

Protection de la levure Saccharomyces cerevisiae par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement

Thanh Dat Nguyen

▶ **To cite this version:**

Thanh Dat Nguyen. Protection de la levure Saccharomyces cerevisiae par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS020 . tel-01510068

HAL Id: tel-01510068
https://theses.hal.science/tel-01510068

Submitted on 19 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

AGROSUP DIJON

INSTITUT NATIONAL SUPÉRIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, DE L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT

UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques)

THESE

présentée à AgroSup Dijon

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Universtité de Bourgogne**

Spécialité : Sciences des Aliments

Option : Biotechnologie, Biochimie Microbienne, Microbiologie, Physico Chimie

Par

NGUYEN Thanh Dat

Protection de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement

Soutenance le 17/10/2016 devant la commission d'examen :

Pr. Monique ALRIC	Rapporteur, Univ. d'Auvergne
Dr. Nadia OULAHAL	Rapporteur, Univ. Lyon 1
Dr. Fernanda FONSECA	Examinateur, INRA
Dr. Stéphane GUYOT	Examinateur, AgroSup Dijon
Dr. Florence HUSSON	Directeur de Thèse, AgroSup Dijon
Pr. Rémi SAUREL	Co-directeur de Thèse, AgroSup Dijon

© NGUYEN THANH DAT, 2016

Remerciements

Ma thèse est réalisée au sein de l'Unité Mixte de Recherche en Procédés Alimentaires et Microbiolgiques. Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Patrick GERVAIS, directeur de l'UMR PAM pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche.

Je tiens à remercier Dr. NADIA et Pr. ALRIC de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement Florence HUSSON, Maître de conférences au sein de l'UMR PAM d'avoir dirigé ma thèse. Merci pour son intérêt permanent, son soutien constant, ses précieux conseils, sa sympathie et sa confiance pour que je puisse avoir une ambiance de travail sympathique et efficace et ainsi participer dans plusieurs projets de recherche.

Je souhaite remercier Rémi SAUREL, Professeur au sein de l'UMR PAM d'avoir codirigé ma thèse. Merci pour son intérêt, son aide et ses conseils scientifiques.

Je voudrais remercier Andrée VOILLEY, Professeur au sein de l'UMR PAM pour sa sympathie et son soutien.

Je tiens aussi remercier Yves WACHE, Professeur au sein de l'UMR PAM pour ses conseils scientifiques et aussi les moments sympathiques avec lui et sa famille pendant mes années de séjours en Bourgogne.

Je remercie Stéphane GUYOT, Maître de conférences au sein de l'UMR PAM pour ses conseils scientifiques et son aide apportés dans mes travaux de thèse.

Merci à Jeannine LHERMINIER, Joël MICHEL et Aline BONNETTE, Chercheurs au sein de la Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne d'avoir collaboré avec nous, pour leur accueil sympathique et surtout l'enthousiasme de Jeannine malgré que sa santé ne fût pas bonne.

Je n'oublie pas de remercier l'équipe « Soleil » se compose : Florence HUSSON, Rémi SAUREL, Stéphane GUYOT, Stéphanie PASSOT, Caroline PENICAUD et Fernanda FONSECA pour la semaine à fond jour et nuit à SOLEIL SYNCHROTRON, Paris. Ce travail a apporté le résultat de 3000 spectres intéressants d'infrarouges et RAMAN. Merci Christophe SANDT pour son aide, ses interventions pendant la nuit, ses conseils et la semaine de formation de l'utilisation du logiciel Unscrambler et la base de l'analyse des composants principaux.

AgroSup Dijon est mon lieu de travail depuis mon arrivée en France en 2010. J'ai pu rencontrer et faire la connaissance avec beaucoup de personnes dans ce bâtiment. Mes remerciement s'adressent alors à tous pour ce qu'ils m'ont aidé et m'a donné une bonne ambiance pendant mes six années : Christine, Jean-François, Brigitte, Célia, Hélène, Aurore,

Sylvie, Karine, Sébastien, Pascal, Alexandre, Cyril, Bernadette, Alexandra, Jérôme, Jean-Christophe, Antonin et encore …

Merci à mes collègues thésard et post-doc Antonio CAMARA, Sophal TRY, NGUYEN Thi Kim Chi, NGUYEN Thi Thu et Manhal YOUSSEEF pour les partages de connaissances, d'expériences et des moments sympathiques de la vie de doctorale au laboratoire.

Je remercie Jean-Luc MESSION et Hélène SCORNEC, deux collègues qui m'ont aidé lors que j'ai eu besoin pendant ma thèse. Leur esprit de recherche m'a relevé ma motivation lors des moments difficiles.

Je termine en remerciant beaucoup mes parents et mon épouse Bao Ngoc pour leur soutien sans faille. Sans eux sans moi.

Enfin, je voudrais dédier cette thèse à mon fils Daniel Anh Duy.

Résumé

Dans le but de protéger la levure *Saccharomyces cerevisiae* pendant la déshydratation, deux stratégies ont été envisagées pour améliorer la survie cellulaire. D'une part, le renforcement de la résistance à l'oxydation (protection interne) a été réalisé par l'enrichissement en glutathion intracellulaire de la levure. D'autre part, l'encapsulation par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) en utilisant deux biopolymères β-lactoglobuline et alginate a été utilisée pour la protection externe de la levure. Un milieu adéquat ainsi que des conditions favorables de culture permettant l'enrichissement en glutathion intracellulaire ont été déterminés. La composition du milieu est riche en nutriments et précurseurs du glutathion se composant de 30 g/L de glucose, 30 g/L d'extrait de levure, 0,6 g/L de KH_2PO_4 et 0,6 g/L de cystéine. Le succès de l'encapsulation a été confirmé par différentes méthodes d'analyse comme la zétamétrie, la microscopie électronique et la spectroscopie infrarouge. Le dépôt des trois couches de β-lactoglobuline/alginate/β-lactoglobuline n'a pas affecté l'intégrité membranaire et la croissance de la levure. De plus, la perméabilité membranaire n'a pas été empêchée par la présence de cette barrière biopolymérique. L'effet de l'enrichissement en glutathion et de l'encapsulation sur la résistance de la levure dans les conditions de déshydratation choisies a été mesuré par l'estimation de la survie, les modifications biochimiques et le métabolisme des cellules. Les résultats ont montré que la levure enrichie en glutathion présente une meilleure survie après la déshydratation. De plus, la survie de la levure est améliorée par l'encapsulation, en particulier pendant la déshydratation à 45 °C. L'analyse des résultats d'infrarouge a relevé un point commun dans la relation entre les propriétés biochimiques de la cellule et la survie cellulaire. Plus le groupement méthyle (CH_3) est important, plus la survie est importante. Le rôle du glutathion dans la protection de la levure a également été mis en évidence pendant la déshydratation. Il semblerait que l'action du glutathion oxydé ait été mise en place après l'intervention du glutathion réduit. De plus, la protection interne par le glutathion a permis à la levure de résister au stress chimique alors que la protection externe par encapsulation renforce la résistance contre les stress physique ou mécanique. Les résultats de la thèse pourront être utiles pour la recherche des nouvelles technologies de production et de protection des levures fragiles actives.

Mots-clés : *Saccharomyces cerevisiae*, glutathion, encapsulation, biopolymère, déshydratation, protection

Abstract

In order to protect the *Saccharomyces cerevisia*e yeast during dehydration, two strategies were used to improve cell survival. Strengthening cell resistance (internal protection) was performed by improving the concentration of intracellular glutathione in yeast. Encapsulation was performed by layer-by-layer method using two biopolymers β-lactoglobulin and alginate for the external protection of the yeast. The adequate medium culture and favorable growing conditions for glutathione enhancement were determined. The composition of the culture medium is rich in nutrients and glutathione precursors consisting in 30 g/L glucose, 30 g/L yeast extract, 0.6 g/L KH_2PO_4 and 0.6 g/L cysteine. The success of encapsulation was confirmed by different analytical methods such as zetametry, electron microscopy and infrared spectroscopy. The deposition of three layers of β-lactoglobulin/alginate/β-lactoglobulin did not affect membrane integrity and the growth of yeast. Furthermore, the membrane permeability was not affected by the presence of this biopolymer barrier. The effect of glutathione and encapsulation on the resistance of the yeast in dehydrating conditions was measured by the estimation of cell survival, biochemical modification and cellular metabolism. The results showed that the glutathione-enriched yeast present higher survival after dehydration. Moreover, the survival of the yeast was improved by the encapsulation. These observations were clearly obtained in dehydration conditions at 45 °C. Infrared analysis identified a common point in the relationship between biochemical property and cell survival. Higher survival was observed when the yeast was characterized by methyl group (CH_3). The role of glutathione in yeast protection was highlighted during dehydration. It seemed that the action of oxidized glutathione was set up after the intervention of reduced glutathione. In addition, the internal protection by glutathione allowed the yeast to resist to chemical stress while the external protection by encapsulation enhances the resistance against physical or mechanical stress. These results can be useful for the research of new technology in fragile yeast production and protection.

Keywords : *Saccharomyces cerevisiae*, glutathione, encapsulation, biopolymer, dehydration, protection

Liste des publications

PUBLICATIONS

En cours et soumises

Thanh Dat NGUYEN, Rémi SAUREL and Florence HUSSON. An overview of layer-by-layer self-assembly techniques and their applications on living cells. (à soumettre)

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane GUYOT, Caroline PÉNICAUD, Stéphanie PASSOT, Christophe SANDT, Fernanda FONSECA, Rémi SAUREL and Florence HUSSON. Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared. (en cours)

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane GUYOT, Caroline PÉNICAUD, Stéphanie PASSOT, Christophe SANDT, Fernanda FONSECA, Rémi SAUREL and Florence HUSSON. Protective effect of microorganized shells of natural polyelectrolytes on yeast cells response against dehydration using synchrotron infrared microspectroscopy at the single-cell level. (en cours)

Antonio de Anchieta CÂMARA Júnior, **Thanh Dat NGUYEN**, Audrey JOSSIER, Anne ENDRIZZI, Rémi SAUREL, Hélène SIMONIN & Florence HUSSON. Role of glutathione and trehalose on *Saccharomyces cerevisiae* yeast resistance to fluidized bed drying. (en cours)

Nicolas SOK, Maria NIKOLANTONAKI, Stephane GUYOT, **Thanh Dat NGUYEN**, Anne-Sophie VIAUX, Franck BAGALA, Yoann ROUSSELIN, Regis GOUGEON, Florence HUSSON and Rémi SAUREL. New sensitive α,β-unsaturated carbonyl naphtalimide fluorescent probes for thiol bioimaging. (soumis à Chemistry A)

Publiées

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane GUYOT, Jeannine LHERMINIER, Yves WACHE, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2015. Encapuslation of living yeast cells in micro-organized shells of natural polyelectrolytes using the layer-by-layer method. *Process Biochemistry* 50(10): 1528-1536.

Thanh Dat NGUYEN, Céline LAFRAGE, Chloé MURAT, Jean-Luc MESSION, Nathalie CAYOT & Rémi SAUREL, 2014. Partition of volatile compounds in pea globulins - maltodextrins aqueous two-phase system. *Food Chemistry* 164: 406-412.

COMMUNICATION ORALE

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane GUYOT, Jeannine LHERMINIER, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2015. Protection of yeast cells in micro-organized shells of natural polyelectrolytes during drying process. *Colloque "Encapsulation/vectorisation des molécules actives, une stratégie dynamique en agro-alimentaire et en pharmacie"*. Dijon, France.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Antonio de Anchieta CÂMARA Júnior, **Thanh Dat NGUYEN**, Hélène SIMONIN, Rémi SAUREL, Anne ENDRIZZI, Caroline PÉNICAUD, Fernanda FONSECA & Florence HUSSON, 2015. Environmentally reasoned process for functional yeast production and stabilization. *International Conference 10th ECCE - 3rd ECAB - 5th EPIC – 10/2015*. Acropolis, Nice, France.

Antonio de Anchieta CÂMARA Júnior, **Thanh Dat NGUYEN**, Hélène SIMONIN, Rémi SAUREL, Anne ENDRIZZI, Caroline PÉNICAUD, Stéphanie PASSOT, Fernanda FONSECA & Florence HUSSON, 2015. Eco-design process for functional yeast production and stabilization. *XXI Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)*. Dijon, France.

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane GUYOT, Jeannine LHERMINIER, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2015. Protection of yeast cells in micro-organized shells of natural polyelectrolytes during drying process. *International Conference Food Engineering ICEF 12*. Québec, Canada.

Thanh Dat NGUYEN, Stéphane Guyot, Jeannine LHERMINIER, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2014. Caractérisation de la levure encapsulée et l'effet de l'encapsulation sur sa viabilité. *XX Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)*. Besançon, France.

Thanh Dat NGUYEN, Yves WACHE, Jeannine LHERMINIER, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2013. Coating of single living cells in micro-organized polyelectrolyte shells using layer-by-layer method. *XXI International Conference on Bioencapsulation.* Berlin, Germany.

Thanh Dat NGUYEN, Yves WACHE, Jeannine LHERMINIER, Rémi SAUREL & Florence HUSSON, 2013. Coating of single living cells in micro-organized polyelectrolyte shells using layer-by-layer method. *XIX Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)*. Dijon, France.

Liste des figures (hors articles)

Figure 1. Hiérarchie taxonomique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* 4

Figure 2. Population de levure *Saccharomyces cerevisiae* observée au microscope optique (A) et morphologie d'une cellule observée au microscope électronique à balayage (B) 5

Figure 3. Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae* (Michael Breitenbach et al., 2004).....6

Figure 4. (A) Reproduction végétative de la levure *Saccharomyces cerevisiae.* (B) Schéma de l'ajustement de la taille cellulaire en fonction de conditions extérieures : (1) cycle de division et (2) autres métabolismes déterminant le taux de croissance cellulaire dépendent de conditions extérieures (nutrition), (3) le taux de croissance module la progression du cycle cellulaire, et (4) mécanisme spécifique de contrôle de taille. (C) Durée d'un cycle cellulaire en fonction des milieux riche ou pauvre en nutriment (Rupeš et al., 2002).....7

Figure 5. Schéma général des étapes des procédés industrielles et les stress impliqués.....11

Figure 6. Génération des dérivés réactifs de l'oxygène dans la chaine de respiration cellulaire. Les réactifs intermédiaires (rouges), les enzymes antioxydantes sont en vert et les gènes impliqués (bleu) (Temple et al., 2005).....12

Figure 7. Détection de dérivés réactifs de l'oxygène chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur trois souches D170, D301 et T73 après déshydratation par fluorescence en utilisant le 2,7-dichlorofluorescéine diacétate (CDFH-DA) (Gamero-Sandemetrio et al., 2014) 13

Figure 8. Effet de différentes concentrations en éthanol sur la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. (A) courbe de croissance et (B) courbe du taux de croissance (Li et al., 2012).....14

Figure 9. Évolution du volume de la levure *Saccharomyces cerevisiae* soumise à une augmentation progressive de pression osmotique extérieure. (a) en fonction de l'état physiologique (carré): 16 heures de la phase exponentielle, (rond): 48 heures de la phase stationnaire. (b) en fonction de la taille cellulaire dans la phase stationnaire (carré) : petites cellules, (rond) : grandes cellule (de Iñigo Martinez et al., 1996). 15

Figure 10. (A) Cinétique du cycle déshydratation/réhydratation appliqué sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la plage d'aw entre 0.3 et 1 dans deux environnements : liquide (cycle rapide dit choc (shock): ligne pointillée foncée & cycle progressif dit rampe (slope) : diamant noir) et gazeux (cycle choc : ligne pointillée claire & cycle rampe : carré gris). (B) Impact des différentes cinétiques du cycle déshydratation/réhydratation sur la viabilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans deux environnements liquide (barres gris foncé) et gazeux (barres gris clair) (Lemetais et al., 2012).....17

Figure 11. Biosynthèse du glutathion et interactions avec les autres voies métaboliques (Anand K. Bachhawat 2009). 19

Figure 12. Rôle d'antioxydant du couple GSH et GSSG dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. G6DPH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GRX : glutarédoxine, ROOH : peroxydes, ROH : peroxydes réduits, S-S : ponts disulfures (d'après Li et al.(2004) (Li et al., 2004)). 20

Figure 13. Hypothèse de la fonction du glutathion pendant le cycle déshydratation/réhydratation. 21

Figure 14. Méthodologie générale de la démarche opératoire 44

Figure 15. Protocole d'encapsulation par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) 49

Figure 16. Courbe de la corrélation entre la densité optique (600 nm) avec la concentration cellulaire (nombre de cellules par mL) 54

Figure 17. Courbe de la corrélation entre l'absorbance à 420 nm avec la concentration de glutathion standard 55

Figure 18. Courbe d'étalon de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoique (TNB) 57

Figure 19. Biomasse sèche produite dans les conditions de culture testées : YPD, GSH1, GSH2 et GSH3. P+ et P- indique avec ou sans l'addition supplémentaire des acides aminés. T+ et T- indique avec ou sans l'ajustement de température. La biomasse a été récoltée après 48 heures d'incubation avec une vitesse d'agitation de 140 rpm (Lab Shaker, Adolf Kühner AG Schweiz, avec l'ambitude d'orbital de 27 mm). 71

Figure 20. Pourcentage de glutathion total obtenu pour 1 g de biomasse sèche de levure dans les conditions de culture testées. YPD, GSH1, GSH2 et GSH3 sont quatre milieux différents. P+ et P- indique avec ou sans l'addition supplémentaire des acides aminées. T+ et T- indique avec ou sans l'ajustement de température. La concentration en glutathion a été mesurée après 48 heures d'incubation avec une vitesse d'agitation de 140 rpm (Lab Shaker, Adolf Kühner AG Schweiz, avec l'ambitude d'orbital de 27 mm). 72

Figure 21. Concentration du glutathion intracellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps. 73

Figure 22. Concentration en glutathion de quatre souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans le milieu G+. nd : non détecté 75

Figure 23. Survie de deux souches sauvages CBS8066 et BY4742 après déshydratation (0,23 aw à 25 °C, réhydratation rapide) représentée par le log10 (N/N_0), où N_0 et N sont les nombres de colonies de levures obtenues avant et après déshydratation. 76

Figure 24. Survie des trois souches BY4742, ΔGSH1 et ΔGSH2 après déshydratation (0,23 aw à 25 °C, réhydratation rapide) est représentée par le $\log_{10}$ (N/N_0), où N_0 et N sont les nombres de colonies des levures obtenues avant et après déshydratation. 77

Figure 25. Concentration du glutathion total (barres pleines) et le taux du glutathion réduit/total (barres creuses) de la levure cultivée en deux milieux G- (barres vertes) et G+ (barres rouges). G- et G+ indiquent les levures avant déshydratation. G-25 et G+25 indiquent les levures déshydratées à 25 °C. G-45 et G+45 indiquent les levures déshydratées à 45 °C. L'humidité relative a été maintenue à 23 % pendant la déshydratation.....99

Figure 26. Activité de l'enzyme glutathion réductase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans les deux milieux G- et G+ dans les conditions de déshydratation à deux températures 25 °C et 45 °C.....100

Figure 27. Concentration en glutathion de la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée en milieu G- (A) et G+ (B). G+ et G+45 correspondent aux cellules non-encapsulées. G+EN et G+EN45 correspondent aux cellules encapsulées. Les abréviations sont similaires pour le milieu G-. 122

Liste des tableaux (hors articles)

Tableau 1. Viabilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la pression osmotique (Beney et al., 2001) 16

Tableau 2. Méthodes d'optimisation de la production du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisae* 23

Tableau 3. Composition des milieux sélectionnés d'après la littérature qui favorisent la production du glutathion chez la levure. 46

Tableau 4. Concentrations et temps d'addition des précurseurs au cours de la fermentation. 47

Tableau 5. Plan d'expériences pour la sélection des conditions favorables à l'enrichissement du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. YPD, GSH1, GSH2 et GSH3 sont quatre milieux de culture cellulaire. P- et P+ indiquent sans ou avec l'addition des précurseurs supplémentaires. T- et T+ indiquent sans ou avec la modulation de température 47

Tableau 6. Sels utilisés pour le contrôle de l'humidité relative de séchage 52

Tableau 7. Survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 dans différentes conditions de déshydratation/réhydratation. Le gradient de couleurs signifie l'effet des conditions sur la survie. Plus la couleur est verte, plus la survie est importante. Plus la couleur est rouge, plus la survie est faible. 77

Tableau 8. Récapitulatif de la survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* après déshydratation à 23 % d'humidité relative et à 45 °C en fonction des niveaux de protection 127

Abréviations

Symboles

a_w : activité de l'eau

T : température

ζ : potentiel zéta

Acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique

Alg : alginate

asym : asymetric

Blg : β-lactoglobuline

CFU : Colony Forming Unit

CTA : catalase

DO : densité optique

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

EtOH : éthanol

FTIR : Fourier Transform InfraRed

G- : condition non-enrichie en glutathion

G+ : condition enrichie en glutathion

G+2325 : levure du milieu G+ déshydratée à 23 % d'humidité relative et à 25 °C

G+EN : levure cultivée dans le milieu G+ encapsulée

GPX : glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

IFTR : infrarouge à transformée de Fourier

IFTR-S : infrarouge à transformée de Fourier avec la source de Synchrotron

LbL : layer-by-layer

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique en transmission

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PAA : poly(acrylic acid)

PAH : poly(allylaminehydrochloride)

PAM : procédés alimentaires et microbiologiques

PAPC : procédés alimentaires et physico-chimie

PCA : principal component analysis

PDDA : poly(diallyldimethylammonium chloride)

PE : polyelectrolyte

PGA : poly(glutamic acid)

PLL : poly(lysine)

PMAA-co-NH_2 : Poly(methacrylic acid) containing amino

PMB : procédés microbiologiques et biotechnologiques

PSS : poly(styrenesulfonate sodium)

PVPON : poly(N-vinylpyrrolidone)

RH : relative humidity

SOD : superoxyde dimutase

sym : symmetric

TNB : 2-nitro-5-thiobenzoate

TRX : thiorédoxine

UV : ultraviolet

Table des matières

AVANT-PROPOS 1
CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 4
1. *Saccharomyces cerevisiae* 4
1.1. Principales caractéristiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae* 4
1.1.1. Morphologie et métabolisme de la levure 4
1.1.2. Reproduction de la levure 5
1.1.2.1. Phases de croissance cellulaire 5
1.1.2.2. Cycle de vie 5
1.1.3. Origine des différentes souches différentes de la levure 7
1.1.4. Conditions de culture 7
1.2. Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* 8
1.2.1. Fabrication de pâtes levées et de pain. 8
1.2.2. Fabrication de boissons alcoolisées 9
1.2.3. Production de probiotiques 10
1.2.4. Fabrication d'éthanol-carburant. 10
1.3. Impact des différents stress des procédés industriels sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* 11
1.3.1. Oxydation 11
1.3.2. Éthanol 13
1.3.3. Stress osmotique 15
1.3.4. Température 17
1.4. Défenses de la levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis processus de déshydratation 18
1.4.1. Glutathion 19
1.4.1.1. Rôle du glutathion 19
1.4.1.2. Enrichissement des levures en glutathion 21
1.4.2. Enzymes antioxydantes 24
1.4.3. Tréhalose 24
2. Encapsulation (article de review) 27
3. Contexte, objectifs et stratégies 43
CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 45
1. Souche de levure et conditions de culture 45

1.1. Souches de levure 45
1.2. Conditions de culture 45
1.3. Sélection du milieu favorable pour l'enrichissement en glutathion 46
2. Encapsulation des levures par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) 48
2.1. Préparation des biopolymères 48
2.2. Protocole de micro-encapsulation par la méthode layer-by-layer 48
3. Caractérisation de l'encapsulation 49
3.1. Mesure de potentiel zéta 49
3.2. Observations Microscopiques 50
Microscopie électronique à transmission (MET) 50
Microscopie électronique en transmission couplée avec l'immunomarquage 50
Microscopie électronique à balayage 51
3.3. Caractérisation des interactions du système levure/biopolymères par ATR-FTIR 51
4. Conditions de stress testées 51
4.1. Oxydation 51
4.2. Ethanol 52
4.3. Congélation 52
4.4. Protocole de déshydratation 52
Séchage en mode « statique » 52
Séchage en mode « dynamique » 53
5. Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité 53
5.1. Suivie de croissance des levures 53
5.2. Méthode d'estimation de la survie cellulaire 54
5.3. Dosage du glutathion réduit et total 55
5.4. Dosage des activités enzymatiques du glutathion réductase 56
5.5. Estimation de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux 57
5.6. Caractérisation de la modification de la structure cellulaire par IRTF (source synchrotron) 58
CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 59
1. Encapsulation de la levure par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) et influence de son effet protecteur sur la réponse cellulaire à différents stress (article 1) 60
2. Détermination des conditions d'enrichissement en glutathion chez la levure 70
2.1. Effet des conditions de culture sur la biomasse et l'enrichissement en glutathion 70
2.2. Évaluation de la concentration du glutathion pendant la croissance de la levure 73

3. Sélection d'une souche fragile et des conditions de déshydratation 75
3.1. Sélection de la souche fragile 75
3.2. Conditions de déshydratation/réhydratation 77
4. Effet de l'enrichissement en glutathion sur la résistance de la levure dans les conditions de déshydratation retenues (article 2) 79
5. Effet de l'encapsulation sur la résistance de la levure à la déshydratation (article 3) 102
Résultats complémentaires 122
CHAPITRE 4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 124
1. Conclusion générale 124
2. Perspectives 128
LISTE COMPLÈTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 130

AVANT-PROPOS

Les formidables potentialités des levures apportent aujourd'hui réponse à de grands enjeux en matière de nutrition de santé, d'environnement et d'énergie. Les levures sont actrices principales dans la panification, la vinification, la brasserie… Elles jouent également un rôle important dans l'univers du goût et du plaisir alimentaire. L'importance des levures est soulignée dans plusieurs domaines alimentaires et pharmaceutiques. Divers produits à base de levures sont commercialisés dans le monde entier. Pourtant, les chercheurs au sein des équipes de recherche fondamentale et également des pôles de recherche et développement en entreprises sont toujours intéressés par la façon d'augmenter encore leur viabilité et leur fonctionnalité au cours de la production de biomasse levurienne ou de produits fermentés. Il s'agit de trouver des nouvelles souches résistantes aux stress et des techniques innovantes pour conserver leurs fonctionnalités. Cela dépend bien entendu de plusieurs facteurs tels que la souche elle-même, le type de stress ou le type de procédés et aussi l'application, etc. Ceci nous encourage donc à vouloir mieux comprendre les mécanismes de la réponse des levures aux différents stress, l'objectif final étant de satisfaire le besoin des consommateurs exigeants, au niveau de la qualité du produit final.

Parmi les nombreuses espèces de levures dans la nature, *Saccharomyces cerevisiae*, appelée levure de boulangerie, est un organisme eucaryote modèle pour l'étude des mécanismes biologiques fondamentaux et elle est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour la production d'éthanol, la production des levures sèches actives et des produits fermentés (le pain, le vin, la bière …). Cette levure joue un rôle clé notamment en ce qui concerne la stabilité oxydative des produits fermentés ou des milieux modèles. Pourtant, elle peut être soumise à de nombreux stress au cours des procédés de fabrication (O_2, éthanol, température, pH, stress osmotique, UV) qui peuvent entraîner la mortalité et/ou entraîner les modifications du métabolisme conduisant à des produits de qualité organoleptique non satisfaisante.

Depuis plusieurs années, l'Unité Mixte de Recherche Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM – AgroSup Dijon) étudie la réponse physique et biologique des cellules soumises à différentes perturbations de leur environnement (hydratation, température, pression, oxydation). Cette réponse est étudiée plus largement sur différents types de cellules (levures, champignons filamenteux, bactéries, spores bactériennes, cellules végétales, liposomes, …) au niveau cellulaire et moléculaire.

Ce travail de thèse s'effectue au sein de l'UMR PAM en respectant la cohérence de la thématique de recherche. De plus, ces travaux font partie intégrante du projet Cell ExtraDry (Institut Carnot Qualiment) qui a pour le but de produire des levures sèches actives enrichies en

molécules antioxydantes pendant la fermentation. L'objectif global de cette thèse est de construire un système protégeant la levure des stress environnementaux et de comprendre les mécanismes de cette protection ainsi que la réponse cellulaire. Pour cela, un système de micro-encapsulation de la levure par la méthode layer-by-layer en utilisant deux biopolymères (β-lactoglobuline et alginate) a été réalisé. Et d'autre part, les conditions de milieu de culture permettant d'enrichir les levures en glutathion, une molécule antioxydante intracellulaire, ont été étudiées.

La première étape a été consacrée à mettre au point les protocoles de micro-encapsulation et d'enrichissement en glutathion. La souche sauvage du laboratoire *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 a été utilisée au cours de cette étape.

Concernant la micro-encapsulation, les paramètres les plus importants tels que la concentration des biopolymères, le pH, la température, le temps d'agitation, le lavage, la stabilisation des couches, la taille des cellules encapsulées,… ont été étudiés par zétamétrie, granulométrie, microscopie… Une grande partie des travaux de microcopie électronique a été effectué à la plateforme DImaCell, Centre de Microscopie, INRA. L'objectif a été de mettre en évidence la présence des couches biopolymériques autours des levures encapsulées. La microscopie électronique à balayage (MEB), et la microscopie électronique à transmission (MET) couplée avec l'immunomarquage ont été effectuées afin d'observer la morphologie cellulaire, la surface des levures encapsulées et identifier la protéine β-lactoglobuline. Puis, le système levure/biopolymères a été caractérisé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IFTR) afin d'identifier quelles sont les interactions principales entre les biopolymères eux-mêmes et entre les biopolymères et la paroi cellulaire. Enfin, plusieurs stress (oxydation, éthanol, thermique) ont été appliqués sur la levure encapsulée afin de tester la protection des levures par les couches biopolymériques.

Concernant l'enrichissement en glutathion, une liste des milieux et des conditions favorables a été élaborée. Un plan d'expérience a été réalisé pour sélectionner la meilleure condition de culture permettant l'enrichissement en glutathion, une biomasse suffisante ainsi qu'un protocole expérimental simple.

Pour étudier la protection des levures, la déshydratation a été sélectionnée puisqu'elle peut engendrer l'ensemble des stress inhérents aux procédés de conservation des cellules vivantes: le stress mécanique, thermique et oxydatif. De plus, d'autres souches de levures, plus fragiles ont été étudiées pour comparer leurs réponses métaboliques et mieux comprendre l'effet de la protection. Différentes techniques ont été utilisées afin d'estimer cette protection (cultivabilité, dosage d'activité enzymatique, intégrité membranaire) et afin de caractériser les

modifications biochimiques des cellules pendant la déshydratation. En outre, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec la source synchrotron a été utilisée pour étudier le changement biochimique des levures à l'échelle de la cellule unique au cours de la déshydratation.

Le premier chapitre de ce mémoire, correspondant à l'analyse bibliographique, présente la levure *Saccharomyces cerevisiae* et ses réponses aux perturbations environnementales ainsi que le cheminement conduisant à la protection des cellules. Le second chapitre de ce document rassemble les matériels et les méthodes utilisés au cours de ce travail de recherche. Le troisième chapitre expose et discute les résultats obtenus (sous forme d'articles scientifiques parus ou en cours de soumission et les résultats complémentaires). Enfin, la conclusion générale reprend les principaux points développés et propose des perspectives.

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Saccharomyces cerevisiae*

Depuis des années, *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme un organisme clé pour l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires à la base des fonctions fondamentales de toutes les cellules eucaryotes (Knop et al., 2011). A ce jour, cette levure est considérée comme cellule modèle en microbiologie et reconnue comme la « levure de boulanger » indispensable en panification. La Figure 1 représente la classification de cette espèce de levure.

