltons)
KL9a(MF)	390	45
KL9b(FF)	370	38
KL9c(TF)	410	50
K19d(NF)	350	30

MM = Masse moléculaire.

II.3. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES PPM

Les PPM extraits des cellules entières de *K. lactis*, par la méthode de PEAT, filtrés sur gel Trisacryl et dialysés, ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (10%).

Après migration, la révélation du gel fait apparaître plusieurs bandes (figure 163). Ce résultat a été observé dans le cas des PPM des souches "mères". L'apparition de nouvelles bandes est expliquée, selon MASLU et al., (1985) par un effet de dissociation de la molécule mannoprotéique due à l'action du SDS. SALHI (1986) a obtenu des résultats analogues sur les PPM extraits de *Saccharomyces uvarum* flocculante et non flocculante. Cependant, ce résultat n'est pas général puisque MRAWALA (1990) observe seulement deux bandes pour les PPM, des levures *Pichia pastoris* IFP 206, extraits par la même méthode; alors que ELORZA et al., (1985) ont révélé chez *Candida albicans* environ 40 bandes différentes dont les masses moléculaires varient de 15.000 à 80.000 daltons.

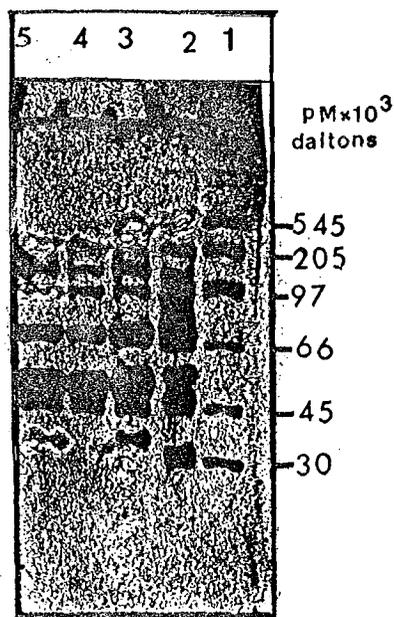


Fig 163: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des mannoprotéines pariétales (PPM) de *K. lactis* et des produits témoins:

- (1) Témoins
- (2) KL9c (TF)
- (3) KL9a (MF)
- (4) KL9b (FF)
- (5) KL9d (NF)

II.4. ANALYSE CHIMIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES PAR FILTRATION SUR BIOGEL A5M

Les résultats des analyses effectuées sur les hydrolysats acides (HCl) des PPM sont indiqués par le tableau 98. Il en ressort que les fractions majeures (FA1) et les fractions mineures (FA2) sont de nature glycoprotéique.

TABLEAU 98: Composition chimique globale des fractions
des PPM de *K. lactis* obtenues par filtration
sur Biogel A5M

FRACTIONS	SOUCHES	KL9c	KL9a	KL9b	KL9d
	CONSTITUANTS				
<u>majeures</u> (FA1)	oses neutres	81,2	78,6	74,3	66,3
	Acides aminés totaux	11,2	11,8	13,01	16,4
	Hexosamines	0,65	0,87	1,03	1,4
	Phosphore	1,8	1,3	0,7	0,6
<u>Mineures</u> (FA2)	oses neutres	84,6	82,3	84,2	83,9
	Acides aminés totaux	6,4	7,1	5,9	8,1
	Hexosamines	0,12	0,08	0,09	0,13
	Phosphore	0,01	T	T	T

(Résultats exprimés en % de la matière sèche).

T : traces

D'après ces mêmes résultats, il apparaît que seuls les constituants des fractions majeures (FA1) évoluent en relation avec le caractère floculant des souches. Les variations des constituants indiquent une augmentation des oses neutres et du phosphore et une diminution des hexosamines et des acides aminés des fractions majeures obtenues à partir des PPM des cellules floculantes.

L'analyse des acides aminés (tableaux 98 et 99, et histogrammes 13 et 14) révèle, comme dans le cas de l'analyse

globale des différents PPM "bruts" dialysés, une prédominance des acides aspartique et glutamique, de l'alanine, et de la sérine dans les fractions des souches flocculantes.

En revanche, la teneur en thréonine, proline, arginine et lysine augmente légèrement dans les fractions des souches non flocculantes.

L'analyse qualitative des oses par chromatographie sur papier et chromatographie en phase gazeuse, sous forme d'acétates d'alditols, met en évidence la présence exclusive du mannose (figure 164).

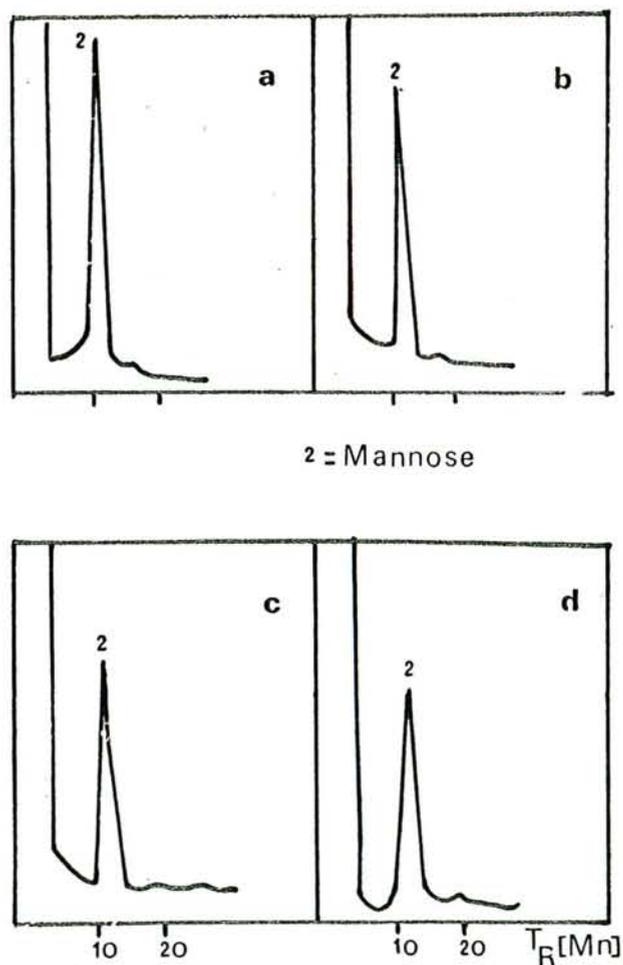


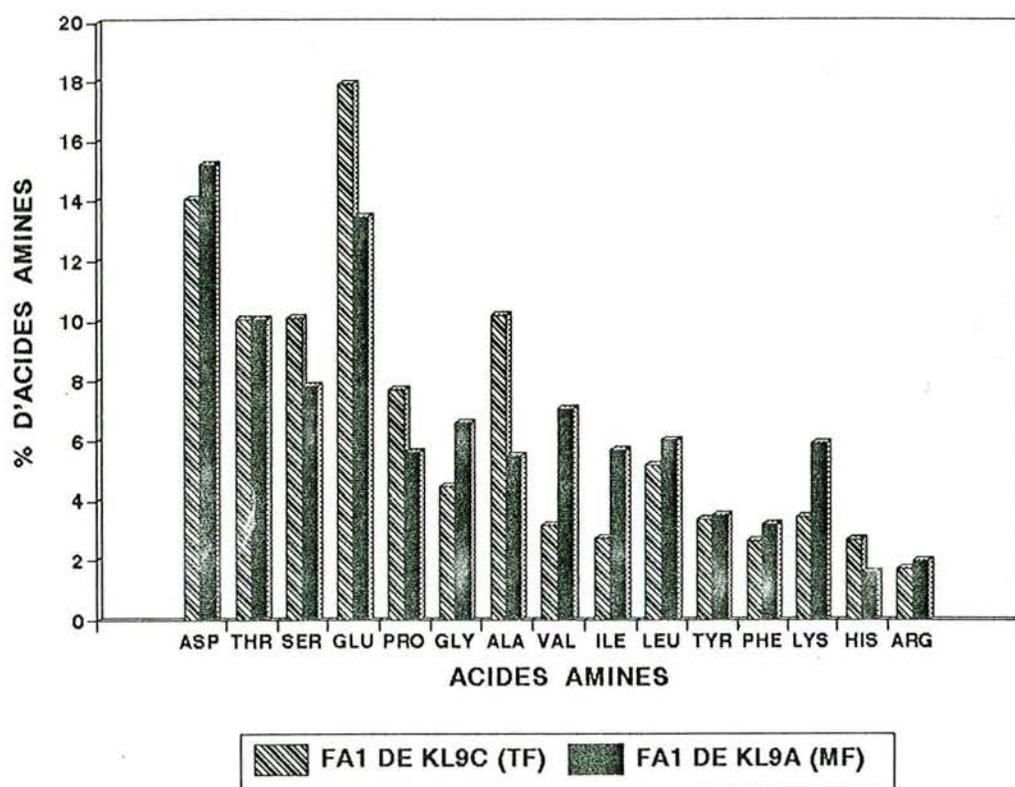
Fig. 164: Chromatogramme des acétates d'alditols des fractions (FA1) obtenues par filtration sur Biogel A5M des PPM de *K. lactis* (a) KL9c; (b) KL9a; (c) KL9b (d) KL9d

TABLEAU 99: Composition en acides aminés des fractions majeures (FA1) issues des PPM de *K. lactis*: KL9c (TF) et KL9a (MF)

AA	FRACTION FA1 DE KL9c (TF)		FRACTION FA1 DE KL9a (MF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	15,56	14,07	18,01	15,25
Thr	11,12	10,09	11,92	10,09
Ser	11,43	10,13	9,95	7,83
Glu	19,74	17,92	15,87	13,44
Pro	8,50	7,71	6,65	5,63
Gly	4,92	4,46	7,80	6,60
Ala	11,25	10,21	6,50	5,50
Val	3,52	3,19	8,37	7,09
Ile	3,02	2,74	6,75	5,71
Leu	5,71	5,18	7,12	6,03
Tyr	3,73	3,38	4,15	3,51
Phe	2,92	2,65	3,79	3,21
Lys	3,81	3,46	6,98	5,91
His	2,95	2,68	1,89	1,60
Arg	1,89	1,71	2,31	1,95
Total	110.16	99.58	118.06	99.35

TF : Très flocculante

MF : Moyennement flocculante

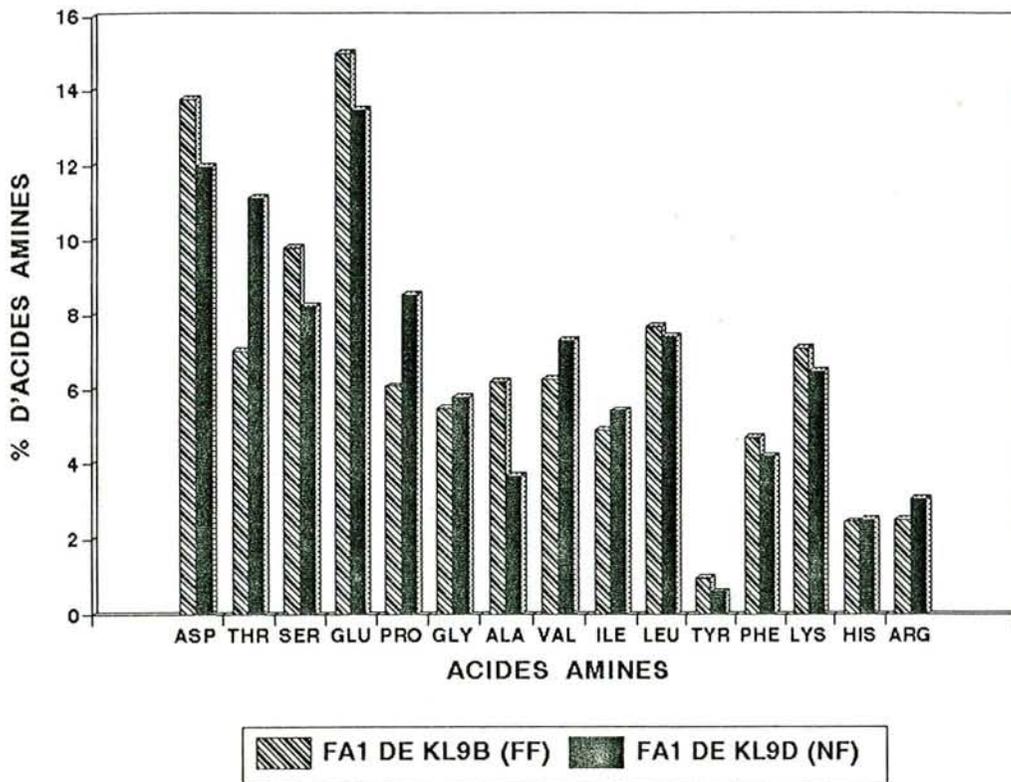


Histogramme 13: Variation de la teneur en acides aminés des fractions majeures (FA1) issues des PPM de *K. lactis* : KL9c (TF) et KL9a (MF)

TABLEAU 100: Composition en acides aminés des fractions majeures (FA1) issues des PPM de *K. lactis*: KL9b (FF) et KL9d (NF)

AA	FRACTION FA1 DE KL9b (FF)		FRACTION FA1 DE KL9d (NF)	
	µg/mg	% AA	µg/mg	% AA
Asp	17,43	13,74	19,55	11,97
Thr	8,92	7,03	18,22	11,15
Ser	12,47	9,83	13,46	8,24
Glu	19,01	14,99	22,03	13,49
Pro	7,71	6,08	13,98	8,56
Gly	6,98	5,50	9,47	5,80
Ala	7,87	6,29	11,98	7,33
Val	7,98	6,29	11,98	5,44
Ile	6,25	4,92	8,89	5,44
Leu	9,72	7,66	12,08	7,40
Tyr	1,21	0,95	1,01	0,61
Phe	5,95	4,69	6,87	4,21
Lys	9,01	7,10	10,55	6,46
His	3,11	2,45	4,145	2,53
Arg	3,21	2,53	5,04	3,08
Total	110,16	99,58	118,06	99,35

FF: faiblement flocculante
 NF: non flocculante



Histogramme 14: Variation de la teneur en acides aminés des fractions majeures (FA1) issues des PPM de *K. lactis*: KL9b (FF) et KL9d (NF)

II.5. CARACTERISTIQUES DES FRACTIONS MAJEURES (FA1)

La composition des fractions majeures obtenues par filtration des PPM sur Biogel A5M évolue selon le caractère flocculant des souches, nous avons, alors effectué des "tests" comparatifs sur ces fractions.

I.5.1. TITRATION DES FRACTIONS (FA1)

Les fractions (FA1) ont été traitées en ajoutant régulièrement une quantité connue de NaOH 0,0025N et on mesure le pH. Les courbes de titration sont indiquées par la figure 165.

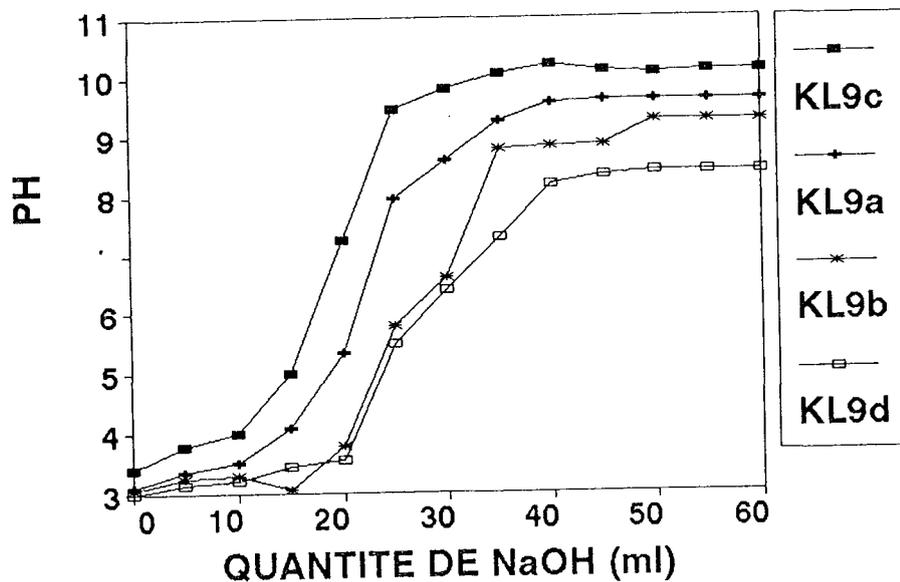


Fig. 165: Courbe de titration par NaOH 0,0025N des glycoprotéines issues des PPM après filtration sur Biogel A5M

Les résultats montrent que la quantité de NaOH nécessaire à la neutralisation des différentes fractions augmente lorsque le degré de flocculation augmente; ceci confirme que dans les fractions des levures flocculantes, les teneurs en phosphore sont plus élevées.

