

**Évaluation des mécanismes de la
toxicité d'un composé d'arôme
hydrophobe chez la levure à l'aide
de sondes fluorescentes**

Plan

INTRODUCTION

Quelques lactones

Toxicité lors de la bioproduction

Yarrowia lipolytica, levure modèle

MÉTHODES et RÉSULTATS

I. Mesure de la fluidité membranaire

La méthode

Résultats

II. Évaluation du pH intracellulaire

La méthode

Résultats

III. Évolution du potentiel membranaire

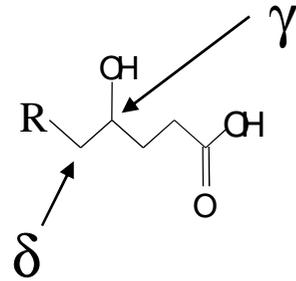
La méthode

Résultats

CONCLUSIONS

Quelques lactones présentant des propriétés aromatisantes

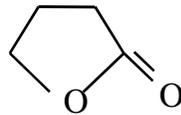
Hydroxy-acide



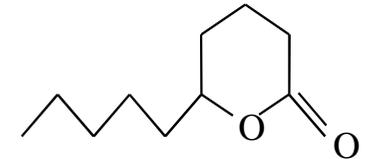
γ -dodecalactone
pêche, gras



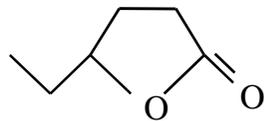
γ -butyrolactone
beurre, doux



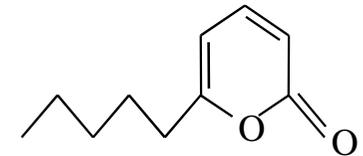
δ -decalactone
pêche, huileux



γ -hexalactone
herbe, caramel



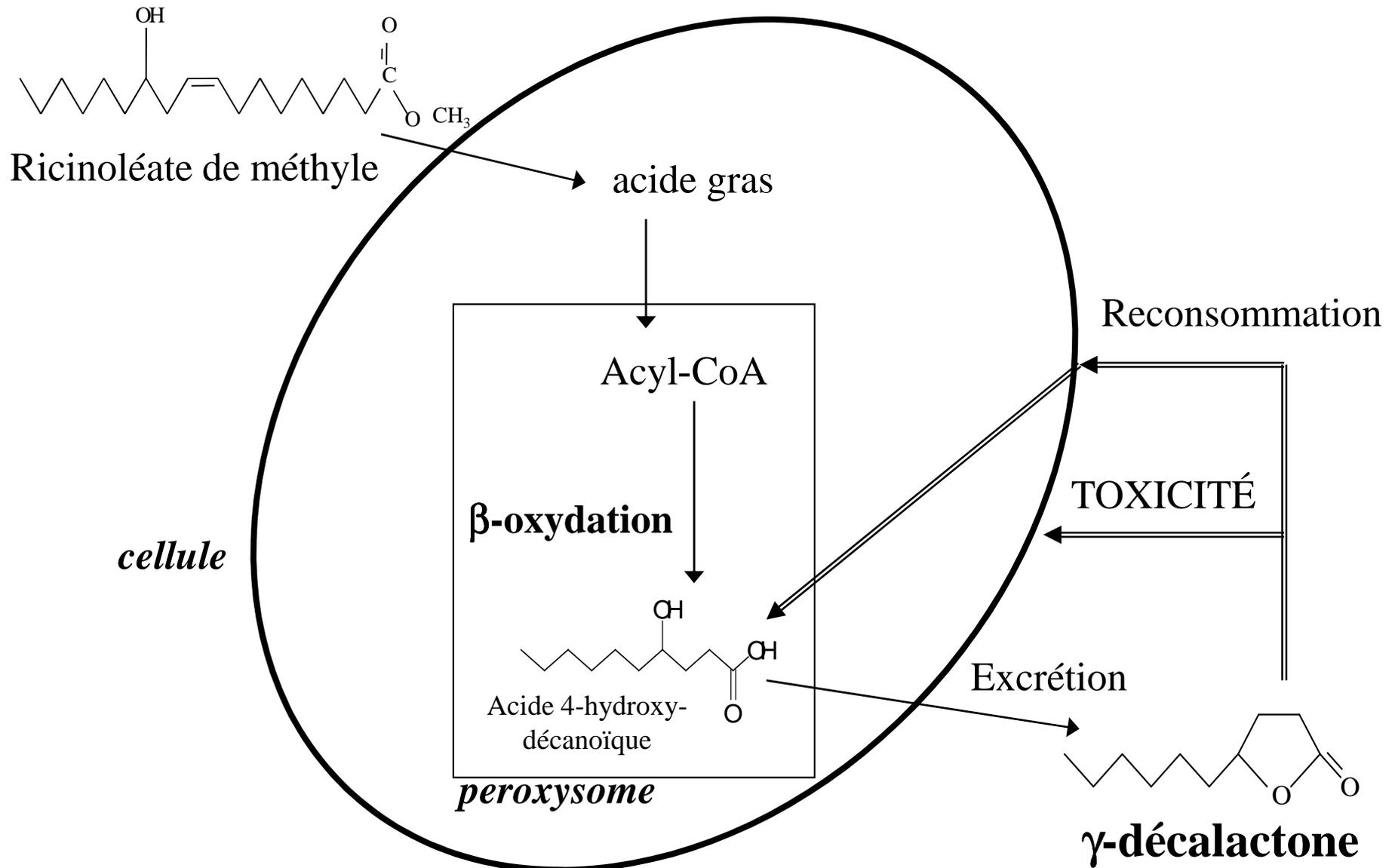
6-pentyl- α -pyrone
noix de coco, pêche



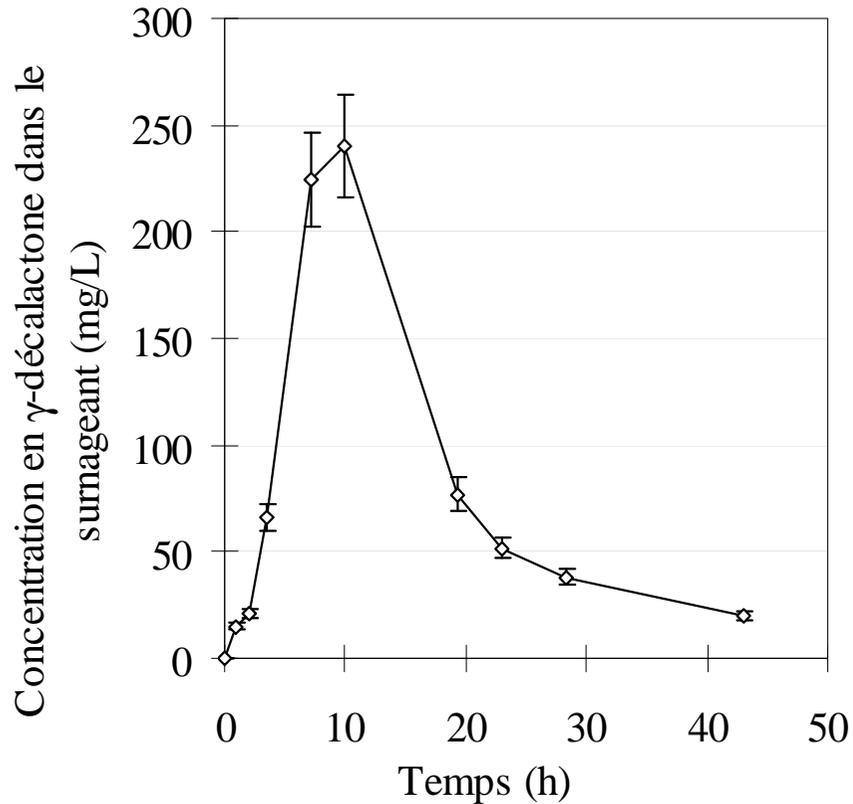
γ -decalactone
pêche, fruité



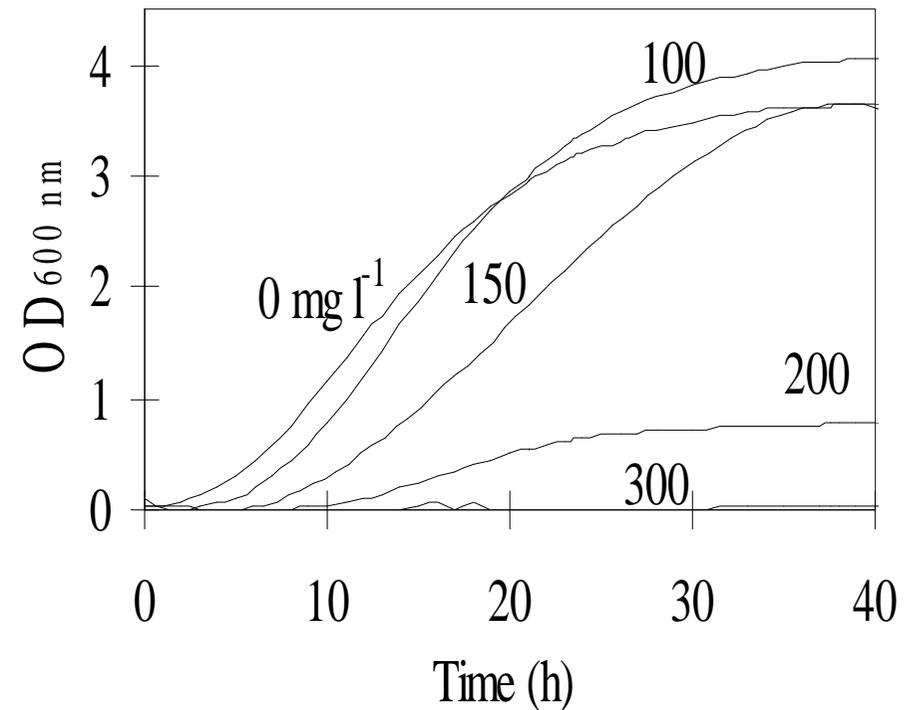
Toxicité des lactones lors de la bioproduction