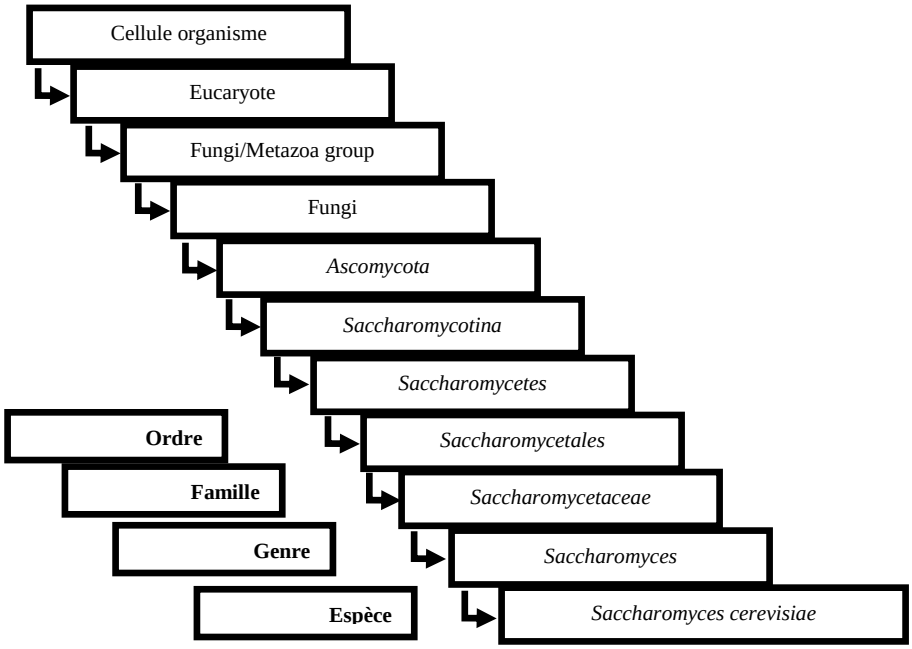


Figure 1. Hiérarchie taxonomique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

1.1. Principales caractéristiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1. Morphologie et métabolisme de la levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est reconnue par sa forme ovoïde à arrondie (phase stationnaire). La taille de la levure peut être variable de 1 à 10 µm en fonction de la composition nutritive de son milieu. La figure 2 représente la morphologie de *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope.

Saccharomyces cerevisiae est capable de suivre deux voies métaboliques : la voie aérobie et la voie anaérobie. Cela lui permet de vivre dans des environnements divers. Pour la voie aérobie, la levure se sert de la respiration aérobie pour métaboliser les glucides en dioxyde de carbone et en eau. Pour la voie anaérobie, elle fermente les glucides et produit de l'éthanol et du CO_2.

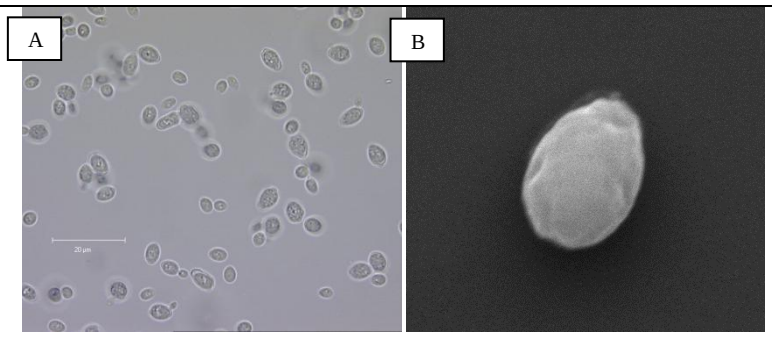


Figure 2. Population de levure *Saccharomyces cerevisiae* observée au microscope optique (A) et morphologie d'une cellule observée au microscope électronique à balayage (B)

1.1.2. Reproduction de la levure

1.1.2.1. Phases de croissance cellulaire

La croissance de la levure se présente principalement en quatre phases : phase latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin. Elle peut être encore distinguée plus précisément en rajoutant deux phases : phase d'accélération et phase de ralentissement. Cette terminologie est souvent utilisée pour décrire la courbe de croissance dans un milieu liquide, mais la croissance des cellules dans un milieu solide présente de phases similaires.

Les deux phases les plus importantes de la courbe de croissance pour les études fondamentales ou les applications industrielles sont la phase exponentielle et la phase stationnaire. Dans la phase exponentielle, les cellules se divisent rapidement et la vitesse de division et le taux de croissance dépendent de la qualité nutritionnelle du milieu. Lorsque les éléments nutritifs essentiels deviennent limités, la croissance cellulaire ralentit ou même s'arrête. Lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire, la levure contient une quantité plus élevée de tréhalose et de glycogène que dans les autres phases (Michael Breitenbach et al., 2004). Les cellules de la phase stationnaire sont capables de résister à un large nombre de stress (Werner-Washburneet al., 1993).

1.1.2.2. Cycle de vie

La levure *Saccharomyces cerevisiae* existe sous deux formes diploïde ou haploïde qui peuvent suivre deux types de divisions cellulaires : la reproduction végétative et la reproduction sexuée. La ploïdie est la répétition de chromosome. Les cellules sont haploïdes lorsque les chromosomes qu'elles contiennent sont chacun en un seul exemplaire (n chromosomes). Au contraire, les cellules avec des chromosomes en double exemplaire (2n chromosomes) sont diploïdes. La reproduction cellulaire est différente en fonction du génotype de la construction cellulaire.

La figure 3 représente un cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae.* Les haploïdes (MAT a ou α) émettent des phéromones (facteur a ou α) qui sont détectées par les cellules de type sexuel opposé grâce à des récepteurs spécifiques. La fusion cellulaire et nucléaire des deux cellules haploïdes aboutit à la formation d'une cellule diploïde qui se multiplie ensuite par bourgeonnement (reproduction végétative) ou forme des spores.

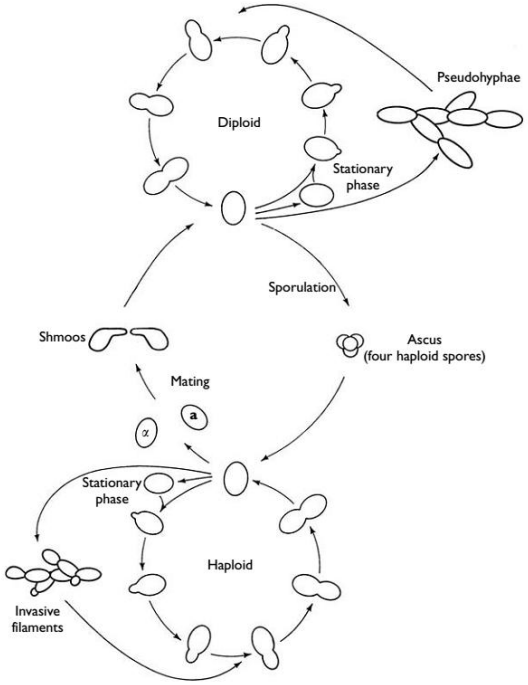


Figure 3. Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae* (Michael Breitenbach et al., 2004)

Les cellules diploïdes (MAT a et α) se multiplient seulement en mode végétatif et produisent des nouveaux diploïdes. Une nouvelle cellule est formée par la division depuis sa cellule « mère ». Lors du bourgeonnement, la cellule « mère » forme un bourgeon à sa surface. Pendant que le bourgeon grossit, le noyau de la cellule mère se divise (mitose). Une paroi cellulaire commence à se former entre la cellule mère et le bourgeon. Lors que la taille de la nouvelle cellule acquiert 2/3 de celle de sa mère, elles se séparent et deviennent deux cellules individuelles (Rupeš et al., 2002; Michael Breitenbach et al., 2004). Le cycle de la division cellulaire est représenté dans la figure 4.

La sporulation est observée chez les diploïdes (méiose) (Michael Breitenbach et al., 2004; Knop et al., 2011; Ibáñez et al., 2014). Quatre cellules haploïdes sont nées après cette étape. Lorsque les nutriments du milieu sont limités (condition de sporulation), les diploïdes forment les spores et produisent des haploïdes qui possèdent des gènes différents par rapport à leurs cellules mères (Michael Breitenbach et al., 2004). Des auteurs ont reporté l'avantage de l'adaptation des

cellules diploïdes comparées à celles haploïdes (Kondrashov and Crow, 1991; Thompson et al., 2006)

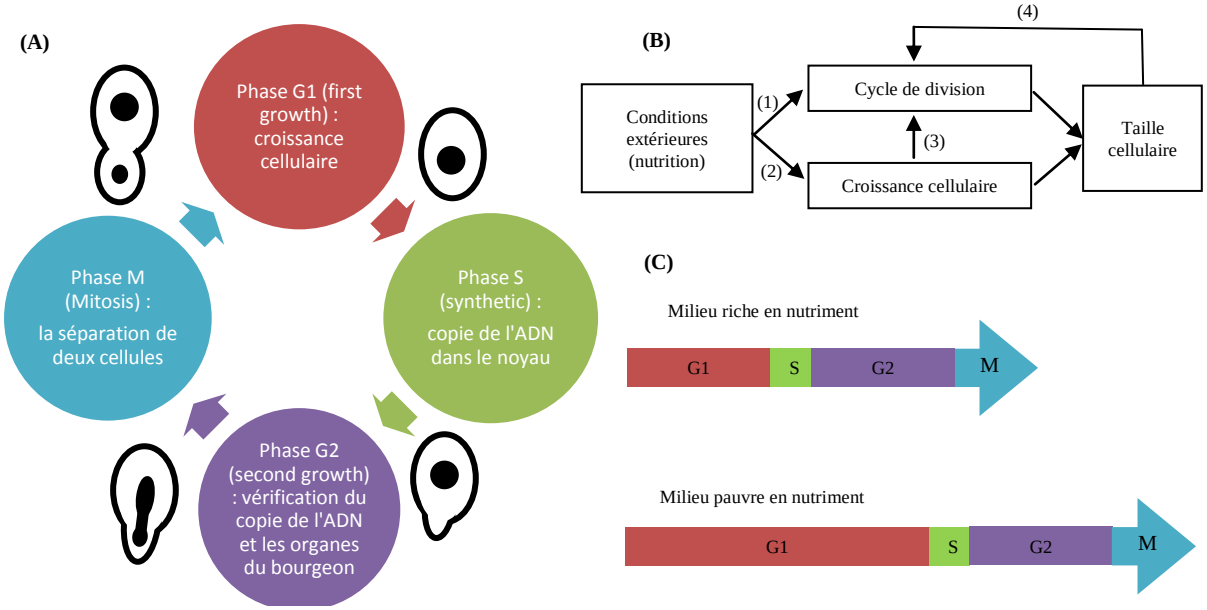


Figure 4. (A) Reproduction végétative de la levure *Saccharomyces cerevisiae.* (B) Schéma de l'ajustement de la taille cellulaire en fonction de conditions extérieures : (1) cycle de division et (2) autres métabolismes déterminant le taux de croissance cellulaire dépendent de conditions extérieures (nutrition), (3) le taux de croissance module la progression du cycle cellulaire, et (4) mécanisme spécifique de contrôle de taille. (C) Durée d'un cycle cellulaire en fonction des milieux riche ou pauvre en nutriment (Rupeš et al., 2002).

1.1.3. Origine des différentes souches différentes de la levure

Les souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être isolées depuis plusieurs origines, telles que le sol, les fruits (raisins), la sève des arbres, etc., et présentent des propriétés physiologiques différentes (Barbara Dunn et al., 2012). Cette diversité indique leur capacité d'adaptation dans les conditions différentes de l'environnement. Ces différences sont basées sur une large variation génétique qui est corrélée avec l'origine géographique et les sources d'isolement (Jespersen et al., 2003; Fay and Benavides, 2005; Aa, Townsend et al., 2006).

1.1.4. Conditions de culture

Saccharomyces cerevisiae peut être cultivée dans un milieu liquide ou solide. L'énergie et les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et la prolifération de la levure doivent être assurés. La compréhension des conditions de culture permet de produire des levures qui présentent des caractéristiques intéressantes. Deux types de milieu peuvent être utilisés pour cultiver la levure : un milieu riche sélectif et un milieu synthétique.

Pour les milieux riches sélectifs, par exemple YPD, ceux-ci contiennent tous les nutriments essentiels pour le développement cellulaire. L'extrait de levure et peptone sont les sources d'azote principales. Ils contiennent également le phosphate, le sulfate, le sodium, le magnésium, le calcium, le cuivre, le fer, des acides aminées, des nucléotides, etc. De plus, ils contiennent des autres composés que toutes les souches de *Saccharomyces* sont incapables de synthétiser. Le sucre ou d'autres sources d'énergie doivent être ajoutés comme le glucose, le saccharose, l'acide lactique, etc., en fonction du génotype de la souche et la capacité de consommation des levures. Le glucose est la source de carbone la plus répandue. Dans ce type de milieu, les cellules se divisent rapidement avec un temps de division d'environ 90 minutes et les colonies sont facilement observées après environ deux jours d'incubation.

Le milieu synthétique fourni les éléments nutritifs essentiels comme le milieu riche sélectif, mais il manque les acides aminés, les nucléotides et d'autres précurseurs. Ainsi, une souche doit être capable de synthétiser ces éléments afin de croître et se diviser dans le milieu synthétique. La croissance cellulaire est significativement plus lente avec un temps de division d'environ quatre heures. Les souches sauvages sont souvent capables de croître dans un milieu minimal synthétique qui contient une source de carbone et des sels minéraux. Par contre, les souches mutées sont incapables de synthétiser un élément essentiel. Si une souche est incapable de synthétiser un élément particulier alors les éléments nutritifs devront être ajoutés aux milieux pour sa croissance. Si une souche est incapable d'utiliser un élément nutritif particulier, le milieu doit contenir un autre élément de même source.

1.2. Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Depuis l'Antiquité, les Babyloniens, les Égyptiens et Celtes ont utilisé la levure pour la préparation de boissons alcoolisées. Vers 370 ans avant J.-C, Hippocrate, le célèbre médecin grec, a découvert l'action diurétique de la levure de bière et l'a conseillé comme remède. Au Moyen-Âge, les moines qui soignaient les lépreux absorbaient de la levure afin de ne pas être contaminés à leur tour. De nos jours, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour la fabrication des boissons alcoolisées, du pain, des produits de santé et du bio-carburant.

1.2.1. Fabrication de pâtes levées et de pain.

Le pain est fabriqué à partir de farine, de levure ou levain, de sel et d'eau. C'est l'activité chimique des levures qui provoque le dégagement de bulles de gaz carbonique et fait lever la pâte à pain. Les bactéries lactiques (*Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus*) acidifient le pain. Ainsi, la qualité du pain, tel que les propriétés organoleptiques et le dégagement de CO_2 pendant le

façonnage, dépend de l'activité fermentaire de la levure. Basé sur cette problématique, plusieurs types de levures et levains sont commercialisées pour faciliter et optimiser la fabrication du pain. C'est un point important à considérer pour réaliser des avantages concurrentiels. Dans le domaine des levures et de la fermentation, l'industrie dont le leader mondial est Lesaffre, offre sur le marché une large gamme de levures pour les boulangers : levure pressée, levure émiettée, levure liquide, levure sèche active, levure sèche instantanée, levure à humidité intermédiaire surgelée. En revanche, des procédés complexes doivent être parfaitement maitrisés pour produire ces types de levure. De solides connaissances sur le comportement des levures, par exemple la compréhension de la résistance des levures pendant la déshydratation pour la production des levures sèches actives, sont requises.

1.2.2. Fabrication de boissons alcoolisées

La fermentation alcoolique sous l'effet des levures transforme le glucose en éthanol et en dioxyde de carbone. La fabrication de l'alcool est un processus complexe qui fait souvent intervenir plusieurs microorganismes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée principalement pour fabriquer les deux boissons les plus consommées : le vin et la bière.

Vin

Des grappes de raisin rouge ou blanc sont écrasées pour casser la peau et récupérer le jus. Différentes espèces comme *Saccharomyces cerevisiae (*levures de vinification) et *Brettanomyces, Dekkera, Kloeckera, Hanseniaspora* (levures d'altération ou de contamination) sont présentes dans le moût. La levure *Saccharomyces cerevisae* joue un rôle important dans la première étape (fermentation alcoolique) de la production du vin. Les levures transforment le sucre en alcool et libèrent une grande variété de produits secondaires, grâce aux enzymes qui participent aux réactions chimiques. Ces différentes substances complètent les senteurs initiales du fruit par des arômes secondaires, lesquels dépendent de la nature de la levure, de la température de fermentation et des nutriments de la levure. *Saccharomyces cerevisae* est présente en faible quantité sur le raisin (pas plus de 10% de la population levurienne) mais quelques jours après la fermentation alcoolique, elle devient l'espèce prédominante (90%). Ce sont les conditions du milieu qui engendrent cette sélection : l'anaérobiose, le sucre et le SO_2 favorisent les différentes souches de *Saccharomyces cerevisae* au détriment des autres levures moins résistantes et moins adaptées.

Bière

Saccharomyces cerevisiae est utilisée pour produire de la bière à haute fermentation (ale) alors que *Saccharomyces carlsbergensis* est utilisée pour produire de la bière à basse

fermentation (lager). Les bières de fermentation basse doivent fermenter plus longtemps et à des températures plus basses que les bières de fermentation haute.

Autres boissons alcoolisées

Au Japon, *Saccharomyces cerevisae* est également utilisée après *Aspergillus oryze,* pour produire le saké qui est une boisson fermenté à base de riz. Le même protocole que pour la fermentation du vin est appliquée pour la fabrication du cidre à partir de pommes ou du poiré à partir de poires. Pour les alcools "forts" comme le rhum issu de la fermentation de cannes à sucre, ou encore la vodka issue de la fermentation de pommes de terre, de seigle ou de betteraves à sucre, la fermentation est suivie d'une distillation afin de concentrer l'alcool.

1.2.3. Production de probiotiques

Les probiotiques sont des concentrés de levures sèches (*Saccharomyces cerevisiae)* utilisés dans l'alimentation animale comme apports de nutriments favorables : les levures libèrent des vitamines, des acides aminés et des peptides qui permettent de renforcer la protection de la flore intestinale, de normaliser le transit et de stimuler l'immunité intestinale renforçant ainsi les défenses naturelles des animaux ; les probiotiques permettent ainsi d'obtenir un meilleur rendement de la production laitière, de réduire significativement les pertes de poids des animaux, d'augmenter significativement le taux de croissance des portées, d'améliorer la qualité des viandes, etc. En outre, *Saccharomyces cerevisiae* est une levure modèle pour les études fondamentales sur les eucaryotes. Le développement dans le domaine génétique et biologique a permis de modifier des gènes de cette levure afin de produire de nouvelles protéines et enzymes actives.

1.2.4. Fabrication d'éthanol-carburant.

C'est un alcool à indice d'octane élevé produit par la fermentation de sucre ou d'amidon prétraité, provenant de grains de blé ou de maïs ; l'ajout de levure entraîne la fermentation des sucres et produit l'éthanol qui est ensuite séparé du mélange par distillation.
Les avantages de l'éthanol par rapport à l'essence sont diverses : baisse d'émissions de monoxyde de carbone, de dioxyde de carbone et d'hydrocarbure, et réduction globale des gaz à effet de serre, durabilité de la production d'éthanol due à l'utilisation de matières premières comme des grains et des produits du bois, marché supplémentaire pour le maïs et les autres matières premières agricoles utilisées dans la production d'éthanol et réduction de la dépendance à l'égard des produits pétroliers importés.

1.3. Impact des différents stress des procédés industriels sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Les recherches actuelles portent sur l'amélioration des techniques de fermentation, la sélection de souches microbiennes à fort potentiel industriel et la découverte et l'exploitation de nouvelles voies biochimiques. Des groupes de scientifiques se sont attachés à mieux comprendre les phénomènes mis en œuvre lors des fermentations, des étapes de stabilisation et conservation, les aspects nutritifs de la levure, ou encore l'influence de certains paramètres physico-chimiques. L'impact de certains stress impliqués dans ces procédés est rapporté dans cette partie.

La figure 5 représente globalement les étapes essentielles dans les procédés industriels et les stress principaux impliqués.

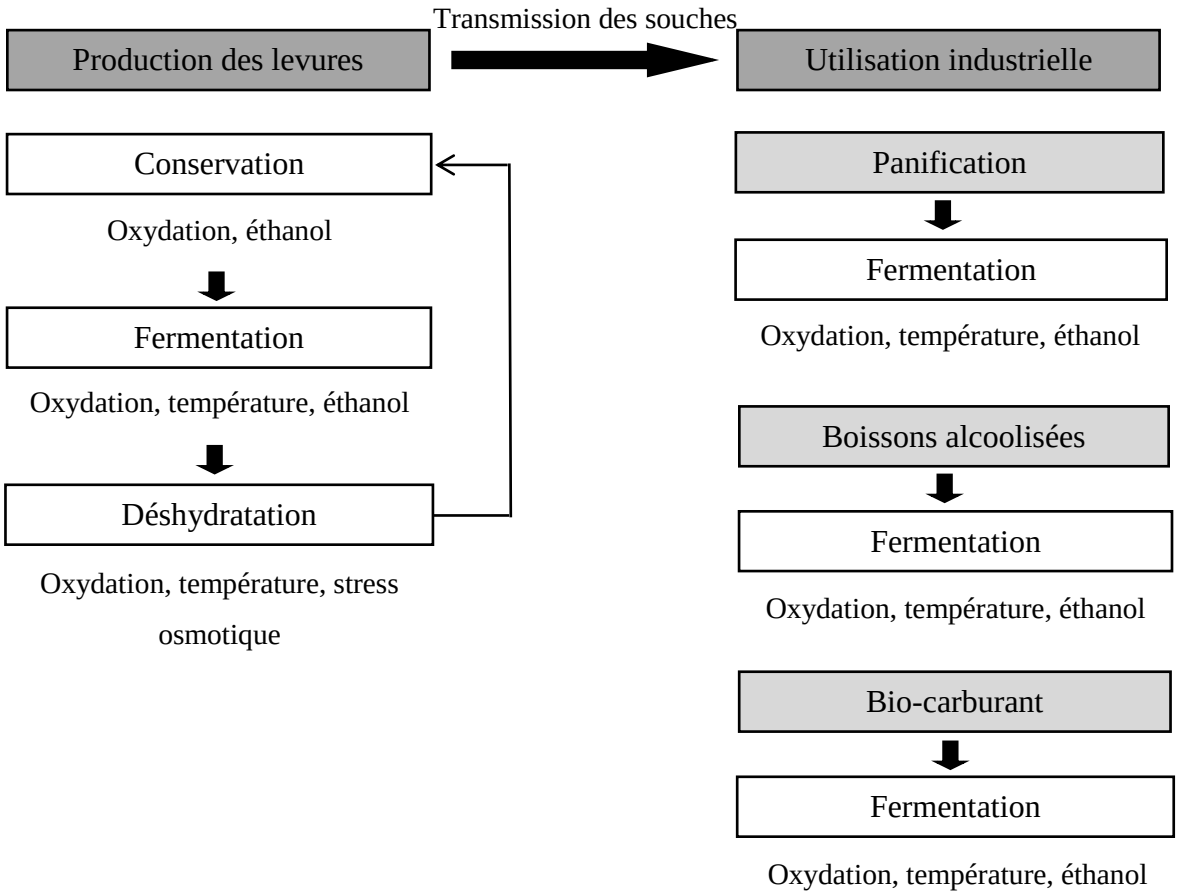


Figure 5. Schéma général des étapes des procédés industrielles et les stress impliqués

1.3.1. Oxydation

La source de l'oxydation est la réaction de la molécule d'oxygène avec d'autres éléments actifs dans la chaine de respiration cellulaire pour produire la molécule d'eau (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Temple et al., 2005; Perrone et al., 2008). La chaine des réactions induisant la génération des dérivés réactifs de l'oxygène est représentée dans la figure 6.

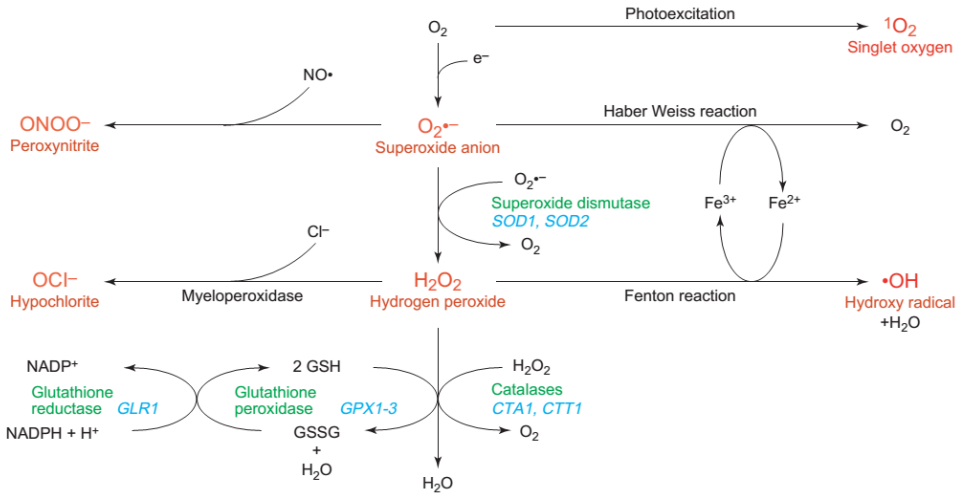


Figure 6. Génération des dérivés réactifs de l'oxygène dans la chaine de respiration cellulaire. Les réactifs intermédiaires (rouges), les enzymes antioxydantes sont en vert et les gènes impliqués (bleu) (Temple et al., 2005).

Une molécule oxydante est un radical libre qui possède un électron célibataire sur sa couche périphérique. Ziegelhoffer et al. (2009) a décrit deux grandes classes des radicaux libres, formés soit par un transfert d'électron, soit par un transfert d'énergie (Ziegelhoffer and Donohue, 2009). Le transfert d'électron à une molécule d'oxygène peut former le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $^{\cdot}OH$ (Herrero et al., 2008). Tous trois sont toxiques pour les cellules (Costa and Moradas-Ferreira, 2001; Toledano et al., 2003). L'impact du stress oxydatif est plus sensible pour les cellules en phase exponentielle qu'en phase stationnaire (Jamieson et al., 1994; Izawa et al., 1996). L'accumulation de ces dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) est la cause de l'apoptose, un phénotype de mortalité cellulaire. H_2O_2 induit l'apoptose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Lorsque la levure est exposée à un stress oxydatif, le taux de survie est approximativement de 20 % à 1 mM H_2O_2 et une perte complète de viabilité est observée à 3 mM H_2O_2 (Madeo et al., 1999).

Le stress oxydatif est trouvé pendant la phase de déshydratation de la levure (figure 7). La déshydratation génère l'oxydation (Espindola et al., 2003; Pereira de Jusus et al., 2003; França et al., 2005; França et al., 2007). L'expression du gène *TRX2* est obtenue lorsque la levure est exposée à un stress oxydatif de 2 mM H_2O_2 et l'expression de ce gène dépend de l'aération (Pérez-Torrado et al., 2005; Pérez-Torrado et al., 2009). Des résultats montrent que l'oxydation de la levure est augmentée 10 fois après la déshydratation (Pereira de Jusus et al., 2003). Une des causes principales avancées pour expliquer la perte de viabilité cellulaire durant le stockage est l'oxydation conduisant à la formation de radicaux libres (Crowe et al., 1983); en effet, les

radicaux libres peuvent attaquer différents composants cellulaires tels que les protéines, les acides nucléiques (Beker and Rapoport, 1987) ou bien encore les lipides (Santivarangkna et al., 2008).

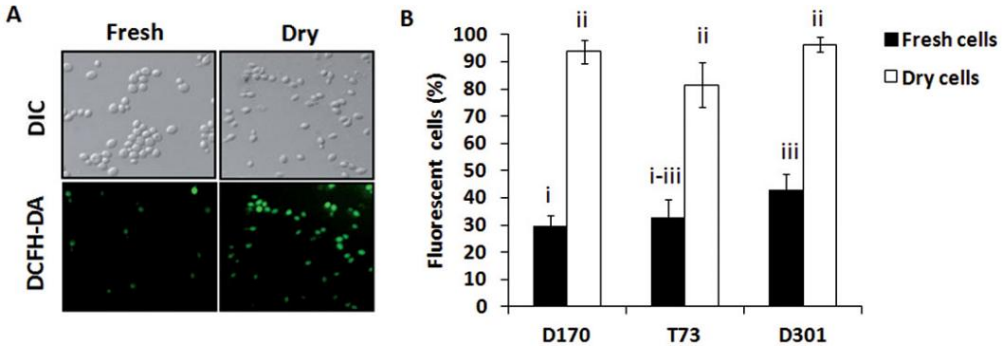


Figure 7. Détection de dérivés réactifs de l'oxygène chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur trois souches D170, D301 et T73 après déshydratation par fluorescence en utilisant le 2,7-dichlorofluorescéine diacétate (CDFH-DA) (Gamero-Sandemetrio et al., 2014)

La membrane cellulaire est la première cible de l'attaque des DRO. L'étude de Garre et al. (2010) montre l'augmentation de la peroxydation lipidique pendant la déshydratation de la levure. La peroxydation lipidique produit des radicaux lipidiques comme les peroxydes lipidiques et le 4-hydroxy-trans-2-nonenal (Stark et al., 2005) qui sont plus toxiques que les superoxydes ou le radical hydroxyle. Les DRO modifient les acides nucléiques, par exemple le radical hydroxyle forme la 8-hydroxyguanine à partir de la guanine (David et al., 2007). Les DRO oxydent directement les protéines et affectent leur structure (Deanet al., 1997). La structure secondaire des protéines est changée par formation de ponts disulfures, conséquence de l'oxydation des cystéines. D'autres acides aminés (méthionine, tryptophane, phénylalanine, tyrosine, histidine, arginine, lysine, proline, thréonine) peuvent être oxydés pour produire des résidus acides ou aldéhydes (Toda et al., 2010).

1.3.2. Éthanol

Pendant la fermentation, lors de la production des boissons alcoolisées, du bioéthanol ou des autres produits fermentés, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est stressée par l'augmentation de la concentration en l'éthanol dans le milieu (Attfield, 1997; Aguilera et al., 2006; Hirasawa et al., 2007; Ding et al., 2009; Zhao and Bai, 2009; Ma and Liu, 2010; Stanley et al., 2010). L'éthanol influence le métabolisme, la croissance et la vitalité de la levure. Après 60 minutes d'incubation avec de l'éthanol à différentes concentrations, le taux de survie de *Saccharomyces cerevisiae* est inférieur à 30% à 15% d'éthanol (v/v), et ce taux est inférieur à 5% à 20% d'éthanol (v/v) (Birch and Walker, 2000). L'accumulation de l'éthanol inhibe la croissance de la

levure à partir de 10% (v/v). La biomasse atteint la phase exponentielle et la phase stationnaire plus lentement à des concentrations élevées qu'à des concentrations faibles en éthanol (figure 8).