D'autre part, les courbes de titration présentent un seul point d'inflexion ce qui indique que les phosphates présents dans les 4 types de PPM purifiés sont sous forme diester.

II.5.2. PRECIPITATION DES PPM PURIFIES (FRACTION FA1) PAR LA CONCAVALINE A (Con A)

Les PPM purifiés sur Biogel A5M (fractions majeures FA1) ont été précipités par la conA, selon le protocole décrit par OKUBO et SUZUKI (1978).

Les résultats indiqués par les figures 166 et 167, montrent que les courbes de précipitation des PPM extraits des 4 souches *K.lactis* présentent des allures similaires. La précipitation maximale évaluée par le dosage des sucres et des protéines, est obtenue pour des concentrations en PPM variant de 400 à 500mg selon le degré de floculation des souches tableau 101.

Les réactions de précipitation positives obtenues pour les différents PPM, trahissent la présence dans ces molécules, d'une part de ramifications et d'autre part d'un nombre élevé de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ (CHARPENTIER 1979).

Par ailleurs, l'intensité de la réaction de précipitation des PPM des souches floculantes est plus élevée que celles des PPM des souches non floculantes, ceci indiquerait que la concentration en polyosides et le degré de ramification de ces polymères sont plus élevés dans les souches floculantes.

En outre GORIN et al., (1968) ont observé l'absence de précipitation des mannoses extraits de certaines souches de levures *R.glutinis*, qu'ils attribuent à une structure linéaire de ces PPM ainsi qu'une alternance de liaisons $(1 \rightarrow 2)$ et $(1 \rightarrow 3)$

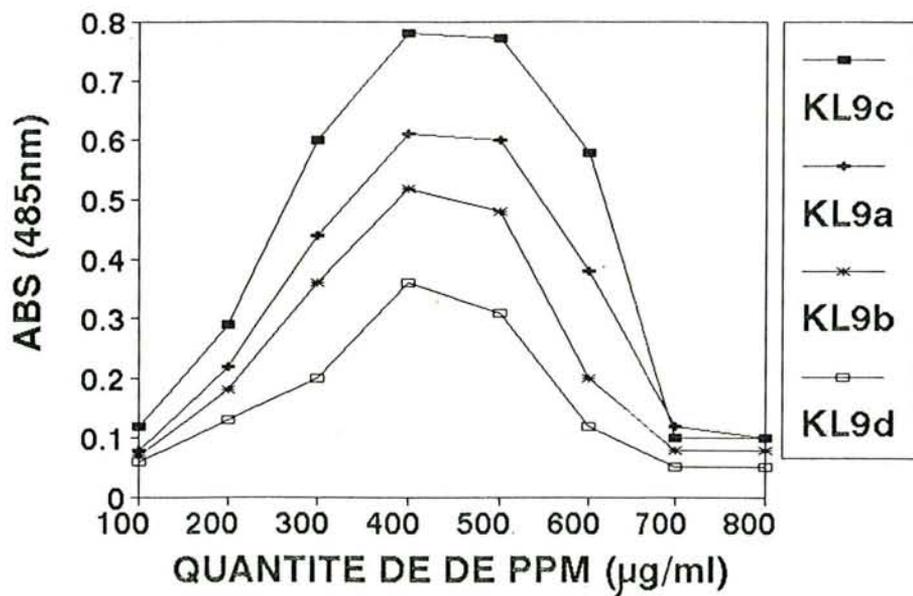


Fig. 166: Courbe de précipitation par la ConA des fractions (FA1) des PPM extraits des cellules de *K. lactis* (Dosage des oses dans le culôt)

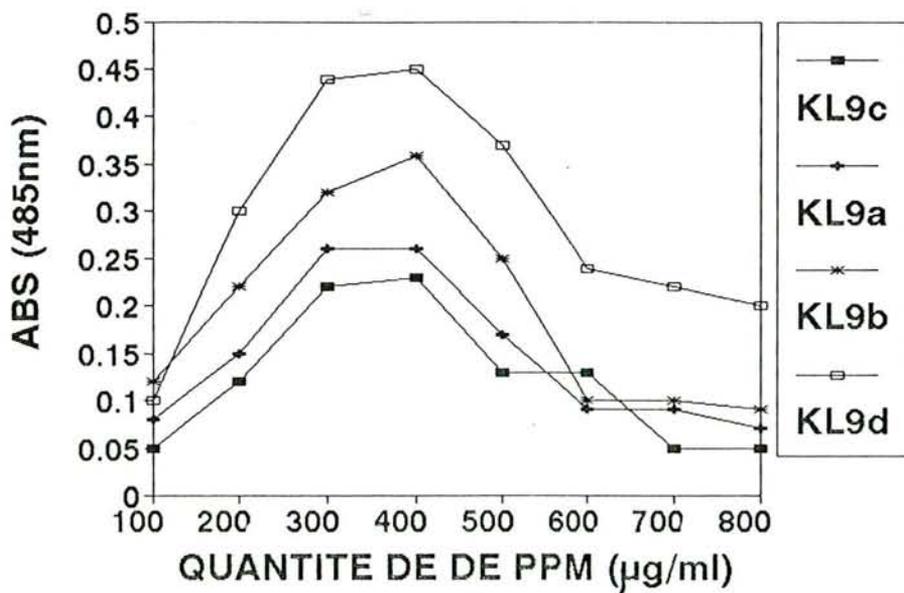


Fig.167: Courbes de précipitation par la Con A des fractions (FA1) des PPM extraits des cellules de *K. lactis*, (Dosage des protéines dans le culôt)

TABLEAU 101: Teneurs en oses, proteines et rapport molaire (oses/Proteines) des précipités obtenus par réaction PPM- ~~CONA~~

PPM ($\mu\text{g/ml}$)	KL9c			KL9a			KL9b			KL9d		
	oses	Protéines	RM	oses	Protéines	RM	oses	Protéines	RM	oses	Protéines	RM
50	25,3	6,7	3,77	14,9	5,4	2,75	16,4	4,0	4,1	12,1	3,5	3,45
100	69,7	13,8	5,06	46,7	12,5	3,73	43,3	11,3	3,83	25,8	5,3	4,86
150	90,1	27,3	3,30	65,3	23,6	2,76	60,1	20,7	2,90	39,6	8,1	4,88
200	99,1	35,4	2,80	87,8	34,8	2,52	83,7	31,2	2,68	64,8	9,3	6,96
400	105,3	40,7	2,58	38,6	19,8	1,94	86,2	17,9	4,81	67,8	6,2	10,93
600	97,4	24,9	3,91	82,7	15,1	5,47	80,1	13,2	6,06	60,1	5,4	11,12
800	86,5	16,5	5,24	76,8	12,9	5,95	74,5	10,4	7,16	58,7	4,7	12,48
100	70,2	11,2	6,26	10,8	6,04	69,2	9,1	7,60	7,60	55,3	3,6	15,44

Résultats (oses et protéines) exprimés en $\mu \text{MX}10^3$.

II.5.3. CAPACITE DE FIXATION DES IONS Ca^{2+} PAR LES PPM "BRUTS" ET PURIFIES

La présence de calcium, comme il a été montré précédemment est indispensable à la floculation des levures. Nous avons observé, par ailleurs, que la teneur en calcium des PPM des levures floculantes est plus élevée que celle des PPM des levures non floculantes.

Afin de déterminer le rôle des PPM et celui des ions Ca^{2+} nous avons évalué la capacité de fixation de ces ions par les PPM "bruts" et purifiés, selon la méthode de BEVERIDGE et MURRAY (1976) modifiée.

Les résultats rassemblés dans le tableau 102 indiquent que la grande partie du calcium se fixe sur les fractions majeures (FA1), en effet les quantités de calcium fixées par les fractions mineures (FA2) sont, dans tous les cas, très inférieures à celles fixées par les PPM "bruts" et les fractions majeures (FA1).

Par ailleurs, les PPM "bruts" et les fractions majeures (FA1) des levures floculantes fixent 2 à 6 fois plus de calcium que ceux des levures non floculantes; ceci confirme les résultats obtenus chez d'autres levures (LYONS et HOUGH, 1971; STEWART et al., 1975; AMRI et al., 1981).

Dans une récente étude sur la fixation des ions Ca^{2+} après modification des PPM de *K. lactis*, MANGUNWIDJAJA (1988) observe que la capacité de fixer les ions calcium des PPM diminue lorsque ceux-ci sont modifiés par blocage de leurs groupements carboxyliques et phosphates. Ces résultats confirment les hypothèses selon lesquelles les groupements carboxyliques et phosphates des PPM interviennent dans le phénomène de floculation des levures *K. lactis*.

TABLEAU 102: Capacité de fixation du calcium par les PPM "bruts" dialysés et les différentes fractions (FA1 et FA2) des souches *K. lactis* flocculantes et non flocculantes

FRACTIONS SOUCHES	PPM"BRUTS" DIALYSES	FRACTIONS MAJEURES (FA1)	FRACTIONS MINEURES (FA2)
KL9a (MF)	40,6	41,5	4,8
KL9b (FF)	20,2	17,9	3,2
KL9c (TF)	60,3	64,7	5,1
KL9d (NF)	10,5	8,4	4,1

(Résultats exprimés en µg de calcium/100mg de produits).

MF = Modérément flocculante
 FF = Faiblement flocculante
 TF = Très flocculante
 NF = Non flocculante

II.6. ACETOLYSE DES PPM PURIFIES (FA1)

Les PPM obtenus par filtration sur Biogel A5M (fractions majeures FA1) ont été soumis à une acétolyse selon la méthode de KOCOUREK et BALLOU (1969).

Les sepectres d'acétolyse sont indiqués par les figures 168 (a b) et 169 (c,d). Les différentes fractions obtenues sur Biogel P2 ont été identifiées par leur volume d'élution à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie.

Les résultats de l'analyse chimique des diverses sous-fractions d'acétolyse sont rapportés dans le tableau 103.

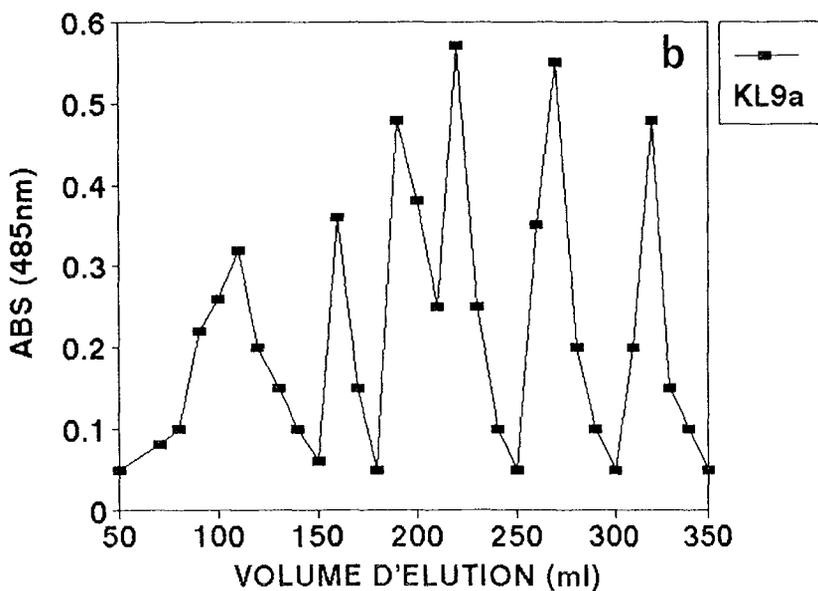
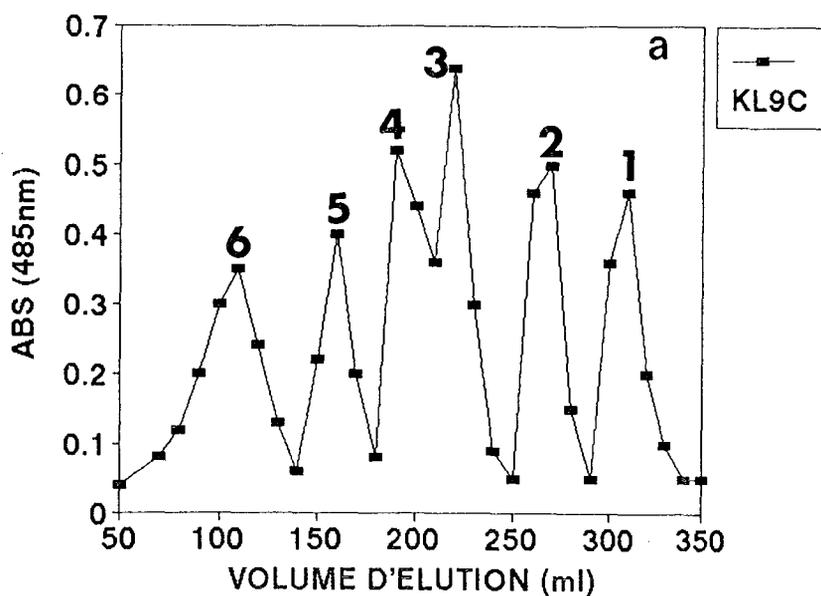


Fig. 168: Profil d'élution sur Biogel P2 des produits d'écétolyse des PPM (FA1) de *K. Latis*: (a) KL9c (TF); (b) KL9a (MF)

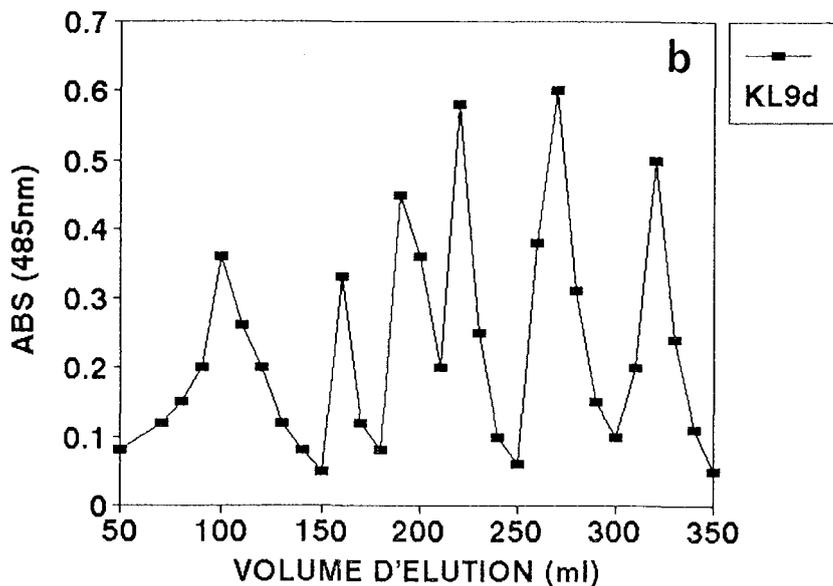
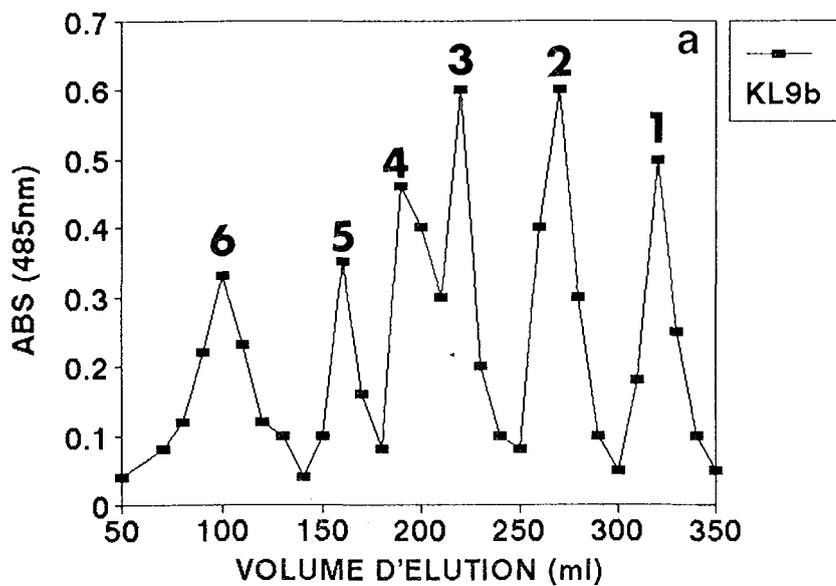


Fig. 169: Profil d'élution sur Biogel P2 des produits d'acétolyse des PPM (F1) de *K.lactis*; (a)KL9b (FF); (b) KL9d (NF)

TABLEAU 103:Composition chimique globale des différentes sous-fractions des produits d'acétolyse des PPM de *K.lactis* obtenus par filtration sur Biogel P2

	PICS	MM	RM	OSSES	AA	P	GlcN
SOUCHES							
KL9c	I	180	1,0	++	-	-	-
	II	343	0,90	++	-	-	-
	III	520	1,60	++	-	±	-
	IV	625	1,30	++	-	±	-
	V	762	1,20	++	±	+	T
KL9a	I	182	1,00	++	-	-	-
	II	344	1,10	++	-	-	-
	III	530	1,55	++	-	±	-
	IV	640	1,20	++	-	+	-
	V	770	1,20	++	+	+	+
KL9b	I	183	1,00	++	-	-	-
	II	342	1,12	++	-	-	-
	III	526	1,42	++	-	±	-
	IV	635	1,50	++	-	-	±
	V	772	1,10	++	±	-	-
KL9d	I	185	1,00	++	-	-	-
	II	346	1,18	++	-	-	-
	III	539	1,30	++	-	-	-
	IV	642	1,00	++	-	T	±
	V	768	1,11	++	±	T	±

MM : Masse moléculaire

RM : Rapport molaire exprimé par rapport au mannobiose

AA : Acides aminés

P : Phosphore

GlcN: Hexosamine

± : Détecté par analyse chimique

++ : Majeure partie

- : Non détecté par l'analyse chimique

T : Traces

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons retenir:

- Les spectres d'acétolyse des différents PPM présentent une grande analogie.