Production et toxicité chez *Yarrowia lipolytica*



Production de γ -décylactone par *Yarrowia lipolytica*



Croissance de *Yarrowia lipolytica* en présence de γ -décylactone

I. Mesure de la fluidité membranaire

La méthode

Sonde: DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène)

Principe: - Faisceaux d'excitation et d'émission polarisés

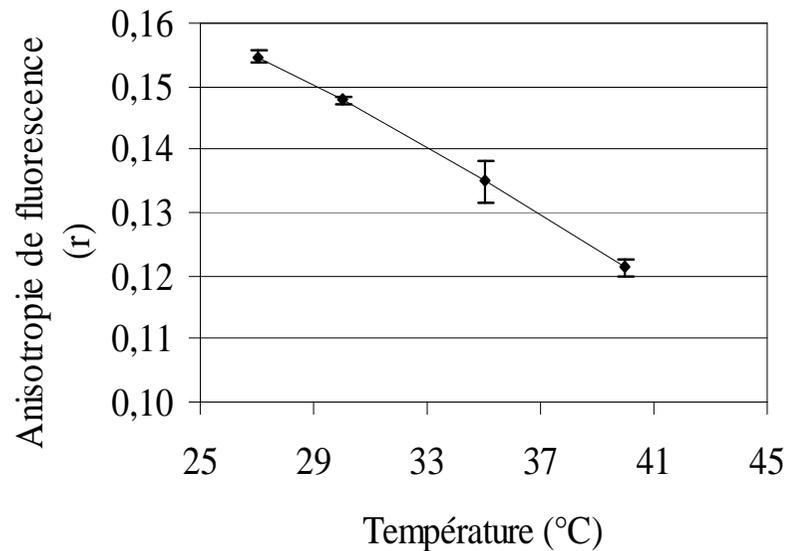
$$- \quad r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad \text{et} \quad G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