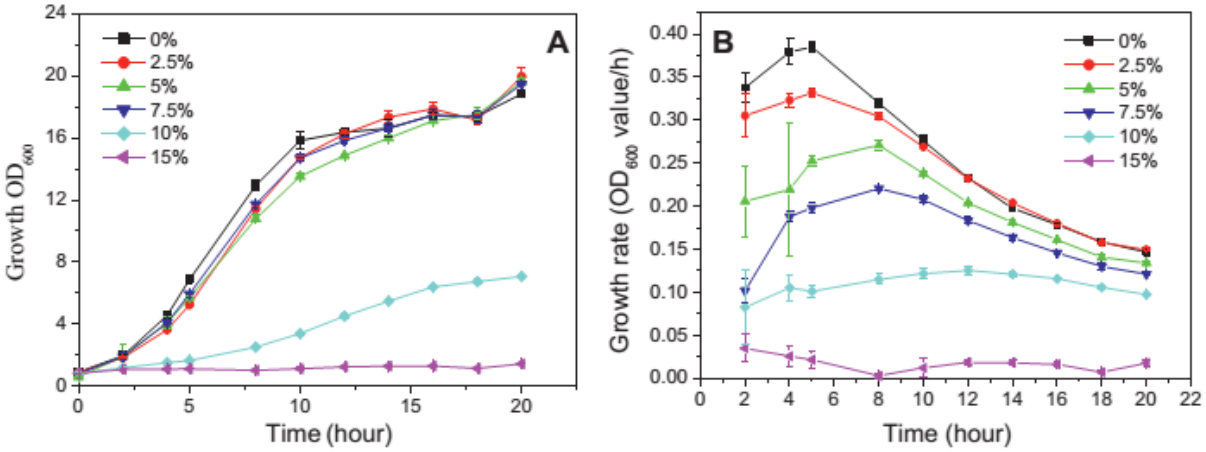


Figure 8. Effet de différentes concentrations en éthanol sur la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. (A) courbe de croissance et (B) courbe du taux de croissance (Li et al., 2012)

L'éthanol influence le métabolisme, la biosynthèse des macromolécules (production des protéines « heat-shock »), diminue la vitesse d'accumulation des protéines, dénature des protéines intracellulaires,... (Hu et al., 2007; Ding et al., 2009). Dans l'étude de Li et al. (2012), les auteurs trouvent que le stress dû à l'éthanol favorise l'accumulation intracellulaire de glucose et galactopyranose (Li et al., 2012). Cela indique que la glycolyse est inhibée par l'éthanol et que la consommation de la source de carbone pour la fermentation est diminuée. De plus, cette étude démontre que le métabolisme des lipides et des acides aminés change à cause du stress éthanol. La membrane cellulaire est considérée comme le premier site de dommage causé par l'éthanol. La levure stressée par l'éthanol présente une augmentation de la fluidité membranaire et en conséquence son intégrité membranaire diminue (Mishra and Prasad, 1989).

Hallsworth et al. (1998) ont montré que l'éthanol induit un stress hydrique chez *Aspergillus oryzae* et donc entraine une diminution de la disponibilité des molécules d'eau dans les cellules (Hallsworth et al., 1998). Cela peut expliquer la diminution de volume cellulaire en présence d'éthanol (Stanley et al., 2010) et entrainer l'inhibition des enzymes clés dans la glycolyse et la dénaturation des protéines (Hallsworth et al., 1998). Dans l'étude de Bleoanca et al. (2013), l'augmentation de l'expression du gène *SOD1* (gène de régulation de système antioxydant) a été mise en évidence lorsque la levure est exposée à l'éthanol (Bleoanca et al., 2013).

1.3.3. Stress osmotique

L'eau est présente en grande quantité (40 à 95 % du volume) dans les cellules biologiques (Ellis et al., 2003). Cette molécule possède une structure dipolaire qui détermine ses rôles importants (i) transporteur de composés dissouts ou en suspension (Pollack et al., 2001; Jasnin et al., 2008); (ii) élément structurant de la cellule (Tanford et al., 1997; Fuller et al., 2004; Brovchenko et al., 2007); (3) élément indispensable des réactions biochimiques. Ces trois fonctions majeures de l'eau intracellulaire permettent de la considérer comme un composant actif dans la biologie de la cellule (Ball, 2008).

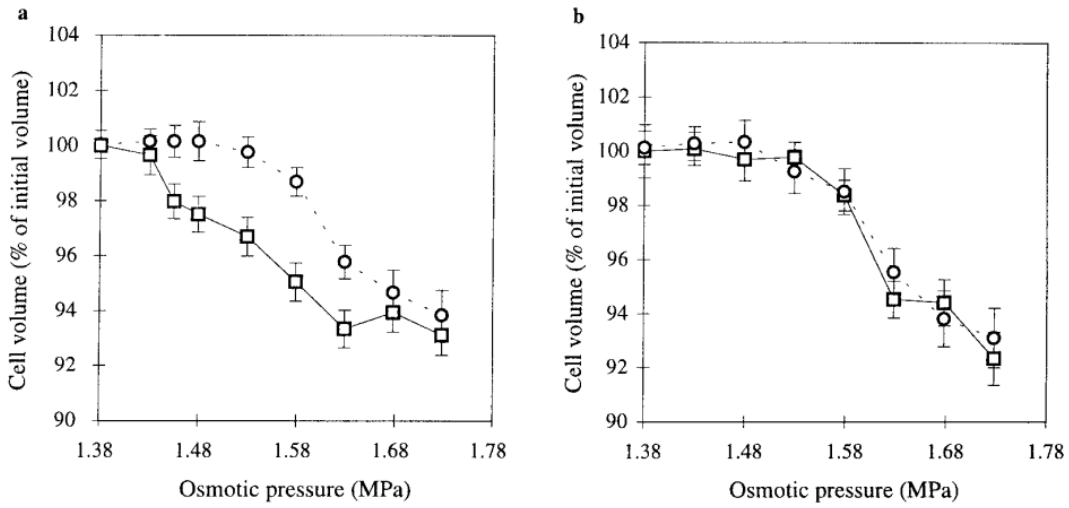


Figure 9. Évolution du volume de la levure *Saccharomyces cerevisiae* soumise à une augmentation progressive de pression osmotique extérieure. (a) en fonction de l'état physiologique (carré): 16 heures de la phase exponentielle, (rond): 48 heures de la phase stationnaire. (b) en fonction de la taille cellulaire dans la phase stationnaire (carré) : petites cellules, (rond) : grandes cellule (de Iñigo Martinez et al., 1996).

L'hydratation des cellules est influencée par l'état hydrique du milieu. La croissance des cellules dépend de la pression de turgescence qui est fonction de la différence entre les potentiels hydriques interne et externe. Ces derniers dépendent de la différence de pression osmotique interne et externe. En situation optimale de croissance, les concentrations intracellulaires supérieures à celles du milieu externe, impliquent que le potentiel hydrique osmotique intracellulaire est plus faible qu'à l'extérieur. La pression de turgescence intracellulaire est en conséquence positive. Il est reporté que cette valeur est entre 0,05 et 0,2 MPa chez la levure (de Iñigo Martinez et al., 1996) et elle est plus élevée chez les bactéries (entre 1,5 et 2,5 Mpa) (Poolman et al., 1998). Quand un microorganisme est transféré dans une solution concentrée (faible potentiel hydrique de l'eau) l'eau sort de la cellule via sa membrane hémiperméable vers

le milieu extérieur. Il s'agit d'un stress hyperosmotique. Dans ce cas, la pression de turgescence est annulée et le volume cellulaire est diminué (figure 9).

Tableau 1. Viabilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la pression osmotique (Beney et al., 2001)

Pression osmotique (MPa)	Viabilité cellulaire (% population)
1,38	100
14,5	97 ± 2
30,8	96 ± 3
49,2	94 ± 5
70,5	59 ± 9
80	38 ± 6
99	25 ± 4

Lorsque la levure est soumise au stress osmotique, la quantité d'eau intracellulaire diminue (déshydratation) et provoque des modifications structurales et fonctionnelles des molécules constitutives des levures (Morris et al., 1983; Beker and Rapoport, 1987; Gervais et al., 1992; Crowe et al., 1992). Lors du retrait de l'eau intracellulaire, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les forces de van der Waal's entre les protéines sont modifiées. Cela peut aboutir à la dénaturation de leurs structures secondaire, tertiaire et quaternaire. Un autre phénomène décrit lors de la déshydratation cellulaire est l'agrégation protéique. En effet, la perte de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau causée par la déshydratation entraîne des interactions protéine-protéine conduisant à un regroupement de protéines en amas concomitant avec leur dénaturation (Wolkers et al., 2002). Dans les membranes biologiques, les lipides sont organisés en bicouche lipidique sous l'effet structurant de l'eau intra et extracellulaire. Une diminution de l'hydratation des têtes polaires des phospholipides peut conduire à une transition de l'état liquide à l'état gel. Ce phénomène conduit à la réorganisation des lipides dans la membrane en fonction de leur état.

Les états faiblement hydratés sont à l'origine d'une diminution de la viabilité cellulaire (tableau 1). Un des facteurs influençant la perte de viabilité au cours de la déshydratation est le type de microorganismes. Il existe également des différences de survie au sein d'une même espèce. Il a été montré que la souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* 14 est plus résistante au séchage que la souche *Saccharomyces cerevisiae* Tomskaya (Beker and Rapoport, 1987). De plus, la survie cellulaire est également influencée par des paramètres du cycle déshydratation/réhydratation. Dans des plages de pressions osmotiques comprises entre 80 MPa

et 300 MPa, plusieurs études ont montré que la déshydratation progressive conduit à des taux de survie supérieurs à ceux obtenus à l'issue d'un traitement rapide (Gervais et al., 1992; Marechal et al., 1995). Lemetais et al. (2012) a récemment observé une cinétique similaire entre la déshydratation en milieu liquide (stress osmotique) et en milieu gazeux (dessiccation) (Lemetais et al., 2012). La similarité de la valeur a_w est obtenue dans les deux environnements pendant le cycle déshydratation/réhydratation (figure 10A). Les auteurs ont trouvé que la viabilité de la levure est la plus importante lorsqu'elle est traitée progressivement (slope) et au contraire, sa viabilité est la plus faible dans le cas d'un traitement rapide (shock) (figure 10B).

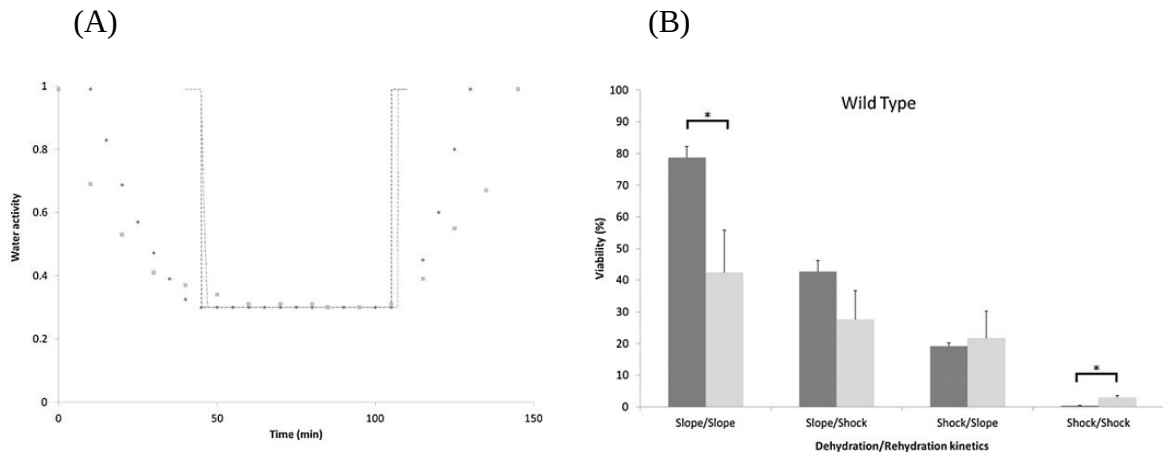


Figure 10. (A) Cinétique du cycle déshydratation/réhydratation appliqué sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la plage d'aw entre 0.3 et 1 dans deux environnements : liquide (cycle rapide dit choc (shock): ligne pointillée foncée & cycle progressif dit rampe (slope) : diamant noir) et gazeux (cycle choc : ligne pointillée claire & cycle rampe : carré gris). (B) Impact des différentes cinétiques du cycle déshydratation/réhydratation sur la viabilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans deux environnements liquide (barres gris foncé) et gazeux (barres gris clair) (Lemetais et al., 2012).

1.3.4. Température

La température est un paramètre important des procédés de production. Lors du séchage des levures en lit fluidisé, la température la plus élevée du flux d'air à l'entrée et à la sortie est de 100 à 120 °C et de 32 à 34 °C respectivement dans la zone de séchage des levures. (Akbari et al., 2012). Pour la production de vin blanc, la température varie entre 10 °C et 25 °C (Aysun Sener 2007) alors qu'une plage de température plus élevée (30 °C à 60 °C) est nécessaire pour la production de bioéthanol (Khattak et al., 2014). La température affecte l'activité fermentaire des levures. Une diminution du rendement de la production bioéthanol de 3,37 g/L à 1,60 g/L a été

observée lorsque la température de fermentation augmente de 30 à 60 °C (Khattak et al., 2014). La levure est donc stressée par une température élevée (Kim al., 2006).

L'augmentation de température est associée à la mortalité de la levure (Gervais et al., 2003; Guyotet al., 2005; Guyot et al., 2006). Une augmentation rapide de température de 27 °C à 50 °C entraine une perte de viabilité 50 fois plus importante qu'une augmentation progressive avec un gradient de 0,5 °C/min. Le volume de la levure morte diminue après la perturbation thermique mais il n'y a pas d'influence de la température sur le volume de la levure vivante. Cette observation est valable pour les deux modes de traitement rapide ou progressif (0,417 °C/min) (Gervais et al., 2003). Plusieurs études ont montré que la température peut induire le stress oxydatif chez la levure (Davidson and Schiestl, 2001; Moraitis and Curran, 2004; Moraitis and Curran, 2007). Lorsque la température est augmentée, la fluidité membranaire est augmentée (Dynlacht and Fox, 1992). Cela entraine une sensibilité de la membrane à la présence de molécules oxydantes pendant la déshydratation (Crowe et al., 1989). Beney et al., (2000) ont souligné que le contrôle de température est important pour augmenter la viabilité de la levure pendant la déshydratation. Ils ont démontré qu'une température égale ou inférieure à 10 °C permettait de préserver la viabilité de la levure après un stress osmotique (99-100 Mpa), alors qu'une température plus élevée (températures testées jusqu'à 25 °C) entraine une perte de viabilité plus importante (Beney et al., 2000). La température et l'oxydation sont considérées comme responsables de la diminution de la viabilité cellulaire pendant la déshydratation en lit fluidisé (Bayrock and Ingledew, 1997).

1.4. Défenses de la levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis processus de déshydratation

Bien que la déshydratation affecte la viabilité et les propriétés physiologiques de la levure, l'élimination de l'eau intracellulaire entraine le ralentissement des métabolismes cellulaires. Ce principe est largement appliqué pour stabiliser et conserver les microorganismes. La stabilisation basée sur la déshydratation offre plusieurs avantages tels que la réduction du volume des produits, la simplicité de transport et de stockage, et la réduction de la contamination microbienne. La congélation, la lyophilisation, et le séchage par lit fluidisé sont des techniques pour déshydrater et stabiliser les cellules à l'échelle industrielle (Akbari et al., 2012). Il est donc nécessaire de connaître les mécanismes de défense cellulaire à la déshydratation. Ces connaissances permettront de trouver des nouvelles solutions stratégiques pour maintenir la viabilité et la fonctionnalité de la levure après ces processus. Dans cette partie, quelques mécanismes clés impliqués dans la défense de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont abordés.

1.4.1. Glutathion

1.4.1.1. Rôle du glutathion

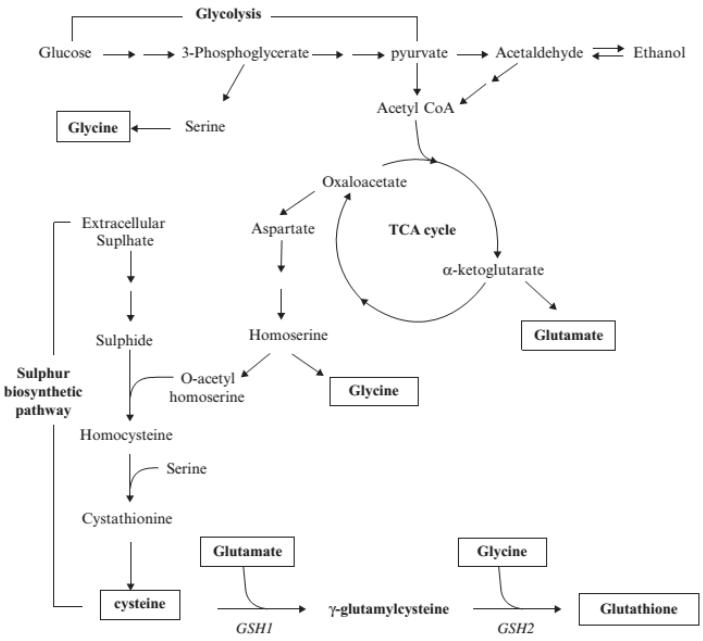


Figure 11. Biosynthèse du glutathion et interactions avec les autres voies métaboliques (Anand K. Bachhawat 2009).

Le glutathion est un tripeptide (γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) qui se compose de trois acides aminés : la cystéine, la glycine et l'acide glutamique. La biosynthèse de cette molécule par deux enzymes principales : la γ-glutamylcystéine synthétase (E.C. 6.3.2.2 GSH1) intervient dans la première étape de formation de dipeptide γ-glutamylcystéine; la glutathion synthétase (E.C.6.3.2.3 GSH2) intervient dans la deuxième étape de formation du glutathion. Yap1, le facteur de transcription de la réponse cellulaire à l'oxydation (Sugiyama et al., 2000), est essentiel dans la régulation de l'enzyme GSH1 (Anand et al., 2009). L'expression de GSH1 est corrélée avec l'accumulation du glutathion (Garre et al., 2010). La biosynthèse et la dégradation du glutathion dépendent aussi de plusieurs facteurs de régulation (figure 11). Le glutathion représente environ 0,1% à 1% de la biomasse sèche (Pócsi et al., 2004). Le glutathion est une molécule réductrice bien connue produite par la levure qui agit comme un puissant antioxydant. L'absence de synthèse du glutathion entraine une diminution de la durée de vie cellulaire et augmente l'apoptose (Madeo et al., 1999).

Le glutathion est un antioxydant qui joue un rôle important dans la défense cellulaire au cours de la déshydratation (Izawa et al., 1995; Sies et al., 1999; Penninckx et al., 2000; Garre et al., 2010; Saharan et al., 2010). Il existe sous deux formes : glutathion réduit (GSH) et glutathion oxydé (GSSG). Espindola et al. (2003) ont observé que l'oxydation cellulaire est deux fois plus

importante en absence de glutathion (Espindola et al., 2003). Le glutathion existe souvent sous forme réduite et l'augmentation de GSSG est considérée comme indicateur de stress.

$$GSSG + NADPH + H^+ \leftrightarrow 2\ GSH + NADP^+ \quad (1)$$

La réduction de l'accumulation de DRO pendant la déshydratation est associée avec l'augmentation de GSSG et la peroxydation lipidique (Espindola et al., 2003; Pereira de Jusus et al., 2003; França et al., 2005). Pour d'autres organismes (plantes), la tolérance à la déshydratation dépend du ratio GSH/GSSG et de la capacité à revenir à la forme réduite du glutathion oxydée (Kranner et al., 2002; Kranner et al., 2006).

D'un côté, GSH est capable de réduire le peroxyde d'hydrogène et de maintenir la balance du potentiel d'oxydoréduction du milieu intracellulaire (Perrone et al., 2008).

$$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2\ H_2O \quad (2)$$

GSH participe dans les réactions pour réduire les ponts disulfures et éliminer les peroxydes en présence de la glutarédoxine et de glutathion peroxydase alors que GSSG joue un rôle dans le maintien du potentiel d'oxydoréduction. Le rôle antioxydant du glutathion est représenté dans la figure 12.

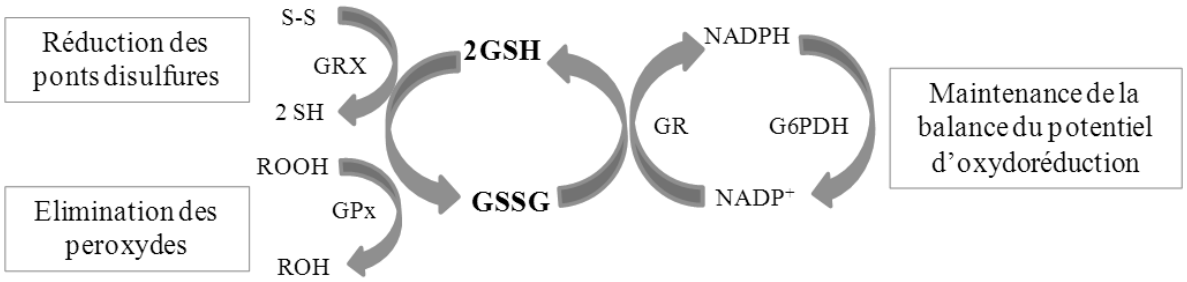


Figure 12. Rôle d'antioxydant du couple GSH et GSSG dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. G6DPH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GRX : glutarédoxine, ROOH : peroxydes, ROH : peroxydes réduits, S-S : ponts disulfures (d'après Li et al.(2004) (Li et al., 2004)).

Par ailleurs, dans la revue d'Ilse Kranner and D.Grill, les auteurs ont rapporté la protection des protéines thiol par le glutathion en formant des ponts disulfure protéine-glutathion (Kranner and Grill, 1996). La formation irréversible des ponts disulfure entre les protéines thiols provoque la dénaturation protéique, une conséquence de la déshydratation. Le mécanisme de protection des protéines thiols du couple GSH et GSSG est différent pendant la déshydratation/réhydratation. GSSG peut réagir avec les protéines thiol pendant la déshydratation :

$$Protéine\ SH + GSSG \rightarrow Protéine\ SSG + GSH \quad (3)$$

Les protéines SSG peuvent être réduites en protéines thiol par GSH pendant la réhydratation :

Protéine SSG + GSH → Protéine SH + GSSG (4)

Le rôle de l'activité du glutathion pendant le cycle déshydratation/réhydratation est suggéré dans le schéma suivant :

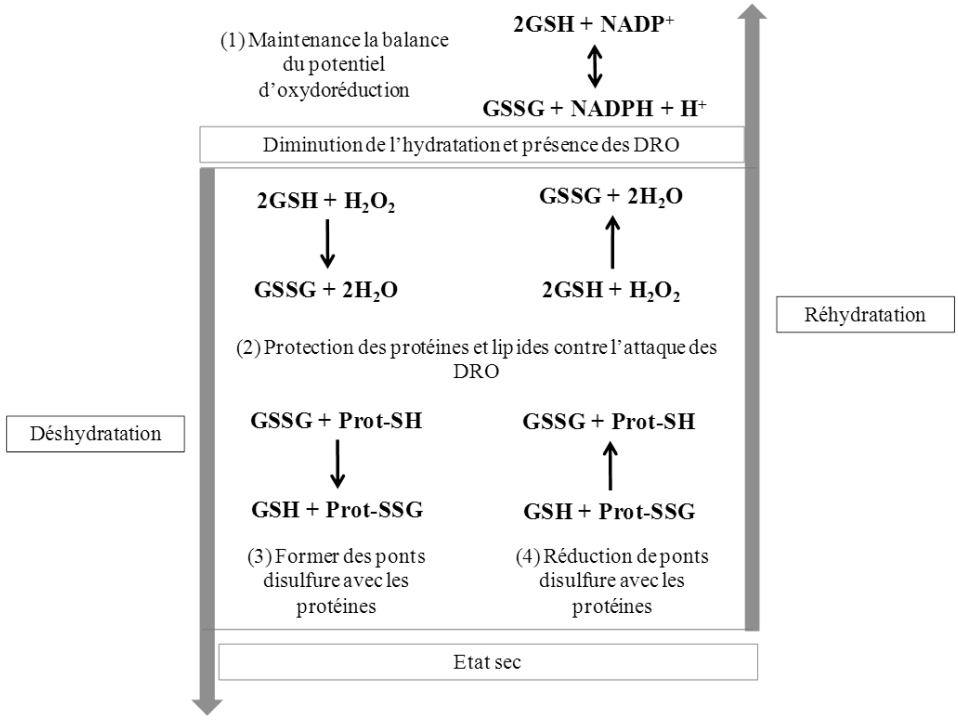


Figure 13. Hypothèse de la fonction du glutathion pendant le cycle déshydratation/réhydratation

1.4.1.2. Enrichissement des levures en glutathion

Grâce à sa capacité antioxydante, le glutathion est une molécule d'intérêt biotechnologique. Différentes études ont montrés une amélioration du rendement de production grâce à l'augmentation de la concentration intracellulaire du glutathion chez les microorganismes (Li et al., 2004; Anand K. Bachhawat et al., 2009). Les levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*) sont préférées aux bactéries (*Escherichia coli*) pour la production du glutathion. Les trois principales méthodes pour la production du glutathion sont : la méthode enzymatique (présence de l'ATP et des acides aminés), la méthode de fermentation (sources favorisant la biosynthèse du glutathion) et la méthode génétique et métabolique. La perturbation oxydative ou thermique permet d'augmenter le glutathion intracellulaire. Les méthodes d'enrichissement en glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont représentées dans le tableau 2.

L'objectif final de la production du glutathion se focalise sur deux critères : la concentration intracellulaire du glutathion et la densité cellulaire (biomasse) (Li et al., 2004). A

l'échelle industrielle, la méthode enzymatique n'est pas applicable car elle est très coûteuse. La méthode de fermentation avec le contrôle de nutriment est plus adaptée. Dans ce rapport, nous nous focaliserons donc sur les conditions de culture pour l'enrichissement du glutathion chez la levure et l'optimisation de la biomasse.

Les sources de carbone, d'azote, de phosphate et d'acides aminés sont les précurseurs essentiels utilisés pour la stratégie de production du glutathion chez la levure (tableau 2). Le glucose est considéré comme la meilleure source de carbone, comparée au lactose, fructose, sucrose, mannitol, éthanol et glycérol (Liu et al., 1999; Jae-Young Cha et al., 2004). Les auteurs ont montré que l'extrait de levure, le sel KH_2PO_4, la cystéine sont les meilleurs par rapport aux autres sources d'azote, de sel et d'acides aminés respectivement (Jae-Young Cha et al., 2004; Wen et al., 2005). La concentration des nutriments doit être optimisée pour la stratégie de production du glutathion. Bien que la cystéine soit l'acide aminé le plus importante pour l'enrichissement du glutathion, elle entraine un effet d'inhibition de la croissance cellulaire si elle se trouve en quantité non-adaptée dans la culture (Alfafaraet al., 1992). Un excès du glucose dans la culture ne permet pas d'augmenter la teneur en glutathion. Cha et al. (2004) ont trouvé que la teneur en glutathion est de 1,32 % ($m_{glutathion}/m_{biomasse}$) lorsque la concentration de glucose est de 3 % (m/m) (Jae-Young Cha et al., 2004). Au de-là, la teneur en glutathion diminue. En revanche, Liu et al. (1999) ont déterminé que la teneur du glutathion est maximisée avec 1,5 % (m/m) de glucose (Liu et al., 1999). Cela veut dire que la concentration optimisée déterminée d'une source nutritive est associée avec celle des autres sources.

L'éthanol produit par la levure pendant la fermentation est un élément qui influence la teneur en glutathion. Dans l'étude de Wen et al. (2006), les auteurs ont observé que la teneur en glutathion diminue de 1,23 % à 0,38 % lorsque la concentration de l'éthanol augmente de 0,65 % à plus de 3,5 % (Wen et al., 2006). L'éthanol doit être donc maintenu à faible concentration. L'effet de la température sur la croissance cellulaire et la production du glutathion chez la levure *Candida utilis* a été étudié par Wei et al., (2003) (Gongyuan Wei et al., 2003). La croissance cellulaire est favorisée à haute température (30 °C) mais la production du glutathion est favorisée à une température plus faible (26 °C). Donc une stratégie à deux niveaux de température est proposée : à 30 °C pendant 8 heures (croissance cellulaire) et ensuite à 26 °C (synthèse du glutathion). En outre, les acides aminés peuvent être ajoutés une fois au départ (Jae-Young Cha et al., 2004) ou plusieurs fois (Alfafara et al., 1992; Wen et al., 2004; Wen et al., 2005) pendant la fermentation. Le moment efficace pour l'addition de la cystéine est compris entre 2 et 6 heures de fermentation. Si elle rajoutée après 12 heures alors il n'y a pas d'augmentation de la teneur en glutathion et l'inhibition de la croissance cellulaire est détectée (Wen et al., 2004). Le fait de

rajouter la cystéine une deuxième fois ne permet pas d'augmenter la teneur de GSH mais augmente l'inhibition de croissance de la levure (Alfafara et al., 1992). Néanmoins, la combinaison de cystéine, deglycine et d'acide glutamique peut être utilisée pour l'enrichissement en glutathion (Wen et al., 2006).

Tableau 2. Méthodes d'optimisation de la production du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisae*

Méthodes	Paramètres optimisés	Biomasse (g/L)	Teneur en GSH (%)	Références
Fermentation	Addition une fois de cystéine 3 mM (au maximum 0,7 mM/g cellule : pas d'inhibition de croissance cellulaire)	-	-	(Catalino G. Alfafara et al., 1992)
Fermentation	Contrôle du niveau EtOH (0,3 %), 2 mM Cystéine ajouté après 2 h et une combinaison de 10 mM acide glutamique, 3,35 mM Cystéine et 18 mM glycine est ajoutée après 24, 44 et 56 heures, 30 °C, pH 5,5	140	1,56	(Wen et al., 2006)
Traitement thermique	2 % glucose, 0,67 % extrait de levure (source de carbone, pH 5,5), 23 °C à 41 °C	-	0,07	(Sugiyama et al., 2000)
Fermentation	20 g/L molasse, 5 g/L $Al_2(SO_4)_3$, 1,2 g/L $MgSO_4$, pH 5,8, 24 °C	-	1,85	(Rollini and Manzoni, 2006)
Fermentation	2 mM cystéine ajouté après 2 heures, combinaison (10 mM acide glutamique, 18 mM glycine et 3,35 mM cystéine) ajouté après 7 heures, 30 °C, pH 5,5	18 g/L	1,67	(Wen et al., 2005)
Fermentation + Contrôle de température *(Candida utilis)*	30 g/L glucose, 8 g/L $Al_2(SO_4)_3$, 3 g/L KH_2PO_4 et 0,25 g/L $MgSO_4$, pH 5,5, 30 °C et ensuite la température est baissée à 26 °C après 8 heures.	15.4	2,5	(Gongyuan Wei et al., 2003)
Fermentation	5,20 % glucose, 4,84 % peptone, 1,16 % $MgSO_4$, 30 °C, 24 heures	7.95	1,45	(Liu et al., 1999)
Fermentation	2 mM cystéine ajouté après 2 heures, combinaison (10 mM acide glutamique, 10 mM glycine et 10 mM sérine) est ensuite ajoutée après 7 heures, 30 °C, 24 heures	9.4	1,63	(Wen et al., 2004)
Fermentation	3.0 % glucose, 3 % extrait de levure, 0,06 % KH_2PO_4, 0,06 % L-cystéine, pH 6,0, 30 °C	8.5	2,4	(Jae-Young Cha et al., 2004)

1.4.2. Enzymes antioxydantes

La production et la détoxification des DRO sont deux mécanismes clés pour la survie cellulaire pendant la déshydratation (Pereira de Jusus et al., 2003; França et al., 2007). L'accumulation des DRO active le métabolisme antioxydant et accélère le mécanisme d'élimination des radicaux libres, y compris l'activité enzymatique (Jamieson et al., 1998; Sugiyama et al., 2000; Pereira de Jusus et al., 2003; Lu et al., 2005; França et al., 2007; Skoneczna et al., 2007; Veal et al., 2007).