- Les PPM des levures flocculantes sont particulièrement riches en mannotriose phosphate, en revanche, on note une teneur plus élevée de mannobiose chez les PPM des levures non flocculantes.

- Les fractions d'acétolyse des PPM ont été ensuite soumises à une chromatographie sur couche mince de gel de silice (après déphosphorylation).

Le tableau 104 indique les Rf, des produits d'acétolyse des divers PPM, comparés à ceux des témoins. Les résultats de la CCM confirment, l'identification de sous-fractions par les volumes d'élution sur colonne de Biogel P2.

TABLEAU 104: Rapports frontaux (Rf) des oligosaccharides témoins et des produits de l'acétolyse des PPM de *K. lactis* (CCM: Butanol/ éthanol/eau 5/3/2 (V/V))

FRACTIONS	I	II	III	IV	V	VI
PRODUITS (PPM)						PM > 5
Témoins	0,81	0,72	0,55	0,44	0,24	0,09
PPM KL9c	0,80	0,69	0,54	0,44	0,25	0,1
PPM KL9a	0,83	0,70	0,55	0,45	0,23	0,09
PPM KL9b	0,82	0,71	0,53	0,44	0,24	0,08
PPM KL9d	0,81	0,70	0,56	0,43	0,24	0,09

TEMOINS:

I : Mannose
 II : Mannobiose
 III: Mannotriose

IV : Mannotétraose
 V : Mannopentose
 VI : Dextrane PM > mannopentose

II.7. D I S C U S S I O N

Dans ce chapitre, nous avons étudié les PPM isolés des cellules floculantes et non floculantes "hybrides" par autoclavage en tampon citrate (PH 7,0) selon la méthode de PEAT et al., (1961). Comme nous l'avons constaté chez les cellules "mères", ces constituants sont directement impliqués dans le phénomène de floculation. Ils sont facilement extractibles, ce qui laisse supposer qu'ils sont localisés sur des zones externes dans la structure de la paroi des levures.

Par filtration sur colonne de Biogel A5M, nous avons obtenu des PPM dont les masses moléculaires varient, selon le pourcentage de floculation de 370 à 410 X 10³ daltons. Les PPM extraits des souches les plus floculantes ont des masses moléculaires les plus élevées (410 X 10³ daltons).

L'analyse des PPM, relativement purifiés des 4 souches, montre des différences significatives entre ceux des cellules floculantes et ceux des cellules non floculantes. Elle confirme clairement, qu'au moment de la floculation il y a augmentation de la teneur en oses totaux et de certains acides aminés (Asp, Ser, Glu.) dans les PPM bruts ou dans les fractions majeures (FA1), en dépit d'une baisse globale des protéines. En effet, dans les PPM des souches non floculantes, nous avons noté une relative augmentation de la proline et de la tyrosine et une diminution globale des mannanes .

L'augmentation des PPM chez les levures floculantes s'accompagne d'un enrichissement en phosphore. En effet, les rapports phosphore sur oses dans les PPM isolés des cellules floculantes augmentent (25 à 50 %) par rapport à ceux des levures non floculantes. Des résultats analogues ont été obtenus par STEWART et BALLOU (1968) pour *Saccharomyces uvarum*, *Candida albicans* et *Candida stellatoïda*; ALMAHMOOD et al., (1987) pour *Kluyveromyces bulgaricus*; et MANGUNWIDJAJA (1988) pour *Kluyveromyces lactis*.

Selon CHARPENTIER (1979) les mannanes des levures sont caractérisés par la présence de phosphore en quantité variable suivant l'espèce; cependant la relation entre la teneur en phosphore des mannanes et le genre auquel appartiennent les levures est difficile à établir. Selon cet auteur et d'après SANBLAS et CUNNINGHAM, (1974) une limitation en phosphate dans le milieu de culture, entraîne une diminution de la teneur en phosphate dans les PPM, et son remplacement par des groupements O-acétyl dans le mannane d'*Hansenula holstii*; ce résultat a été confirmé plus tard par SALHI (1986) pour *Saccharomyces uvarum*.

Par ailleurs, les nombreux travaux sur le phénomène de floculation, ont montré en général que les PPM des levures floculantes sont plus riches en phosphore que ceux des levures non floculantes de la même espèce et dans les mêmes conditions de culture, ceci se confirme dans le cas des levures *K. lactis* étudiées.

A partir des courbes de titration des mannanes, nous avons déduit que le phosphore était sous forme diester, la courbe ne présente effectivement qu'un point d'inflexion.

Ce type de liaison a été signalé par de nombreux auteurs dans les mannanes de *S. cerevisiae* ((MILL, 1966; COLONNA et LAMPEN, 1974); de *K. bulgaricus* (HUSSAIN et al., 1983); de *R. pastoris* (MBAWALA, 1990). Ces différents travaux ont également permis d'identifier, par ailleurs, la nature des fonctions alcools impliquées dans l'estérification (THIEME et BALLOU 1971, 1972; LIPKE et al., 1974).

Le rôle de la fraction protéique associée au PPM est mis en évidence par une diminution (30 à 50%) de leur teneur en acides aminés totaux dans les PPM des cellules floculantes. Cependant, d'après MANGUNWIDJAJA (1988), la variation des teneurs en acides aminés, avec notamment l'augmentation de l'alanine et la diminution de l'acide aspartique impliquent qu'il s'agirait d'une réorganisation structurale au sein de la protéine.

Par contre les teneurs en hexosamines sont moins importantes dans les PPM des cellules floculantes, ce qui indique, vraisemblablement un réarrangement (ou une modification) structural des couches glucidiques externes de la paroi impliquées dans le phénomène de floculation des levures.

D'un point de vue topologique, les PPM correspondent à des matrices glycoprotéiques qui peuvent être assimilées à des glycoprotéines fonctionnelles telles que les enzymes (PHAFF 1971), les agglutines sexuelles (BURKE et al., 1980) ou probablement des facteurs lectiniques impliqués dans la floculation.

Un des moyens d'approche de la structure des mannanes employé pour les PPM de *Hansenula hosti* par SLODKI et al., (1963) et de *Saccharomyces cerevisiae* par COLONNA et LAMPEN (1974) est la réaction ConA-mannane; cette réaction a été également utilisée pour confirmer le rôle des PPM dans le phénomène de floculation par KALZ et al., (1971) et MIKI et al., (1980).

Les réactions de précipitations positives obtenues pour les PPM des différentes souches *K. lactis* traduisent la présence dans ces molécules de ramifications d'une part et d'un nombre élevé de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ d'autre part. Ce résultat est en accord avec ceux de l'acétolyse de ces PPM. De plus selon GORIN et al., (1965), l'absence de précipitation des PPM par la ConA est due à une structure linéaire ainsi qu'à une alternance de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 3)$.

La réaction de précipitation ConA-PPM en fonction du pourcentage de floculation de la souche laisse suggérer que les sites actifs des PPM des levures floculantes ont une structure voisine, différente de celle des PPM des levures non floculantes, caractérisée par une faible interaction avec la ConA. Cette observation est controversée; en effet, CAWLEY et BALLOU (1972) ont observé que les PPM de *S. cerevisiae* localisés sur la surface des cellules floculantes et non floculantes possèdent des déterminants antigéniques similaires.

Selon GOLDSTEIN et al., (1973), ce sont les chaînes latérales des mannanes qui fixent la ConA et de ce fait, elles pourraient participer à la floculation des levures (MIKI et al., 1982). Chez la levure *K. lactis*, d'après BALLOU (1976), les PPM sont constitués d'une chaîne principale d'unités mannosyles unies par liaisons $\alpha(1 \rightarrow 6)$ et portant des ramifications en liaison $\alpha(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 3)$; et avec une chaîne latérale sur laquelle est fixé un résidu de N-acétyl- glucosamine en position 2 du mannose. Nos résultats d'acétolyse des PPM et de dosage des hexosamines confirment particulièrement cette structure.

Les nombreuses études sur les parois des levures ont montré que les polymères extérieurs de ces parois peuvent fixer des ions métalliques (BEVERIDGE et MURRAY, 1980; HOYLE et BEVERIDGE, 1984; FERRIS et BEVERIDGE, 1986; KIHN et al., 1987). Cette fixation, résulte d'un phénomène électrostatistique qui s'effectue par l'interaction entre les cations métalliques solubles et les sites anomériques liés aux surfaces hydrophiles des polymères. Il a été particulièrement observé que certains composants protéiques des parois fixent les ions Ca^{2+} impliqués dans le phénomène d'aggrégation cellulaire (CAMPBELL, 1973; JUMBLATT et al., 1980; AMRI et al., 1982).

Dans le cas des levures *K. lactis*, la capacité des PPM à fixer les ions Ca^{2+} est étroitement liée au degré de floculation. En effet nous avons montré que les PPM des levures floculantes fixent plus de Ca^{2+} que ceux des levures non floculantes. Ces résultats ont été obtenus pour d'autres levures (STEWART et al., 1975; AMRI et al., 1981).

Ces résultats sont généralement expliqués par le fait que la structure des PPM des levures floculantes contiendrait plus de sites potentiels qui fixent les ions Ca^{2+} . Ces sites sont constitués de groupement carboxyliques, phosphates, phénoliques, imadozoles.... (NISHIHARA et al., 1977).

La modification des PPM par des traitements chimiques et enzymatiques entraîne une perte de leur capacité de fixer les ions calcium; ceci confirme les différentes observations selon lesquelles les groupements anioniques des parties protéiques des PPM interviennent dans la floculation (AMRI et al., 1981; KAMADA et MURATA, 1986; MANGUNNIDJAJA, 1988).

Selon BEAVAN et al., (1978), l'agrégation cellulaire chez les levures est la résultante, au niveau de la paroi, d'un réarrangement structural qui pourrait-être dû à l'action d'enzymes pariétales.

Ce réarrangement peut conduire soit à une meilleure accessibilité des groupements carboxyliques disponibles soit à la mise en disponibilité d'un certain nombre de groupements carboxyliques par suite du départ de calcium ou de non incorporation de ces cations dans la paroi de la levure.

Selon ces auteurs, l'effet établi du calcium, par ailleurs, est de diminuer la répulsion électronique entre les cellules, ce qui permet d'expliquer les différences de floculation entre les levures par des différences d'accessibilité des sites. En effet, selon MIKI et al., (1981), les variations de la composition des parois de levures floculantes et non floculantes signifient que la floculation est possible grâce à la formation à la surface des parois de constituants spécifiques de nature peptidomannane qui interviennent comme des ligands entre les cellules de levure.

GORIN et PERLIN (1956) ont été les premiers à utiliser l'acétolyse pour déterminer la structure des mannanes de *Saccharomyces rouxi*. Rappelons que cette technique coupe sélectivement les liaisons $1 \rightarrow 6$ entre les unités mannose et transforme la plupart des mannanes en oligosaccharides de faibles masses moléculaires, constitués d'unités mannose associées en $1 \rightarrow 2$ et $1 \rightarrow 3$.

Les spectres d'acétolyse des PPM isolés des souches floculantes et non floculantes présentent un profil similaire.

La singularité des spectres d'acétolyse des PPM des levures floculantes est leur richesse en mannotriose par rapport à ceux des levures non floculantes.

Une séparation par chromatographie sur couche mince de gel de silice fait apparaître, par ailleurs, des mono, di, tri, tétra, et mannopentose, ce dernier n'a pas été mis en évidence dans les produits d'acétolyse des mannanes de *Saccharomyces cerevisiae* obtenus par LEE et BALLOU (1965).

Selon CHARPENTIER (1979) l'appartenance des levures à la même espèce n'implique pas une similitude de structure des mannanes de leurs parois. La même constatation a été faite par CAWLEY et BALLOU (1972) qui ont isolé de *S. cerevisiae* (levure de boulangerie) un mannane dépourvu de la chaîne latérale, composée de 2 à 4 unités, mise en évidence dans le mannane d'une autre souche de la même espèce (*S. cerevisiae*).

En conclusion, l'étude comparée de la composition chimique des PPM pariétaux des 4 souches *K. lactis* montre globalement, une augmentation des oses totaux et du phosphore concomitante à une diminution de la teneur en acides aminés. Ce résultat concorde avec ceux obtenus sur les PPM extraits des souches "mères" par diverses méthodes.

L'ensemble des résultats montre, en outre, que les masses moléculaires des PPM extraits des cellules entières (ou à partir des parois isolées) augmentent lorsque les levures sont floculantes.

L'étude de certaines propriétés des PPM notamment leur interaction avec la ConA et la réaction de l'acétolyse, confirme le rôle de ces constituants dans le mécanisme de floculation des levures *K. lactis*. Ces résultats, enfin semblent confirmer l'hypothèse de MIKI et al., (1980) selon laquelle il existe à la surface des cellules de levures une structure réceptrice, complémentaire des PPM.

CONCLUSION GENERALE

Les nombreux travaux sur la floculation des levures ont été consacrés, particulièrement aux levures du genre *Saccharomyces*. Afin de préciser si des mécanismes différents interviennent dans chaque cas de floculation des levures, nous avons entrepris l'étude de la floculation des levures *K.lactis* haploïdes.

Le mécanisme de floculation de *K.lactis* a été abordé dans un premier temps sous l'aspect physiologique et physico-chimique en étudiant l'expression phénotypique de la floculation en fonction des facteurs nutritionnels et physico-chimiques du milieu de culture. Dans un second temps, nous avons étudié les structures biochimiques impliquées dans la floculation et obtenues à partir de cellules entières ou des parois isolées des souches floculantes et non floculantes.

Nous avons comparé des souches potentiellement floculantes et non floculantes (souches "mères") puis des souches issues des premières par croisement (souches "filles"); ces dernières sont caractérisées par des degrés de floculation variables, bien qu'elles proviennent d'un même asque.

En considérant l'expression phénotypique de la floculation des différentes souches haploïdes comme une manifestation génétiquement définie, nous avons constaté que l'intensité de leur floculation est soumise aux influences des facteurs nutritionnels ainsi que des facteurs physico-chimiques liés à l'environnement; toutefois l'étude de la croissance des souches sur divers milieux de culture ne met pas en évidence des différences significatives de croissance, entre elles et selon le degré de floculation. Les cinétiques de croissance des souches floculantes et non floculantes sont similaires dans les mêmes conditions de culture.

Il faut remarquer, par ailleurs, que les souches potentiellement floculantes, floculent en phase exponentielle et l'intensité maximale de la floculation est atteinte en début de phase stationnaire. La floculation se manifeste dans tous les milieux de culture, cependant, le milieu sabouraud à base de glucose et de peptone est le plus favorable. Nous avons, également constaté que les souches floculent en tampon acétate de Helm (pH 4.5) en présence de calcium seulement. Le degré de floculation en tampon acétate de Helm est inférieur à celui observé en milieu de culture ; ceci indique la présence de facteurs du milieu, indispensables pour que les levures floculent bien que leur rôle dans la floculation soit sujet à controverse.

La variation des concentrations en calcium dans le milieu de culture a permis de mettre en évidence le rôle joué par cet ion.

Nos observations montrent en effet, que la floculation n'apparaît que si le calcium est présent à des concentrations de 0.07mM. La floculation maximale est obtenue pour des concentrations comprises entre 2 et 5 mM selon le degré de floculation. D'après les résultats les concentrations qui induisent une intensité maximale de floculation sont plus élevées lorsque la floculation est mesurée en tampon acétate de Helm (pH 4.5). D'autre part les souches potentiellement peu floculantes exigent des concentrations en calcium plus élevées quel que soit le milieu de mesure; cette observation indique le rôle "direct" des ions Ca^{2+} dans le phénomène de floculation. Lorsque les concentrations sont supérieures à 5mM l'intensité de la floculation baisse notamment chez les souches peu floculantes.