En pratique: - r calculés pour signal stabilisé

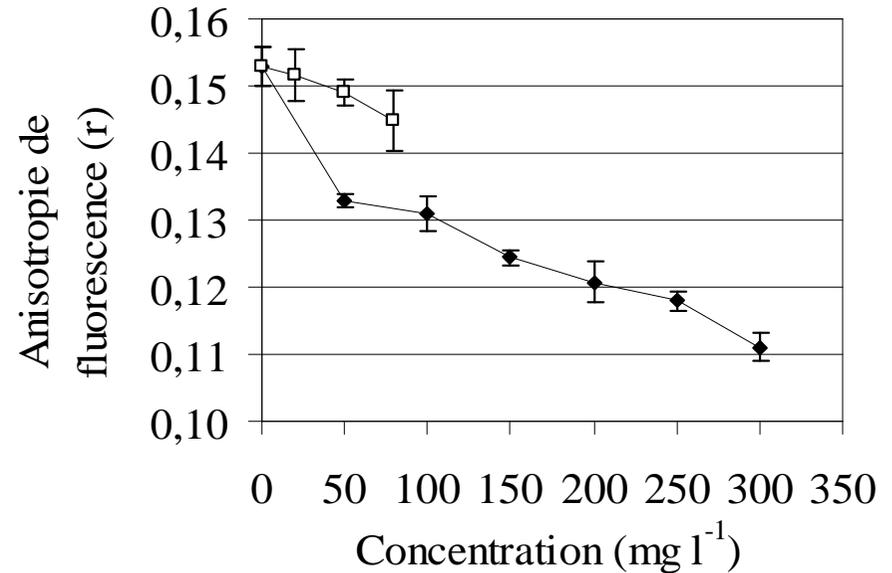
- correction du signal

I. Mesure de la fluidité membranaire

Résultats



Anisotropie de fluorescence en fonction de la température



Anisotropie de fluorescence en fonction de la concentration en lactone et en ac. octanoïque.

→ Effet fluidifiant important de la lactone

Effet peu important de l'ac. octanoïque

II. Évaluation du pH intracellulaire

La méthode

Sonde: Pyranine (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid)

Principe: - électroporation, lavages

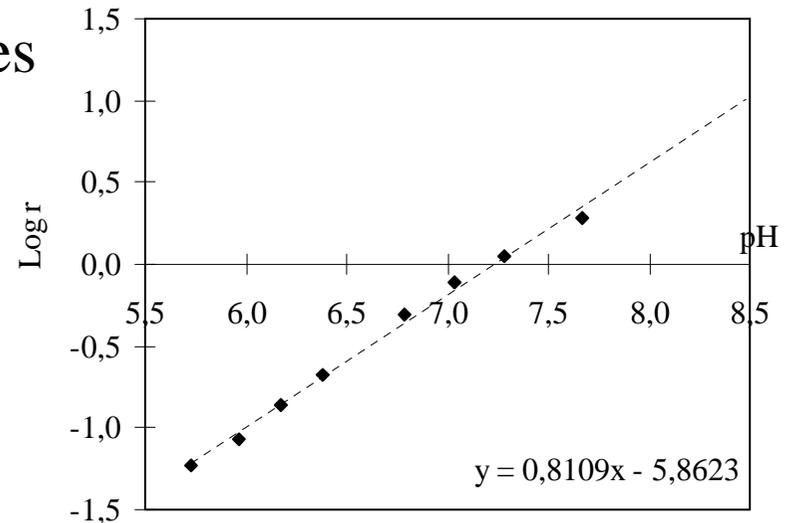
- Em. 520 nm

- Exc. 460 et 405 nm

En pratique:

- filtration, mesure du surnageant

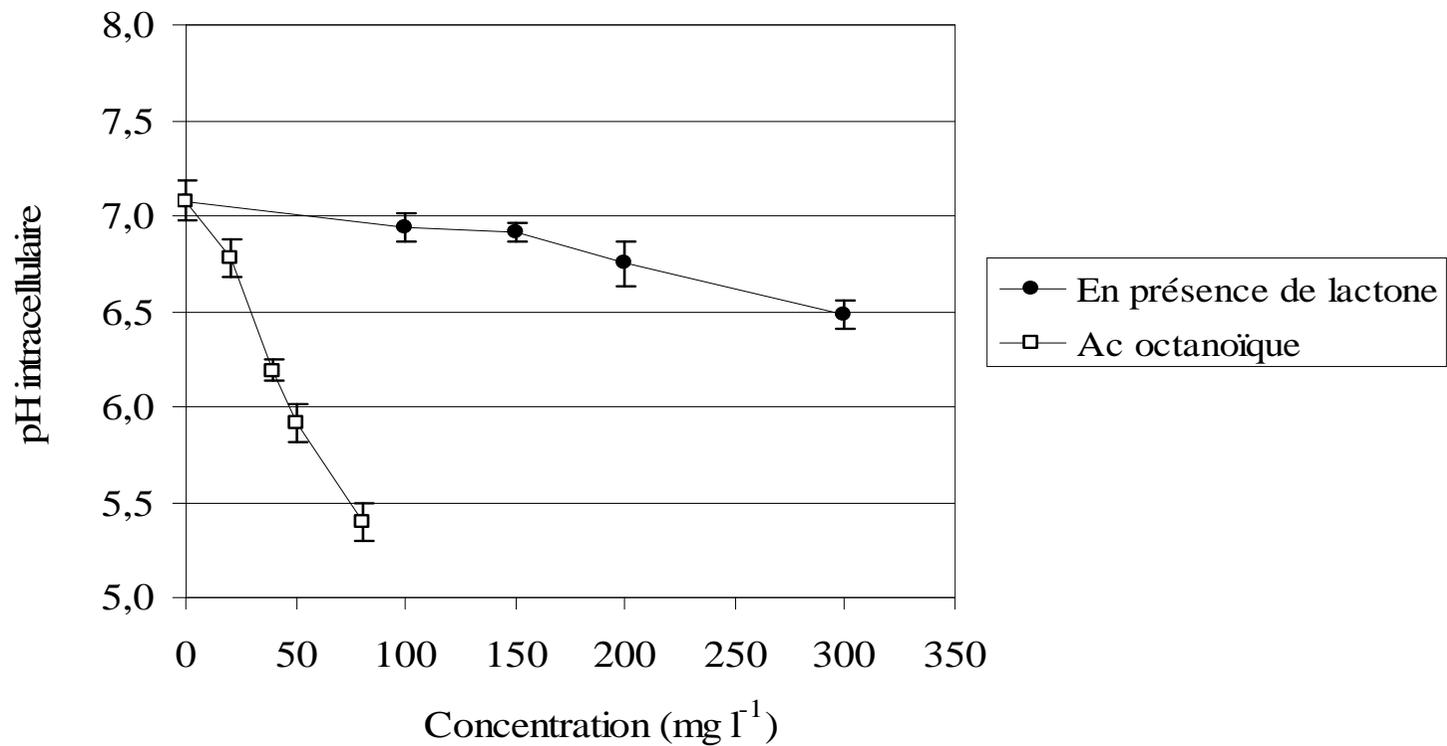
- correction du signal $r = (460_{\text{total}} - 460_{\text{filtrat}}) / (405_{\text{total}} - 405_{\text{filtrat}})$.