L'enzyme superoxyde dismutase est reconnue comme facteur essentiel dans la défense cellulaire contre l'oxydation (Jamieson et al., 1998; Pereira de Jusus et al., 2003). Le rôle principal de cet enzyme est reporté dans la détoxification de l'anion superoxyde. Il existe en deux formes : Cu/Zn superoxyde dimutase Sod1p est localisée dans le cytoplasme et l'espace inter-membranaire des mitochondries, et Mn superoxyde dimutase Sod2p est localisée dans les mitochondries (Liochev and Fridovich, 2005; Leitch et al., 2009). Ces activités enzymatiques sont régulées par l'expression de deux gènes *SOD1* et *SOD2* (Pereira de Jusus et al., 2003). Deux isoformes de superoxyde dimutase participent dans la tolérance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* contre la déshydratation. Calahan et al. (2011) ont démontré que l'absence d'un des deux enzymes entraine la diminution de viabilité après déshydratation (Calahan et al., 2011). Des résultats similaires ont été trouvés dans l'étude de Pereira et al. (2003). Pourtant, ces auteurs ont reporté que la perte de viabilité de deux souches mutantes ΔSOD1 et ΔSOD2 n'est pas différente et suggèrent que la présence de l'un de ces deux gènes peut assurer la tolérance de la levure contre la déshydratation. De plus, les auteurs ont trouvé que la surexpression de *SOD1* permet d'augmenter 5 fois la tolérance de la levure au séchage et la surexpression simultanée de deux gènes *SOD1* et *SOD2* peut augmenter la tolérance cellulaire de 8 fois contre la déshydratation (Pereira de Jusus et al., 2003).

Les enzymes catalases (catalase A peroxysome et catalase T cytoplasmique codées par deux gènes *CTA1* et *CTT1*) (França et al., 2005) peuvent réduire H_2O_2 et produire la molécule d'oxygène. Garre et al. (2010) ont étudié l'oxydation intracellulaire de la levure pendant la déshydratation (Garre et al., 2010). L'oxydation peut augmenter jusqu'à 70% chez les souches dont la catalase cytoplasmique manque ; la tolérance envers la déshydratation est en conséquence réduite. Cela démontre le rôle de la catalase dans la maintenance de la balance redox pendant la déshydratation (França et al., 2005; Garre et al., 2010).

1.4.3. Tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide composé de deux molécules de glucose. Cette molécule est synthétisée par la levure et impliquée dans la résistance de la levure contre différent stress. Il est

reporté que l'effet protecteur du tréhalose est évident lorsque sa concentration intracellulaire atteint 20 µg/mg de biomasse (Eleutherio et al., 1993; Benaroudj et al., 2001; Richards et al., 2002; Pereira de Jusus et al., 2003). Le tréhalose peut protéger la levure contre les stress osmotique et oxydatif dûs à la déshydratation au niveau de la membrane cellulaire. Lors d'un stress osmotique, le tréhalose peut s'insérer pour remplacer les molécules d'eau dans la membrane cellulaire et diminuer la perturbation membranaire (Crowe et al., 1984). D'autre part, l'accumulation du tréhalose permet de réduire la peroxydation lipidique chez la levure (Herdeiro et al., 2006). De plus, le tréhalose a la capacité de cryoprotection dans les procédés de déshydratation à basse température. L'addition de 10 % de tréhalose dans le milieu augmente la survie cellulaire dans les conditions de congélation (Coutinho et al., 1988).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un modèle de cellule eucaryote pour les études fondamentales. Elle est sous forme ovoïde à arrondie et sa taille est en moyenne de 5 µm. *Saccharomyces cerevisiae* en phase stationnaire est plus résistante aux conditions environnementales qu'en phase exponentielle. Cette levure peut se reproduire selon deux voies : sexuelle pour les haploïdes et végétative pour les haploïdes et diploïdes. Cependant, si le milieu contient seulement les haploïdes, elles ne peuvent pas sporuler alors que la sporulation est observée chez les diploïdes dans le cycle de vie de la levure en conditions non-favorables. De plus, la sporulation d'un diploïde produit quatre haploïdes qui possèdent des génomes différents de leur parentes. Cela donne la variation de la population et promeut la survie cellulaire. Les diploïdes sont plus avantageuses en terme de résistance contre les conditions non-favorables de l'environnement autour de la levure.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée dans l'industrie alimentaire et peut être soumise à plusieurs stress pendant les procédés industriels. L'éthanol, la température et l'extraction des molécules d'eau intracellulaire favorisent l'oxydation. En conséquence la fonctionnalité et la viabilité de la levure en sont diminuées.

Avant d'être utilisée dans les procédés de panification, de vinification ou de production de bio-éthanol, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est d'abord stabilisée et conservée. La maîtrise de ces étapes est alors très importante et nécessaire pour que la qualité des produits fermentés finaux soit élevée. La déshydratation est une méthode adéquate pour stabiliser les cellules. L'intérêt de cette méthode est évident mais il est toujours compliqué de produire la levure séchée vivante et fonctionnelle. Pendant la déshydratation, la levure est soumise à un double stress mécanique (stress osmotique) et chimique (stress oxydatif). La réduction du volume cellulaire, la perturbation structurale de la membrane cellulaire et des protéines sont des conséquences majeures de ces stress. Plusieurs éléments participent aux défenses naturelles de la levure pour lutter contre ces stress. Le rôle du glutathion, des enzymes antioxydantes et du tréhalose a été mis en évidence au cours de la déshydratation.

2. Encapsulation (article de review)

An overview of layer-by-layer self-assembly techniques for the protection of living cells

Thanh Dat NGUYEN, Rémi SAUREL[a*] and Florence HUSSON[1a*]

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques UMR PAM A 02.102, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne-Franche Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

Abstract

In this review, we focalized on the principle and interest of layer-by-layer technique applied for the encapsulation of viable biological cells. A summary of interesting polyelectrolytes used for this technique and the mechanisms controlling shell properties are presented. Finally, the advantage of natural polyelectrolytes for the protection of individual cells in harsh conditions is highlighted.

Keywords

layer-by-layer, natural polyelectrolytes, shell properties, protection

Introduction

Beneficial cells have been used in large range of fields such as food processing, pharmacy, biofuel production and agricultural biotechnology. For example, probiotics, i.e. lactic acid bacteria, non-lactic bacteria and yeasts, beneficially affect the host's health (Burgain, Gaiani et al. 2011). However, in order to improve higher cell density for higher product yields, retention of activity for long period of time, suitable conditions for growth and metabolism and at the same time cell protection against harsh environmental conditions are required (Rathore, Desai et al. 2013).

Naturally, cells can protect themselves by the help of their defensive systems. Cell envelope and plasma membrane are considered as protective walls. It has been demonstrated that plasma membrane is the main target of environmental stress on yeast cells (Beker and Rapoport, 1987; Guyot, Ferret et al., 2006; França, Panek et al., 2007). It has been shown that plasma

1 Corresponding author Tel.: +33 ; fax: +33
E-mail address: florence.husson@u-bourgogne.fr (F. Husson).
** : co-last authors*

membrane of yeast cells can be used to protect active molecules such as aroma or antioxidants (Pham-Hoang, Romero-Guido et al., 2013). Furthermore, cells can adapt themselves to harsh conditions forming a physical barrier to isolate and protect them completely from their surroundings. It is a very interesting property of several bacteria. Bacterial endospores, in particular, display a remarkable resistance to several stress such as nutrition, heat, radiation, chemical, and desiccation (Driks 2002). In order to imitate and enhance the protection of endospores, researchers have developed novel techniques and materials (Hong, Park et al., 2013). Encapsulation is a technique presenting various advantages allowing protection of cell. In particular, layer-by-layer (LbL) deposition of polyelectrolytes (PE) is a method selected for encapsulating individual living cells that has received increasingly attention for two decades.

In this mini review, PE materials, shell properties and factors affecting the formation of multilayer systems are summarized. Finally, the protection of living cells by LbL self-assembly technique using natural PE is highlighted.

The field of encapsulation and the interest of layer-by-layer method

Encapsulation is a physicochemical or mechanical process to entrap active agents (molecules or cells) within a carrier material. This technique contributes to improve protection and delivery of bioactive molecules and living cells into their environments and may find further applications in many other fields (Park and Chang, 2000). In food, several applications of encapsulation have been reported in the review of Nedovic et al., (2011). This technique is used to provide stability of final products and also during processing. Furthermore, this technique can be used to immobilize cells or enzymes in food processing applications, such as fermentation and metabolite production processes (Nedovic, Kalusevic et al., 2011). Various advantages have been found in comparison to the use of free cells. Different studies reported that encapsulation includes easy separation of the cells from the products, greater productivity due to high cell concentrations achieved, protection of cells against harsh environmental conditions, possibility to use packed columns, reusability of the immobilized cells and prevention of cell washout (Rathore, Desai et al. 2013). It has been shown that *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* maintained their viability to a great extent (5 log improvement) by encapsulation. The number of encapsulated bacteria remained well above the threshold for a minimum probiotic effect (10^7 CFU/g) (ÖZer, Uzun et al., 2008).

Several techniques of encapsulation have been reported in previous studies (Park and Chang, 2000; Gharsallaoui, Roudaut et al., 2007; Burgain, Gaiani et al., 2011; Pham-Hoang, Romero-Guido et al., 2013; Rathore, Desai et al., 2013; Kang, Park et al., 2014). Two main principles can be characterized contributing to encapsulation methods. Extrusion, atomization

and spray drying are described as mechanical methods while emulsification, coacervation, interfacial polymerization, pre-gel dissolving, liquid droplet formation, layer-by-layer deposition are considered as chemical methods. Each technique presents advantages and disadvantages depending on the application field. For example, spray-drying is extensively applied in the food industry because it is flexible and continuous but high temperature can affect the structure of samples. Others methods have been used such as spray-chilling, freeze-drying, melt extrusion and melt injection (Nedovic, Kalusevic et al., 2011). In the case of chemical methods, coacervation is an efficient but expensive process (Burgain, Gaiani et al., 2011).

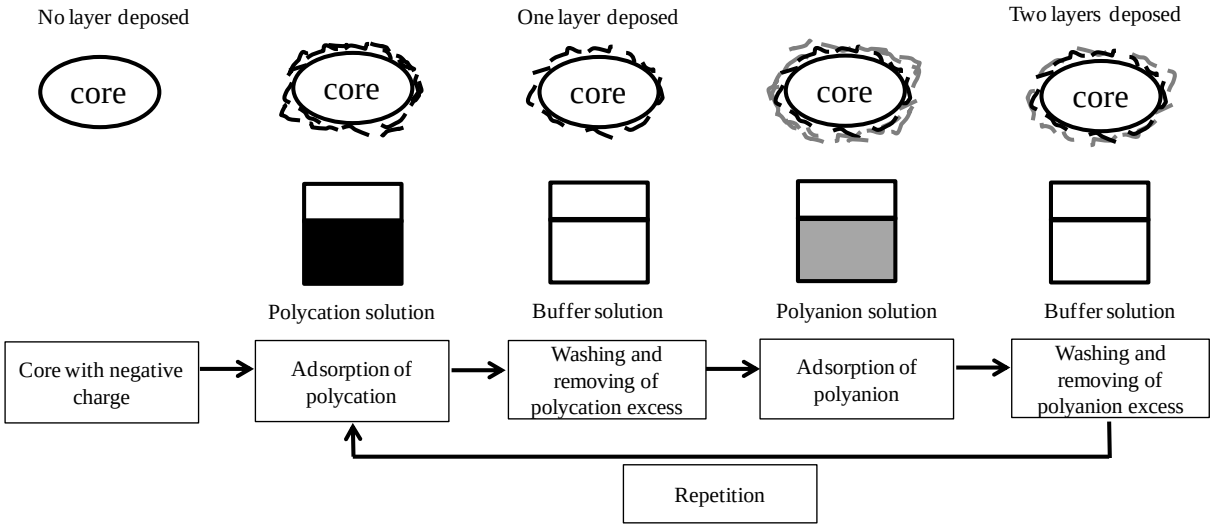


Figure 1. Schematic illustration of multilayer shell formation by LbL self-assembly technique

Among encapsulation methods, layer-by-layer self-assembly technique, which was firstly described by Decher (Decher, Hong et al., 1992) and then applied by others researchers (Decher, Lvov et al., 1994; Sukhorukov, Möhwald et al., 1996; Decher, 1997; Ai, Jones et al., 2003), has received particular attention offering novel encapsulation applicability. Figure 1 represents this technique which is based on the alternating exposure of a charged substrate to solutions of positive or negative PE, respectively (Ai, Jones et al., 2003). It is noted that rinsing step are generally required between PE adsorption in order to efficiently perform individual microencapsulation. Monolayer adsorption to oppositely charged surface is considered as a key step. First kinetic step involves the transport of molecular chains to the surface by diffusion, so that adsorption due to electrostatic forces can take place. In order to form the multilayer system, the adsorption of one layer does not use all charge of polyion. The remaining charges compensated by counterions allow continuing adsorption of a next layer. It can be used to build-up multilayered materials with desired properties. Layer-by-layer self-assembly can be controlled by internal and external factors.

This technique offers several advantages such as control over the required multilayer thickness, the broad selection of shell material, the location and sequence of the layers, surface labeling with targeting molecular species, and stabilization of submicron particles. Moreover much lower amounts of colloids are needed to produce a functional coating compared to a minimum of 10 % with conventional techniques resulting in a low cost technique (de Villiers, Otto et al., 2011). Moreover layer-by-layer is a simple process and requires no specific equipment. Finally, shells prepared from natural PE provide good biocompatibility and biodegradability (Zamaleeva, Sharipova et al., 2010).

Choice of natural and synthetic polyelectrolytes

Layer-by-layer provides an interesting advantage regarding the broad choice of encapsulating materials. Two classes can be distinguished being synthetic and natural PE. Polyelectrolytes, which have been usually used for cell encapsulation, are represented in table 1.
The advantage of synthetic polyelectrolytes is its easy preparation. The couple PSS/PAH is largely used for multilayer shell formation because of its compatibility. PSS is a weak polyanion has molecular weight of 15.8 kD and high soluble property in water (Adamczyk, Jachimska et al. 2009). PAH is a weak cationic polyelectrolyte that exhibits different aggregation properties as a function of pH value (Park Jaejung et al., 2008). The stability of this multilayer system can be controlled by pH variation (Ai, Jones et al., 2003). PSS/PAH has been usually selected as model for many studies of LbL method on *Saccharomyces cerevisiae* in order to investigate encapsulated cell morphology and the protection of multilayer shell on yeast response to hard environment (Diaspro, Silvano et al., 2002; Krol, Cavalleri et al., 2003; Zamaleeva, Sharipova et al., 2010). The possibility to extend this polyelectrolyte nanocapsule to the individual encapsulation of living cells, while preserving their metabolic activity and their ability to divide, has been demonstrated (Diaspro, Silvano et al., 2002).

Materials used to design the protective shell of encapsulates must be biodegradable and be able to form a barrier between the internal phase and its surroundings (Nedovic, Kalusevic et al., 2011). Compared to synthetic polyelectrolyte, the use of natural polyelectrolytes has the advantage to get good biocompatibility and biodegradability. Natural polyelectrolytes have been almost used at the beginning of multilayer encapsulation development. Furthermore natural polyelectrolytes have been selected because they are less toxic than synthetic polyelectrolytes contributing to large applications in pharmaceutical and food fields.

Table 1. Polyelectrolytes used for LbL self-assembly method

	Polyanions	Polycations	Cores	References
Synthetic PE association	poly(styrenesulfonate sodium) (PSS)	poly(allylaminehydrochloride) (PAH)	yeast cell	(Diaspro, Silvano et al., 2002; Krol, Cavalleri et al., 2003; Krol, Nolte et al., 2005; Zamaleeva, Sharipova et al., 2010)
	poly(styrenesulfonate sodium) (PSS), poly(acrylicacid) (PAA), poly(glutamic acid) (PGA)	poly(allylaminehydrochloride) (PAH), poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA)	bacteria cell	(Franz, Balkundi et al., 2010)
	poly(styrenesulfonate sodium) (PSS), poly(glutamic acid) (PGA)	poly(lysine) (PLL), poly(dimethyldiallylammonium chloride) (PDDA)	bacteria spore	(Balkundi, Veerabadran et al., 2009)
	poly(styrenesulfonate sodium) (PSS)	poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA)	mammalian cell	(Germain, Balaguer et al., 2006)
Natural PE association	alginate	β-lactoglobulin	yeast cell	(Nguyen, Guyot et al., 2015)
	alginate	chitosan	probiotic bacteria cell	(Cook, Tzortzis et al., 2013)
	carboxymethyl cellulose	chitosan	probiotic bacteria cell	(Priya, Vijayalakshmi et al., 2011)
	dextran sulfate	chitosan	yeast cell	(Thomas, Vaidyanathan et al., 2014)
	fibronectin, collagen	gelatin, laminin	tissue cell	(Matsuzawa, Matsusaki et al., 2013)
Mixed association	silicic acid	poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA)	yeast cell	(Lee, Hong et al., 2015)
	poly(N-vinylpyrrolidone) (PVPON)	Poly(methacrylic acid) containing amino (PMAA-co-NH_2)	yeast cell	(Drachuk, Shchepelina et al., 2012)
	alginate	chitosan-graft-phosphorylcholine, poly-L-lysine-graft-polyethylene glycol	red blood cell	(Mansouri, Merhi et al., 2011)
	hyaluronic acid	poly(lysine) (PLL)	mouse mesenchymal stem cells	(Veerabadran, Goli et al., 2007)

Proteins or colloids have been selected for the first time by Decher et al., (1997) because of their flexible property and because proteins or colloids are expected to be beneficial for many potential applications (Decher, 1997). Albumin, gelatin and β-lactoglobulin are considered as good candidates for layer-by-layer encapsulation (Balkundi, Veerabadran et al., 2009; Nguyen,

Guyot et al., 2015). It has been shown that the nanoparticles prepared with β-lactoglobulin presented stability property in acidic conditions (Gunasekaran, Ko et al., 2007).

Among natural PE recently used for layer-by-layer self-assembly method, chitosan and alginate have been largely used. They can be incorporated together or with others polyelectrolytes. Chitosan is a polycation presenting various advantages such as availability, low cost, high biocompatibility, and ease of chemical modification (Li 1992). The encapsulation of mouse lung fibroblast cells by cellulose acetate and chitosan multilayer shell have shown good compatibility and no cytotoxicity (Li, Li et al., 2012). The presence of LbL shell of chitosan/alginate and chitosan/hyaluronic acid was observed on *E. coli* cells by transmission electron microscopy (Hillberg and Tabrizian, 2006). The authors have demonstrated that the complex of PE multilayers did not affect cellular activity and a second generation of cells was observed. Furthermore, this polycationic polymer was applied on *Saccharomyces boulardii* probiotic in order to improve the cell protection against harsh conditions (Thomas, Vaidyanathan et al., 2014).

Alginate is a polyanionic polyelectrolytes extracted from various species of algae and composed of β-D-mannuronic and α-L-guluronic acids. It is used extensively in cell encapsulation, cell transplantation, and tissue engineering applications because of its simplicity, non-toxicity, biocompatibility and low cost (Rowley, Madlambayan et al., 1999; Krasaekoopt, Bhandari et al., 2003). Diverse utilizations of alginate in combination with others polymers for encapsulation applications are reported in previous reviews (Bhatia, Khattak et al., 2005; Burgain, Gaiani et al., 2011). Therefore, alginate is a good candidate as natural polyanion to be applied for LbL self-assembly. High biodegradability and low cytotoxicity of alginate have been reported (Yang, He et al., 2007). In the work of Mansouri, Merhi et al. (2011, the optimized shell was composed of four bilayers of alginate and chitosan-graft-phosphorylcholine surrounded by two bilayers of alginate and poly-L-lysine-graft-polyethylene glycol resulting in the highest viability and functionality of encapsulated red blood cells (Mansouri, Merhi et al., 2011).

Furthermore, proteins such as albumin, gelatin and β-lactoglobulin are considered as good candidates for layer-by-layer encapsulation (Balkundi, Veerabadran et al., 2009; Nguyen, Guyot et al., 2015). The charge of these biopolymers can be controlled by pH adjusting. Natural polycations are rare (chitosan is largely used as polycation). It has been shown that the nanoparticles prepared with β-lactoglobulin presented stability property in acidic conditions (Gunasekaran, Ko et al., 2007). Moreover, β-lactoglobulin and alginate have been used to encapsulate *Saccharomyces cerevisiae* yeast in order to protect cells against freezing conditions by mean of a cryoprotecting effect (Nguyen, Guyot et al., 2015).

Impact of internal and external factors on shell properties

Shell thickness

Controlled thickness of layers to nanometer scale precision within a range of 5 to 1000 nm is a force advantage of the layer-by-layer method in comparison with others (Ai, Jones et al., 2003). Shell thickness can be adjusted by control of many factors such as pH, salt concentration and polyelectrolyte choice.

The amount of PE layers deposited lead to increase the shell thickness of multilayer shell. The thickness of PLL/hyaluronan multilayer shell increases exponentially with the number of deposited layers during the buildup (Picart, Mutterer et al., 2002). Nguyen et al. (2015) have observed that the multilayer shell of β-lactoglobulin and alginate on *Saccharomyces cerevisiae* yeast presented about 40 nm for the first protein layer and about 190 nm for three natural PE layers using transmitted electron microscope (Nguyen, Guyot et al., 2015). When using PSS/PAH to encapsulate yeast, others authors have found that the shell thickness was about 1.5 nm per layer (Diaspro, Silvano et al., 2002). Moreover, the nature of polyelectrolytes is also a factor modifying shell thickness. Balkundi et al. (2009) have used four synthetic PE in order to construct multilayer shell on *Bacillus subtilis* spore (Balkundi, Veerabadran et al., 2009). The assembly of PSS/PDDA multilayer provided an increment of 2.2 ± 0.2 nm for each bilayer, and the PLL/PGA multilayer processes showed 3.5 ± 0.4 nm for each bilayer.

Furthermore, the thickness of each layer can be adjusted by changing the ionic strength in the solution which is supplied in function of salt concentration (in solution). Thicker film is obtained in accord to higher ionic strength or increase in salt concentration (Schönhoff, 2003; Tang and Besseling, 2016). Alternating adsorption of PSS/PDDA from solutions with ionic strength 0.01 M NaCl and 1 M NaCl resulted in the bilayer growth step variation from 1.6 nm up to 6 nm (Ai, Jones et al., 2003). Buron and Filiâtre (2014) have demonstrated the ejection of chloride when polycation PDDA began to adsorb onto the LbL film containing polyanion PAA (Buron and Filiâtre, 2014). However, the ejection of the counter-ions was higher at low salt concentration (0.001 M NaCl) when compared to high salt concentration (0.1 M NaCl). It means that the interaction between polycation and polyanion is stronger than that of polycation and counter-ions at low salt concentration. Indeed, the linear growth of PSS/PDDA multilayer at low ionic strength (0.001 to 0.01 M NaCl) indicates the amounts added per exposure step are typical for interaction between polyelectrolytes monolayer at solid substrates (Tang and Besseling, 2016). At high ionic strength (0.5 to 1 M NaCl), the system are more fluid and the PE can be able penetrate the whole film resulting an increase in PE amount adsorption and thickness (figure 2).

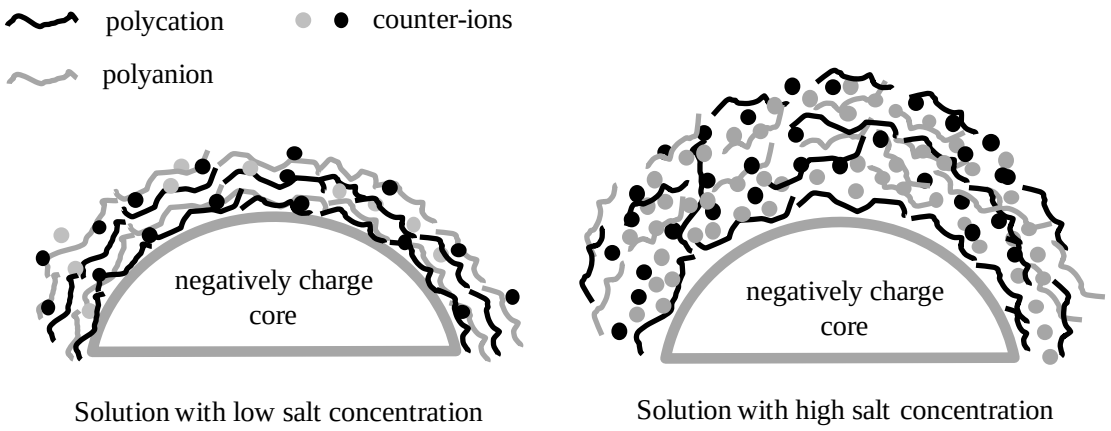


Figure 2. Multilayer shell thickness in function of salt concentration

Stability of polyelectrolyte multilayer shells

The polyelectrolyte shells could be instable in certain unfavorable conditions. The dissolution of the layer complex has been reported in a previous review (Schönhoff, 2003). Therefore good stability property in different environments during long time is required.

Electrostatic interactions are considered as the main intrinsic interactions between the different polyelectrolyte molecules and themselves with the encapsulated core. These interactions of the system yeast/β-lactoglobulin/alginate have been characterized by FTIR spectroscopy (Nguyen, Guyot et al., 2015). Moreover, other attractive interactions can also contribute to the stability of the layers, such as hydrophobic interactions between polymer segments (Tedeschi, Möhwald et al., 2001; Schönhoff, 2003).

The negative charge of polyanion is occupied by sulfate groups or carbonate group. Amino- and imino- groups are responsible for positively charged cationic polymers (Ai, Jones et al., 2003; Nguyen, Guyot et al., 2015). The efficiency of multilayer formation in PE complexes relies on their opposite charges which are related to degree of ionization in solution. The selected pH plays a role in maintaining high degree of polyion ionization (Ai, Jones et al., 2003). In the case of charge strength depending on the isoelectric point of polymers, i.e. proteins, pH of solution has been always kept at value where ionization degree is optimal. It has been reported that the cross-linking density in weak polyeletrolyte multilayer formation is optimized at a pH value close to the pKa of the polyions involved (Buron and Filiâtre ,2014). Variation of external pH results in an excess of charge level leading to change in shell morphology, thickness and permeability (Schönhoff, 2003). Therefore the release of encapsulated cells or active molecules can be controlled by pH modification.

The shell stability can be improved by increasing the number of deposited layers. This strategy has been used in the study of Kahraman et al. (2009) (Kahraman, Zamaleeva et al., 2009). The bacteria cell wall wass coated with PAH, a positively charged polymer, and then with citrate reduced Au or AgNPs. The stability of the coating wass performed by the preparation of another layer of PAH at the surface of shell. Furthermore, chemical cross-linking method using glutaraldehyde (GA)-amine reaction has been studied in order to improve the stability of LbL shells constructed by weak polyelectrolytes PAH and PAA (Tuong, Lee et al., 2008). It has been demonstrated that inherent morphology was fixed and the adhesion and mechanical strength of the system wass improved by this covalent reaction. The surface property of the polyelectrolyte films wass altered and converted from hydrophilic to hydrophobic by chemical modification.

Permeability of polyelectrolyte multilayer shells

It is required that multilayer shells possess a selective permeability in order to preserve cell functionality and metabolism. In a previous review, it has been reported that the multilayer shell permeability can be influenced by many factors such as shell thickness, ionic strength, charge of a permeating molecule and temperature treatment (Antipov, Sukhorukov et al., 2002; Antipov and Sukhorukov, 2004).

The regulation of external pH allows PE multilayer shell wall permeability to macromolecules, such as water-soluble polymers and proteins (Sukhishvili, 2005). This result can be explained by shell porosity changes in function of pH. It has been shown that the capsules prepared by sodium poly(styrene sulfonate) and poly(allylamine hydrochloride) onto melamine formaldehyde particules are closed at a pH value of 8 and higher, but at a pH lower than 6 macromolecules permeate into the capsule interior (Antipov, Sukhorukov et al., 2002). It has been demonstrated that pH-responsive shells can lead to delay the growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeast when pH is above the isoelectric point of the amino-containing copolymer of methacrylic acid (PMAAco-NH_2) (Drachuk, Shchepelina et al., 2012).

As described above, high ionic strength leads to increase shell thickness because it become more fluid. Thus, high salt concentration enhances shell permeability (Sukhishvili, 2005). However, an increase in shell thickness by increasing the number of layers deposited can cause the decrease in molecule penetration (Kilan and Warszyński, 2014). Moreover, temperature can affect the shell permeability. Quinn and Caruso (2004) tested the effect of temperature (from 21 to 50 °C) on loading and release capacity of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)/poly(acrylic acid) film prepared by LbL method with Rhodamine B dye. The authors have shown that dye adsorption and release capacity is enhanced at elevated temperature

(Quinn and Caruso, 2004). The impacts of internal and external factors on shell properties are illustrated in figure 3.

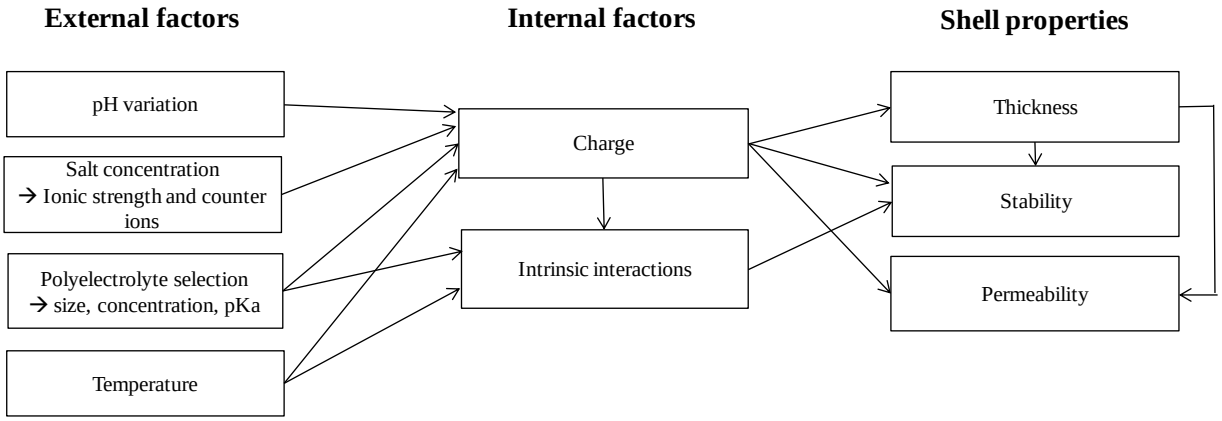


Figure 3. Impacts of internal and external factors on shell properties

Protection of natural polyelectrolyte shell on living cells

One of intention of LbL technique is the protection of individual living cells by micro-organized shells against harsh conditions keeping cell viability and functionality after encapsulation. In the past years, many studies have contributed to this topic.

Many authors have demonstrated that single living yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* encapsulated by layer-by-layer method preserve their metabolic activities and that they are still able to divide (Diaspro, Silvano et al., 2002; Krol, Cavalleri et al., 2003; Mansouri, Merhi et al., 2011; Drachuk, Shchepelina et al., 2012; Gu, Wang et al., 2013; Nguyen, Guyot et al., 2015). In agreement with these studies, other authors has also found that the artificial shells does not kill cells remaining still metabolically active after encapsulation (Krol, Nolte et al., 2005). Duplication capacity of yeast cells after encapsulation has been reported (Nguyen, Guyot et al., 2015).

Thanks to the advantages of natural PE, as already discussed in previous section (§ 2.3), biopolymer are considered as good candidate for protection of living cells using LbL method. Protection by micro-organized shells under harsh conditions is one of the intentions of LbL method application. The better protection of cell using natural PE has been demonstrated as compared to synthetic PE (Matsuzawa, Matsusaki et al., 2013).