Les ions Na^+ et K^+ peuvent se comporter, aux fortes concentrations, comme des antagonistes dans le phénomènes de floculations, mais ils n'ont pas d'effet aux faibles concentrations. L'action de ces ions dépend de la concentration en calcium dans le milieu de culture. En ce qui concerne le rôle des ions Mg^{2+} sur la floculation, les résultats obtenus suggèrent que ces ions pourraient se substituer partiellement aux ions Ca^{2+} en se liant sur les sites des molécules responsables de la floculation. En revanche, les ions Ba^{2+} et Sr^{2+} se comportent comme des inhibiteurs même à de faibles concentrations (0.1 à 0.5mM).

Les expériences réalisées sur la stabilité des agrégats cellulaires de *K.lactis* font apparaître que la floculation des levures du genre *Kluyveromyces* se distingue de celle des levures *Saccharomyces* par une spécificité bien définie. En effet chez les levures *K.lactis* les oses les plus dispersants de la floculation sont ceux qui ont des structures similaires à celle du galactose, en revanche, ceux qui sont actifs sur la floculation des levures *Saccharomyces* ont des structures similaires à celles du mannose (AMRI et al., 1982; HUSSAIN et al., 1986). La nécessité d'une telle spécificité pour que les oses soient actifs impose que ceux-ci soient reconnus par des molécules impliquées dans la floculation et qu'ils soient présents sur la surface cellulaire. De tels mécanismes sont mis en évidence dans d'autres phénomènes biologiques analogues qui mettent en jeu des molécules de type lectinique (SHARON et LIS, 1986, 1993; ALMAHMOOD et al., 1987).

Par ailleurs, l'action des agents chimiques dénaturant les structures superficielles ou bloquant les groupements ionisables à la surface des cellules, entraîne une dispersion des agrégats cellulaires; ce qui démontre, d'une part, la participation de ces structures et d'autre part, le rôle des groupements ionisables dans le maintien d'une structure conformationnelle favorable à la floculation des levures (NISHIHARA et al., 1977; MIKI et al., 1982; KAMADA et MURATA, 1984).

L'action d'enzymes protéolytiques sur les cellules floculantes entraîne une perte du pouvoir floculant de ces cellules; ceci résulte d'une action spécifique de l'enzyme sur les structures glycoprotéiques de la surface des parois. Selon HODGSON et al., (1985), la biosynthèse des glycoprotéines pariétales impliquées dans la floculation est gouvernée par deux types de gènes (FLO1 et FLO5).

Selon ces auteurs, nos résultats indiquent que l'expression phénotypique de la floculation de *K.lactis* serait gouvernée par le gène FLO1, puisque les cellules potentiellement floculantes perdent leur aptitude à floculer lorsqu'elles sont traitées par des protéases et par la chaleur.

Enfin, pour confirmer la potentialité génétique des souches floculantes (KLF) et le rôle de la paroi nous avons obtenu des protoplastes, après traitement des levures floculantes et non floculantes à la cytohélicase, et réalisé la régénération des parois. L'évaluation du pouvoir floculant montre que seules les souches initialement floculantes, refloculent en milieu de culture et en tampon acétate de Helm; ceci indique que les souches KLF ont une potentialité floculante génétiquement acquise.

Les nombreux travaux sur la floculation des levures ont mis en cause le rôle de la paroi dans le phénomène de floculation. Nous avons alors cherché, dans une seconde étape de notre travail, à établir le lien entre les variations de la composition de la paroi, des différentes fractions pariétales et le phénomène de floculation. Les levures ont été cultivées dans les mêmes conditions pour éviter toute variation de la composition chimique des parois et structures pariétales liées aux variations du milieu de culture et avec l'âge des cellules.

Nous avons d'abord comparé la composition chimique des parois isolées, des souches floculantes, peu floculantes et non floculantes. L'analyse globale des parois montre que les parois de levures floculantes se distinguent de celles des levures peu ou non floculantes par:

- Une élévation de glucides (oses totaux) et du phosphore avec une augmentation du rapport Man/Glc.
- Une baisse des teneurs en protéines en hexosamines et une augmentation du pourcentage de certains acides aminés (particulièrement Asp, Ser, Glu.)
- Une augmentation de la teneur en calcium et en phosphore.

Les parois isolées traitées à l'éthylène diamine ont permis de montrer que les changements de la composition chimique résident au niveau de la fraction hydrosoluble des parois. Cette fraction de nature phosphopeptidomannane est plus importante chez les levures floculantes et contient davantage d'oses. Nos résultats, en accord avec ceux de certains auteurs notamment LYONS et HOUGH (1971) montrent que les phosphopeptidomannanes des levures floculantes ont un degré de phosphorylation plus élevé que celui des levures non floculantes. La variation du degré de phosphorylation en relation avec le caractère floculant des levures a été mise en évidence en comparant les teneurs en phosphore des phosphopeptidomannanes des levures très floculantes, faiblement floculantes et non floculantes.

La réaction de précipitation des PPM par la ConA montre une différence structurale entre les PPM des levures floculantes et ceux des levures non floculantes, c'est-à-dire que les polymères des levures floculantes ont une capacité supérieure de se lier quantitativement et qualitativement aux sites de la ConA.

Compte tenu par ailleurs des teneurs en calcium et en phosphore plus élevés dans les PPM des levures floculantes on admet que ces éléments jouent un rôle direct dans le phénomène de floculation de *K. lactis*. L'étude de la fixation des ions Ca^{2+} sur les PPM et fractions majeures indique qu'elle se réalise vraisemblablement sur les groupements carboxyliques, alors que les groupements phosphorylés et les groupements aminés ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans la fraction du complexe PPM-Calcium. Ceci laisse supposer que la floculation de *K. lactis* est le résultat d'un réarrangement structural des PPM qui conduit à une meilleure accessibilité des groupements carboxyles disponibles. Ce réarrangement entraîne, d'après certains auteurs une meilleure accessibilité pour d'autres constituants spécifiques tels que les lectines qui interviendraient comme ligands entre les cellules de levure floculante.

En outre, le fait que la partie protéique de la paroi des levures floculantes diminue et parallèlement, la phosphorylation de la partie osidique de cette partie augmente, indique que les groupements phosphates sont impliqués dans la fixation des ions Ca^{2+} ; ce qui explique les teneurs élevées en ions calcium des parois et des fractions des levures floculantes.

Les études structurales, effectuées par l'acétolyse montrent que les PPM et les différentes fractions manno-protéiques des levures *K. lactis* floculantes se caractérisent par:

- Un poids moléculaire plus élevé lié au degré de polymérisation plus important de la partie manno-protéique.
- Un degré de ramification plus marqué dû à un fort pourcentage en mannotriose et en mannotétraose.
- Un taux élevé en mannotriose et mannotétraose phosphorylés (teneur en phosphore, sous forme diester, élevée).
- Le taux faible d'hexosamines indique que celles-ci sont moins liées aux chaînes latérales dans ces phosphopeptidomannanes.

Par ailleurs plusieurs faits, entre autres l'effet dispersant des oses (spécifiques) sur la floculation permettent d'admettre que les complexes "PPM- Ca^{2+} " jouent un rôle structural, en favorisant une conformation stéréochimique plus appropriée aux interactions des constituants pariétaux de surface cellulaire.

En définitive, si l'ensemble des éléments impliqués dans le phénomène de floculation des autres levures, se manifestent dans le cas de la floculation de *K. lactis*, nos résultats indiquent que leur importance varie d'un genre à l'autre. La floculation des levures *Kluyveromyces* aurait pour mécanisme de base, des modifications structurales au niveau de la paroi au moment de la floculation. Ces modifications seraient des récepteurs reconnus par des facteurs (du type lectinique) ayant une spécificité pour le galactose. L'isolement et l'étude de tels facteurs conduiront à une meilleure connaissance du mécanisme de floculation des levures *K. lactis*.

BIBLIOGRAPHIE

- AIBA, S., and NAGATANI, M., (1971). Separation of cells from culture media. *Adv. Biochem. Eng.*, 1, 31-54.
- AL BASSAM, R, (1982). Etude sur les parois de levures *Saccharomyces cerevisiae* Hausen sauvages et mutantes
Thèse de Doctorat es-Sciences Naturelles. Univ. Nancy I
- AL BASSAM, T., POULAIN, D., GIUMMELY, P., LEMATRE, J. and BONALY, R., (1985). Chemical and antigenic alterations of *candida albicans* cell wall related to action of amphotericin B subinhibitory concentrations.
J. Antimicrob. Chemother., 15, 263- 269.
- Al-HADITY, A.J.W., (1984). Etude sur les mannanes pariétaux de Levures *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, sauvage (4) et mutante.(183).
Thèse de Docteur-Ingénieur Univ. NANCY. I.
- ALLEN, R. J. L., (1940). Estimation of phosphorus.
Biochem. J., 34, 358-365.
- ALLEN, G., (1981). In " Sequencing of proteins and peptides". ed. North Holland publishing compagny Amsterdam. New York-Oxford. pp 78-80.
- AL MAHMOOD, S., GIUMMELLY, P. and BONALY, R., (1986). Mise en évidence d'une activité lectinique dans le milieu de culture de la levure *Kluyveromyces bulgaricus*. Dans Bioréacteurs. 11^e Colloque Soc. Fr. Microbiol, Toulouse P. 247- 251.
- AL MAHMOOD, S., GIUMMELLY, P. and BONALY, R., (1987). Structure and modification of mannans during Flocculation of *Kluyveromyces bulgaricus*.
Appl. Microbiol., Biotechnol., 26, 462 - 467.
- AL MAHMOOD, S., (1988a). Contribution à l'étude des récepteurs pariétaux impliqués dans la flocculation de la levure *Kluyveromyces bulgaricus*.
Thèse de Doctorat de 3^{eme} cycle Univ. de Nancy I.
- AL MAHMOOD, S., GIUMMELLY P., BONALY R., DELMOTTE F. and MONSIGNY M., (1988). *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins: Isolation of N-acetyl-glucosamine and galactose-specific lectins, their relation with flocculation.
J. Biol. Chem., 263, 3930-3934.

- AMRI, M. A., BONALY, R., DUTEUTRE, B. and MOLL, M., (1979 a).
Growth and flocculation of two *Saccharomyces uvarum* strains.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 227-234.
- AMRI, M.A., BONALY R., DUTEUTRE,B., and MOLL, M, (1979 b).
Interaction between Ca^{2+} and K^+ ions in the flocculation of two brewer's yeast strains.
Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7 ,235-240.
- AMRI, M. A., (1980). Incidence des facteurs nutritionnels sur la composition chimique et structure de la paroi dans le phénomène de floculation de *Saccharomyces uvarum*.
Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences. Univ. de NANCY I. (France).
- AMRI, M.A., BONALY, R, DUTEURTRE, B. et MOLL, M., (1981).
Caracterisation des constituants pariétaux impliqués dans la floculation de la levure *S. uvarum*.
Biochimie, 63, 575-585.
- AMRI, M. A., BONALY, R., DUTEURTRE, B., (1982). Yeast flucculation: Influence of nutritional factors on cell wall composition.
J. Gen. Microbiol., 128, 2001-2009.
- ANDERSON, E and MARTIN, P.A., (1975). the sporulation and mating of brewing yeasts.
J. Inst. Brew., 81, 242-247.
- ANTONOV, U.K., (1977). New data on pepsin mechanism and specificity. In: "Acid proteases structure, Function and biology Tang y. (ed.). Plenum Press New-York and London pp. 179-198.
- ARCHER, D.B., (1977). Chitin biosynthesis in protoplasts and subcellular fractions of *Aspergillus fumigatus*.
Biochem. J., 164, 653-658.
- ARNOLD, W.D., (1980). Yeast envelopes: biochemistry, biophysics and Ultrastructure.Vol.II, CRC Press, inc. BOCA Raton, Florida. pp 65-84.
- ASANO, S., HISAYASU, C., YAMADAKI, M., MORIMURA, S., KISHIMOTO, M., MORIMURA, S., KISHIMOTO M. and KIDA, K., (1987).
Contraction of flocculating yeast and Characteristics of ethanol fermentation of on a constructed strain.
HUKKOKOGAKU, 65, 169-177.

- ASPINALL, G. O., (1982). Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. *The polysaccharides*, 1, 35-131.
Molecular Biology. An international series of monography and text books.
- ATKIN, L., GRAY P., MOSESS, W. and FEINTEIN, M., (1949). Growth and fermentation factor for different brewery yeasts.
Proc. Eur. Brew. Lonv., 1, 96-112.
- ATKINSON, B. and DAOUD, I.S., (1976). Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering
Adv. Biochem. Eng., 4, 41-124.
- BACON, J.S.D., (1973). The contribution of β . glucanases to lysis of fungal Cell-Walls.
In: *Yeast mould and plant protoplasts*. Ed. by VILLANUEVA J.R, GARCIA - ACHA, I., GASCON, S., and URUBURUF. Ed. Acad. Press LONDON and NEW-YOUK.
- BACON, J. S. D., (1980). Nature and disposition of polysaccharids within the cell envelope. In: *Yeast cell envelope*.
G.R.C. Press. USA. pp 65-84.
- BAJAI, ' . and MARGARITS, A., (1986). Studies on the flocculation f *Kluyveromyces marxianus*.
Biotechnol. Bioeng., 28, 283-287.
- BAKER, D. A., and KIRSOP G. H., (1972). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by wort composition and by actidione.
J. Inst. Brew., 78, 454-458.
- BALINT, S., FARKAS, V., and BAUER, S., (1976). Biosynthesis of β -glucans Catalysed by a particulate enzyme preparation from yeast.
F.E.B.S. Lett., 64, 44-47.
- BALLOU, C.E., LIPKE, P.N. and RASHKE W.G., (1974). Structure and immunochemistry of cell wall mannans from *S.chevalieri*, *S. italicus*, *S. diastaticus* and *S. carlsbergensis*.
J.Bacter., 2, 461-467.
- BALLOU, C.E., (1974). Some aspects of the structure immuno-chemistry and genetic control of yeasts mannans. *Adv. in Enzymology*. (ed). Dr. MEISTER)., 40, 239-270.

- BALLOU, C.E., (1976). Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope.
 Adv. Microbial-physiology 14, 93 - 158.
- BALLOU, C.E., (1980a). *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein mutants: isolation of the *mns* mutant and comparison with the *mns* strain.
 J. Biol. Chem., 255, (16) 7700-7707.
- BALLOU, C. E., (1980 b). Genetics of yeast mannoprotein biosynthesis. ACS symposium series n°126 Fungal polysaccharides.
- BALLOU, C., COHEN, R.E., and BALLOU, C.E., (1980). *Saccharomyces cerevisiae* mutants that make mannoproteins with a truncated carbohydrate outer chain.
 J. Biol. Chem., 225, (12) 5986 - 5991.
- BALLOU, L., ALVARADO E., TSAI P. K., DEIL, A. and BALLOU, C.E., (1989). Protein glycosylation defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* 7 mutant class.
 J. Biol. Chem., 264, (20) 1185-11864.
- BARONDES, S. H. and HAYWOOD, P. L., (1979). Comparison of developmentally regulated lectins from three Species of cellular Slime mold.
 Bioch. Biophys. Acta., 550, 297 - 308.
- BARONDES, S.H. (1986). Lectins: Their multiple endogenous cellular Functions.
 Ann. Rev. Biochem., 50, 207-231.
- BARTNICKI, G.S. and NOCKERON, W.J., (1962). Isolation, composition and structure of cell wall of filamentous and yeast like from of *Mucor rouxii*.
 Biochem. Biophys. Acta, 58, 102-119.
- BASU, J.; KUNDU, M.; MUCHERJEE, K. and CHAKRARTI, P., (1986). Release of lectin from a fatty acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae* grown in presence of oleic acid.
 Biochem. Biophys. Res. Commun, 136, 596-602.
- BAUER, H, HORISBERGER, M., BUSH, D. A., SIGARLAKI, E., (1972). Mannan as a major component of the but scars of *Saccharomyces cerevisiae*.
 Arch. Microbiol., 85, 202-208.