II. Évaluation du pH intracellulaire

Résultats

pHi déterminé en présence de lactone et d'acide octanoïque



→ La lactone acidifie légèrement le pHi comparé à l'effet de l'ac. octanoïque

III. Évolution du potentiel membranaire

La méthode

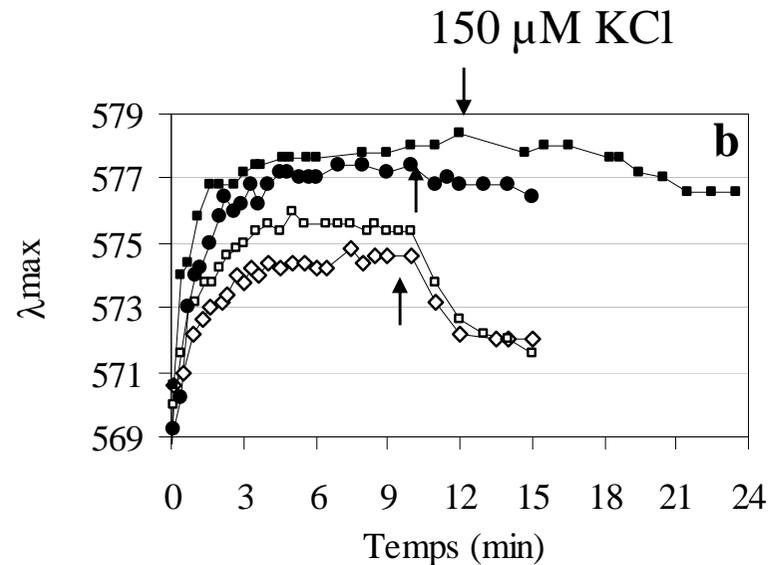
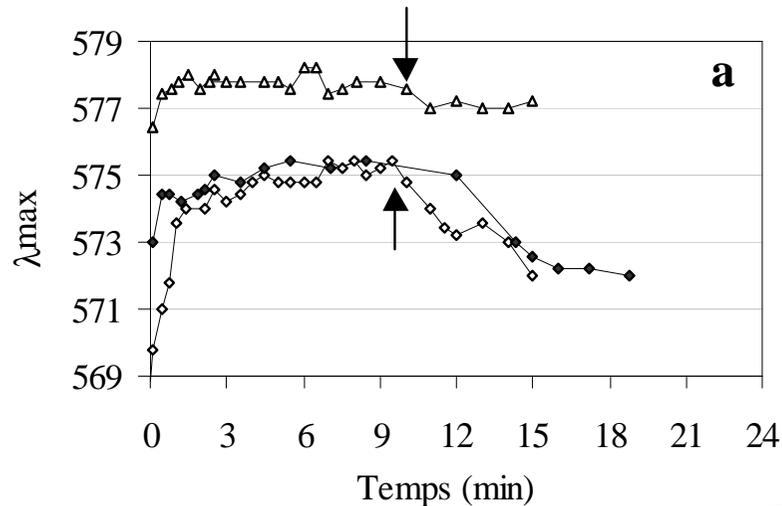
Sonde: DiS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanine)

Principe: - Entrée de la sonde dépendante du $\Delta\Psi$
- Interaction de la sonde avec les constituants cellulaires entraîne un shift du λ_{\max} Em.

En pratique: - Exc. 515 nm
- Em. scannée de 550 à 600 nm
- λ_{\max} Em. en fonction du temps

III. Évolution du potentiel membranaire

Résultats



△ levures mortes

◆ levures + ac. octanoïque 80 mg-l⁻¹

◇ levures seules

□ levures + lactone 100 mg-l⁻¹

● levures + lactone 200 mg-l⁻¹

■ levures + lactone 400 mg-l⁻¹

-
- Léger effet hyperpolarisant pour 100 mg-l⁻¹ de lactone
 - Dès 200 mg-l⁻¹, effet dépolarisant et perméabilisant
 - Pas d'effet de l'ac. octanoïque

CONCLUSIONS

| γ -décalactone | Acide octanoïque |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Agent fluidifiant membranaire• Acidification du pHi légère• Effet hyperpolarisant pour les concentrations n'inhibant pas totalement la croissance• Effet dépolarisant pour les concentrations inhibitrices | <ul style="list-style-type: none">• Acidification intracellulaire importante |



Etudes plus poussée sur l'interaction des lactones avec les membranes biologiques