Multilayer shell of alginate and chitosan has been used in order to improve the survival of *Bifidobacterium breve* during exposure to *in vitro* gastric condition at pH 2 (Cook, Tzortzis et al., 2013). This improved the viability from 3 log(CFU) per mL, measured for free cells, up to maximum of 8.84 log(CFU) per mL with 3 layer coated bacteria cells. Multilayer-coated

alginate/chitosan matrices also showed a targeted delivery to the intestine; with a gradual release of their loads over 240 min. For the same objective, LbL shell of chitosan and carboxymethyl cellulose has been used to enhance the survival of *Lactobacillus acidophilus* in adverse condition of simulated gastric and intestinal fluids (Priya, Vijayalakshmi et al., 2011). The encapsulated cells with 3 layers presented about 33 % log of the cells survived when comparing with almost complete death of free cells. The authors suggested that the enhanced survival rate of encapsulated *Lactobacillus acidophilus* can be attributed to the impermeability of polyelectrolyte nanolayers to large enzyme molecules like pepsin and pancreatin that cause proteolysis and to the stability of the PE nanolayers in gastric and intestinal pH conditions. LbL technique has been also applied on *Saccharomyces boulardii* probiotic. The chitosan and dextran sulfate shells protected cells from degradation during the gastrointestinal tract (Thomas, Vaidyanathan et al., 2014). In the context of enzymatic resistance, it has been demonstrated that the encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* can survive the attack of lytic enzyme such as zymolyase (Wang, Liu et al., 2008). The resistance of cells to enzymatic degradation has been also observed for mammalian cells (HeLa cell) that are individually encapsulated in silica (Lee, Choi et al., 2014). Results obtained have shown that silica shell enhanced the resistance of the HeLa cells to trypsin attack.

Furthermore, PE multilayer shell can be used to protect cell from physical (gravity) and mechanical (dehydration) stress. A significantly higher viability (> 85 %) of hepatocyte carcinoma cell achieved under extreme physical conditions (10000 rpm) was observed after nine steps of LbL assembly using fibronectin-gelatin or collagen-laminin (Matsuzawa, Matsusaki et al., 2013). In that study, the protective effects of LbL were strongly dependent on their thickness (critical thickness > 5 nm). Recently, two natural polyelectrolytes, β-lactoglobulin and alginate have been used to encapsulate *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. The resistance of encapsulated cells against freezing treatment in combination or not with chemical such as H_2O_2 and ethanol has been also described (Nguyen, Guyot et al., 2015). The protection has been checked when the cells were submitted to freeze-drying conditions. Authors have shown that during freeze-drying, the encapsulated yeast cells had enhanced viability by comparison to control (Priya, Vijayalakshmi et al., 2011; Thomas, Vaidyanathan et al., 2014).

Conclusion

Layer-by-layer is based on the alternating exposure of a charged substrate to solutions of positive or negative polyelectrolytes. Natural polyelectrolytes are more advantageous than synthetic polyelectrolytes because of their good biocompatibility, biodegradability and low toxicity. This technique represents several potential interests when comparing with others

techniques in encapsulation field. The principal properties of multilayer shell such as thickness, stability and permeability are related to internal factors and can be controlled and adjusted by different external factors in order to response to various intentions. Protection of multilayer shell on individual cell against harsh conditions is one of those intentions. In the light of literature, natural polyelectrolytes are considered as good material for cell protection in gastric conditions and against several physical and mechanical stresses.

References

Adamczyk, Z., B. Jachimska, et al. (2009). "Structure of poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) in electrolyte solutions: Theoretical modeling and measurements." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **343**(1–3): 96-103.

Ai, H., S. Jones, et al. (2003). "Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles." Cell Biochemistry and Biophysics **39**(1): 23-43.

Antipov, A. A. and G. B. Sukhorukov (2004). "Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability." Advances in Colloid and Interface Science **111**(1–2): 49-61.

Antipov, A. A., G. B. Sukhorukov, et al. (2002). "Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **198–200**: 535-541.

Balkundi, S. S., N. G. Veerabadran, et al. (2009). "Encapsulation of Bacterial Spores in Nanoorganized Polyelectrolyte Shells." Langmuir **25**(24): 14011-14016.

Beker, M. and A. Rapoport (1987). Conservation of yeasts by dehydration. Biotechnology Methods, Springer Berlin Heidelberg. **35:** 127-171.

Bhatia, S. R., S. F. Khattak, et al. (2005). "Polyelectrolytes for cell encapsulation." Current Opinion in Colloid & Interface Science **10**(1–2): 45-51.

Burgain, J., C. Gaiani, et al. (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications." Journal of Food Engineering **104**(4): 467-483.

Buron, C. C. and C. Filiâtre (2014). "Overshoots of adsorption kinetics during layer-by-layer polyelectrolyte film growth: Role of counterions." Journal of Colloid and Interface Science **413**: 147-153.

Cook, M. T., G. Tzortzis, et al. (2013). "Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration." Journal of Materials Chemistry B **1**(1): 52-60.

de Villiers, M. M., D. P. Otto, et al. (2011). "Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly." Advanced Drug Delivery Reviews **63**(9): 701-715.

Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." Science **277**: 1232-1237.

Decher, G., J. D. Hong, et al. (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." Thin Solid Films **210–211, Part 2**: 831-835.

Decher, G., Y. Lvov, et al. (1994). "Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films." Thin Solid Films **244**(1–2): 772-777.

Diaspro, A., D. Silvano, et al. (2002). "Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells." Langmuir **18**(13): 5047-5050.

Drachuk, I., O. Shchepelina, et al. (2012). "pH-Responsive Layer-by-Layer Nanoshells for Direct Regulation of Cell Activity." ACS Nano **6**(5): 4266-4278.

Driks, A. (2002). "Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat." Trends in Microbiology **10**(6): 251-254.

França, M. B., A. D. Panek, et al. (2007). "Oxidative stress and its effects during dehydration." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **146**(4): 621-631.

Franz, B., S. S. Balkundi, et al. (2010). "Layer-by-Layer Nano-Encapsulation of Microbes: Controlled Cell Surface Modification and Investigation of Substrate Uptake in Bacteria." Macromolecular Bioscience **10**(2): 164-172.

Germain, M., P. Balaguer, et al. (2006). "Protection of mammalian cell used in biosensors by coating with a polyelectrolyte shell." Biosensors and Bioelectronics **21**(8): 1566-1573.

Gharsallaoui, A., G. Roudaut, et al. (2007). "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview." Food Research International **40**(9): 1107-1121.

Gu, X., J. Wang, et al. (2013). "Layer-by-layer assembled polyaspartamide nanocapsules for pH-responsive protein delivery." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **108**: 205-211.

Gunasekaran, S., S. Ko, et al. (2007). "Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications." Journal of Food Engineering **83**(1): 31-40.

Guyot, S., E. Ferret, et al. (2006). "Yeast Survival during Thermal and Osmotic Shocks Is Related to Membrane Phase Change." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(22): 8450-8455.

Hillberg, A. L. and M. Tabrizian (2006). "Biorecognition through Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly: In-Situ Hybridization on Living Cells." Biomacromolecules **7**(10): 2742-2750.

Hong, D., M. Park, et al. (2013). "Artificial spores: cytoprotective nanoencapsulation of living cells." Trends in Biotechnology **31**(8): 442-447.

Kahraman, M., A. I. Zamaleeva, et al. (2009). "Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering." Analytical and Bioanalytical Chemistry **395**(8): 2559-2567.

Kang, A., J. Park, et al. (2014). "Cell encapsulation via microtechnologies." Biomaterials **35**(9): 2651-2663.

Kilan, K. and P. Warszyński (2014). "Thickness and permeability of multilayers containing alginate cross-linked by calcium ions." Electrochimica Acta **144**: 254-262.

Krasaekoopt, W., B. Bhandari, et al. (2003). "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt." International Dairy Journal **13**(1): 3-13.

Krol, S., O. Cavalleri, et al. (2003). "Encapsulated yeast cells inside Paramecium primaurelia: a model system for protection capability of polyelectrolyte shells." Journal of Microscopy **212**(3): 239-243.

Krol, S., M. Nolte, et al. (2005). "Encapsulated Living Cells on Microstructured Surfaces." Langmuir **21**(2): 705-709.

Lee, H., D. Hong, et al. (2015). "Layer-by-Layer-Based Silica Encapsulation of Individual Yeast with Thickness Control." Chemistry – An Asian Journal **10**(1): 129-132.

Lee, J., J. Choi, et al. (2014). "Cytoprotective Silica Coating of Individual Mammalian Cells through Bioinspired Silicification." Angewandte Chemie International Edition **53**(31): 8056-8059.

Li, Q. a. D., E.T. and Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A. (1992). "Applications and Properties of Chitosan." Journal of Bioactive and Compatible Polymers **7**: 370-397.

Li, W., X. Li, et al. (2012). "Nanofibrous mats layer-by-layer assembled via electrospun cellulose acetate and electrosprayed chitosan for cell culture." European Polymer Journal **48**(11): 1846-1853.

Mansouri, S., Y. Merhi, et al. (2011). "Investigation of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes on Fully Functional Human Red Blood Cells in Suspension for Attenuated Immune Response." Biomacromolecules **12**(3): 585-592.

Matsuzawa, A., M. Matsusaki, et al. (2013). "Effectiveness of Nanometer-Sized Extracellular Matrix Layer-by-Layer Assembled Films for a Cell Membrane Coating Protecting Cells from Physical Stress." Langmuir **29**(24): 7362-7368.

Nedovic, V., A. Kalusevic, et al. (2011). "An overview of encapsulation technologies for food applications." Procedia Food Science **1**: 1806-1815.

Nguyen, T. D., S. Guyot, et al. (2015). "Protection of living yeast cells by micro-organized shells of natural polyelectrolytes." Process Biochemistry **50**(10): 1528-1536.

ÖZer, B., Y. S. Uzun, et al. (2008). "Effect of Microencapsulation on Viability of Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium bifidum BB-12 During Kasar Cheese Ripening." International Journal of Dairy Technology **61**(3): 237-244.

PARK Jaejung, C. Y.-W., KIM Kyungbae, CHUNG Hoed, SOHN Daewon (2008). "Aggregation Processes of a Weak Polyelectrolyte, Poly(allylamine) Hydrochloride." Korean Chemical Society **29**: 104-110.

Park, J. K. and H. N. Chang (2000). "Microencapsulation of microbial cells." Biotechnology Advances **18**(4): 303-319.

Pham-Hoang, B. N., C. Romero-Guido, et al. (2013). "Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(15): 6635-6645.

Picart, C., J. Mutterer, et al. (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(20): 12531-12535.

Priya, A. J., S. P. Vijayalakshmi, et al. (2011). "Enhanced Survival of Probiotic Lactobacillus acidophilus by Encapsulation with Nanostructured Polyelectrolyte Layers through Layer-by-Layer Approach." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(21): 11838-11845.

Quinn, J. F. and F. Caruso (2004). "Facile Tailoring of Film Morphology and Release Properties Using Layer-by-Layer Assembly of Thermoresponsive Materials." Langmuir **20**(1): 20-22.

Rathore, S., P. M. Desai, et al. (2013). "Microencapsulation of microbial cells." Journal of Food Engineering **116**(2): 369-381.

Rowley, J. A., G. Madlambayan, et al. (1999). "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials." Biomaterials **20**(1): 45-53.

Schönhoff, M. (2003). "Self-assembled polyelectrolyte multilayers." Current Opinion in Colloid & Interface Science **8**: 86-95.

Sukhishvili, S. A. (2005). "Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly." Current Opinion in Colloid & Interface Science **10**(1–2): 37-44.

Sukhorukov, G. B., H. Möhwald, et al. (1996). "Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations." Thin Solid Films **284–285**: 220-223.

Tang, K. and N. A. M. Besseling (2016). "Formation of polyelectrolyte multilayers: ionic strengths and growth regimes." Soft Matter **12**(4): 1032-1040.

Tedeschi, C., H. Möhwald, et al. (2001). "Polarity of Layer-by-Layer Deposited Polyelectrolyte Films As Determined by Pyrene Fluorescence." Journal of the American Chemical Society **123**(5): 954-960.

Thomas, M. B., M. Vaidyanathan, et al. (2014). "Enhanced viability of probiotic Saccharomyces boulardii encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes." Journal of Food Engineering **136**: 1-8.

Tuong, S. D., H. Lee, et al. (2008). "Chemical fixation of polyelectrolyte multilayers on polymer substrates." Macromolecular Research **16**(4): 373-378.

Veerabadran, N. G., P. L. Goli, et al. (2007). "Nanoencapsulation of Stem Cells within Polyelectrolyte Multilayer Shells." Macromolecular Bioscience **7**(7): 877-882.

Wang, B., P. Liu, et al. (2008). "Yeast Cells with an Artificial Mineral Shell: Protection and Modification of Living Cells by Biomimetic Mineralization." Angewandte Chemie International Edition **47**(19): 3560-3564.

Yang, Y., Q. He, et al. (2007). "Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application." Biomaterials **28**(20): 3083-3090.

Zamaleeva, A. I., I. R. Sharipova, et al. (2010). "Polyelectrolyte-Mediated Assembly of Multiwalled Carbon Nanotubes on Living Yeast Cells." Langmuir **26**(4): 2671-2679.

3. Contexte, objectifs et stratégies

Concernant les travaux scientifiques de notre équipe, l'étude de l'adaptation des microorganismes (probiotiques, levures,…) aux stress environnementaux est un sujet d'approfondissement ces dernières années. En effet, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est une des cibles pour étudier les réponses cellulaires aux stress car elle est un organisme eucaryote modèle pour l'étude des mécanismes biologiques fondamentaux et joue un rôle clé en ce qui concerne notamment la stabilité oxydative des produits fermentés ou des milieux modèles. La levure est soumise à de nombreux stress qui peuvent affecter sa viabilité ou entraîner des modifications de son métabolisme. Il est donc essentiel de chercher les solutions pour protéger les cellules de levure de leur environnement.

De par les compétences à mettre en œuvre (microbiologie, biotechnologie, physico-chimie), ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une action transversale de l'unité PAM. Il s'agit de réunir des compétences récentes développées par les équipes constitutives de l'unité (notamment PMB et PAPC). La démarche proposée s'inscrit dans un travail de compréhension des mécanismes de structuration d'assemblages macromoléculaires et de réponse cellulaire au stress.

Les objectifs scientifiques de la thèse sont d'une part de comprendre les phénomènes d'adaptation de la levure (métabolisme du glutathion, biochimie de la cellule) en réponse aux conditions de l'environnement dans des systèmes modèles et d'autre part, l'étude des interactions avec et entre biopolymères ioniques afin de former une barrière protectrice autour des cellules. Donc, deux modes de protection de la levure sont envisagés : la protection intracellulaire (enrichissement en molécules antioxydantes glutathion) et la protection extracellulaire (construction d'une barrière de biopolymères).

La stratégie développée a mis en œuvre des compétences doubles à la fois en biochimie cellulaire et en physicochimie des biopolymères et a comporté les étapes suivantes:

1- Étude des conditions de culture permettant d'obtenir des levures riches en glutathion

Les levures sont cultivées en milieux modèles liquides en présence et en absence des précurseurs de la biosynthèse du glutathion permettant la synthèse de glutathion par réaction de protection de la cellule.

2- Étude de la complexation de polyélectrolytes à l'interface de cellules de levure

Un système de polyélectrolytes de charges opposées biocompatibles composé d'alginate de sodium (polyoside anionique) et de protéines (β-lactoglobuline) est utilisé afin d'encapsuler la levure par la méthode LbL. Les conditions d'interaction entre les biopolymères et les cellules

sont évaluées par la mesure du potentiel zéta et la formation des complexes autour des cellules sera suivie par différentes techniques microscopique (microscopies électroniques) et spectroscopique (FTIR).

3- Effet du complexe de biopolymères sur la protection de la levure

Les levures encapsulées et non encapsulées sont placées dans des conditions de stress. La survie cellulaire est mesurée et le métabolisme de la levure est évalué par dosage du glutathion. L'activité de l'enzyme glutathion réductase est également mesurée.

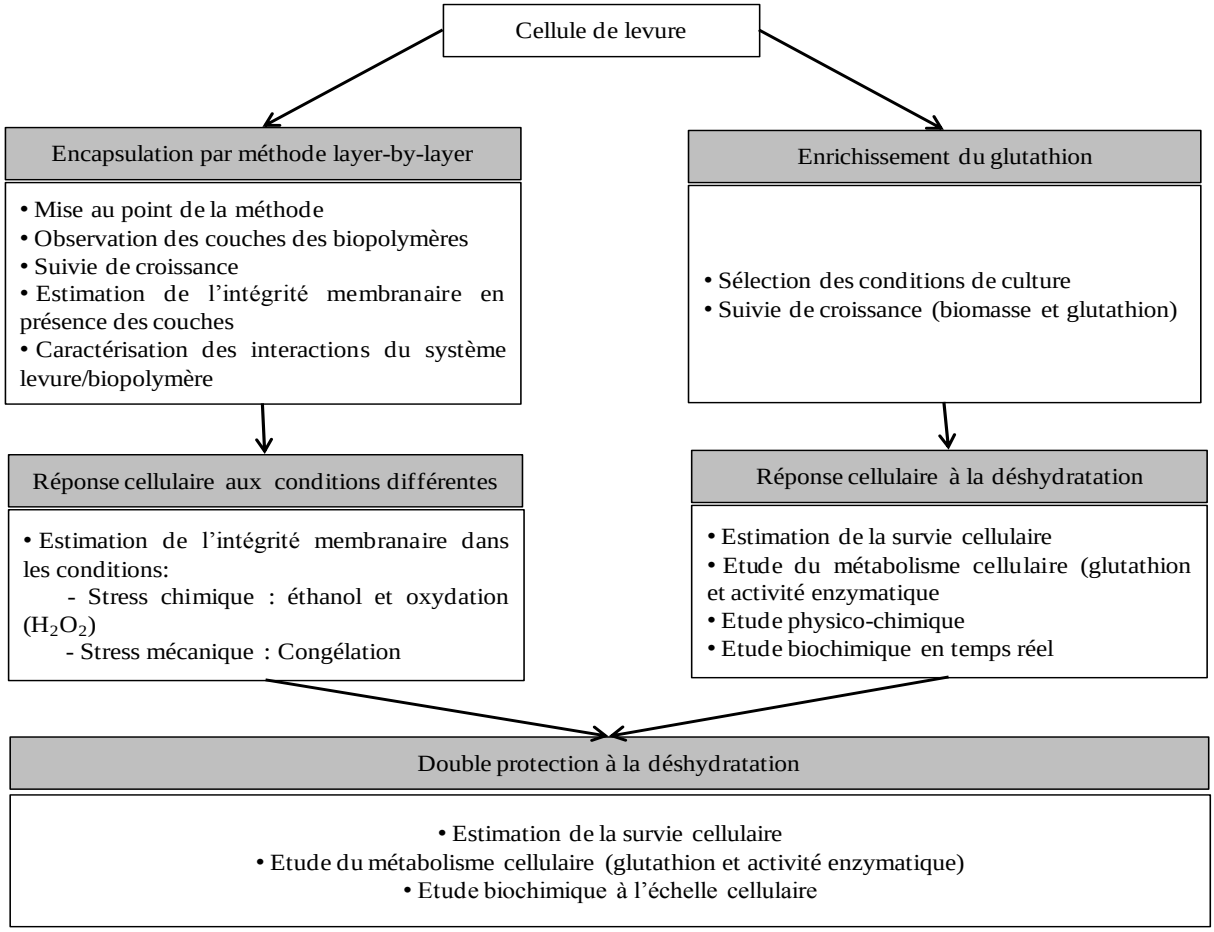


Figure 14. Méthodologie générale de la démarche opératoire

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Souche de levure et conditions de culture

1.1. Souches de levure

La souche diploïde de levure *Saccharomyces cerevisiae* CSB 8066 (de Voor SchimmelBaam & Delft, Holland) a été utilisée comme modèle pour la première étape concernant la mise au point des protocoles de micro-encapsulation et d'enrichissement en glutathion.

La souche haploïde *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf, Frankurt, Allemagne) et deux souches mutées en *gsh1* (ΔGSH1) et *gsh2* (ΔGSH2) (Euroscarf, Frankurt, Allemagne) ont été également utilisées pour la sélection d'une souche fragile à la déshydratation.

1.2. Conditions de culture

La levure a été d'abord inoculée dans 50 mL de milieu de pré-culture dans un erlenmeyer de 250 mL sous agitation à 140 rpm (Lab Shaker, Adolf Kühner AG Schweiz, avec l'ambitude d'orbital de 27 mm) et à 30 °C pendant 24 heures. Puis, les cellules ont été centrifugées et le culot inoculé dans 50 mL de milieu de culture avec une DO à 600 nm au départ égale à 0,2 dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avant utilisation. Différents milieux de culture ont été utilisés en fonction des manipulations.

Pour l'étape de la mise au point des protocoles de micro-encapsulation et d'enrichissement du glutathion, un milieu de pré-culture contenant 20 g/L de glucose, 20 g/L de peptone et 10 g/L d'extrait de levure a été utilisé. Au cours de cette étape, le milieu de culture contenant 10 g/L glucose, 20 g/L peptone et 10 g/L d'extrait de levure a été utilisé pour les manipulations de micro-encapsulation. Pour les manipulations concernant la sélection des milieux favorables à l'enrichissement du glutathion, les quatre milieux de culture suivants ont été utilisés (tableau 3). Le milieu le plus favorable et nommé G+ (GSH1) a été retenu. Ce milieu se compose de 30 g/L de Glucose, 30 g/L d'Extrait de levure, 0,6 g/L de KH_2PO4 et 0,6 g/L de L-cystéine. Le milieu témoin (G-) pauvre en nutriment contient 30 g/L de Glucose, 3 g/L d'Extrait de levure et 0,6 g/L de KH_2PO4.

Le milieu YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) a été utilisé pour la méthode de dénombrement de colonies sur milieu gélosé. Il contient 20 g/L de Glucose, 10 g/L d'Extrait de levure, 20 g de peptone et 16 g d'Agar-agar.

Tous les milieux ont été stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes avant utilisation.

1.3. Sélection du milieu favorable pour l'enrichissement en glutathion

L'objectif de cette partie est de sélectionner un milieu et des conditions de culture favorisant la synthèse du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La souche CBS 8066 a été utilisée comme modèle. D'après la bibliographie, la composition des milieux choisis est représentée dans le tableau 3.

Tableau 3. Composition des milieux sélectionnés d'après la littérature qui favorisent la production du glutathion chez la levure.

Quantité par litre

Nom	GSH1 (Jae-Young Cha et al., 2004)	GSH2 (Wen et al., 2005)	GSH3 (Saharan et al., 2010)	YPD
Glucose	30 g	32 g	90 g	10 g
Urée		1,3 g		
KH_2PO_4	0,6 g	6 g		
$MgSO_4$		0,5 g		
Biotine		0,00001 g		
Calcium panthenate		0,00002 g		
Pyridoxine		0,0002 g		
$ZnSO_4$		0,010 g		
$FeSO_4$		0,012 g		
$CuSO_4$		0,012 g		
$MnSO_4$		0,010 g		
Extrait de levure	30 g			10 g
L-Cystéine	0,6 g		2,423 g	
Peptone				20 g
$MgCl_2$			2,033 g	
A.glutamique			3,284 g	
Glycine			1,502 g	

En outre, une stratégie d'addition de précurseurs supplémentaires au cours de la fermentation a été également appliquée. Les concentrations des précurseurs et le temps auquel a été réalisée l'addition est représentée dans le tableau 4. Les levures ont été incubées sous agitation à 140 rpm. La concentration du glutathion intracellulaire et la biomasse ont été considérées comme réponses principales pour choisir les conditions favorables

Tableau 4. Concentrations et temps d'addition des précurseurs au cours de la fermentation.

Précurseurs	Concentration	Temps d'addition
Cystéine	2 mM	Après 2 heures
Acide glutamique	10 mM	Après 7 heures
Glycine	18 mM	
Cystéine	3,35 mM	

La sélection des conditions favorables a été effectuée grâce à un plan d'expériences. Les levures ont été cultivées dans quatre milieux différents. Pour chaque milieu, l'addition des précurseurs a été effectuée ou pas. Concernant l'addition des précurseurs supplémentaires, la cystéine a d'abord été rajoutée après deux heures (après la phase log) de fermentation pour augmenter la synthèse du glutathion. Ensuite, trois acides aminés : cystéine, glutamate et glycine ont été rajoutés après 7 heures de fermentation (début la phase stationnaire). De plus, la modulation de température a été réalisée pour tester l'enrichissement du glutathion. Pendant les huit premières heures de fermentation, la température a été réglée à 30 °C pour la production de biomasse et ensuite à 26 °C pour la production du glutathion. Une production de biomasse sans modulation de température a été réalisée comme témoin. Le résumé du plan d'expériences est représenté dans le tableau 5.

Tableau 5. Plan d'expériences pour la sélection des conditions favorables à l'enrichissement du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae.* YPD, GSH1, GSH2 et GSH3 sont quatre milieux de culture cellulaire. P- et P+ indiquent sans ou avec l'addition des précurseurs supplémentaires. T- et T+ indiquent sans ou avec la modulation de température

YPD	GSH1	GSH2	GSH3
P + T +	P + T +	P + T +	P + T +
P + T -	P + T -	P + T -	P + T -
P - T +	P - T +	P - T +	P - T +
P - T -	P - T -	P - T -	P - T -

2. Encapsulation des levures par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer)

2.1. Préparation des biopolymères

L'alginate de sodium est fourni par Fisher Scientific. Avant utilisation, ce polysaccharide a été est purifié par le protocole suivant. Une solution de $CaCl_2$ a été ajoutée lentement dans la solution d'alginate de sodium à la concentration initiale à 4 % (m/m) pour créer un gel. Puis, la partie qui n'a pas été gélifiée a été enlevée par lavage dans l'eau distillée. Le gel a été aussi lavé dans l'eau distillée et suspendue dans la solution d'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA). Ensuite, la solution a été dialysée contre une solution saline de NaCl 0,1 M et de l'eau distillée pendant quatre jours. La solution a été congelée et enfin lyophilisée. L'alginate purifié a été conservé au congélateur à -18 °C avant utilisation.

La protéine β-lactoglobuline (> 90% purifiée) est fournie par Sigma-Aldrich. Une solution mère protéique de 0,5% (m/m) a été préparée dans un tampon acétate 10 mM à pH 3,8-4,0. Elle a été agitée doucement pendant deux heures à température ambiante puis filtrée sur filtre de 0,2 µm de taille de pores afin d'éliminer la partie non soluble. Cette solution filtrée peut être conservée à 4 °C avant utilisation.

2.2. Protocole de micro-encapsulation par la méthode layer-by-layer

En respectant les conditions favorisant les interactions entre la levure et les biopolymères, le tampon acétate de pH 3,8 a été utilisé. Le protocole d'encapsulation est représenté dans la figure 13. Après 24 heures de culture, les cellules ont été lavées puis suspendues dans le tampon acétate pH 3,8. La DO de la suspension cellulaire a été mesuré pour calculer le volume à ajouter dans les solutions de biopolymères. La concentration cellulaire finale a été fixée à 4.10^7 cellules/mL. Les solutions de β-lactoglobuline et d'alginate ont été préparées pour l'encapsulation. Les cellules de levure ont d'abord été immergées dans la solution de β-lactoglobuline à 0,1 % (v/v). Le mélange a été maintenu sous agitation (200 rpm) pendant vingt minutes à température ambiante afin d'atteindre une adsorption maximale. Puis, le mélange levures/β-lactoglobuline a été lavé deux fois avec le tampon acétate pour éliminer les protéines qui n'ont pas été adsorbées. Ensuite, les cellules ont été encapsulées par la deuxième couche d'alginate à 0,01% (v/v) et enfin la troisième couche de protéine de la même manière. Des lavages dans le tampon acétate ont été effectués entre les étapes. Dans ce travail, trois couches de biopolymères ont été déposées sur les cellules pour tester la protection.

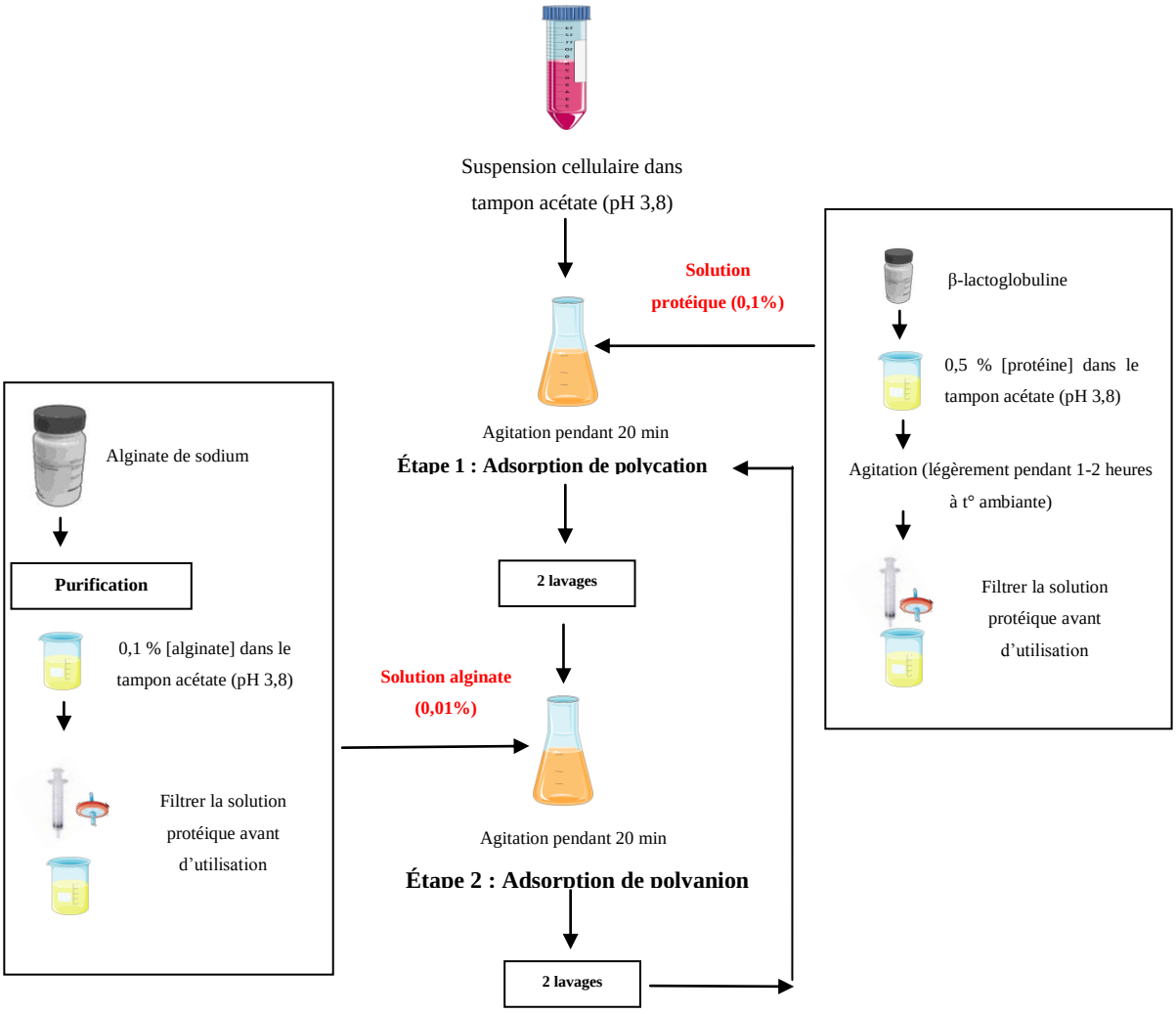


Figure 15. Protocole d'encapsulation par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer)

3. Caractérisation de l'encapsulation

3.1. Mesure de potentiel zéta

La mobilité électrophorétique μ des cellules de levure et des polyélectrolytes est mesurée par un zétamètre ZetaCompact ® de la societé CAD instruments. La mesure se fait dans un canal en quartz rectangulaire (5 x 2 x 70 mm). En appliquant un champ électrique, la particule chargée négativement se déplace vers l'anode et inversement pour celles chargées positivement. Le potentiel ζ des particules est calculé grâce à la mobilité μ en utilisant la loi de Smoluchowski (Senée et al., 2001).