- BEAVAN, M. J., BELK, D. M., STEWART, G. G. and Rose, A.H., (1979). Changes in electrophoretic mobility and lytic enzyme activity associated with development of flocculating ability in *Saccharomyces cerevisiae*.
Can. J. Microbiol., 25, 888-895.
- BERAN, K. and REHACEK, J., (1969). Content and structure of chitin in cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Antonie Van Leeuwenhoek., 35B, 3-4.
- BESSLER, W., SHAFER, J. A., and GOLDSTEIN, I. J., (1974). A Spectrophotometric study of the Carbohydrate binding site of Concanavaline A.
J. Biol. Chem., 249, (9) 2819-2822.
- BHATTACHARYYA, L., KHAN, M.I., FANT, J. and BREWER, C.F., (1989). Formation of highly ordered cross linked lattices between asparagine linked oligosaccharides and lectins observed in electro-microscopy.
J. Biol. Chem., 264, 11543-11545.
- BIELY, P., KOVARIK, J., and BAUER, S., (1973). Lysis of *Saccharomyces cerevisiae* With 2- deoxy-D- glucose -2-fluoro-glucose, an inhibitor of the cell wall glucan synthesis.
J. Bacteriol., 115, 1108
- BIZEAU, C., et BIZEAU, E., (1970). Etude de la préparation de protoplastes chez deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.
Ann. Technol. Agric., 19, 131-140.
- BIZEAU, C., GALZY, P. et BAPTISTA, A.E., (1973). Utilisation du suc d'*Helix pomatia* pour le fractionnement de la paroi d'une souche mutante de *Saccharomyces cerevisiae* Hausen.
Can. J. Microbiol., 19, (9) 1093-1098.
- BLOW, D.M., (1971). The structure of chymotrypsin. In " Enzymes" Boyer PD. ED. N. York an London (3), 185, 212.
- BONALY, R., MOULKI, H., TOUIMI B.A., et PIERFITTE, M., (1971). Etude des parois de levures du genre RHODOTORULA II: Influence des conditions de culture sur la composition chimique des parois.
Biochim. Biophys. Acta, 224, 484-494.

- BONALY, R., et REISINGER, O., (1971). Etude des modifications chimiques et ultrastructurales de la paroi de trois levures du genre *Rhodotorula*.
CR. Acad. Sci., 292, 2309-2312.
- BONALY, R., (1974). Aperçu sur la structure des parois des levures.
Soc. Phar. et Biol. Lorraine., 2, 25-28.
- BONALY, R. et LEMATRE, J., (1983). Aspects de la floculation de *Saccharomyces uvarum*.
Microbiol. Aliments - Nutrit. Vol. 1, 59-66.
- BOURNE, N. and DANCER, B.N., (1987). Regeneration of protoplasts of *Bacillus subtilis* 168 and closely related strains.
J. Gen. Microbiol., 132, 251-255.
- BRAUN, P.C. and CALDERONE, R.A., (1978). Chitin synthesis in *Candida albicans* Comparison of yeast and hyphal forms.
J. Bact., 133, 1472-1477.
- BROHAN, B., and MC. LOUGHLIN, A., (1984). The behaviour of yeast flocs in hindered settling and fluidized bed regimes.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 10-15.
- BULOCK, J.D., COMBERBACH, D.M., and GHOMMIDH, C., (1984). A study of continuous ethanol production using a highly flocculent yeast in the gas lift tower fermentor.
Chem. Eng. J., 29, 9-24.
- BURKE, D.L.; MENDONCA-PREVIATO, L., and BALLOU, C.E., (1980). Cell-Cell recognition in yeast: purification of *Hansenula wingei*. 21.- Cell sexual agglutination factor comparison of the factors from the three genera.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 318-322.
- BURNS, J.A. (1937). Yeast flocculation.
J. Inst. Brew., 43, 31-41.
- BUSH, D.A. and HORISBERGER, M., (1973). Mannan of yeast bud scars. A Comparison of the structure of the bud scar mannan with that of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 248, 1318-1320.
- BYRD, J.C., TARENTINO, A.L., MALEY, F., ATKINSON, P.H. and TRIMBLE, P.H., (1982). Glycoprotein synthesis in yeast.
J. Biol. Chem., 257, 14657-14666.

- CABIB, E. and BOWERS, B. (1970). Chitin and yeast budding: Localization of chitin in yeast budscars. *J. Biol. Chem.*, 264, 152-173.
- CABIB, E., (1975). Molecular aspects of yeast morphogenesis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29, 191-241.
- CABIB, E., (1976). The primary septum: a journey in to three-dimensional biochemistry Trends in: *Biochem. Sci.*, 1, 275-277.
- CABIB, E. and ROBERTS, R., (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 763-793.
- CABIB, E., (1988). Septum and cell wall construction in yeast. Colloque: La paroi fongique, 24 septembre. Inst. Pasteur. Paris.
- CALLEJA, G.B., and JOHNSON, B.F., (1970). Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.*, 64, 247-250.
- CALLEJA, G.B. and JOHNSON, B.F., (1971). Flocculation in a fission yeast: an initial step in the conjugation process. *Can. J. Microbiol.*, 17 1175-1177.
- CALLEJA, G.B., (1974). On the nature of the forces involved in sex directed flocculation. *Can. J. Microbiol.*, 20, 797-803.
- CALLEJA, G.B., and JOHNSON, B.F., (1977). A comparison of quantitative methods for measuring yeast flocculation. *Can. J. Microbiol.*, 23, 68-74.
- CALLEJA, G.B., (1984). Cell aggregation. In : the yeast, 2e edition. Eds: A.H. ROSE and J.S. HARRISON, vol., I. London, Acad. Press.
- CAMPBELL, L., (1971). Antigenic properties of yeast various genera. *J. Appl. Bacteriol.*, 1, 237-242.
- CARBONELL, L.M., (1973). Cell wall regeneration of protoplasts of *Histoplasma capsulatum*, yeast mould and plant protoplasts. Acad. Press. N.y. pp 93-103.

- CASSONE, A., KERRIDGE, D., and GALE, E.F., (1979). Ultrastructural changes in the cell wall of *Candida albicans* following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. *J. Gen. Microbiol.*, 110, 339-349.
- CAWLEY, T.N., and BALLOU, C.E., (1972). Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chemotypes. *J. Bact.*, 111, (3), 690-695.
- CAWLEY, T.N., HARRINGTON, M.G. and LETTERS, R., (1972). A study of the phosphate linkages in phosphomannan in cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 129, 711-720.
- CEFONELLI, J.A. and SMITH, F., (1955). *J. Am Chem. SOC.*, 77, 5682 Cité par JEUNEHOMME - RAMOS et al., (1964).
- CHARPENTIER, C., LHOST, P.; N'GUYEN VANLONG, T., et FONTANGES, R. (1976). Etude comparée des propriétés physicochimiques des mannanes de neuf levures. *Mycopathologia*, 59 , (1), 11-23.
- CHARPENTIER, C., (1979). Etude comparative physicochimique et structurale des antigènes de certaines levures de vinification. Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences. Univ. Claude Bernard. Lyon.
- CHATTAWAY, F.N., HOMMES, M.R., and BARLOW, A.J.E., (1968). Cell-wall composition of mycelial and blastospore form of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, 51, 367-376.
- CHEN, L. and GONG, C., (1986). Continuous ethanol production using induced yeast aggregates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 208-212.
- CLAYTON, E., HOWARD, G.A., and MARTIN, P.A., (1972). Yeast hybridization. *Proc. Ann. Meet. Am. SOC. Brew. Chem.*, 78-81.
- COHEN, R.E., BALLOU, L.E., (1980). Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharide by ¹HNMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 19 , 4345-4358.
- COHEN, R.E., and BALLOU, C.E., (1981b). Cell wall of algae and fungi. Extracellular carbohydrate II. *Encyclopedia of plant physiology. New series.*

- COLONNA, W.J. and LAMPEN, J.O., (1974). Structure of the mannan from *Saccharomyces* Strain- FH 4C, a mutant constitutive for invertase biosynthesis II: Protein moiety and components of the carbohydrate-peptide bonds. *Biochem.*, 13, 2748-2753.
- CRITCHLEY, I.A. and DOUGLAS, L.J., (1987). Isolation and partial characterization of an adhesion from *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 629-636.
- CUMSKY, M.G., and ZUSMAN, D.R., (1979). Myxobacterial hemagglutinin: a development-specific lectin of *Myxococcus Xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76 5505-5509.
- CUMSKY, M.G. and ZUSMAN, D.R., (1981a). Purification and characterisation of myxobacterial hemagglutinin, a development specific lection of *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.*, 256, 12581-12588.
- CUMSKY, M.G. and ZUSMAN, D.R., (1981b). Binding properties of myxobacterial hemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, 256, 12596-12599.
- DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISSEN and BARRY, W.W., (1968). Principles of microbiology and immunology. New-York. A Harper International.
- DAVIS, R.H., and HUNT, P.T., (1986). Modelling and measurement of yeast flocculation. *Biotechnol. Prog.*, 2 91-97.
- DEINEMA, N.H., (1961). Intra and extra cellular lipid production by yeast. Thesis Agricultural Universty WAGENINGEN (pays-BAS).
- DOMINGUEZ, A., VILLAN, EUVA, J.R., and SENTANDREU, R., (1978). Inositol deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 86. *Antonie Van Leuwenhoek*, 44, 25-34.
- DOUGLAS, R.H., and BALLOU, C.E., (1980). Isolation of *Kluyveromyces lactis* mannoproteins by fluorescence - activated cell sorting. *J. Biol. Chem.*, 255, (12), 5979-5985.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, K.J., REBERS, P.H., and SMITH, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.

- DUGUID, J.P., and OLD, D.C., (1980). Adhesive properties of enterobacteriaceae. In: Bacterial Adherence ed. E.H. Beachey. London. Chapman and Hall., pp 186-217.
- DUMAZERT, C., and MARCELET, Y., (1937). Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Dosage de N dans les poudre d'organes, proteines, les feces.
Bull. Soc. Chim. Biol., 20, 201-211.
- DURAN, A. and CABIB, E., (1978). Solubilisation and partial purification of yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogen nature of the enzyme.
J. Biol. chem., 25, 4419-4425.
- DYKE, K. G.H., (1964). The chemical composition of the cell wall of the yeast, *Nadronia elongata*.
Biochim. Biophys. Acta., 37, 374-384.
- EDDY, A.A., (1955 a). Flocculation characteristics of yeasts I: Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Inst. Brew., 51, 307-312.
- EDDY, A.A., (1955 b). Flocculation characteristics II: Sugar as dispersing agents.
J. Inst. Brew., 61, 313-211.
- EDDY, A.A. and RUDIN, A.D., (1958 a). Part of the yeast surface apparently involved in flocculation.
J. Inst. Brew., 64, 19-21.
- EDDY, A.A., and RUDIN, A.D., (1958 b). The identification of the yeast cell wall II: Identification of charged groups at the surface.
Proc. Roy. Soc. London, B148, 419-432.
- EDDY, A.A., and LONGTON, J., (1969). A large mannan molecule released from isolated yeast cell walls by the action of small gut juice.
J. Inst. Brew., 75, 7-9.
- EGGEST, G., STENBERG, E., and KJOSBBAKEN, J, (1983). Flocculation of a *methylomonas* sp: possible involvement of surface protein.
J. Gen. Microbiol., 129, 3611-3617.

- ELAD, U.; CHET, L. and HENIS, Y., (1982). Can. J. Microbiol., 28, 719-722.
- ELORZA, M.,V. and SENTANDREU, R., (1969). Effect of cycloheximide on yeast Cell-Wall synthesis. Biochem. Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 741-747.
- ELORZA, M.,V., LOSTAV, Z.M., VILLANUEVA, J.R., and SENTANDREU, R., (1976). Cell-Wall synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of RNA and protein inhibition. Biochem. Biophys. Acta., 454, 263-272.
- ELORZA, M.,V., MURGUI, A. and SENTANDREU, R., (1985). Dimorphism in *Candidat albicans*: Contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycellial cell walls. J. Gen. Microbiol., 131, 2209-2216.
- ELORZA, M.,V., MURGUI, A., RICO, H., MIRAGALL, F., and SENTANDREU, R., (1987). Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*. Effet of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. J. Gen. Microbiol, 133, 2315-2325.
- ELSON, L. A. and MORGAN, W.T., (1933). A colorimetric method for determination of glucosamine and chondosamine. Biochem. J., 27, 1824-1828.
- ESSER, K., HIURICHS, J. and KUES, U., (1987). Genetic control of flocculation of yeast with respect to application in biotechnology. Proc. Technol., 4, 383-398.
- ESSER, K., HIURICHS, J. and KUES, U., (1983). Flocculation and implication for biotechnology. Proc. Biochem., 12, 21-23.
- EVANS, J.H., DIALA, E. S., EARL, A. and WILKIE, D., (1980). Mitochondria control of cell surface caracteristico in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta., 602, 201-206.
- EVANS, J. H., (1983). Molecular gentic aspects of yeast mitochondria. In: yeast genetics: Fundamental and applied aspects eds. J.F.T. Spencer, D.M. Spencer and A.R.W. Smith. New. York: Spinger-Verlag, pp269-376.

- FERKAS, V. and BAUER, S., (1976). Biosynthesis of yeast mannan characterization of mannan-synthetizing enzyme from mutants defective in mannan structure.
Folia Microbiol., 21, 459-464.
- FARKAS, V., BAUER, S. and VAGABOV, V.M., (1976). Biosynthesis of yeast mannan. Independent formation of two carbohydrate moieties in the mannoprotein molecule.
Biochim. Biophys. Acta, 428, 583-590.
- FARKAS, V., VAGABOV, V. M. and BAUER, S., (1976). Biosynthesis of yeast mannan: Diversity of mannosyltransferase in the mannan-Synthesizing enzyme system from yeast.
Biochim. and Biophys. Acta, 428, 573-528.
- FARKAS, V., (1979). Biosynthesis of cell-wall of Fungi
Microbiol. Rev., 43, (2), 117-144.
- FARKAS, V., (1989). Polysaccharide metabolism In "the yeast" Vol 3 second Edition. Rose A.H. and Harrison J.S. Eds.
Acad. Press.
- FERRIS, F.G., and BEVERIDGE, T.J., (1986). Site specificity of metallic in binding in *Escherichia coli*, K-12 lipopolysaccharide.
Can. J. Microbiol., 32, 52-55.
- FISHER, D.J., (1975). Flocculation. Some observations on the surface charges of yeasts cells.
J. Inst. Brew., 81, 107-110.
- FINKELSTEIN, R.A., and HANNE, L.F., (1982). Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae*.
Infect. Immunn., 36, 1199-1208;
- FLEET, G.H. and PHAFF, H.J., (1973). Effect of glucanases on yeast and bacterial origin on cell walls of *Schizosaccharomyces Species*.
In: Yeast, Mould and plant protoplasts eds. J.R. BARCIA-ACHA I., GASCONS and. URUBURUF. Acad. Press. LONDON and. NEW YORK pp 33-59.
- FLEET, G.H., and PHAFF, H.J., (1974). Lysis of yeast cell-walls: glucanases from *Bacillus circulans* W1-12.
J. Bact., 119, (1) 207-219.
- FLEET, G.H. and MANNERS, D.J., (1976). Isolation and Composition of an alkali-Soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces Cerevisiae*.
J. Gen. Microbiol., 94 180-192.

- FLEET, G.H., (1985). Composition and structure of yeast Cell walls. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 1, 24-56.
- FLORES-CARREON, A., HIXSON, S.H., GOMEZ, A., SHAO, M.C., ROSEVEAR, P.R. and WOLD, F., (1990). The processing of N-Link glycans in yeast. *J. Biol. Chem.*, 265, 754-759.
- FUJIE, T. and HORIE, Y., (1973). Some substances and composition of an alkali-soluble glucan from the cell wall *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 94, 180-192.
- FUJINO, S. and YOSHIDA, T. (1976). Premature flocculation of yeast induced by some wort constituents. *Rept. Res. Lab. Kirin. Brewery. CO., Ltd*, 19, 45-53.
- GALZY, P., (1984). Recombinaison génétique In: *Biotechnologies*. ed. R. Scriban. *Technique et Documentation Paris*. PP. 385-400.
- GEILENKOTTEN, I. and NYNS, E.J., (1971). The biochemistry of yeast flocculence. *The Brewers Digest*, 4, 64-70.
- GILLILAND R.B., (1951). The flocculation characteristics of brewing yeast during fermentation. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congress of Brighton*, 35-55.
- GILLILAND, R.B., (1957). The flocculation of brewing yeast. *Wallerstein Lab. Commun.*, 20, 41-69.
- GHANNOUM, M.A., ABU EL TENN, K., and RADWAN, S.S., (1987). Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. *Mykosen*, 30, 371-378.
- GHUYSEN, J.M.; TIPPER, D.S., and STROMINGER, J.L., (1966). In: *Methods in Enzymology* (COLLOWICK, S.P. and KAPLAN N.D. ed.), 8, 685-699. *Acad. Press. New. York*.
- GOLDSTEIN, I.J., REICHERT. C.M., MISAKI, A. and GORING, P.A.J., (1973). An extension. of Carbohydrate binding specificity of concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta.*, 317, 500-504.