3.2. Observations Microscopiques

Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission a été utilisée afin d'observer la présence des biopolymères autour des levures et de mesurer l'épaisseur des couches. Les cellules encapsulées ont été immédiatement suspendues dans une solution de fixation contenant le tampon acétate, 3% (v/v) de glutaraldéhyde et 2% (v/v) de paraformaldéhyde. La fixation a été réalisée pendant quatre heures à 4 °C. Les cellules ont été ensuite lavées plusieurs fois et le culot cellulaire a été mis dans une solution d'agarose à 2,25% (m/v). Les blocs de cellules dans l'agarose ont été formés et ont été traitées dans 0,5% de tetroxyde d'osmium dans de l'eau pendant une heure à température ambiante. Les cellules ont été ensuite déshydratées progressivement dans une série de solution d'éthanol dans l'eau à 30%, 70%, 90%, 100% et d'oxyde de propylène. Elles ont été ensuite fixées dans une résine l'EPON. Les échantillons ont été coupés par l'Ultracut E ultramicrotome (Reichert, Depew, New York, États-Unis) en section fine de 90 nm. Avant l'observation sous le microscope Hitachi H7500 à 80 kV, ces échantillons ont été contrastés dans 2% l'acétate d'uranyle. Le microscope est équipé d'une caméra AMT connecté avec le logiciel AMT V542 (AMT, Danvers, États-Unis).

Microscopie électronique en transmission couplée avec l'immunomarquage

La microscopie électronique en transmission couplée à un immunomarquage a été utilisée afin d'identifier la présence de la β-lactoglobuline déposée autour des cellules. La fixation a été réalisée dans le tampon acétate pH 3,8 avec 0,5% (v/v) de glutaraldéhyde et 2% (v/v) de paraformaldéhyde pendant une heure à 4 °C. Après la fixation, les cellules ont été ensuite traitées avec du 2% chlorure d'ammonium dans de l'eau pendant 30 minutes. Les cellules ont été centrifugées et puis incluses dans de l'agarose à 2,25%. Après la déshydratation progressive en utilisant une série de solution d'éthanol comme décrit précédemment, les cellules ont été centrifugées puis incluses dans la résine LR White à basse température (-19 °C). Une solution de benzoate de méthyle à 0,5% (v/v) a été rajoutée et les échantillons ont été polymérisés à -19 °C pendant 48 heures puis pendant trois heures à 10 °C sous une lampe UV. Les sections ultrafines de 90 nm ont été faites par Ultracut E ultramicrotome et déposées sur des grilles en nickel. Pour l'immunomarquage, les grilles ont été traitées dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,2 dans lequel 0,1% de glycine a été rajouté. Cette étape a été réalisée pendant 15 minutes pour inactiver les groupements aldéhyde disponibles. Une solution contenant 0,5% (m/v) de sérum albumine bovine (BSA), 0,1% (m/v) de gélatine de poisson (solution de fixation Aurion) et 10% (m/v) de normal goat serum est ajoutée pendant 30 minutes. La solution a été ensuite lavée dans le tampon Tris contenant 0,5% (m/v) de BSA acétylée pendant une heure à température ambiante. Les

grilles sont ensuite incubées dans une solution contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/25^{e} dans le tampon Tris contenant 0,5% de BSA pendant une heure à température ambiante. Les grilles ont été contrastées dans l'acétate d'uranyle puis examinées au microscope Hitachi H7500 à 80 kV.

Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour observer la surface des levures encapsulées. Les cellules ont été fixées dans le tampon acétate pH 3,8 contenant 2,5% (v/v) de glutaraldéhyde. Puis, les échantillons ont été déshydratés dans 30%, 50% et 70% d'éthanol pendant 15 minutes par étape. Après la déshydratation complète dans 100% d'éthanol, le point critique de CO_2 a été réalisé par Critical Point Dryer 030 (Leica, Nanterre, France). Les échantillons ont été mis sur les lamelles qui ont été couvertes par une couche de carbone (Cressington, Eloise, Roissy, France). Les grilles ont été examinées en utilisant le microscope Jeol JSM7600F FEG-SEM (Jeol, Tokyo, Japan) à 2 kV.

3.3. Caractérisation des interactions du système levure/biopolymères par ATR-FTIR

La spectroscopie ATR-FTIR a été utilisée pour caractériser les interactions entre les levures et la protéine β-lactoglobuline seule (une couche déposée), avec le mélange de β-lactoglobuline/alginate (deux couches déposées) et pour caractériser les interactions entre les deux biopolymères. Environ 20 µL d'échantillon ont été déposés sur un hémisphère transparent en ZnSe dans la chambre de l'appareil pendant cinq minutes à 22 °C avant l'observation. La température a été régulée par une circulation d'eau dans une double enveloppe autour de la chambre. L'acquisition des spectres a été réalisée entre 4000 et 900 cm^{-1} en utilisant le spectrophotomètre Vector 22 Bruker (Karlsruhe, Allemand) avec une unité de Bio-ATR II équipée d'un détecteur en mercure-cadmium-telluride. La résolution spectrale a été déterminée à 4 cm^{-1}. Pour chaque échantillon, 10 scans ont été programmés pour acquérir un spectre moyen. Les données spectrales ont été collectées par le logiciel OPUS version 6,5 (Bruker). Les traitements des spectres ont été effectués par plusieurs étapes de glissage (17 points), dérivation, et normalisation basé sur l'intensité de la bande des tyrosines (1515 cm^{-1}).

4. Conditions de stress testées

4.1. Oxydation

Les cellules préalablement lavées ont été traitées avec une solution H_2O_2 pour étudier l'effet protecteur de l'encapsulation sur la réponse cellulaire au stress oxydant. La concentration cellulaire a été ajustée à 10^7 cellules/mL. Les cellules ont été incubées dans une solution à 1mM

H_2O_2 pendant 5 minutes à 25 °C. Enfin, l'intégrité membranaire a été estimée par cytométrie en flux.

4.2. Ethanol

Les cellules préalablement lavées ont été traitées avec de l'éthanol pour étudier l'effet protecteur de l'encapsulation sur la réponse cellulaire au stress alcoolique. La concentration cellulaire a été ajustée à 10^7 cellules/mL. Les cellules ont été incubées dans une solution d'éthanol à 20% (v/v) pendant 5 minutes à 25 °C. Enfin, l'intégrité membranaire a été mesurée par cytométrie en flux.

4.3. Congélation

Les cellules préalablement lavées ont été culotées par centrifugation (2500 g, 5 min, 22 °C). Le surnageant a été éliminé. Le culot de cellules a été congelé à -80 °C pendant 2 heures. Les échantillons ont été ensuite décongelés lentement à température ambiante (25 °C) pendant une heure. Les cellules ont été remises en suspension dans le tampon d'acétate (pH 3.8). Ensuite, une combinaison de plusieurs stress : congélation en présence d'éthanol (20% v/v) et composé oxydant (1 mM H_2O_2) a été effectuée. Enfin, l'intégrité membranaire a été mesurée par cytométrie en flux.

4.4. Protocole de déshydratation

Séchage en mode « statique »

Le séchage a été réalisé d'après le protocole mis en place dans notre laboratoire (Lemetais et al., 2012). Les échantillons ont été placés dans des boites hermétiques dont l'humidité relative est contrôlée. Des solutions salines saturées ont été utilisées pour contrôler l'humidité des boites (tableau 6) ventilées en utilisant un ventilateur ACi, 4000, Ebm-papst (Obernai, France) réglé à 3 V pour augmenter la vitesse de transfert.

Tableau 6. Sels utilisés pour le contrôle de l'humidité relative de séchage

Sels utilisés	Humidité relative dans boites de séchage
Eau	99%
NaBr	58%
K_2CO_3	45%
CH_3COOH	23%
LiCl	8%

5 gouttes de 2 µL de suspension cellulaire ont été déposées sur un support en polypropylène (15 x 10 x 2 mm, Ets Scientix, Fougeres, France) et ont ensuite été séchées dans les boites à humidité contrôlée pendant une heure. Lemetais, en 2012, a déterminé le temps d'équilibrage de

l'humidité relative dans les boites pour les sels utilisées. L'auteur a démontré que le temps suffisant pour déshydrater complètement 10 µL de cellules est une heure. Les boites ont été placées dans une étuve pour maintenir la température à 25 °C ou 45 °C. Notons que les boites ont été maintenues aux températures souhaitées pendant une heure avant séchage. Après séchage, les cellules ont été réhydratées de manière rapide dans le tampon acétate à pH 3,8-4,0. Les cellules réhydratées ont été enfin mises sur des boites YPDA ou passées au cytomètre pour estimer leur viabilité et leurs propriétés physicochimiques (intégrité membranaire et activité de l'estérase).

Séchage en mode « dynamique »

Ce mode « dynamique » a été réalisé pour étudier les modifications biochimiques de la levure au cours du séchage en temps réel. Le séchage se réalise dans une chambre spécifique (Linkam IRTF600) avec contrôle de l'humidité relative et de la température. Les différents niveaux d'humidité relative ont été ajustés grâce à un mélange de flux d'air humide à 99% humidité relative avec un autre flux d'air sec de 1% obtenu depuis un générateur de gaz (Balston IRTF). L'humidité relative de la chambre a été mesurée par une sonde de température et d'humidité relative (Radiospare RS 1364).

Une goutte de 2 µL des cellules préalablement lavées a été d'abord déposée sur un hémisphère ZnSe pendant 15 min à température ambiante (25 °C et 25% humidité relative) pour fixer les cellules sur l'hémisphère. Les cellules ont ensuite été mises dans une boite hermétique contenant de l'eau distillée pendant une heure pour se réhydrater lentement. Les cellules réhydratées ont adhéré sur l'hémisphère et cet ensemble a été placé dans la chambre Linkam IRTF600 à la température souhaitée (25 °C ou 45 °C). Les cellules ont été déshydratées progressivement : l'humidité relative a été diminuée de 96% à 60%, 40%, 23% et 8%. Chaque condition d'humidité relative a été maintenue pendant 30 minutes et les spectres d'IRTF ont été acquis.

5. Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité

5.1. Suivie de croissance des levures

La courbe de croissance a été suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. La DO mesurée doit être inférieure à 0,9 pour que le résultat soit correct et fiable. La DO a été mesurée plusieurs fois pendant la croissance cellulaire dans le milieu de culture. En outre, la concentration cellulaire corrélée à la DO a été déterminée par méthode du dénombrement sur cellule de Malassez afin d'élaborer une courbe de corrélation des deux grandeurs (figure 14)

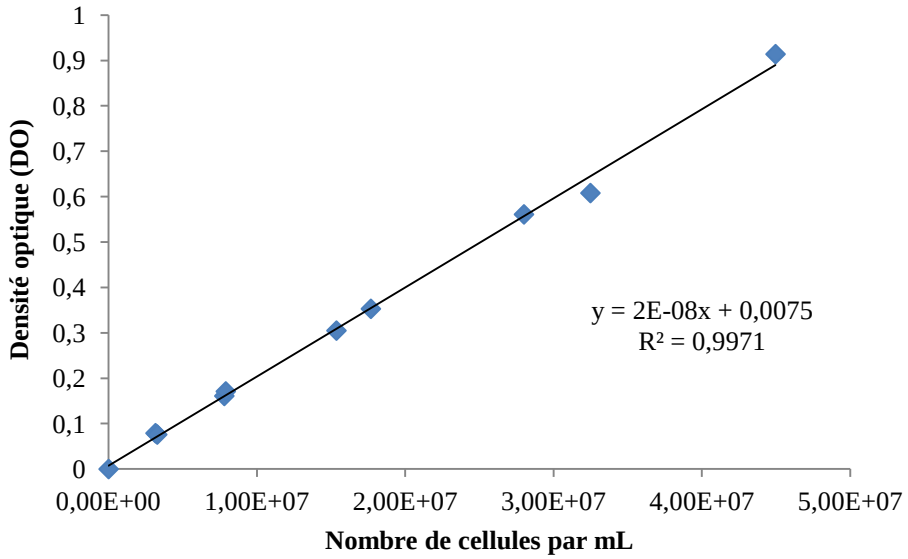


Figure 16. Courbe de la corrélation entre la densité optique (600 nm) avec la concentration cellulaire (nombre de cellules par mL)

5.2. Méthode d'estimation de la survie cellulaire

La survie cellulaire a été estimée par la méthode du dénombrement des colonies (UFC – Unité Formant Colonie). Cette méthode permet de calculer le nombre de cellules cultivables. La densité optique des suspensions cellulaires a été d'abord mesurée par spectrophotométrie à 600 nm. En fonction de la valeur de DO obtenue, la concentration cellulaire correspondante a été calculée afin de réaliser une série de dilution en cascade. Pour chaque dilution, trois gouttes de 10 µL de suspension cellulaire ont été déposées attentivement sur le milieu gélose YPDA. Un nombre de colonies entre 5 et 30 est considéré dénombrable. Notons que les gouttes de la dilution à 1/1 (non dilué) ont été toujours déposées sur le milieu gélosé pour tous les échantillons. Cela permet d'assurer la détection de toutes les cellules cultivables. Enfin, les géloses ont été incubées à 30 °C pendant 36 heures minimum et 48 heures maximum. Le nombre de colonies cultivables développés dans 1 mL a été calculé par l'équation suivante.

$$UFC/mL = \frac{\sum colonie \ . \ FD}{V \ .10^{-3}} \quad (1)$$

Où

V : volume total des gouttes déposées (V = 30 µL)

FD : facteur de dilution du dénombrement de colonies (une dilution de 1/10 alors FD = 10)

5.3. Dosage du glutathion réduit et total

La concentration du glutathion a été dosée par méthode d'Ellman. Cette méthode est basée sur l'absorbance à 412 nm de la molécule TNB produite dans les réactions entre le glutathion et le réactif. Le principe du dosage est représenté par les réactions suivantes :

$$2\ GSH + DTNB \rightarrow GSSG + 2\ TNB \quad (5)$$

GSH réductase

$$GSSG + NADPH + H^+ \text{ ----------> } 2\ GSH + NADP^+ \quad (6)$$

La combinaison de deux réactions :

GSH réductase

$$DTNB + H^+ + NADPH \text{ ----------> } 2\ TNB + NADP^+ \quad (7)$$

GSH/GSSG

Avant le dosage du glutathion, l'étape d'extraction de celui-ci du milieu intracellulaire a été effectuée. Les cellules ont été d'abord centrifugées; après élimination du surnageant, 300 µL d'acide 5-sulfosalicylique à 5% (m/v) et 300 mg de billes de verre de 0,45 µm de diamètre ont été rajoutés à la suspension cellulaire et les cellules ont été cassées au FastPrep. L'acide a été utilisé pour précipiter les protéines libérées pendant l'extraction. L'opération a été effectuée en six cycles de 45 secondes avec une vitesse de vibration de 24 m/s. Les échantillons ont été ensuite immédiatement refroidis dans de la glace pendant 10 minutes pour la précipitation des protéines. Le surnageant contenant le glutathion intracellulaire des levures a été récupéré par centrifugation à 4 °C et 10000 g. Les échantillons peuvent être conservées à -80 °C pendant au maximum 10 jours avant dosage.

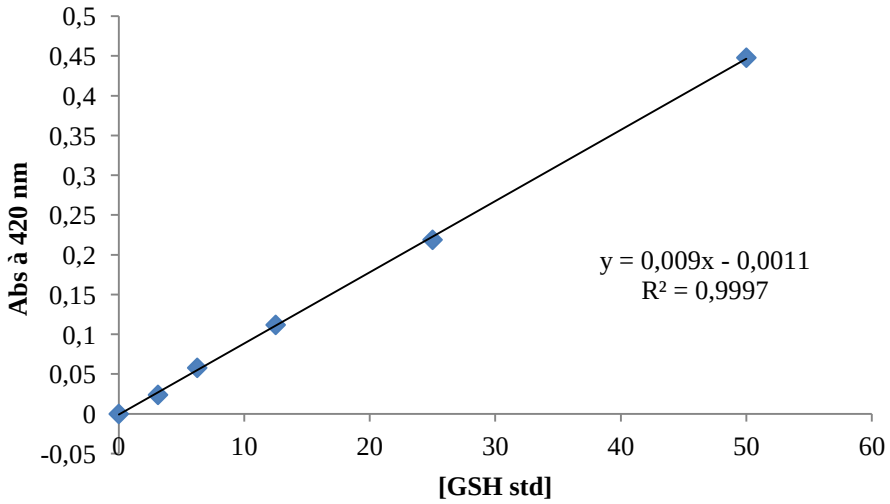


Figure 17. Courbe de la corrélation entre l'absorbance à 420 nm avec la concentration de glutathion standard

Il est nécessaire d'élaborer une courbe d'étalonnage en utilisant le glutathion réduit standard (Sigma-Aldrich) pour déterminer la concentration de celui des échantillons. Une solution stock du glutathion standard à 10 mM a été préparée dans de l'eau distillée. Cette solution peut être conservée à -18 °C pendant trois mois. Elle a été diluée 200 fois dans l'acide 5-sulfosalicylique à 5% pour obtenir une solution à 50 µM. Une série de dilutions en cascade a été effectuée jusqu'à 3,125 µM. La courbe d'étalon est représentée dans la figure 15.

Pour doser la concentration en glutathion total, une solution contenant l'enzyme glutathion réductase 6 Unités/mL et le DTNB à 0,04 mg/mL dans le tampon phosphate à pH 7,0 a été utilisée. Une solution de NADPH à 0,16 mg/mL a été également rajoutée pour la réaction. Les mélanges ont été réalisés dans une plaque de 96 puits et l'absorbance a été lue à 412 nm en utilisant un lecteur de plaques (Paradigm, Beckman Coulter, California, USA). Concernant le dosage du glutathion réduit, l'enzyme glutathion réductase n'a pas été rajoutée mais remplacée par du tampon phosphate. Les autres opérations ont été réalisées de la même manière.

5.4. Dosage des activités enzymatiques du glutathion réductase

L'activité de l'enzyme glutathion réductase (GR) est déterminée grâce à la réaction suivante :

$$\beta\text{-NADPH} + \text{GSSG} \xrightarrow{\text{GR}} \beta\text{-NADP} + 2\ \text{GSH} \quad (8)$$

Avec : β-NADPH : β-Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite

β-NADP : β-Nicotinamide Adéninсe Dinucléotide Phosphate, forme oxydée

GSSG : glutathion oxydé

GSH : glutathion réduit

Le glutathion réduit réagit avec le réactif DTNB (5-5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) pour générer le TNB^{2-} (acide 5-thio-2-nitrobenzoique) qui a une couleur jaune. Sa concentration est corrélée avec la densité optique à la longueur d'onde $\lambda_{(max)}$ = 405 nm.

Après extraction, 200 µL de surnageant contenant le milieu intracellulaire ont été récupérés. Les échantillons ont subi un prétraitement afin d'éliminer les faux positifs dûs à la réaction du GSH avec le DTNB; 100 µL de l'échantillon ont été incubés avec 5 µL de la solution H_2O_2 3% pendant 5 minutes à 25 °C. 50 µL d'une solution mixte des réactifs (kit K761-200, BioVision, Milpitas, USA) préalablement préparée ont été ajoutés dans 50 µL de l'échantillon. La lecture de l'absorbance A1 est la mesure de la densité optique à 405 nm au temps 1. Les échantillons ont été ensuite incubés à 25 °C. La lecture de la densité optique a été enregistrée jusqu'à ce que l'absorbance soit constante. L'absorbance A2 a été déterminée au temps T2. La différence entre les deux mesures d'absorbance (ΔA = A2-A1) a été utilisée pour calculer la

concentration de TNB (ΔB) dans l'échantillon grâce à une courbe d'étalonnage de TNB préalablement réalisée (figure 16). La mesure de l'absorbance a été réalisée dans lecteur de plaque (Paradigm, Beckman Coulter, California, USA).

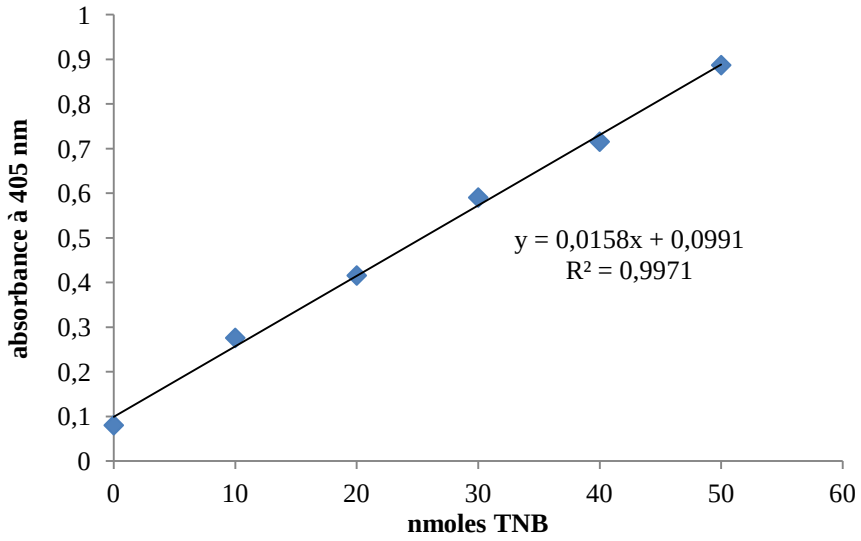


Figure 18. Courbe d'étalon de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoique (TNB)

La concentration de l'enzyme réductase a été calculée par l'équation suivante :

$$Activité\ GR = \frac{\Delta B}{(T2-T1)x\ 0,9\ x\ V}\ \text{x facteur de dilution de l'échantillon (mU/mL)}\ (2)$$

D'où :

ΔB : concentration de TNB calculée depuis la courbe d'étalon (nmole)

T1 et T2 : le temps de lecture de deux absorbances A1 et A2 (minutes)

V : le volume de l'échantillon déposé (mL)

0,9 : le facteur de changement de volume (après l'étape de prétraitement). Cette valeur est constante.

5.5. Estimation de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux

L'intégrité membranaire est reliée à la fonctionnalité et à la viabilité cellulaire. La réponse des levures aux différents stress appliqués a été appréhendée par cytométrie en flux. Les échantillons ont été examinés en utilisant le cytomètre de modèle BD FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) équipée d'un laser de 488 nm et du logiciel BD FACS Diva. L'iodure de propidium (IP) ne passe la membrane cellulaire que lorsqu'elle a perdu son intégrité, se complexe à l'ADN et fluoresce à 615 nm. Grâce à sa propriété intéressante, IP a été utilisée pour marquer les cellules. 2 µL de la solution d'IP ont été rajoutés dans la suspension cellulaire (10^7 cellules/mL) et incubés pendant 5 minutes. Enfin, la suspension a été diluée 10 fois pour la lecture de résultat. La combinaison de Forward Scatter (FSC) et Side Scatter (SSC) a été utilisée

pour distinguer les levures du bruit de fond. En outre, des contrôles positif et négatif ont été réalisés pour vérifier la mesure. Pour chaque échantillon, 10000 éléments (cellules) ont été collectés. Les expériences ont été réalisées trois fois.

5.6. Caractérisation de la modification de la structure cellulaire par IRTF (source synchrotron)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de source synchrotron (IRTF-S) (Ligne Spectroscopie et Microscopie Infrarouge avec le rayonnement Synchrotron (SMIS), SOLEIL Synchrotron, Saint-Aubin, Paris, France) a été utilisée pour caractériser les modifications biochimiques des levures à l'échelle de la cellule unique. Deux modes opératoires ont été utilisés : la réflexion (ATR- Attenuated Total Reflectance) et la transmission. La ligne SMIS est équipée un microscope infrarouge Thermo Scientific Continuum couplé à un spectromètre Thermo Scientific Nicolet 8700 ou 5700.

Pour le mode réflexion, l'IRTF-S a été utilisée pour acquérir l'absorption des vibrations moléculaires des échantillons en temps réel. Dans ce travail, cette expérience est appelée mode « dynamique » (voir la partie Matériels et Méthodes §4.4, page 54). Elle a été appliquée pour étudier la modification biochimique des levures pendant le séchage par l'air. Une goutte de 2 µL de suspension cellulaire a été déposée sur un hémisphère en ZnSe. L'ouverture d'IRTF-S a été ajustée à 10 x 10 µm. Comme le diamètre d'une levure est en moyenne environ 5 µm, l'hémisphère caractérisé par index de réfraction n=2,3 a été utilisé pour diminuer la résolution spatiale jusqu'à 4,3 x 4,3 µm. L'acquisition spectrale a été réalisée à une résolution de 4 cm^{-1}. Pour obtenir un spectre brut, 256 scans ont été acquis dans la région spectrale entre 4000 et 800 cm^{-1}.

Pour le mode transmission, l'acquisition des spectres n'a pas été réalisée en temps réel au cours de la déshydratation mais au début et à la fin du process de déshydratation (mode « statique », voir la partie Matériels et Méthodes §4.4, page 53). Les données spectrales ont été collectées pour les cellules fraiches (après cultures et encapsulation) et les cellules déshydratées en couche mince. Une goutte de 2 µL a été déposée directement sur un support en ZnSe. Une carte des cellules a été sélectionnée pour l'acquisition sur environ 20 cellules individualisées. L'ouverture d'IRTF-S a été ajustée à 5 x 5 µm. L'acquisition spectrale a été réalisée avec une résolution de 4 cm^{-1}. Pour obtenir un spectre brut, 256 scans ont été acquis dans la région spectrale entre 4000 et 800 cm^{-1}.

CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Cette partie rassemble les résultats principaux des travaux réalisés lors de ma thèse. Celle-ci est présentée sous forme d'articles (acceptés ou en préparation) précédés d'une courte introduction et certains points sont présentés en français sous forme condensée. Le plan, correspondant à la suite chronologique du travail de recherche, est le suivant :

1. Encapsulation de la levure par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) et influence de son effet protecteur sur la réponse cellulaire à différents stress

Article 1: Protection of living yeast cells by micro-organized shells of natural polyelectrolytes

2. Détermination des conditions d'enrichissement en glutathion chez la levure

3. Sélection d'une souche fragile et des conditions de déshydratation

4. Effet de l'enrichissement en glutathion sur la résistance de la levure dans les conditions de déshydratation retenues

Article 2: Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared

Résultats complémentaires

5. Effet de l'encapsulation sur la résistance de la levure à la déshydratation

Article 3: Protective effect of micro-organized shells of natural polyelectrolytes on yeast cells response against dehydration using synchrotron infrared microspectroscopy at the single-cell level

Résultats complémentaires

1. Encapsulation de la levure par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) et influence de son effet protecteur sur la réponse cellulaire à différents stress (article 1)

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été encapsulée par la méthode couche-par-couche en utilisant deux biopolymères : β-lactoglobuline (polycation) et alginate (polyanion). La souche diploïde CBS8066 a été utilisée pour la mise au point du protocole de l'encapsulation. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux questions suivantes :

1. Est-ce que les couches biopolymériques sont bien déposées sur la levure ?
2. Comment sont-elles réparties sur la surface de la levure ?
3. Quelles sont les interactions principales du système levure/biopolymères ?
4. Comment les couches protègent la levure dans les conditions de stress ?

Tout d'abord, la zétamétrie et l'ensemble des méthodes de microscopie électronique ont été utilisées pour démontrer le succès du dépôt des couches biopolymériques sur la surface de la levure. Trois couches de biopolymères ont été déposées sur la levure dans l'ordre : β-lactoglobuline/alginate/β-lactoglobuline. Cela a permis d'avoir une bonne stabilité de la capsule, de faire une économie de temps de manipulation. La valeur positive du zéta potentiel du système correspond à la charge positive de la dernière couche protéique, alors que la levure et l'aginate ont la même charge négative dans les conditions testées. L'observation microscopique a été effectuée jusqu'au niveau de la monocouche. L'immunomarquage a dû être appliqué afin de prouver la présence des couches protéiques sur la levure. Ensuite, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée pour caractériser les interactions du système multicouche. La capacité de division cellulaire et l'intégrité membranaire de la levure encapsulée ont été observées. Enfin, l'objectif de l'encapsulation était de protéger la levure de différents stress de son environnement. La protection de la levure a été testée dans trois conditions : (i) stress chimique (H_2O_2 et EtOH), (ii) stress physique (congélation) et (iii) combinaison de ces deux types de stress.

Process Biochemistry 50 (2015) 1528–1536

Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Protection of living yeast cells by micro-organized shells of natural polyelectrolytes

Thanh Dat Nguyen[a], Stéphane Guyot[a], Jeannine Lherminier[b], Yves Wache[a], Rémi Saurel[a,1], Florence Husson[a,*,1]

[a] UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques A 02.102, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France
[b] INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, BP 86510, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 March 2015
Received in revised form 13 May 2015
Accepted 4 June 2015
Available online 4 July 2015

Keywords:
Saccharomyces cerevisiae
Layer-by-layer
β-Lactoglobulin
Immuno-electron microscopy
FTIR
Freezing

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae, a eukaryotic model organism, plays a key role in the oxidative stability of fermented products. In order to protect cells against environmental stresses, we report a method of modifying the cell surface architecture while maintaining the internal working properties of the system. The objective was to encapsulate living yeast cells in micro-organized polyelectrolyte shells using layer-by-layer (LbL) assembly. For the first time, the natural polyelectrolytes, β-lactoglobulin and sodium alginate, were alternately deposited on the surface of *S. cerevisiae*. Transmission electron microscopy coupled with immune-cytochemistry and scanning electron microscopy provided evidence of the polyelectrolyte layers around yeast cells. The electrostatic interactions between the yeast, β-lactoglobulin and alginate were assessed using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). We observed the preservation of yeast functionality and membrane integrity after encapsulation. Finally, we showed that the LbL method does not influence the yeast growth and improves the yeast viability after freezing treatments in combination or not with chemical (H_2O_2 or ethanol) stresses.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Yeasts play an important role in the sensory quality of a wide range of fermented foods. Indeed, brewing, distilling, baking, oriental food, and wine-making industries employ many filamentous fungi and yeasts [1]. The preservation of microbial strains used in food processing is an emerging issue [2,3] since loss of functionality or viability is often observed in biomass subjected to environmental stresses occurring during fermentation (oxidative and ethanol stress, for example) and/or fermented food. Hydrogen peroxide is an inorganic messenger produced by yeast during aerobic respiration. H_2O_2 is toxic at high concentration (0.7 mM) and triggers programmed cell death [4]. Ethanol produced during fermentation by yeast targets membranes and affects the transport system of essential compounds such as amino acids and glucose. Its accumulation compromises a range of cellular functions leading to the reduction of cell viability [5]. Moreover, the yeasts could be frozen for cell preservation. However, freezing is a common and potential stress encountered by yeasts. As a result of water freezing, some damage can be expected from several causes such as extracellular or intracellular ice formation. Thus, studies of methods for cell protection against environmental stresses are a crucial subject for researchers.

Encapsulation is a technique that can be used to protect cells against an adverse environment. It is a physicochemical or mechanical process to entrap a substance in a material in order to produce particles of a few nanometers to a few millimeters in diameter. The encapsulated substance, called the core material, is dispersed in a matrix called coating or shell. This carrier material must be food grade if used in the food industry and able to form a barrier to protect the encapsulated substance [3,6].

One encapsulation technique uses surface modification technology, i.e. electrostatic layer-by-layer (LbL) self-assembly, whereby oppositely charged polyelectrolytes are alternately adsorbed to form multilayer assemblies of which essentially the topmost layer determines the surface properties [7,8]. This is a simple, low-cost technique and the wall properties, such as permeability, texture or thickness, can be tailored on a nanometer scale by changing the pH, ionic strength, or counter ions during assembly of the layers [9,10]. This technique has recently been used for several applications; Table 1 shows some yeast cell encapsulation studies using the LbL method. However, the polymers used in these studies are

* Corresponding author.
E-mail address: florence.husson@u-bourgogne.fr (F. Husson).
[1] Co-last authors.

http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.003
1359-5113/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
An overview of the yeast encapsulation using layer-by-layer method.

Yeasts	Information	Materials	Methods	References
S. cerevisiae	Morphological and mechanical properties	PAH/PSS	AFM, CLSM	[6]
S. cerevisiae	Shell and cell integrity	PAH/PSS	CLSM, Flow cytometry	[39]
S. cerevisiae	Mechanical properties	PAH/PSS	AFM	[45]
S. cerevisiae	Composite coatings, cell viability, electrochemical properties	PAH/PSS/MWNTs	TEM,SEM, Cyclic voltammetry, EIS	[29]
S. cerevisiae and *Trichoderma asperellum*	Process and effect of the coating, cell viability	PAH/PSS/BSA/DNA/gold or silver nanotubes	Optical microscopy, SEM, TEM AFM	[12]
S. cerevisiae	Interaction between microstructure surface and encapsulated living cells, cell viability	PAH/PSS/PEI	CLSM	[46]
S. cerevisiae	Morphology, cell viability, cell life cycle	PDADMAC/PAA	SEM, TEM, SAED	[47]
S. cerevisiae	Protective ability of polyelectrolyte capsules against lysosomal enzymes	PAH/PSS	CLMS, TPE-FM	[10]
S. cerevisiae	Cultivation of encapsulated yeast cells, cell density, ethanol production	NACS/PDMDAAC		

PAH, poly(allylamine hydrochloride); PSS, poly(sodium 4-styrenesulfonate); MWNTs, multiwalled carbon nanotubes; PEI, poly(ethyleneimine); PDADMAC, poly(diallyldimethylammonium chloride); PAA, poly(acrylic sodium).
SAED, selected area electron diffraction; TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; AFM, atomic force microscopy; CLSM, confocal laser scanning microscopy; EIS, electrochemical impedance spectroscopy; TPE-FM, two-photon excitation fluorescence microscopy.

all of synthetic nature. To our knowledge, there are only few reports describing the coating of yeast with thin polyelectrolyte layers of only natural poly-ions [11,12]. Therefore, biopolymers are regarded as promising materials for yeast encapsulation because of their interesting properties (thermo-stability, amino acid content, stabilizers and thickeners) for food or health compatible applications.

In the present paper, we report results on the encapsulation of living yeast cells with natural polyelectrolytes using the layer-by-layer assembly method. Two natural biopolymers, β-lactoglobulin and sodium alginate, were selected for yeast encapsulation. Both these food-grade biopolymers have already been used to encapsulate probiotic cells [3].

Milk proteins are natural vehicles for bioactive molecules. Many structural and physicochemical properties of milk proteins facilitate their natural functionality in delivery tasks [13]. They are usually used because of their amphoteric properties [14]. Indeed, proteins are positively charged in acidic conditions and negatively charged in neutral and basic conditions, with a transition occurring at their isoelectric point [15]. Consequently, they can form electrostatic complexes in acidic conditions with anionic polysaccharides such as alginate, carragenan or pectin. In addition, milk proteins such as β-lactoglobulin are good candidates for the LbL method due to their biocompatibility [13].

Alginate is also a naturally derived polysaccharide extracted from various species of algae and composed of β-D-mannuronic and α-L-guluronic acids, which are negatively charged over a wide range of pH values [16]. Alginate hydrogels have been used extensively in cell encapsulation [17], and calcium alginate is preferred for encapsulating probiotics because of its simplicity, non-toxicity, biocompatibility and low cost [18].

The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* was chosen as the cell model. This yeast is one of the most extensively used microorganisms in industrial applications. In addition to its applications in the food industry, *S. cerevisiae* has played a key role in the identification and understanding of the underlying molecular mechanisms of the basic functions of all eukaryotic cells [19,20].

To apply the LbL method to individually encapsulate yeast cells, β-lactoglobulin, the main whey protein component, was used as a polycation and sodium alginate as a strong polyanion [21]. Different analytical methods were used to investigate the organization of the multilayer polyelectrolyte shell around the cell surface at molecular or microscopic level: zetametry, scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), and Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The effect of the successive addition of the natural polyelectrolytes forming layers was also studied using flow cytometry to evaluate membrane integrity, which is an indicator of cell viability, and growth of encapsulated cells. The viability of encapsulated *S. cerevisiae* cells subjected to oxidative, ethanol and thermal stresses was then determined in order to evaluate the protective effect of the coating method.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The yeast strain *S. cerevisiae* CBS 8066 used in this study was provided by Voor Schimmelcultures (Baarn & Delft, Holland). Glucose, sodium acetate, acetic acid, purified β-lactoglobulin (Blg, >90% purity), ethanol and $CaCl_2$ were all obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and NaCl were obtained from Euromedex (Mundolsheim, France). Peptone was obtained from Biokar diagnostics (Beauvais, France). Yeast extract was obtained from AES laboratory (Bruz, France). Sodium alginate (Alg) was obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Propidium iodide was obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Chemicals for electron microscopy were purchased from Electron Microscopy Sciences/Delta Microscopies (Mauressac, France). Colloidal gold conjugated antibody was bought from Aurion (Wageningen, The Netherlands). The purified rabbit anti-β-lactoglobulin polyclonal IgG was a gift from Dr. A. Venien, INRA-Centre de Clermont/Theix, UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 St-Genes-Champanelle, France.

2.2. Yeast strain and culture conditions

Yeast cells were grown with an initial OD_{600} of 0.2 in 50 mL of YPD medium (10 g/L Glucose, 20 g/L Peptone and 10 g/L Yeast extract) using 250 mL battled Erlenmeyer flasks, in an incubator at 140 rpm and 30 °C for 24 h. The cells obtained by centrifugation were then used for encapsulation. Encapsulated cells were inoculated in the same medium for growth determination. The number of encapsulated and non-encapsulated cells was then calculated from OD_{600} values using a correlation curve. All of the microbiological experiments were carried out in triplicate from independent cultures.

2.3. Polyelectrolyte solution preparation

The 10 mM acetate buffer (0.54 g/L acetic acid and 0.14 g/L sodium acetate in distilled water) at pH 3.8 was prepared for all experiments.

Purified Blg was used for cell encapsulation. The 0.5% wt freeze-dried protein powder was dispersed directly in 10 mM acetate buffer at pH 3.8, maintained under low stirring at room temperature for 2 h and filtered using a 0.20 μm pore size filter. The final protein solution was stored at 4 °C before use.

Alg was used after purification and then freeze-dried as described previously [22]. A solution of 1 M $CaCl_2$ was added slowly to a solution of Alg (4% w/w) to make a gel. The gel was washed thoroughly with distilled water to remove the other non-gelling materials. The gel was solubilized further in a solution of 0.5 M EDTA at pH 7.0. The solution was dialyzed for several days against water and a solution of 0.1 M NaCl (changed 4 times per 24 h). The Alg solution was frozen and freeze-dried. Finally, 0.1% (w/w) purified alginate was dispersed in acetate buffer at pH 3.8 for cell encapsulation.

2.4. Encapsulation procedure

Yeast cells were suspended in acetate buffer at pH 3.8. The Blg and Alg solutions were prepared for encapsulation at concentrations of 0.1% (v/v) and 0.01% (v/v), respectively. The cells (4.10^7 cells/mL) were firstly incubated with the Blg solution, then the Alg solution. The suspension was maintained under low stirring for 20 min at room temperature for complete adsorption. Polyelectrolytes not adsorbed were washed twice with acetate buffer at pH 3.8 between steps. The yeast cells were separated from the supernatant by centrifugation at $2000 \times g$ for 3 min.

2.5. Zeta potential measurements

The electrophoretic mobility, μ (μm/s/V/cm), of yeast cells and polyelectrolyte solution was determined in a fused rectangular quartz channel (5 mm × 2 mm × 70 mm) using a ZetaCompact® (CAD instruments, Les Essarts-le-Roi, France). The velocity at the stationary surface was measured under a microscope. In the model solvent containing ions of known valency, the ζ-potential of the particles was deduced from the mobility μ according to Smoluchowski's law [23]. All of the experiments were carried out in triplicate.

2.6. Observation of encapsulated cells using transmission electron microscopy (TEM)

Yeast cells were pelleted using low-speed centrifugation (3 min, $2000 \times g$) and were immediately fixed for 4 h at 4 °C in a mixture of 10 mM acetate buffer (pH 3.8) containing 3.0% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) paraformaldehyde. The cells were resuspended in the fixative mixture to optimize this fixation step. After being washed several times in the same buffer over a period of 30 min, the cells were pelleted and embedded in 2.25% (w/v) low gelling temperature agarose. The agarose blocks were then treated with 0.5% osmium tetroxide in water for 1 h at room temperature. The cells were then dehydrated with a graded ethanol series and propylene oxide, and embedded in EPON according to the standard procedure [24]. Ultrathin sections (90 nm) were cut using an Ultracut E ultramicrotome (Leica, Rueil-Malmaison, France). Sections on grids were post-stained using the PATAg method (periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate) to enhance the contrast of the yeast cell walls and to reveal the Alg layer [25]. Cells were observed using a Hitachi H7500 transmission electron microscope (operating at 80 kV) equipped with an AMT camera driven by AMT V542 software (AMT, Danvers, MA, USA).

2.7. Immunogold labeling of β-lactoglobulin

Cells were fixed in 10 mM acetate buffer (pH 3.8) containing 0.5% (v/v) glutaraldehyde and 2% (v/v) paraformaldehyde for 1 h at 4 °C. After fixation, the cells were treated with 50 mM ammonium chloride in water for 30 min. The cells were then pelleted and embedded in 2.25% (w/v) low gelling temperature agarose. After dehydration in an ethanol series, the cells were progressively infiltrated in medium grade LR White using an automatic freeze substitution system (Leica, AFS1) according to a progressive low temperature protocol at −19 °C. The resin, to which 0.5% benzoin methyl ether was added, was polymerized for 48 h at −19 °C and then 3 h at 10 °C using UV light. Ultra-thin sections were collected on Formvar-coated nickel grids and immunocytochemical labeling was performed to detect the Blg.

The grids were treated with 10 mM Tris buffer saline (TBS) pH 7.2 supplemented with 0.1% glycine for 15 min to inactivate free aldehyde groups, then with a blocking solution containing 0.5% Bovine serum albumin (BSA), 0.1% fish gelatin (Aurion blocking solution) and 10% normal goat serum for 30 min. They were then rinsed with TBS containing 0.5% acetylated BSA for 1 h at room temperature. Sections incubated with medium devoid of primary antibody were used as negative controls. The primary antibody was detected with 15 nm gold-labeled goat anti-rabbit IgG (Aurion) diluted 1/25 in TBS +0.5% BSA for 1 h at room temperature. The grids were then examined using a Hitachi H7500 transmission electron microscope (Hitachi Scientific Instruments Co., Tokyo, Japan) operating at 80 kV and equipped with an AMT camera driven by AMT V542 software (AMT, Danvers, USA).

2.8. Observation of the surface of the encapsulated cells using scanning electron microscopy (SEM)

Yeast samples were fixed for 2 h at 4 °C with 2.5% glutaraldehyde in 10 mM acetate buffer (pH 3.8). Cells were dehydrated in 30%, 50% and 70% ethanol for 15 min each and spread onto glass cover slips coated with poly-L-lysine. After a dehydration step in 100% ethanol, the yeasts cells were dehydrated using the CO_2 critical point method (Critical Point Dryer 030, Leica, Nanterre, France). The glass cover slips were then mounted on aluminum stubs and coated with a thin carbon layer (Cressington, Eloise, Roissy, France). The samples were observed using a Jeol JSM7600F FEG-SEM (Jeol, Tokyo, Japan) operating at 2 kV.

2.9. Cell surface characterization using ATR-FTIR spectroscopy

The interactions between (i) the yeast wall and Blg alone or the Blg/Alg complex, and (ii) Blg and Alg, were estimated using ATR-FTIR spectroscopy applied to hydrated (and not dried) samples. About 20 μL of each sample were placed on an infrared-transparent ZnSe window and equilibrated for 5 min at 22 °C. Different types of samples in acetate buffer (pH 3.8) were analyzed: (i) non-encapsulated yeast cells, (ii) yeast cells encapsulated with Blg, (iii) yeast cells encapsulated with Blg/Alg, (iv) purified Blg, (v) purified Alg and (vi) purified Blg/Alg complex. In the presence of yeast, a volume of cell suspension was centrifuged at $2000 \times g$ for 3 min at 22 °C and the cell pellets were harvested and then placed on the infrared-transparent ZnSe window. The temperature was regulated by water circulation in a double envelope surrounding the window. All the ATR-FTIR second derivative spectra were recorded between 4000 and 900 cm^{-1} (wavenumber) on a Vector 22 FTIR spectrometer from Bruker (Karlsruhe, Germany) with a Bio-ATR II unit equipped with a mercury–cadmium–telluride (MCT) detector. The spectral resolution was 4 cm^{-1}. To obtain the spectrum for each sample, 10 scans were recorded and analyzed using OPUS 6.5 software (Bruker). Several data preprocessing algorithms were

used to analyze all the FTIR spectra. Data preprocessing included firstly a smoothing of the spectra (17 smoothing points, provided by the OPUS 6.5 software), then a second-order derivation and finally, normalization (except for alginate alone) with respect to the corresponding tyrosine band (around 1515 cm^{-1}), meaning that the intensity of this band could be used as the internal standard and was set to unity. The peaks of interest were determined using the OPUS 6.5 peak-picking function: only peaks with negative intensities were considered as "true" peaks. All of the experiments were carried out in triplicate.

2.10. Measurement of yeast cell membrane integrity using flow cytometry

The integrity of the encapsulated yeast cell membranes was assessed using a flow cytometer. Propidium iodide (PI) binds to DNA when the membrane of eukaryotic cells is disrupted, so PI was also used as an indicator of cell viability. Cells were suspended in 1 mL of acetate buffer, supplemented with 2 μL of PI (1 mg/mL) and incubated for 10 min to assess membrane integrity. Samples were analyzed using a BD FACS Aria II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with a 488 nm laser and BD FACS Diva Software. A combination of Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) was used to discriminate yeast cells from the background and a threshold of 5000 was set for the FSC signal. The cells were killed using a controlled heat treatment (10 min at 90 °C). For each sample, 10,000 events were collected. All of the experiments were carried out in triplicate.

2.11. Oxidative, ethanol and freezing stress conditions

In order to study the effect of the polyelectrolytes coating, the encapsulated and non-encapsulated yeasts were subjected to many stress conditions and their viability was then evaluated by PI labeling method. Membrane integrity of yeast cells was considered as a viability indicator. It was estimated using flow cytometry. First, ethanol or H_2O_2 was added in a suspension of 10^7 cells per mL to obtain a final concentration of 20% (v/v) or 1 mM for oxidative and ethanol treatments, respectively. Second, the cell suspension was cooled to −80 °C after removal of the supernatant for freezing treatment. After 2 h at −80 °C, sample was thawed at room temperature at least 1 h before viability test. Moreover, the yeasts were also subjected to the combined oxidative or ethanol and freezing stresses. All experiments were carried out in triplicate.

2.12. Statistic analysis

Statistic analysis was performed using Student's *t*-test and the difference in means was considered significant at $p < 0.05$. The results were presented as mean ± standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. ζ-potential measurements of yeasts, Blg and Alg

The sign of the ζ-potential indicates the charge of the cell surfaces and the polyelectrolytes. Fig. 1 shows the particle charges according to the pH. An overall negative charge for yeast cell surfaces was observed from pH 3.4 to pH 7.0. This can be explained by the presence of negatively charged phosphate groups in the carbohydrate side chains of the yeast cell walls [26]. For Blg, the ζ-potential was dependent on the pH. This protein had a positive charge from pH 2.0 to pH 4.5, and a negative charge from pH 4.6 to pH 6.0 [16]. However, Alg had a clear negative charge whatever the pH of the solution. Considering this result, it was decided to apply the LbL method at pH 3.8 where a high degree of ionization of all the

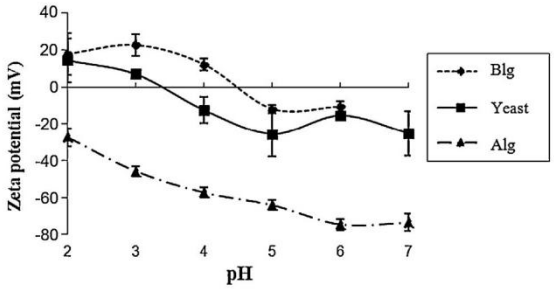


Fig. 1. ζ-potential of *Saccharomyces cerevisiae* and polyelectrolytes (Alg and Blg) as a function of pH.

polyions and cells was maintained and where electrostatic attraction should be strong enough for significant interactions between them.

Fig. 2 shows the ζ-potential of the surface of *S. cerevisiae* at pH 3.8 before and after encapsulation with an increasing number of layers. The results indicate that the surface potential of the yeast cells was −22.52 mV, and it changed to +14.68 mV after first Blg layer, then to −7.64 mV after second Alg layer and finally to +16.81 mV after third Blg layer deposition. It was assumed that the LbL assembly proceeded with the alternate adsorption of cationic polymer (Blg) and anionic polymer (Alg), resulting in symmetric changes in cell potential from negative to positive to negative, characteristic of the LbL process [27,28].

3.2. Observation of encapsulated yeasts using electron microscopy

Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) were used to further investigate the surface of individual encapsulated yeast cells and the thin structure of the polyelectrolyte layers. SEM studies showed that the cell surface morphology was clearly different between non-encapsulated and encapsulated cells (Fig. 3). Indeed, non-encapsulated cells produced a relatively smooth surface (Fig. 3A) while encapsulated cells with one layer of Blg were covered by a rough "carpet" of protein (Fig. 3D). On the surface of the yeast cells encapsulated with Blg/Alg/Blg (Fig. 3G), large deposits of Alg were observed and we noticed that this Alg layer did not cover the cell surface homogeneously. Moreover, the Blg protein, identical in size and morphology to the first layer, could be visualized on

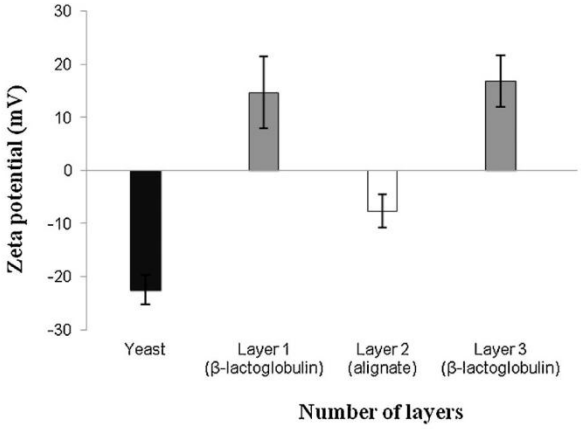


Fig. 2. Charge modification at pH 3.8 with successive deposition of polyelectrolytes Blg (polycation) and Alg (polyanion).

the surface of these large Alg deposits, indicating the binding of the third layer of Blg to the Alg deposits.

TEM observations indicated that layer-by-layer assembly of polyelectrolytes around yeast cells did not alter their surface morphological structure, as shown in Fig. 3B, E and H. The cell wall surface of the native yeast cells appeared to be smooth and featureless (Fig. 3B). Yeast cells encapsulated with one layer of Blg exhibited encapsulating material, which was clearly visible, associated with the cell wall and coating the entire yeast cell surface (Fig. 3E). The thickness of this Blg layer was between 20 and 50 nm. On sections of triple-layered yeast cells, the Patag test, which revealed polysaccharide-rich materials such as alginate, distinctly stained the intermediate Alg layer, which appeared packed at the surface. The total thickness of the deposits was between 160 and 190 nm. The layer thickness increased with the amount of polyelectrolyte layers deposited and was dependent on polymer size. A coating thickness in the range of 24–60 nm has been observed for *Escherichia coli* cells coated with chitosan/alginate/chitosan/alginate [28]. The layer thickness of yeast cells coated with PAH/PASS/PAH/MWNTs/PAH/PSS was found to be around 80 nm, although thinner (20–30 nm) and thicker layers (up to 200 nm) were occasionally observed on several areas of the cell walls [29]. The possibility of controlling the layer thickness is an advantage of the LbL method. The film architecture can be accurately designed and controlled with nanometer precision ranging from 5 to 1000 nm [7]. Therefore, the coating thickness can be modified to obtain high protection of yeast cells for further applications.

However, we noted that the third Blg layer, deposited after the Alg one, could not be visualized. To specifically identify the Blg layer and to reveal the presence of the third layer of Blg on the yeast cells, we performed in situ immunolabeling with antibodies raised against a purified Blg. The immunocytological experiments performed on control yeast cell sections did not show any labeling of the cell wall (Fig. 3C). Gold particles were visualized and were found to be closely associated with the surface of the Blg-coated yeast cell wall (Fig. 3F), indicating the presence of the Blg layer on the surface of the cell. When three layers were deposited around the yeast cells, gold particles were also detected on the surface of the Alg deposit, which corresponded to the second Blg layer (Fig. 3I). This immunolabeling of the protein at the surface of the alginate demonstrated the presence of the third layer and proved the individual coating of the yeast cells using the LbL assembly procedure.

3.3. Characterization of the structure and interactions between yeast, Blg and Alg using ATR-FTIR spectroscopy

Infrared spectroscopy was used to strengthen and complement the observations described previously. In order to acquire the infrared spectra under optimal storage conditions of the

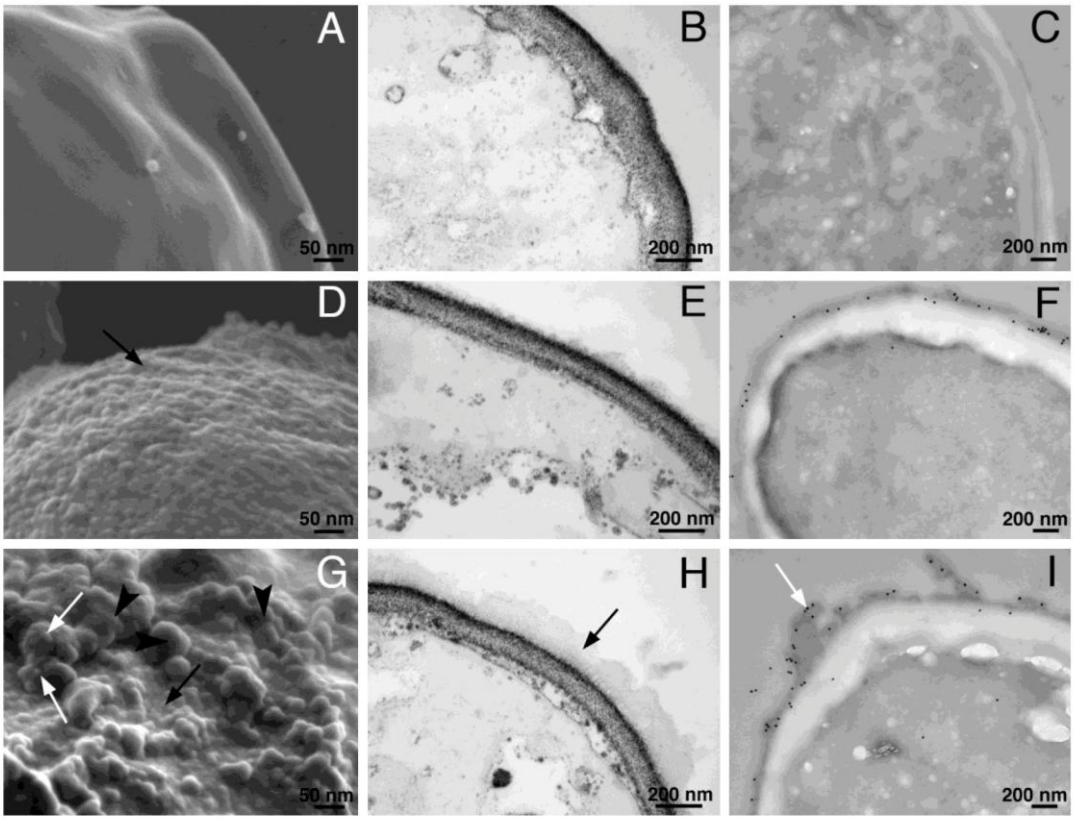


Fig. 3. Electron microscopy images of non-encapsulated and encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*. Non-encapsulated control yeast cells: SEM image (A); TEM image after PATAg staining (B); Immunolocalization of Blg using a polyclonal antibody against Blg followed by GAR-15 secondary antibodies conjugated to 15 nm gold particles (C) – no labeling was observed on this control section. Yeast cell encapsulated with Blg: SEM image revealed the protein layer at the surface of the yeast cell (arrow) (D); TEM image of this layer deposited on the surface of the cell wall and slightly highlighted with the PATAG staining (E); gold particles revealed the immunocytological reaction and indicated the presence of Blg all around the yeast cell (F). Yeast cell encapsulated with Blg/Alg/Blg: SEM image (G) – the first Blg layer can be visualized at the surface (black arrow) covered with Alg deposits (arrowhead) and the third Blg deposit can be visualized (white arrow); TEM image showing the Alg layer stained using the PATAg reaction (arrow) (H); Immunolabeling indicating that this Alg layer was covered with Blg molecules revealed by the gold particles (arrow) (I).

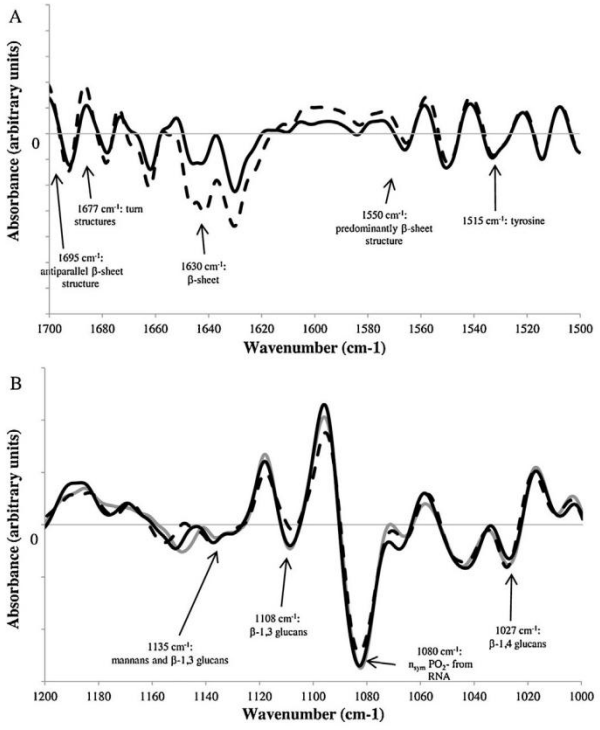


Fig. 4. Second derivative FTIR spectra normalized with respect to the tyrosine band (around 1515 cm^{-1}). (A) Secondary protein structure of Blg in acetate buffer (pH 3.8) in the absence (—) and presence of Alg (- - -); (B) yeast wall composition of non-encapsulated yeasts (—) and yeasts encapsulated with Blg (—) and Blg/Alg (- - -) suspended in acetate buffer (pH 3.8). Experiments were performed in triplicate; a representative curve is shown here.

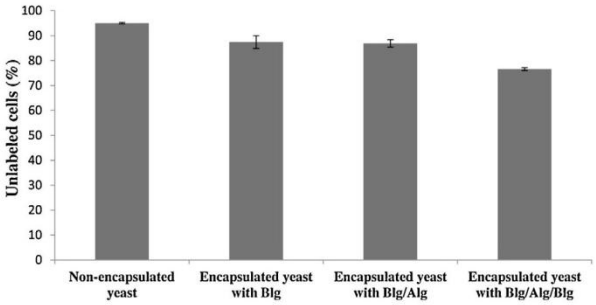


Fig. 5. Percentage of unlabeled non-encapsulated and encapsulated cells. The percentage was measured by counting cells labeled or not with PI. Unlabeled cells: cells that have preserved their membrane integrity or living cells; labeled cells: cells that have lost their membrane integrity or dead cells.

encapsulated yeasts (i.e., in acetate buffer at pH 3.8 and 22 °C), samples were fully hydrated in (i) acetate buffer and (ii) H_2O. It is well known that H_2O disturbs the quality of spectra but it was not replaced by D_2O, which presents a lower absorbance of infrared but interacts differently with molecules such as proteins.

Infrared spectroscopy was used to characterize Alg and Blg. Analysis of Alg spectra showed a peak of high intensity at about 1411 cm^{-1} (COO^- symmetrical stretch) meaning that Na^+ ions were present in the alginate block (data not shown) [30]. Interestingly, as shown in Fig. 4A, the secondary structure of Blg was not affected by the presence of Alg. Indeed, Blg exhibited turn structures (band at about 1677 cm^{-1}) both in the absence and in the presence of Alg and a predominantly β-sheet structure (band at about 1550 cm^{-1}). This was confirmed by the presence of the band recorded at about 1628 cm^{-1} and another band found at about 1695 cm^{-1}, which could indicate that the β-sheet structures in the proteins are antiparallel β-sheet structures. Bands recorded in H_2O were assigned in accordance with Dong et al. [31]. Moreover, according to previous studies, the thiol SH stretch band of Blg was found in the presence and in the absence of Alg at about 2550 cm^{-1} (data not shown) [32].

On the other hand, we verified that the LbL process did not dramatically change the yeast wall structure. A process like this can lead to electrostatic interactions between yeast, Blg and Alg (see Section 3.1), and so one can assume that the yeast wall structure was preserved. The results presented in Fig. 4B confirm this assumption since the main structures of the yeast wall were not affected by the presence of Blg alone and Blg/Alg. According to several authors, the following assignments were made: bands at about 1135, 1108 and 1027 cm^{-1} were characteristic of mannans/β-1,3 glucans, β-1,3 glucans, and β-1,4 glucans, respectively [33–35]. The absence of change in the 1135–1027 cm^{-1} region (such as the disappearance of one or more bands) suggested the absence of strong bonds between Blg and yeast. FTIR spectroscopy has been successfully used to detect curcumin–glucan interactions according to the disappearance of the band at 1027 cm^{-1} [36].

Although the LbL process did not dramatically change the yeast wall structure, one can ask whether cell viability was preserved. Infrared spectroscopy can help us to partially answer this question since the band at about 1080 cm^{-1}, which could be related to the ribose in RNA and indicates an increase in free nucleotides due to RNA degradation [33,34], was similar in non-encapsulated yeast and yeast encapsulated with Blg or Blg/Alg (Fig. 4B). In the light of this observation, one can assume that no over-degradation of RNA occurred in encapsulated yeast for which the viability could be preserved. Cell viability was then assessed by flow cytometry using propidium iodide.

3.4. Membrane integrity of yeast cells after the encapsulation procedure

The goal was to study the effect of the deposition of the polyelectrolyte layers on the membrane integrity of encapsulated yeast. Cells were incubated with propidium iodide (PI) to estimate the percentage of labeled (disrupted membrane) and unlabeled (intact membrane) cells. The results showed a decrease in membrane integrity of the cell population after the encapsulation procedure (Fig. 5). Results of the reducing capacity evaluated by methylene blue staining (dead cell labeling) showed the same trend. A similar percentage of cells labeled with PI and with methylene blue was observed (data not shown). Moreover, the results of Ta et al. [37] also showed that the loss of reducing capacity was correlated with the loss of membrane integrity for glucose-grown yeast cells. Therefore, the loss of membrane integrity is a good indicator of cell death.