- GOODAY, G.W., (1977). Biosynthesis of fungal wall mechanisms and implications.
J. Gen. Microbiol., 99, 1-11.
- GOPAL, P.K., and BALLOU, C.E, (1987). Regulation of the protein glycosylation pathway in yeast: Structural control of N-Linked oligosaccharide elongation.
Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 8824-8828.
- GORING, P.A.J. and SPENCER, J.F.T, (1968). Galactomannans of *Trichosporon fermentans* and other yeast: proton magnetic resonance and chemical Studies.
Can. J. Chem., 46, 2299-2304.
- GORIN, P.A.J., SPENCER, J.F.T. and BHATTACHARJEE, S.S., (1969a). Structure of yeast mannans containing both α and β linked D-mannopyranose units.
Can. J. Chem., 47, 1499-1505.
- GORIN, P.A.J. and SPENCER, J.F.T., (1970). Proton magnetic resonance spectroscopy in identification and Chemotaxonomy of yeast.
Adv. Applied. Microbiol., 13, 25-89.
- GORIN, P.A.J., SPENCER, J.F.T. and FINLAYSON, N.J., (1971). Occurrence of (2-acetamido-2-desoxygluco)-mannans in the cells of yeast.
Carbohydr. Res., 16, 161-166.
- GORIN, P.A.J., (1973). The position of phosphate groups in phosphomannan of *Hansenula capsulata* as determined by C-13 magnetic resonance Spectroscopy
Can. J. Chem., 51, 2105-2109.
- GRAEME, M., WALKER, J. and DUFFUS, H., (1980). The regulation of cell division in yeast by magnesium. In: Current developments in yeast research. ed. by Graham, STEWART and I. RUSSEL. PP. 20-25.
- GREENSHIELD, R.N., and SMITH, E.L., (1971). Tower fermentation systems and their application.
Chem. Eng., 249, 182-190.
- GREENSHIELD, R.N., YATES, J., SHARP, D. and DAVIS, T.N.C., (1972). Studies in tower continuous fermentation I : methods for the characterization of flocculent yeast.
J. Inst. Brew., 78, 236-242.

- GRIFFIN, S.R. and Mc WILLIAM, I.C., (1969). Variation of cell wall contents in flocculent and non flocculent yeast strains.
J. Inst. Brew., 75, 355-358.
- HARRIS, R.H. and MITCHELL, R., (1973). The role of polymers in microbial aggregation.
Ann. Rev. Microbiol., 27, 27-50.
- HASHIMOTO, C., COHEN, R.E. and BALLOU, C.E., (1981). Characterization of phosphorylated oligosaccharides from *Hansenula Wingel* mannoprotein.
Biochem., 15, 2835.
- HAWORTH, W.N., HIRST, E.L. and ISHERWOOD, F.A., (1937). Polysaccharids Part XXIV: Yeast mannan.
J. Chem. Soc. 784-791.
- HAWORTH, W.N., HEATH, R.L. and PEAT, S., (1941). The constitution of yeast mannan.
J. Chem. Soc., 833,842.
- HAUKELI, A.D. and LIE, (1971). Experimental conditions affecting yeast growth.
J. Inst. Brew., 3, (77), 253-251.
- HAWORTH, W.N., HIRST, E.L. and SHERWOOD, F.A., (1937). Polysaccharides XXIV: yeast Mannan.
J. Chem. Soc. , 784-791.
- HELM, E., MOHR, B. and THORNE, R.S.W., (1953). The measurement of yeast flocculence and its significance in brewing.
Wallerstein. Labo. Commun., 16, 315-326.
- HERNANDEZ, L.M., BALLOU, L., ALVARADO, E., GILLECE-CASTRO, B.L., BULINGAME, A.L., BALLOU, C.E., (1989 a). A new *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutant N-Linked oligosaccharide structure.
J. Biol. Chem., 264, 11849-11856.
- HERNANDEZ, L.M., BALLOU, L., ALVARADO, E., TSAI, P.K., and BALLOU, C.E., (1989 b). Structure of the phosphorylated N-Linked oligosaccharides from the mnn 9 and 10 Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 264, 13648-13659.

- HERRERA, J.R., SING, V., VANDER-NOUDE, W.J. and BARTNICKIGARGIA, S., (1975). Microfibril assembly by granules of chitinsynthetase.
Proc. Nat. Acad. Sci, 72, 2706- 2710.
- HIRATA, T. and ISHITANI, T., (1978). Studies on discrimination of SCP-related yeast by proton magnetic resonance Spectroscopy: Structural charges in cell wall mannan of *Candida subtropicalis* growth in different media.
Agric. Biol. Chem., 42, (4) 775- 780.
- HODGSON, J.A.; DAVID, R.B. and JOHNSTON, J.R., (1985). Discrimination by heat and proteinase Treatments between flocculent phenotypes conferred on *Saccharomyces cerevisiae* by genes FLO1 and FLO5.
J. Gen. Microbiol., 131, 3219-3227.
- HOLMBERG, S., (1978). Isolation and characterization of polypeptide absent from non flocculent mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*.
Garlsberg. Res. Comm., 43, 401-413.
- HOLMBERG, S. and KIELLAND-BRANDT, M.C. (1978). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* temperature sensitive for flocculation. Influence of oxygen and respiratory deficiency on flocculence.
Carlsberg. Res. Commun., 43, 37-47
- HOUWINK, A. and KREGER, D.R., (1953). Observation on the cell walls of yeast an electron microscopic and x-Ray diffraction study.
Antonie van Leewenhoek, 19,1-24
- HUBBARD, S.S.C., (1988). Regulation of glycosylation: The influence of protein structure on N-Linked oligosaccharide processing.
J. Biol. Chem., 263, 19303- 19317.
- HUMPHREY, S., HUMPHREY, T. and SANO, T., (1977). Organization and polysaccharides of sponge aggregation factor
J. Supramol. Struct., 7, 339-351.
- HUSSAIN, T., (1983). Etude du mécanisme de floculation de la levure *Kluyveromyces bulgaricus*.
Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle Univ. de NANCY I (France)

- HUSSAIN, T., SALHI, O., LEMARTRE, J., CHARPENTIER, C. and BONALY, R., (1986). Comparative studies of flocculation of *Saccharomyces uvarum* and *Kluyveromyces bulgaricus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 269-273.
- ISENBERG, H., ALLERMAN, J., BERKMAN, J.J. and GOLDBERG, D., (1963). Immunological and toxic differences between mouse virulent and mouse avirulent *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, 86, 1010-1018.
- JANSEN, H.E. and MENDELİK, F., (1951). A study on yeast flocculation. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congress Brighton* PP 59-81.
- JANSEN, H.E., (1958). Flocculation of yeast in chemistry and biology of yeasts. A.H. OOKE ed. Acad. press FNC. Publi. New-York.
- JAYATISSA, P.M. and ROSE, A.H., (1976). Role of the phosphomannan in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 96, 165-174.
- JELINEK-KELLY, S. and HERSCOVICS, A., (1988). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Purification of alpha mannosidase which removes one specific mannose residu from Man9 Glc-NaC. *J. Biol. chem.*, 263, 14757-14763.
- JERMYN, M.A. and ISHERWOOD, F.A, (1949). Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. *Biochem. J.*, 44, 402-407.
- JEUNE HOMME, R. Cl., CASTIAU, M. et MASSCHELEIN, Ch. A., (1964). Flocculence et variabilité de la fraction mannane-protéine au cours de la croissance de la levure. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 15, 18-22.
- JOHANIDES, V. and IVAN KOVIC, T., (1980). Parametres affecting agglutination ability in opposite mating types of yeast *Saccharomyces kluyveri*. Current development in yeast Research. Edited by G. STEWART and RUSSEL I. pp. 265-270.
- JONES, G.H. and BALLOU, C.E., (1969). Studies on the Structure of yeast mannan II: Mode of action of the Artrobaqter α -mannosidase on yeast mannan. *J. Biol. Chem.*, 244, 1052-1059.

- JOHNSTON, J.R., (1980). Genetic control of yeast flocculation.
Proc. Symp. Yeast. Gen., London, pp 23-24.
- JOHNSTON, J.R., (1981). Recent developments in the applications
of genetic to brewing and wine strains of yeast.
Coll. Soc. Fr. Microbiol., Reims, pp 125-146.
- JOHNSTON, J.R and READER, H.P., (1982). Genes conferring and
suppressing flocculation in brewing and Laboratory
Strains of *Saccharomyces*.
11th. Inter. Conf. Mol. Biol. Montpellier. 124.
- JOHNSTON, J.R. and READER, H.P., (1983). Genetic control of
flocculation In: yeast genetics: Fundamental and applied
aspects, eds, J.F.T Spencer, D.M. Spencer and A.R.W.
Smith. New-york. Springer-Verlag pp 205-224.
- JUMBLATT, J.E., SCHLUP, V. and BURGER, M.M., (1980). Cell-Cell
recognition: Specific binding of *Microoctona* Sponge
aggregation factor to homotypic cells and the role of
calcium ions.
Biochemistry, 19, 1038-1042.
- JUNG, P. and TANNER, W., (1973). Identification of lipid inter
mediate in yeast mannan biosynthesis.
Eur. J. Biochem., 37, 1-6.
- KAMADA, K. and MURATA M., (1984a). Effet of environmental
condition on flocculation-dispersion of brewer's yeast
flocculation.
Nippon Nogeikgaku Kaishi, 58 , 983-990.
- KAMADA, K., and MURATA, M., (1984b). Physiological factors
affecting flocculation-dispersing changes in brewer's
yeast.
Nippon Nogeikgaku Kaishi, 58, 991-998.
- KAMADA, K. and MURATA, M., (1984c). On the mecanism of brewer's
yeast flocculation.
Agric. Biol. Chem., 48, (10) 2423-2433.
- KANG MOHINDER, S. and CABIB, E., (1986). Regulation of fungal
cell wall growth: a guanine nucleotide binding
proteineous Component requied for activity of (1-3)
 β .glucan. synthetase.
Proc. Nat. Acad. Sci., 83, 5808-5812.

- KELLER, F.A. and CABIB, E., (1971). Chitin and yeast budding: properties of chitin synthetase from *S. carlsbergensis*.
J. Biol. Chem., 246, 160-166.
- KIDA, K., YAMADAKI, M., ASANO, S.I., NAKATA, T. and SONODA, Y., (1989). The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast.
J. Ferment. Bioeng., 68, (2), 107-111.
- KIHN, J.C., MESTDAGH, MM. and ROUXHET, P.G., (1987). ESR Study of copper (II) retention by entire cell, cells walls, and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*.
Can. J. Microbiol., 33, 777-782.
- KIRSOP, B.H., (1974). Control of yeast activity during fermentation.
The Brewer., 1, 28-31.
- KOCOUREK, J., and BALLOU, C.E., (1969). Method for fingerprinting yeast cell wall mannans.
J. Bacteriol., 100, 1175-1181.
- KOGAN, G., PAVLIAK, V., and MASLER, L., (1988 a). Structure studies of mannans from the cell wall of the pathogenic yeasts, *Candida albicans* serotypes A and B and *Candida parapsittasis*.
Carbohydr. Res., 172, 243-253.
- KOGAN, G., PAVLIAK, V., SANDULA, J., and MASLER, L., (1988 b). Novel structure of the cellular mannan of the pathogenic yeast *Candida krusei*.
Carbohydr. Res., 184, 171-182.
- KOPECKA, M., PHAFF, H.J. and FLEET, G.H., (1974). Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature.
J. Cell. Biol., 62, 66-76.
- KOPECKA, M. and FARKAS, V., (1979). RNA synthesis and the formation of the cell wall-effect of lomofungin on regenerating protoplasts.
J. Gener. Microbiol., 110, 453-463.
- KOPECKA, M., (1984). Papulacandin β inhibitor of (1-3)- β -D-glucan fibrielar component of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts.
Folia. Microbiol., 29, 441-449.

- KORN, F.C. and NORTHCOTE, D.H., (1960). Physical and Chemical properties of polysaccharides and glycoproteins of yeast cell wall.
Biochem. J., 75, 12-17.
- KORNFELD, R. and KORNFELD, S., (1985). Assembly of asparagine linked oligosaccharide.
Ann. Rev. Biochem., 54, 631-664.
- KOVAC, L., (1985). Calcium and *Saccharomyces cerevisiae*. flocculation,
Biochim. Biophys. Acta., 840, 317-323.
- KREBS, H.A., (1972). The pasteur effect and the relation between respiration and fermentation In: Essays in biochemistry, eds., P.N.C. Campbell and F. Dickens.
 London, New York. Acad. Press., 8, pp 1-34.
- KUKURUZINSKA, M.A., BERGH, M.L.E. and JACKSON, B.J., (1987). Protein glycosylation in yeast.
Ann. Rev. Biochem., 526, 915-944.
- KUMADA, J., NAKAJIMA, S., TAKAHASHI, T., PROJECTTEAM, D.G. and NARZISS, L., (1975). Einfluss von druck und temperatur bei der garung auf den Stoffwechisel der hefe und bierqualitat.
Proc. Eur. Brew. Conv., 615-623.
- KURIYAMA, H., SEIKO, Y., MURAKAMI, T., KOBAYASHI, H. and SONADA, Y.(1985). Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculating yeast.
J. Ferment. Technol., 62, 55-62.
- LAMPEN, J.O., (1968). External enzymes of yeast:their nature and formation .
Antonie Van Leenwenhoek, 34, 1-18.
- LEE, Y.C. and BALLOU, C.E., (1965). Preparation of mannobiose, mannotriose and mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannans
Biochem., 4, 257-264.
- LEE, Y.C., and BALLOU, C.E., (1968). Preparation of mannobiose, mannotriose and a new mannotetraose from *Saccharomyces cerevisiae* mannan.
Biochem., 4 , 257-264.

- LEE, J.D., and KOMAGATA, K., (1980). Taxonomic study of methanol assimilating yeasts.
J. Gen. Appl. Microbiol., 26, 133-158.
- LELEU, J. B., (1977). Contribution à l'étude chimique et structurale des parois de levures alimentaires cultivées sur n-paraffine, ethanol et methanol.
 Thèse de Docteur Ingenieur Univ. de NANCY I. (FRANCE).
- LELEU, J.B., FOURNET, B., MORILHAT, J.P., BONALY, R. et MONTREUIL, J., (1977). Isolement et structure d'une glycoprotéine superficielle de la paroi de *Torulopsis candida*.
Biochimie, 59, 687-692.
- LEWIS, C.W. and JOHNSTON, J. R., (1974). Genes controlling flocculation in yeast.
Proc. Soc. Gen. Microbiol., 1, 73.
- LEWIS, C.W., JOHNSTON, J.R. and MARTIN, P.A., (1976). The genetics of yeast flocculation.
J. Inst. Brew., 82, 158-160.
- LI, Y.T., and LEE, Y.C., (1972).
J. Biol. Chem., 247, 3677-3683.
- LIMTONG, S., NAKATA, M., FUNAHA-SHI, H., YOSHIDA, T., SEKI, T., KUMAJANTA, T. and TAGUCHI, H., (1984). Continuous ethanol production by a concentrated culture of flocculating yeast.
J. Ferment. Technol., 62, 55-62.
- LINDQUIST, W., (1953). On the mechanism of yeast flocculation
J. Inst. Brew., 59, 59-61.
- LIPKE, P.N., and HULL-PILLSBURY, C., (1984). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* tup 1 mutants.
J. Bacteriol., 159, 797-799.
- LIS, H., and SHARON, N., (1986). Biological properties of lectins
 In: The lectins: Properties, function and applications in biology and medicine, ed I.E. LINNER. New-York, Acad. Press. pp 265-291.
- LOPEZ ROMERO, E., and RUZ HERRERA, J., (1987). Properties of β -glucan synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*.
Antonie Van Leeuwenhoek, 44, 329-339.

- LOTON, R., BERDKEVSKY, I., MERZACH, D., and GROSSOWICZ, N., (1976). Effet of calcium ions on growth and metabolism of *Saccharomyces carlsbergensis*.
J. Gen. Microbiol., 92, 76-80.
- LUERS, A., and HEUSZ, R.Z, (1971).
Z. gest. Branw., 44, p.18.
- LYONS, T.P., and HOUGH, J.S., (1970 a). Flocculation of brewer's yeast.
J. Inst. Brew., 76, 564-570.
- LYONS, T.P., and HOUGH J.S, (1970b). The role of yeast cell wall in brewing.
Brew. Dig., 45, 52-60.
- LYONS, T.P., and HOUGH J.S, (1971). Futher evidence for the cross-bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast.
J. Inst. Brew., 77 , 189-203.
- MAEBA, P.J., (1986). Isolation of a surface glycoprotein from *Myxococcus Xanthus*.
J. Bacteriol., 166, 644-650.
- MANACHINI, P.L., (1979). DNA sequence similiary, cell wall mannans and physiological characteristics in some strains of *Candida utilis* and *Hansenula partiersnii*.
Antonie Van Leeuwenhoek., 45, 451-468.
- MANGUNWIDJAJA, D.A., (1988). Rôle des ions calcium et des phosphopeptidomannanes pariétaux dans le mécanisme de la floculation des levures *Kluyveromyces lactis haploides*.
These de Doctorat. Université de Nancy I. (FRANCE).
- MANNERS, D.J. and MASSON, A.J., (1969). The structure of two glucans from yeast cell walls.
F.E.B.S. Letters, 4 , 122-124,
- MANNERS, D.J., MASSON, A.J. and PATTERSON, J.C., (1973). The structure of a β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls.
Biochem. J., 135, 19-30.
- MANNERS, D.J., MASSON, A.J., PATTERSON, J.C., BJORNDAL, H., and LINBERG, B., (1973). The structure of a β (1→6) D-glucan from yeast cell wall.
Biochem. J., 135, 31-36.

- MANNERS, D.J. and MEYER, M.T., (1977). The molecular structure of glucans from the cell wall of some *Schizosaccharomyces pombe*.
Carbohydr. Res., 57, 189-193.
- MANNIELLO, J.M.; HEYMMANNE, H. and ADAR, F.W., (1979). Isolation of atypical lipopolysaccharide from purified cell wall of *Pseudomonas Cepaëia*.
J. Gen. Microbiol., 112, C2) 397-400.
- MARSA, V., BARBARIC, S., RIES, B. and MILDNER, P., (1987). Role of glycosylation in secretion of yeast acid phosphatase.
F.E.B.S. Lett., 217, 174-179.
- MARC, I., (1982). Modélisation de la fermentation de la bière dans un réacteur cylindrique conique: Cinétique d'assimilation de sucre et d'acides aminés, de croissance et de floculation, de Production de Co₂ et de métabolites. Thèse de Docteur-Ingenieur INPL. NANCY, (FRANCE).
- MARFEY, P., SORENSEN, S.B. and OTTENSEN, M., (1977). Studies on yeast flocculation comparison of enzymatic digests of flocculent and non flocculent cells of *Saccharomyces carlsbergensis*.
Carlsberg. Res. Comm., 42, 363-367.
- MARTIN, D.M., MAYES, P.M., and RODWEL, V.D., (1983). Review of Biochemistry California: Lange Medicals publications.
- MASSCHELEIN, C.A., JEUNE HOMME-RAMOS, C., CASTIAU, C. and DEVREUX, A., (1963). Mechanism of phenotypic variations in the flocculence character of yeast.
J. Inst. Brew., 69, 332-337.
- MATSUI, I, OISHI, K., KANAYA, K. and BABA, N., (1985). The morphology of L. Fucose, D- mannose specific lectin (SFL 100-2) produced by *Streptomyces* N° 100-2.
J. Biochem., 97, 399-408.
- MBAWALA, A., AL-MAHMOOD, S., LOPPINET, V. and BONALY, R., (1990). Acetolysis and ¹HNMR studies on mannans isolated from very flocculent and weakly flocculent cells of *Pichia pastoris* IFP 206.
J. Gen. Microbiol., 136, 1279-1284.

- MC CLARE, C.W.F, (1971). An accurate and convenient organic phosphorus assay.
Anal. Biochem., 39 , 527-530.
- MC COURTIE, J., and DOUGLAS, L.J., (1984). Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*.
Inf. Immun., 45, 6-12.
- MC COURTIE, J.M., and DOUGLAS, L.J., (1985). Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion.
J. Gen. Microbiol., 131, 495-503.
- MC DOWELL, W., and SCHWARZ, R.T., (1988). Dissecting glycoprotein biosynthesis by the use of specific inhibitors.
Biochimie, 70, 1535-1549.
- MC WILLIAM, I.C., (1970). The structure, synthesis and function of yeast cell wall. A review.
J. Inst. Brew., 81, 524-533.
- MICHIKO, I.A., and OPPENHEIMER, S.B., (1970). Inhibition of cell aggregation by specific carbohydrates.
Exp. cell. Res., 120, 101.
- MILL, P.J., (1964a). The effect of nitrogenous substances on the time of flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Gen. Microbiol., 35, 53-62.
- MILL, P.J., (1964b). The nature of interaction between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Gen. Microbiol., 35, 63-68.
- MILL, P.J., (1966). Phosphomannans and other components of flocculent and non-flocculent walls of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Gen. Microbiol., 44, 329-341.
- MIKI, B.L.A., POON, N.H., JAMES, A.P., and SELIGY, V.L., (1980). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: Mechanism of cell interaction. In: *Adv. Biotechnol. Curr. Dev. Yeast. RES.*, eds. G. Stewart and I. RUSSEL Turo, to. Pergamon Press., PP 193-198.

- MIKI, B.L.A., POON N.H., JAMES A.P., and SELIGY V.L., (1982 a). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FL01 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 152, 878-889.
- MIKI, B.L.A., POON, N.H., and SELIGY, V.L., (1982 b). Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 35, 53-60
- MISAKI, A., JOHNSON, J., KIRK WOODS, S., SCALLETTI, J.V. and SMITH, F., (1968). Structure of the cell wall glucan of the yeast. *Carbohydr. Res.*, 6, 150-164.
- MOBLEY, P.W., METZGER, R.P., and WICK, A.N., (1975). "Methods in enzymology" (WOOD, W.A), 41, 173-177. Acad. press. NEW York.
- MONSIGNY, M., ADAM-CHOSSON, A. et MONTREUIL, J., (1968). Etude sur les glycoprotéides IXII: Détermination de la nature de point d'attache glycane-protéines dans les préparations d'ovomucoïde de poule. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, (4), 857-886.
- MONTREUIL, J. et SPIK, G., (1968). Microdosage des glucides monographie N° 2. Faculté des sciences de lille.
- MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., DEBRAY, H., FOUNET, B., SPIK, G. and STECKER, G., (1986). In " Carbohydrate analysis : A partial approach" : glycoproteins CHAPLIN M.F. and KENNEDY J.F Eds IRL. PRESS.
- MORIMOTO, K., SHIMAZU, T., FUJI, G. and HORIE, Y., (1975). Some substances in malt inducing early flocculation of yeast preliminary investigation on high molecular weight substance in malt and wort. *Rep. Res. Lab. Kirin. Brew.*, 18, 63-64.
- MORRIS, E.O., (1966). Aggregation of micells : yeasts. In: The fungi (vol II). The Fungal organism. AIN WORTH. G.C. ed. PP 63-81.
- MOULKI, H., et BONALY, R., (1974). Etude des parois de levures du genre *Rhodotorula* IV. Variation de la teneur en chitine. *Biochem. Biophys. Acta.*, 338, 120-124.

- MULLER, W.E.G., CONRAD, J., SCHRODER, S., ZAHN, R.K., KURELEC, B., DRESSBACH, K., and UHCENBRUCK, G., (1983). Characterization trimetric self-recognizing *Grodia cydonium* lectin I.°Eur. *J. Biochem.*, 133, 263-267.
- MURGUI, A., ELDRZA, V., and SENTANDREU, R., (1985). Effet of papulacandin B calcofluor white on the incorporation of manno proteins in the wall of *Candida albicans* blastospor B., B., A., 841, 215.
- MURGUI, A., ELORZA, V.M., and SENTAN IDREU, R., (1986). Tunicamycin and papulacandia B inhibit in corporation of specific mannoproteins into the wall of *Candida albicans* regenerating protoplast. *Biochem., Biophys. Acta.*, 884, 550-558
- MURGUI, A., ELORZA, V., and SENTANDREU, P., (1987). Effet of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochim. Biophys. Acta.*, 841, 215.
- MUZZARELLI, R.A.A., (1977). Chitin. Pergamon Press. Oxford, New-York, Toronto Sydney, Paris, Frankfurt.
- MIZUNAGA, T. and NOGUCHI, T., (1982). The role of Core oligosaccharide in formation of an active acide phophatase and its secretion by yeast protoplast. *J. Biochem.*, 91, 191-200.
- NAMBA, H., and KURODA, H., (1974). Studies on Fungicides XII: Biosynthesis of β -glucan and chitin-like substance of cell wall from *Cochliobolus migabeanus* (2). *Chem. Pharm. Bull. (Japon).*, 22, 1895-1901.
- NAKAJIMA, T., and BALLOU, C.E., (1974a). Characterization of Carbohydrate fragment obtained from *Sacharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7679- 7584.
- NAKAJIMA, T., and BALLOU, C.E., (1974b). Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J. Biol. Chem.*, 249, 7685-7694.

- NAKAJIMA, T., and BALLOU, C.E., (1975). Yeast mannoprotein biosynthesis: Solubilisation and selective assay of four mannosyltransferases.
Proc. Nat. Acad. Sci., 72, (10) 3912-3916.
- NAKAJIMA, K., ARAKI, Y., and ITO, E., (1976). The formation of a mannose containing trisaccharide on a lipid and its transfer to protein in yeast.
F.E.B.S. LETTERS, 72, 287-290.
- NAKAJIMA, H., TORAYA, T., and FUKUI, S., (1988). Structural alteration of cell wall polysaccharide from *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Gen. Microbiol., 35, 53-60.
- NECAS, O., and SVOBODA, A., (1980). Morphogenesis in protoplasts. In: Yeast cell envelopes.
CRC Press USA. Vol II PP. 105-127.
- NISHIHARA, H., TORAYA, T., and FUKUI, S., (1976a). Factors affecting flocculating of brew's yeast.
J. Ferment. Technol., 54, 315-351.
- NISHIHARA, H., TORAYA, T., and FUKUI, S., (1976b). Induction of the floc-forming ability in brewer's yeast.
J. Ferment. Technol., 54, 356-360.
- NISHIHARA, H., (1977). Effect of chemical modification of cell surface components of a brewer's yeast on the floc forming ability.
Arch. Microbiol., 115, 19-23
- NISHIHARA, H., TORAYA, T., and FUKUI, S., (1982). Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effect of metal ions protein denaturants and enzyme treatments.
Arch. Microbiol., 131, 112-115.
- NISHIHARA, H., TORAYA, T., and FUKUI, S., (1987). Essential roles of cell surface protein and carbohydrate components in flocculation of a brewer's yeast.
Agric. Biol. Chem., 51, (10) 2721-2726.
- NODRING-HERTZ, B., and CHET, L., (1986). Fungal lectins and agglutinins. In: Microbial lectins and agglutinins: Properties and biological activity.
Ed. D. Mirelman. New-York: Wiley, PP 393-403.

- NORTHCOTE, D.H., (1963). The structure and organization of the polysaccharides of yeast.
Pur. Appl Chem., 7, 669-675.
- NOVAES-LEDIEU, M., and GARCIAMEN-DOZA, C., (1970). Biochemical studies on walls synthesized by *Candida utilis* protoplasts.
J. Gen. Microbiol., 61, 335-342.
- NOVOTNY, Y., FLUENTES, J.C., CARRE, P.H., BOZE, H., MOULIN, G., and GALZY, P., (1983). Homothallism expression in *Kluyveromyces lactis*. *Heredity*, 51, 549-559.
- NURMINEN, T., OURA, E., and SUOMALEINENN, H., (1970). The enzymic composition of the isolated cell wall and plasma membrane of baker's yeast.
Biochem. J., 116, 51-69.
- OFEK, I. et SHARON, N., (1983). Comment les bactéries adhèrent aux cellules.
La Recherche, 14, 376-378.
- OKUBO, Y. and SUZUKI, S., (1978). Fractional precipitation of D-Mannan from baker's yeast with concanavalin A.
Carbohydr., 62, 135-141.
- OKUBO, Y., SHIBATA, N., ICHIKAWA, S., and SUZUKI, S., (1981). Immunochemical study on baker's yeast mannan prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide.
Arch. Biochem. Biophys., 212, 204-215.
- ORLEAN, PETER, A.B., (1982). (1-3) β -glucan synthase from budding and filamentous culture of the dimorphic fungus *Candida albicans*.
Eur. J. Biochem., 127, 397-403.
- OTIS, D.R., and DAY, D.F., (1987). Optimization of protoplast formation and regeneration in *Leuconostoc mesenteroides*.
Appl. Env. Microbiol., 7, 1694-1695.
- PASTEUR, L., 1876. "Etude de la Biere".
Ed. Ganthir VILLARS, PARIS, P.196.
- PASTOR, F.I.J., HERRERO, E., and SENTANDREU, R., (1982). Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* envelope mannoproteins.
Arch. Microbiol., 132, 114-148.

- PATEL, G.B., and INGLEDEW, W.M., (1975a). The relationship of acid-soluble glycogen to yeast flocculation.
Can. J. Microbiol., 21, 1608 -1613.
- PATEL, G., and INGLEDEW, W.M., (1975b). A flocculation test for moderately flocculent brewing yeast.
J. Inst. Brew., 81, 123-126.
- PEAT, S., WHELAN, W.J., and EDWARDS, T.E., (1961a). Polysaccharides of baker's yeast. Part IV: Mannan.
J. Chem. Soc., 29, 34.
- PEAT, S., TURVEY, J.R., and DOYLE, D., (1961b). The polysaccharides of baker's yeast. PART IV: A further study of the mannan.
J. Chem. Soc., 3918-3923.
- PELHAM, H.R.B., HARDWICK, K.G., and LEWIS, M.J., (1988). Sorting of soluble ER proteins.
EMBO. J., 7, 1757-1762.
- PEREZ, M. and HIRSBERG, C.B, (1986). Topography of glycosylation reaction in the rough endoplasmic reticulum membrane.
J. Biol. Chem. 261, 6822-6830.
- PHAFF, H.J., (1963). Cell wall of yeast.
Ann. Rev. Microbiol., 17, 15-30.
- PHAFF, H.J., (1971). Structure and biosynthesis of yeast cell envelope. In " the yeast Vol.2, eds. A.H. Rose and J.S. Hanison, London.
Acad, Press. pp. 135-210
- PIEZ, K.A., and MORRIS, L., (1960). A modified procedure for the automatic analysis of amino acids.
Anal. Biochem., 1, 187-192.
- PIGMAN, W., MOSCHRA, J., DOWNS, F., and WAKABASHI, T., (1974). Mechanisms and condition for beta-elimination of oligosaccharides from glycoproteins.
Colloques Int. du C.N.R.S, 221 230-247.
- PORTER, A.H., and MAC CAULEY, R.J., (1965). Studies on flocculation I: a relation-ship between the pH and Calcium content of the growth medium.
J. Inst. Brew., 71, 175-179.

- POSADA, J., CANDELA, J., CALERO, G., ALMENAR, J., and MARTIN, S., (1977). Fermentation condition and yeast Performance. Proc. Eur. Brew. Conv., 73, 533-544.
- POULAIN, D., TRONCHIN, G., DUBREME T Z, J.F., and BIGUET, J., (1978) Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: Study of its constitutive layers by the use of acytochemical technic revealing polysacchades. Ann. Microbiol., 129, 141-153.
- POULAIN, D., TRONCHIN, G., and VERNES, A., (1985). Application d'une méthode d'extraction des lipides aux parois de blastospores de *Candida albicans*. Mycopathologia, 92, 141- 147.
- PRINCE, I.G., and BARDFORD, J.P., (1982). Induced flocculation of yeast for use in the tower Fermenter. Biotechnol. Lett., 10, 621-626.
- PUHAN, Z., and MARTIN, S.M, (1971). Prog. Ind. Microbiol., 9, 13-16. Cité par STEWART (1975).
- RAINBOW, C., (1966). yeast flocculation. Proc. Biochem., (12), 1, 489-491.
- RASCHKE, W.C., and BALLOU, C.E., (1971). Immunochemistry of phosphomannan of the yeast *Kloeckera brevis*. Biochemistry, 10, (22) 4130-4135.
- REYSSET, G., (1987). Protoplast formation and regeneration of *Clostridium acetobutylicum* strain N1-4080. J. Gen. Microbiol., 133, 2595- 26.00.
- RIVAS , L.A. and PONTLEZICA, R., (1987). Synthesis of β -glucans in *Protheca zopfii*. Isolation and Characterization of the glycoprotein primer. Eur. J. Biochem., 163, 135- 140.
- ROGERS, H.J., PERKINS, H.R., and WARD, J.B., (1980). Microbiol. Cell. Walls and membranes London. New-York. CHAPMAN and HALL. ed.
- ROLAND, J.L., (1972). Structure, édification et rôle des parois vegetales Ann. Univ. A.R.E.R.R.S Reims, pp 88-93.

- ROMERO, P.A., and HERSCOVIC S, A., (1989). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 264, 1940-1950.
- ROSE, A.H., (1984). Physiology of aggregation: Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. In: Microbial adhesion and aggregation. ed. K.C. Marshall. Heidenberg, Berlin: Springer Verlag., pp. 320-325.
- ROSE, S.D., SIMPSON, D.L., Rose, J.E., and BARONDES, S.H., (1974). Carbohydrate-binding protein from *Polyphochelium pallidum* implicated in intercellular adhesion.
Nature (London), 252, 149-151.
- ROSENFELD, L., and BALLOU, C.E., (1974 a). Acetolysis of disaccharides: Comparative kinetics and mechanism.
Carbohydr. Res., 32, 287-298
- ROSENFELD, L., and BALLOU, C.E., (1974 b). Genetic control of yeast mannan structure. Biochemical basis for the transformation of *Saccharomyces cerevisiae* somatic antigen.
J. Biol. Chem., 249, 2319-2321.
- ROSENFELD, L., and BALLOU, L.E., (1975). An approach to the sequencing of yeast mannan.
Biophys. Res. Com., 63, (3). 571-579.
- ROTHBLATT, J.A., and MEYER, D.I., (1986). Secretion in yeast: Reconstitution of the translocation and glycosylation of alpha factor and invertase in a homologous cell-free system.
Cell., 44, 619-628.
- ROTHSTEIN, R.J., and SHERMAN, F., (1980). Genes affecting the expression of cytochrome C in yeast: genetic mapping and genetic interactions
Genetic., 94, 871-899.
- RUNGE, K.W., and ROBBINS, P.W., (1986). A new yeast mutation in the glucosylation steps of the asparagine -linked glycosylation pathway .
J. Biol. Chem., 261, 15582- 15590.

- RUSSEL, I., STEWART, G.G., and GARISON, I., STEWART, G.G., and GARISON, I.F., (1973). Studies on the formation spheroplasts from stationary phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Inst. Brew., 79, 48-54.
- RUSSEL, I., STEWART, G.G., READER, H.P., JOHSTON, J.R, and MARTIN, P.A, (1980). Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation.
J. Inst. Brew., 86, 120-121.
- SALHI, O., (1986). Etude sur les structures pariétales des levures floculantes *Saccharomyces uvarum*.
 Thèse de Docteur-Ingenieur. Univ. de NANCY I. (FRANCE).
- SALKOWSKI, E. Ueber die Kohlehydrate der Hefe.
Ber. dt. Chem. Ges., 27, 497-502 et 425-926
- SALTUKOGLU, A., and SLAUGHTER, J.C, (1983). The effect of magnesium and calcium on yeast growth.
J. Inst. Brew. Vol. 89. (3-4) pp.81-83.
- SANBLAS, G., and CUNNINGHAM G., (1976). Structure of cell wall and exocellular mannans from the yeast *Hansenula holstii* II: Mannan produced in phosphate limited medium.
Biochim. Biophys. Acta., 354, 247-253.
- SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H., and JEANES, A., (1965). Quantitative determination of monosaccharides and their alditol acetates by gas chromatography.
Anal. Chem., 57, 1602-1604.
- SBURLATI, A., and CABIB, E., (1986). Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 261, (32), 15147-15152.
- SCHARMA, C.B., LEHLE L., and TANNER, W., (1981). N-glycosylation of yeast proteins.
Eur. J. Biochem., 116, 101-108.
- SCHEKMAN, R. and NOVICK, P, (1982). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, metabolism and gene expression. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SEKUL, G., VINNET, C.H., and ORY, R.L., (1978). Enzyme modification of protein.
J. Agric. Food. Chem., 26, 855.

- SENTANDREU, R., and NORTHCOTE, D.H., (1968). The structure of glycopeptide isolated from yeast cell wall.
Biochem. J., 109, 419-432
- SENTANDREU, R., and NORTHCOTE, D.H., (1969). Yeast cell. wall synthesis.
Biochem., J., 115, 231.
- SENTANDREU, R., and LAMPEN, J.O., (1972). Biosynthesis of mannan in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of lipid intermediate and its identification as a mannosyl-1-phosphoryl polyphenol.
F.E.B.S. Letters, 27,(2) 331-334.
- SENTANDREU, R., ELORZA, M.V., and VILLANUEVA, J.R., (1975). Synthesis of yeast cell glucan.
J. Gen. Microbiol., 90, 13-20.
- SHARMA, C.B., LEHLE, L., and TANNER, W., (1981). N-glycosylation of yeast proteins.
Eur. J. Biochem., 116, 101-108.
- SHARON, N., (1986). Bacterial lectins. In: The lectins properties, functions and applications in biology and medicine, ed I.E. PP. 493-527.
- SHAWN, M.A., and ALIS, A.K., (1972).
J. Immunol., 36, 256 Cité par STEWART (1975)
- SHIBATA, N., FUKASAWA, S., KOBAYASHI, H., TOJO, M., YONEZU, T., AMBO, A., OHKUBO, Y., And SUZUKI, S., (1989). Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form of *Candida albicans* NIH A.207 Serotype A Strain.
Carbohydr. Res., 187, 239-253.
- SIETSMA, J.H., and WESSELS, J.G.H., (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*.
Biochem, Biophys. Acta., 496, 225-239.
- SIETSMA, J.H., RAST, D., and WESSELS, J.G.H., (1977). The effect of carbon dioxide on fruiting and on the degradation of a cell-wall glucan in *Schizophyllum commune*.
J. Gen. Microbiol., 102, 385-389.
- SIETSMA, J.H. and WESSELS, J.G.H., (1979). Evidence for covalent linkage between chitin and β -glucan in a fungal wall.
J. gen. Microbiol., 114, 99-108.

- SIMON, P., et MEUNIER R., (1970). Microbiologie industrielle et genie biochimique. Ed. MASSON. Paris.
- SLODKI, M.E., SAFRANSKI, M.J., HENSLEY, D.E., and BABCOCY, G.E., (1979). Variation in composition of yeast phosphohexosans. *Appl Microbiol.*, 19, 1019.
- SMITH, W.L., NAKAJIMA, T., and BALLOU, C.E., (1975). Biosynthesis of yeast mannan, isolation of *Kluyveromyces lactis* mannan mutants and a study of the incorporation of N-acetyl-D- glucosamines in to the polysaccharide side chains.
J. Biol. Chem., 250, (9) 3426-3453.
- SNIDER, M.D., and ROGERS, O.C., (1984). Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis. *Cell.*, 36, 753-761.
- STAHL, U., KUES, U., and ESSER, K., (1983). Flocculation in yeast an assay on the inhibition of cell agregation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 199-202.
- STEWART, T.S., and BALLOU, C.E., (1968). A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. *Biochem.*, 7 , 1855-1863.
- STEWART, G.G., RUSSEL, I., and GARRISON, I.F., (1973). Futher studies on flocculation in brewer's yeast strains. *Am. Soc. Brew. Chem. PROC.*, 973, 100-106.
- STEWART, GG., RUSSEL, I., and GARRISSON, I.F., (1974). Flocculation in brewer's yeast Strain: old and new finding in perpective. *J. Inst. Brew.*, 80, 26-28.
- STEWART, G.G, (1975). Yeast flocculation: pratical implication and experimental finding. *Brew. Digest.*, 3 , 42-60.
- STEWART, G.G., RUSSEL, I., and GARRISON, I.F., (1975). Nature-murture anomalies. Futher studies in yeast. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 33, 137-147.
- STEWART, GG., RUSSEL, I., and GARRISON, I.F., (1975). Some consideration of flocculation characteristics of ale and larger yeast strains. *J. Inst. Brew.*, 81, 248- 257.

- STEWART, G.G., and GORING, T.E., (1976). Effect of some monovalent and bivalent metals ions on the flocculation of brewer's yeast strain.
J. Inst. Brew., 82, 341-342.
- STEWART, G.G., GARRISON, I.F., GORING, T.E., MELEC, M., PIDAST, P., and RUSSEL, I., (1976). Biochemical and genetic studies on yeast flocculation .
kemia . kemio., 10, 465-479.
- STEWART, G.G., and RUSSEL, I., (1977). The identification, characterization and mapping of a gene for flocculation in *Saccharomyces* Sp.
Can. J. Microbiol., 27, 973-990.
- STEWART, G.G., (1981). The genetic manipulation of industrial yeast strains.
Can. J. Microbiol., 27, 973-990.
- STEWART, G.G., and RUSSEL I., (1981). Yeast flocculation In: *Brewing Science*. Ed. J.R.A POLLOCK, Vol.2. LONDON Academic Press. pp 61-92.
- STODART, R.W., (1984). In "the biosynthesis of polysaccharides" CROOM HELM. LONDON et Sydney, P. 354.
- STODOLA, F.H., DEINEMA, M.H., and SPENCER, J.F.T., (1967). Extracellular lipids of yeast.
Bacteriol. Rev., 31, 194-213.
- STRATFORD, M., (1989). Yeast flocculation: The influence of agitation.
Yeast, vol. 5. 4.,
- STREIBLOVA, E., (1968). Surface structure of yeast protoplasts.
J. Bacteriol., 2, 700-707.
- SUOMALAINEN., H., and NURMINEN, T., (1970). Lipid composition of cell wall and plasma membrane of baker's yeast
Chem. phys. Lipids, 4 , (3), 247.
- SUZZI, G., ROMANO, P., ZAMBONELLI, C., (1984). Flocculation of wine yeast: frequency difference, and stability of the character.
Can. J. Microbiol., 30, 36- 39.

- SVOBODA, A., (1978). Fusion of yeast proplasts induced by polyethylene glycol.
J. Gen. Microbiol., 109, 169-175.
- TAMMI, M., BALLOU L., TAYLOR, A., and BALLOU, C.E., (1987). Effect of glycosylation on yeast invertase oligomer stability.
J. Biol. Chem., 262, 4395- 4401.
- TANNER, W., and LEHLE, L., (1987). Protein glycosylation in yeast
Biochim. Biophys. Acta., 906, 81-89.
- TARENTINO, A.L., PLUMMER, T.H., and MALEY, F., (1974). The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo- β -N-acetyl glucosaminidase II.
J. Biol. Chem., 249, 818-824.
- TAYLOR, N.W., and ORTON, W.L., (1973). Effect of alkaline earth metal Salts on flocculence in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Inst. Brew., 79, 294-297.
- TAYLOR, N.W., and ORTON W.L., (1978). Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Inst. Brew., 84, 113-114.
- TEMEYER, K.B., (987). Comparison of methods for protoplasts formation in *Bacillus thuringiensis*.
J. Gen. Microbiol., 168, 503-506.
- THIEME, T.R., and BALLOU, C.E., (1970). Constancy of cell wall mannan structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 39, 621-625. THIEME, T.R. and BALLOU C.E. (1971). Nature of phosphodiester linkage of the phosphomannan from the yeast *Kloecker brevis*. *Biochemistry*, 10, 4121 - 4129.
- THORNE, R.S.W., (1951). Some aspects of yeast flocculation, *Proc. Eur. Brew. Con. Brighton.*, 10, 4121 - 4129.
- TKACS, J.S., CYBULSKA, E.B., and LAMPEN, J.O, (1971). Specific straining of wall mannan in yeast wall, with fluorescence conjugated concanavaline A. *J. Bacteriol.*, 105, 1 - 5.
- TRAVELYAN, W.E., PRICTER, D.P, and HARRISON, J.S, (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166, 444 - 445.

- TRONCHIN, G., POULAIN, D., and BIGUET, J., (1979). Etude cytochimique et ultrastructurale de la paroi de *Candida albicans*. Localisation des mannanes par utilisation de la concanavaline A sur coupes ultrafines. *Archi. Microbiol.*, 123, 245 - 249.
- TRONCHIN, G., POULAIN, D. et GIGUT, J., (1984). Aspects ultrastructuraux et cytochimique de la régénération de sphéroplastes chez *Candida albicans*. *Ann. Microbiol. (IP)*, 133, 275-291.
- VALENTIN, E., HERRERO, E., PASTOR, F.I.J., and SENTANDREU, R., (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell-wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1419-1428
- VAVASEUR F., (1985). Modification in vitro des glyadines action de diverses endoproteines sur les glyadines. D.E.A. physiologie végétale. Univ. de MANTES. U.F.R Sciences.
- WLKER, G.M., and DUFFUS, J.H., (1980). Magnesium ions and the control of the cycle in yeast. *J. Cell. Sci*, 42, 329-356.
- WAXDAL, M.J., (1971). Selctive cleavage of proteins *J. Agric. Food. Chem.*, 19, 632 - 637.
- WILKIE, D., and EVANS, I, (1982). *Mitochondria* and the yast cell surface. *Trebd. Biochem. Sci.*, 7, 147 - 151.
- WILKIE, D., (1983). Genetic and fonctional aspects of yeast mitochondria. In: yast gentic. Eds J.F.T. Spencer, D.M.Spencer and A.R.W. Smith. New-York: Springer-verlag. PP. 255-267.
- WINDISCH, S., (1968). Flocculation Brewing yeast. *The Brewers Digest*, 62-66.
- YAMADA, H, HIRAIWA, M., and TOSHIO, M., (1983). Caracterasation of mannoproteins from yast and mycelial forms of *Mucor rouxi*. *Carbohydrate Res.*, 119, 129-140.

- YEN, P.H. and BALLOU, C.E., (1974). Structure and immunochemistry of *Hansenula Wihgei*.
Biochem., 13, (11), 2420-2427.
- ZHANG, W.J. and BALLOU, C.E., (1981). *Saccharomyces kluyveri* cell wall mannoprotein : Structure of the O and N-linked carbohydrate of the components.
J. Biol.Chem., 256, (19), 10073-10079.
- ZIEGLER, F.D.; MALEY, F., and TRIMBLE, R.B., (1988). Characterization of the glycosylation sites in yeast extrnal invertase.
J. Biol. Chem., 263, 6986 - 6992.



NANCY 1
Université

Nom : BELLAL

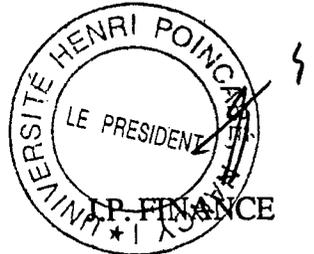
Prénom : Mohand Mouloud

DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES . NATURELLES.

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 2 DEC. 1994 - n° 369

Le Président de l'Université



R E S U M E

Une étude sur le mécanisme de floculation de six souches de levure *Kluyveromyces lactis* haploïdes, a été orientée vers la recherche et la caractérisation des polymères responsables de ce phénomène.

Après croissance sur milieu favorable, les levures élaborent des structures spécifiques stables qui leurs permettent de flocculer. Les ions Ca^{++} sont indispensables à l'expression phénotypique de la floculation et celle-ci est réversée spécifiquement par des sucres libres et liés qui ont une structure D-galactose non réductrice terminale. Le pH optimum d'agrégation se situe entre 4,5, et 5 à 25°C; cependant les pH extrêmes et les températures supérieures à 60°C provoquent une dispersion des cellules. Les ions Mg^{++} peuvent se substituer, partiellement aux ions Ca^{++} alors que les ions Sr^{++} et Ba^{++} se comportent comme de puissants inhibiteurs.

L'état de floculation et celui de non floculation se traduit par des variations quantitatives et structurales des polymères pariétaux, de nature phosphopeptidomannane (PPM), hydrosolubles.

Chez les levures flocculantes les parois contiennent une teneur plus élevée de ces polymères périphériques dont la masse moléculaire est plus importante que chez les levures non flocculantes. Ceci résulte d'une structure complexe, en particulier d'une présence d'un plus grand nombre de ramifications à trois et quatre unités mannose. L'analyse des produits d'acétolyse révèle en effet, que les PPM flocculants libèrent essentiellement des unités de mannotriose et mannotétraosephosphorylés, alors que les PPM non flocculants se caractérisent par la présence d'unités de mannobiose. Au niveau des tri et tétrasaccharides, les différences portent sur les teneurs en phosphate et en N-acétylglucosamine. Les PPM des levures non flocculantes portent davantage de résidus N-acétylglucosamine que les polymères des levures flocculantes. Cette variation semble caractéristique chez les levures *Kluyveromyces*.

L'ensemble des résultats montre que la floculation des levures *K. lactis* présente des spécificités et obéit à un mécanisme de base qui se traduit, en présence des ions Ca^{++} , par des modifications conformationnelles des structures glycoprotéiques superficielle des parois cellulaires.

Mots clés: *Kluyveromyces lactis* - floculation-phosphopeptidomannanes-parois-fractions pariétales.