Thus, PI crossed the polyelectrolyte layers, and labeled the DNA when the cell membrane is damaged. In total, the integrity of 76.6% of yeast cells encapsulated with Blg/Alg/Blg was maintained showing that most of the cells possessed an intact membrane and preserved their viability. The results are in agreement with the ATR-FTIR spectroscopy data, which also suggested the preservation of yeast RNA integrity. This decrease in cell membrane integrity was found after the deposition of the Blg layer but not with the Alg layer. The Blg polycation effect could explain these results. Indeed, cell viability depended on the type of polycation used for encapsulation [38] and was not affected by the number of layers. Our results are in agreement with the report by Diaspro et al. [39] who showed

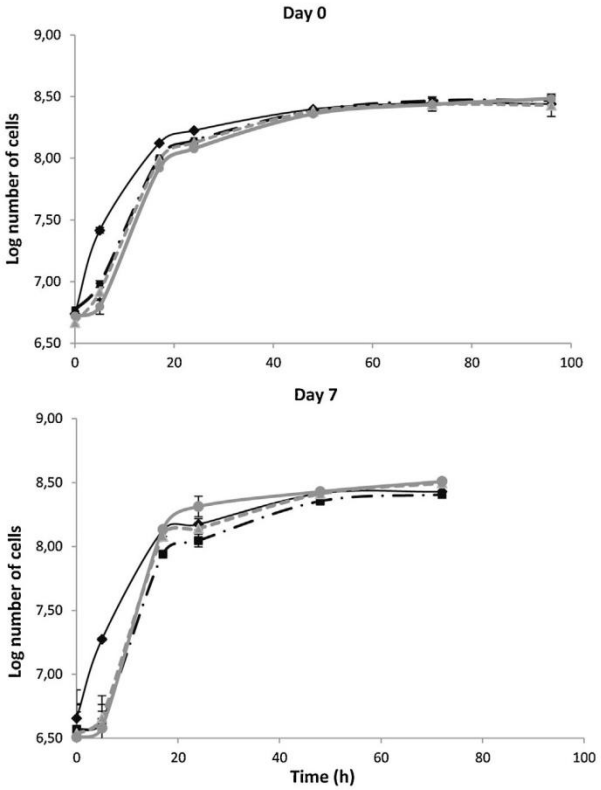


Fig. 6. Growth kinetics of yeast cells: non-encapsulated (◊) and encapsulated cells: with Blg (□), Blg/Alg (△) and Blg/Alg/Blg (○) at day 0: the yeast cells were inoculated immediately in YPD liquid medium and at day 7: the yeast cells were kept in acetate buffer for one week at room temperature and then were inoculated in YPD liquid medium.

that the viability of yeast cells coated with up to six poly(allylamine hydrochloride)/poly(sodium 4-styrenesulfonate) bilayers is not affected. The other factors of the encapsulation procedure, e.g. centrifugation, acetate buffer pH, stirring and washing steps, did not show a toxic effect on membrane integrity (data not shown).

3.5. Growth of encapsulated yeast

The growth kinetic of *S. cerevisiae* was determined in order to verify the viability and functionality of encapsulated yeast. Fig. 6 shows the growth kinetics of non-encapsulated and encapsulated cells (from 1 to 3 layers deposited) at day 0 and day 7 (yeast cells were inoculated in YPD medium immediately after encapsulation and after 7 days). In the first 5 h of incubation, we observed a lag phase for encapsulated cells at day 0 and day 7. This phase is not observed in the case of non-encapsulated cells. It means that the encapsulated cells had to adapt to their new coating and so, their multiplication was slower. The yeast cells entered the equilibrium phase at 20 h of culture. During this phase, encapsulated and control cells reached the same log value. Therefore, it can be concluded that the polyelectrolytes layers did not prevent the cell growth. Moreover, results of membrane integrity (see Section 3.4) showed that PI, a small molecule like nutrients, was able to pass through the shell indicating a good permeability of the layers. Consequently, we can conclude that the growth of encapsulated cells was not influenced by the layers.

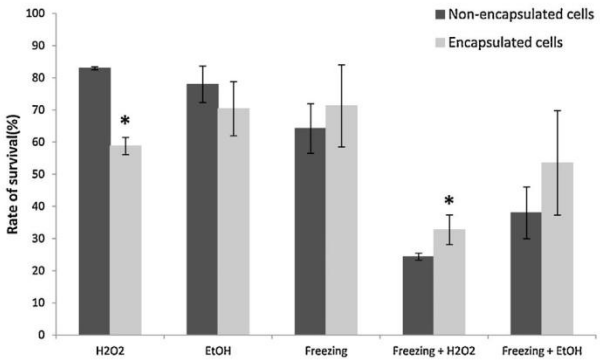


Fig. 7. Survival rate of non-encapsulated and encapsulated cells subjected to treatments. $^{*}p < 0.05$ vs. non-encapsulated cells.

3.6. Response of encapsulated yeast cells toward oxidative, ethanol and freezing treatments

In order to verify the protection of the shell environmental stresses, yeast cells were placed under different stress conditions. The rate of survival of cells with and without treatments was calculated. The rate of survival corresponded to the percentage of cells unlabeled by PI (determined by flow cytometry). In Fig. 7, it is observed that the survival rate of non-encapsulated cells was higher than encapsulated cells treated in oxidative (significant difference) and ethanol conditions. It indicates that there was no protective effect of the polyelectrolyte layers on yeast for these types of stress. The viability decrease of both encapsulated and non-encapsulated yeast could be explained by the oxidative effect of H_2O_2 and ethanol. These small molecules were able to pass through the layers and damaged yeast cells. Targets of oxidation are the membrane, lipid, DNA inducing cell death [40]. The higher mortality of encapsulated cells could be explained by an osmotic local stress before oxidant (H_2O_2 and EtOH) treatments induced by the high hydrophilic properties of the polyelectrolytes shell. Indeed, it was observed by optic microscopy that the size of encapsulated cells was smaller in comparison to control cells (data not shown).

However, compared with non-encapsulated yeast (64%), the survival rate of encapsulated cells (71%) tends to increase after freezing. Freezing is the most critical process which can damage cells. Many types of stress can occur during the freezing treatment and decrease of the respiratory activity and the succinate oxidizing activity of mitochondria which are two crucial factors of life have already been found in *S. cerevisiae* indicating a decrease of viability [41]. Moreover, ice crystallization and ice crystal size during freezing could be considered as important cell damaging factors, inducing cell injury [42]. In the case of rapid cooling, the cell damage has been mainly found because of intracellular ice crystallization [43]. The presence of the polyelectrolytes around the cells might then exert a cryoprotective effect by decreasing the intracellular water level (effect of osmotic local stress). Moreover, the hydrophilic property of both polyelectrolytes used plays an important role in cell cryoprotection against freezing treatment. Indeed, the formation of hydrogen bonds between the functional amine and carboxyl groups of the protein (Blg) with the water molecules can hinder the increased formation of large crystals around yeast cells. On the other hand, the carboxyl of the polysaccharide (Alg) is also able to create the hydrogen bonds and fixed the water molecules, again limiting the ice crystal size. This cryoprotective effect was also reported by Thomas et al. [44] who showed that layer-by-layer encapsulated *S. cerevisiae* cells survived better than non-encapsulated one after freezing and freeze-drying treatments.

In order to verify the cryoprotective effect of polyelectrolytes layers on yeast cells, they were subjected to oxidative and ethanol stress after freezing. Compared with non-encapsulated cells, the survival of encapsulated cells increased significantly after the combined stresses of freezing and H_2O_2. In the case of the combined stresses of freezing and ethanol, the survival rates were 38% and 54% for non-encapsulated cells and encapsulated cells but these differences, which suggest again a protective effect of the biopolymers, were not significant. During freezing treatment, the non-encapsulated cell membrane becomes more fragile and perturbed. When yeasts were treated by H_2O_2, they were more susceptible to attack by reactive oxygen species increasing the cell mortality. Therefore, despite a relative lethality due to the encapsulation process, we can conclude that polyelectrolyte shell has protected the yeasts during combined stress in freezing condition.

4. Conclusion

We have demonstrated that yeast cells can be encapsulated individually with natural polyelectrolytes (β-lactoglobulin and alginate) using the layer-by-layer method. The two different Blg and Alg layers were visualized and localized precisely using SEM and TEM-immunolabeling. The layer thickness was evaluated between 20 and 50 nm for the first Blg layer and 160–190 nm for the three Blg/Alg/Blg layers. The electrostatic interactions of the yeast/Blg/Alg system were characterized using ATR-FTIR spectroscopy. The secondary structure of Blg does not seem to be affected by the deposition method and the structure of the yeast wall were found to be preserved. The encapsulated yeast cells maintained their membrane integrity after the encapsulation procedure. We have shown that the polyelectrolytes layers (up to 3 layers) did not influence the cell growth. In this work, the results obtained demonstrated the protection of yeast cells in micro-organized shells using the layer-by-layer method in oxidative stress after freezing conditions. It can be concluded that the LbL encapsulation using natural polyelectrolytes might be an effective technique to develop preservation process applied to yeast cells.

Acknowledgements

We would like to thank Aline Bonnotte (Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, BP 86510, F-21000 Dijon, France) and Frederic Herbst (Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS-Université de Bourgogne, 9 Av. A. Savary, BP 47 870, F-21078 DIJON Cedex, FRANCE) for their great support in preparing the SEM samples and for the SEM images.

References

[1] M. Penninckx, A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses, Enzyme Microb. Technol. 26 (2000) 737–742.
[2] M.-J. Chen, K.-N. Chen, Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, Blackwell Publishing, 2007, pp. 83–112.
[3] J. Burgain, C. Gaiani, M. Linder, J. Scher, Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications, J. Food Eng. 104 (2011) 467–483.
[4] V. Folmer, N. Pedroso, A.C. Matias, S.C.D.N. Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, H.S. Marinho, H_2O_2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembr. 1778 (2008) 1141–1147.
[5] B.R. Gibson, S.J. Lawrence, J.P.R. Leclaire, C.D. Powell, K.A. Smart, Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, FEMS Microbiol. Rev. 31 (2007) 535–569.
[6] T.S. Lanero, S. Krol, R. Magrassi, A. Diaspro, R. Rolandi, A. Gliozzi, O. Cavalleri, Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells, Ultramicroscopy 107 (2007) 913–921.
[7] H. Ai, S.A. Jones, Y.M. Lvov, Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles, Cell Biochem. Biophys. 39 (2003) 23–43.
[8] M. Müller, T. Rieser, P.L. Dubin, K. Lunkwitz, Selective interaction between proteins and the outermost surface of polyelectrolyte multilayers: influence of the polyanion type, pH and salt, Macromol. Rapid Commun. 22 (2001) 390–395.
[9] C.C. Buron, C. Filiâtre, Overshoots of adsorption kinetics during layer-by-layer polyelectrolyte film growth: role of counterions, J. Colloid Interface Sci. 413 (2014) 147–153.
[10] S. Krol, O. Cavalleri, P. Ramoino, A. Gliozzi, A. Diaspro, Encapsulated yeast cells inside *Paramecium primaurelia*: a model system for protection capability of polyelectrolyte shells, J. Microsc. 212 (2003) 239–243.
[11] I. Drachuk, O. Shchepelina, S. Harbaugh, N. Kelley-Loughnane, M. Stone, V.V. Tsukruk, Cell surface engineering with edible protein nanoshells, Small 9 (2013) 3128–3137.
[12] R.F. Fakhrullin, A.I. Zamaleeva, M.V. Morozov, D.I. Tazetdinova, F.K. Alimova, A.K. Hilmutdinov, R.I. Zhdanov, M. Kahraman, M. Culha, Living fungi cells encapsulated in polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles, Langmuir 25 (2009) 4628–4634.
[13] Y.D. Livney, Milk proteins as vehicles for bioactives, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 15 (2010) 78–83.
[14] G.K. Gbassi, T. Vandamme, S. Ennahar, E. Marchioni, Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins, Int. J. Food Microbiol. 129 (2012) 103–105.
[15] S. Gunasekaran, S. Ko, L. Xiao, Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications, J. Food Eng. 83 (2007) 31–40.
[16] T. Harnsilawat, R. Pongsawatmanit, D. McClements, Characterization of β-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study, Food Hydrocoll. 20 (2006) 577–585.
[17] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, Biomaterials 20 (1999) 45–53.
[18] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, Int. Dairy J. 13 (2003) 3–13.
[19] A. Kolkman, M. Slijper, A.J.R. Heck, Development and application of proteomics technologies in *Saccharomyces cerevisiae*, Trends Biotechnol. 23 (2005) 598–604.
[20] M. Knop, Yeast cell morphology and sexual reproduction – a short overview and some considerations, C. R. Biol. 334 (2011) 599–606.
[21] S.R. Bhatia, S.F. Khattak, S.C. Roberts, Polyelectrolytes for cell encapsulation, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 10 (2005) 45–51.
[22] J.L. Mession, A. Assifaoui, C. Lafarge, R. Saurel, P. Cayot, Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins–sodium alginate–water ternary system, Food Hydrocoll. 28 (2012) 333–343.
[23] K. Redmann, H.L. Jenssen, H.J. Köhler, Experimental and functional changes in transmembrane potential and zeta potential of single cultured cells, Exp. Cell Res. 87 (1974) 281–289.
[24] J.H. Luft, Improvements in epoxy resin embedding methods, J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 (1961) 409–414.
[25] J.C. Roland, B. Vian, General preparation and staining of thin sections, in: J.L. Hall, C. Hawes (Eds.), Electron Microscopy of Plant Cells, Academic Press, 1991, pp. 1–66.
[26] F.M. Klis, A. Boorsma, P.W.J. De Groot, Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast 23 (2006) 185–202.
[27] S.S. Balkundi, N.G. Veerabadran, D.M. Eby, G.R. Johnson, Y.M. Lvov, Encapsulation of bacterial spores in nanoorganized polyelectrolyte shells, Langmuir 25 (2009) 14011–14016.
[28] A.L. Hillberg, M. Tabrizian, Biorecognition through layer-by-layer polyelectrolyte assembly: In-situ hybridization on living cells, Biomacromolecules 7 (2006) 2742–2750.
[29] A.I. Zamaleeva, I.R. Sharipova, A.V. Porfireva, G.A. Evtugyn, R.F. Fakhrullin, Polyelectrolyte-mediated assembly of multiwalled carbon nanotubes on living yeast cells, Langmuir 26 (2009) 2671–2679.
[30] C. Sartori, D.S. Finch, B. Ralph, K. Gilding, Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy, Polymer 38 (1997) 43–51.
[31] A. Dong, J. Matsuura, S.D. Allison, E. Chrisman, M.C. Manning, J.F. Carpenter, Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β-Lactoglobulin A and B†, Biochemistry 35 (1996) 1450–1457.
[32] W. Yantasee, C.L. Warner, T. Sangvanich, R.S. Addleman, T.G. Carter, R.J. Wiacek, G.E. Fryxell, C. Timchalk, M.G. Warner, Removal of heavy metals from aqueous systems with thiol functionalized superparamagnetic nanoparticles, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 5114–5119.
[33] M. Cavagna, R. Dell'Anna, F. Monti, F. Rossi, S. Torriani, Use of ATR-FTIR microspectroscopy to monitor autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells in a base wine, J. Agric. Food Chem. 58 (2009) 39–45.
[34] E. Burattini, M. Cavagna, R. Dell'Anna, F. Malvezzi Campeggi, F. Monti, F. Rossi, S. Torriani, A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Vib. Spectrosc. 47 (2008) 139–147.
[35] R.J. Karreman, E. Dague, F. Gaboriaud, F. Quilès, J.F.L. Duval, G.G. Lindsey, The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteomics 1774 (2007) 131–137.
[36] E.I. Paramera, S.J. Konteles, V.T. Karathanos, Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*, Food Chem. 125 (2011) 892–902.

[37] T. Ta, L. Cao-Hoang, H. Phan-Thi, H. Tran, N. Souffou, J. Gresti, P.-A. Marechal, J.-F. Cavin, Y. Waché, New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (2010) 1089–1099.
[38] M. Germain, P. Balaguer, J.-C. Nicolas, F. Lopez, J.-P. Esteve, G.B. Sukhorukov, M. Winterhalter, H. Richard-Foy, D. Fournier, Protection of mammalian cell used in biosensors by coating with a polyelectrolyte shell, Biosens. Bioelectron. 21 (2006) 1566–1573.
[39] A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi, Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells, Langmuir 18 (2002) 5047–5050.
[40] M.B. França, A.D. Panek, E.C.A. Eleutherio, Oxidative stress and its effects during dehydration, Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 146 (2007) 621–631.
[41] Y. Mori, H. Suzuki, T. Nei, Freezing injury in the yeast respiratory system, Cryobiology 23 (1986) 64–71.
[42] P.R. Santagapita, F. Kronberg, A. Wu, P. Cerrutti, M.P. Buera, M.A. Galvagno, Exploring differential scanning calorimetry as a tool for evaluating freezing stress sensitivity in Baker's yeasts, Thermochim. Acta 465 (2007) 67–72.
[43] V.M. Odagescu, Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Physique de la matière et du rayonnement. Thesis, 2005.
[44] M.B. Thomas, M. Vaidyanathan, K. Radhakrishnan, A.M. Raichur, Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes, J. Food Eng. 136 (2014) 1–8.
[45] T.S. Lanero, O. Cavalleri, S. Krol, R. Rolandi, A. Gliozzi, Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes, J. Biotechnol. 124 (2006) 723–731.
[46] S. Krol, M. Nolte, A. Diaspro, D. Mazza, R. Magrassi, A. Gliozzi, A. Fery, Encapsulated living cells on microstructured surfaces, Langmuir 21 (2005) 705–709.
[47] B. Wang, P. Liu, W.G. Jiang, H.H. Pan, X.R. Xu, R.K. Tang, Yeast cells with an artificial mineral shell: protection and modification of living cells by biomimetic mineralization, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 3560–3564.

2. Détermination des conditions d'enrichissement en glutathion chez la levure

Après avoir mis au point les conditions d'encapsulation, la deuxième partie de la thèse avait pour but d'enrichir les levures en composés antioxydants afin de renforcer leur résistance aux conditions de stress environnementaux. Ce travail fait partie intégrante du projet Cell Extra Dry (Institut Carnot Qualiment) qui était de produire des levures sèches actives enrichies en molécules antioxydantes (glutathion) pendant la fermentation. L'objectif de cette partie est de déterminer les conditions de culture qui favorisent l'enrichissement du glutathion intracellulaire et la production de biomasse de la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin d'améliorer finalement sa viabilité et sa fonctionnalité pendant la déshydratation.

La souche diploïde CBS8066 a été utilisée comme modèle. D'après l'analyse bibliographique, la fermentation est considérée comme la meilleure voie pour à la fois produire de la biomasse et enrichir la levure en glutathion. Néanmoins les conditions de culture testées sont très diverses et l'efficacité de la méthode est reportée sur des souches différentes. Pour déterminer les conditions favorables à notre objectif, nous avons appliqué les meilleures conditions de la littérature sur notre souche modèle. Suite à la détermination des conditions optimales, l'évolution de la biosynthèse du glutathion pendant la croissance cellulaire a été suivie.

2.1. Effet des conditions de culture sur la biomasse et l'enrichissement en glutathion

La levure a été cultivée dans quatre milieux différents. Le milieu riche classique YPD est utilisé comme contrôle pour comparer avec trois autres milieux GSH1, GSH2 et GSH3 (sélectionnés de la bibliographie). Deux autres conditions sont l'ajustement de la température et l'addition supplémentaire d'acides aminés. Deux critères d'amélioration des conditions sont la biomasse sèche produite et le pourcentage de glutathion par gramme de biomasse sèche. Au plan statistique, le test ANOVA à plusieurs facteurs a été utilisé pour tester l'effet significatif de chacun des facteurs sur les critères retenus (variables : biomasse sèches ou glutathion) au niveau de confiance de 95%.

La biomasse sèche produite après 48 heures de fermentation est représentée dans la figure 17. Les résultats montrent que le milieu et l'addition supplémentaire d'acides aminés affecte la production de biomasse alors que l'ajustement de la température n'a pas d'impact sur la production de biomasse. La quantité de biomasse sèche est la plus importante (environ 6 g/L) lorsque la levure est cultivée dans le milieu GSH1 alors que elle est la plus faible (environ 0,2 g/L) pour le milieu GSH3. Le milieu GSH3 a donc été éliminé. Le milieu de contrôle YPD

entraîne une production de biomasse d'environ 4 g/L, soit 1,5 fois moins importante que celle du milieu GSH1. L'effet du milieu GSH2 n'est pas différent que celui du milieu YPD. La biomasse de la levure cultivée dans le milieu GSH2 est environ 3 à 4 g/L. Donc le milieu GSH1 est le meilleur parmi ceux testés pour la production de biomasse de levure.

Pour le milieu GSH1, il n'y a pas d'effet des deux autres facteurs sur la production de biomasse. L'effet de l'addition supplémentaire des acides aminés a été trouvé seulement sur le milieu GSH2. Le résultat montre que l'addition supplémentaire d'acides aminés peut augmenter la biomasse.

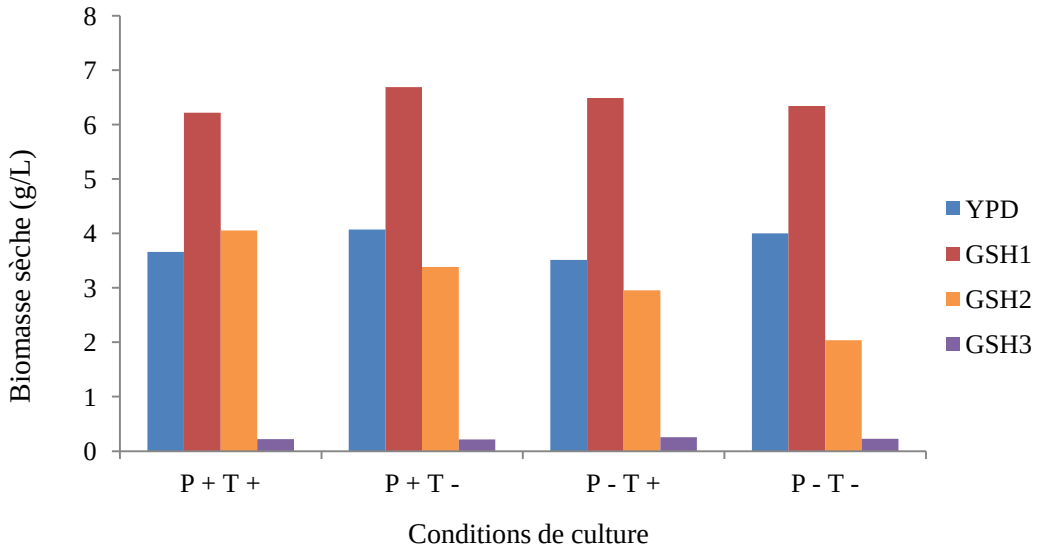


Figure 19. Biomasse sèche produite dans les conditions de culture testées : YPD, GSH1, GSH2 et GSH3. P+ et P- indique avec ou sans l'addition supplémentaire des acides aminés. T+ et T- indique avec ou sans l'ajustement de température. La biomasse a été récoltée après 48 heures d'incubation avec une vitesse d'agitation de 140 rpm (Lab Shaker, Adolf Kühner AG Schweiz, avec l'ambitude d'orbital de 27 mm).

La concentration en glutathion intracellulaire a été mesurée pour chaque biomasse récoltée à partir de chaque milieu de culture dans les mêmes conditions opératoires. La figure 18 représente cette valeur traduite en pourcentage sur matière sèche de levure en fonction des conditions de culture. Le pourcentage de glutathion sur biomasse sèche est le plus important lorsque la levure est cultivée dans les trois milieux YPD, GSH1 et GSH3. La valeur maximale de 1,16 % est observée pour le milieu YPD. Le milieu GSH2 ne favorise pas la biosynthèse du glutathion selon nos conditions opératoires. Le pourcentage minimal de 0,2 % de glutathion est trouvé pour ce milieu. Le milieu GSH2 est alors éliminé.

L'optimisation de la biosynthèse du glutathion est obtenue lorsque la température est ajustée et que les acides aminés supplémentaires sont ajoutés (condition P+T+) pour les trois milieux YPD (1,16 %), GSH1 (1,09 %) et GSH3 (0,86 %). Parmi ces trois milieux, le pourcentage de glutathion obtenu chez la levure cultivée dans le milieu GSH3 est le plus faible. De plus, ce milieu ne favorise pas la production de biomasse. Donc le milieu GSH3 n'est pas retenu pour la suite de l'étude.

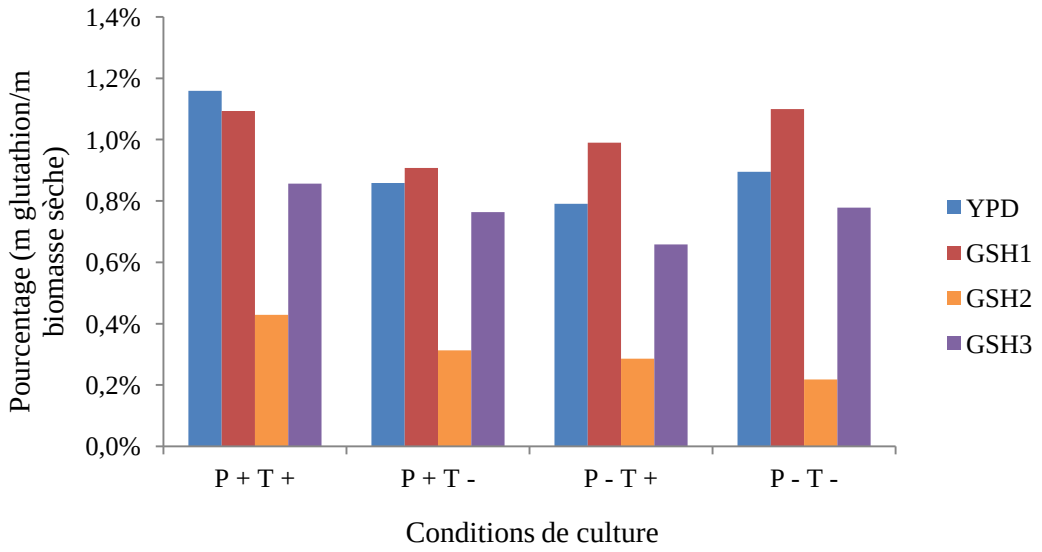


Figure 20. Pourcentage de glutathion total obtenu pour 1 g de biomasse sèche de levure dans les conditions de culture testées. YPD, GSH1, GSH2 et GSH3 sont quatre milieux différents. P+ et P- indique avec ou sans l'addition supplémentaire des acides aminées. T+ et T- indique avec ou sans l'ajustement de température. La concentration en glutathion a été mesurée après 48 heures d'incubation avec une vitesse d'agitation de 140 rpm (Lab Shaker, Adolf Kühner AG Schweiz, avec l'ambitude d'orbital de 27 mm).

Il n'y a pas de différence significative du pourcentage du glutathion entre les deux milieux YPD et GSH1 selon les différentes conditions de culture. De plus, 1,10% de glutathion est trouvé chez la levure cultivée dans le milieu GSH1 dans les conditions de culture standard (P-T-). Pour ce milieu GSH1, l'ajustement de température et l'addition supplémentaire d'acides aminés n'entrainent aucun effet sur la production du glutathion chez la levure. Cela signifie que la biosynthèse du glutathion par la levure est favorisée par la composition du milieu GSH1 sans besoin de contrôle des autres conditions. Ce résultat montre l'intérêt de l'utilisation du milieu GSH1 car il permet d'obtenir une concentration en glutathion intracellulaire importante tout en diminuant les risques de contamination.

En conclusion, le milieu GSH1 est retenu pour l'enrichissement en glutathion et l'optimisation de la biomasse de levure. La fermentation est effectuée aux conditions simplifiées (incubation à 30 °C, sans addition supplémentaire d'acides aminés et agitation à 140 rpm avec l'amplitude d'orbital de 27 mm).

2.2. Évaluation de la concentration du glutathion pendant la croissance de la levure

Le milieu GSH1 est retenu pour l'enrichissement du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il était alors nécessaire de déterminer le temps optimal pour obtenir la biomasse la plus riche en glutathion en fonction de sa croissance. Pour cela, la concentration du glutathion synthétisé par la levure a été estimée en fonction du temps.

Pour une question de simplification, le milieu GSH1 est désormais appelé G+. En outre, un milieu nommé G-, 10 fois plus pauvre en concentration d'extrait de levure et de cystéine par rapport au milieu G+ a été réalisé. Il est considéré comme contrôle négatif qui ne favorise pas l'accumulation du glutathion chez la levure. L'évolution de la concentration du glutathion pendant la croissance de la levure cultivée dans deux milieux G+ et G- est représentée ci-dessous (figure 19).

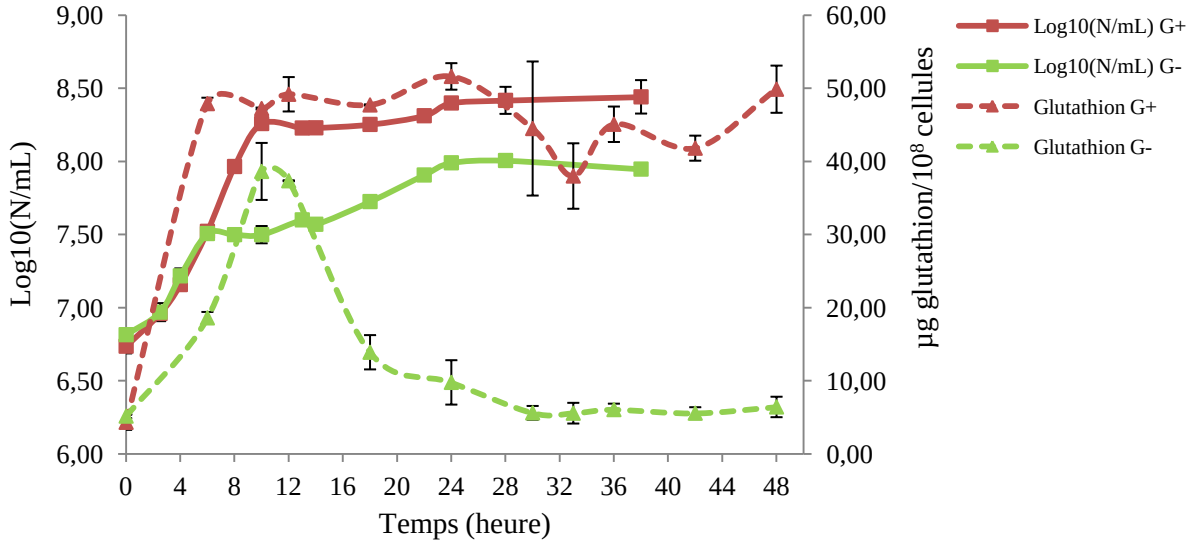


Figure 21. Concentration du glutathion intracellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps.

D'après la courbe de croissance, la levure cultivée dans le milieu G- représente une biomasse moins importante (environ 1,5 log de différence) que celle du milieu G+. De plus, les cellules du milieu G- atteignent la phase stationnaire plus tôt que celles du milieu G+. Pour le milieu G-, la phase stationnaire commence après 6 heures d'incubation, soit quatre heures plus tôt en comparant avec le milieu G+. Ces résultats peuvent être expliqués par la différence au niveau des nutriments des deux milieux.

L'augmentation rapide du glutathion est observée dès le début de la croissance de la levure pour les deux milieux G+ et G-. En effet, la concentration du glutathion atteint rapidement 47,89 µg/10^8 cellules après 6 heures pour le milieu G+ et 37,34 µg/10^8 cellules après 12 heures pour le milieu G-. En revanche, la levure cultivée dans le milieu G+ est capable de continuer à synthétiser le glutathion pendant la phase stationnaire (la concentration maximale est 51,61 µg/10^8 cellules après 24 heures) alors que la concentration du glutathion des cellules du milieu G- diminue rapidement (2,3 µg/10^8 cellules par heure). Après 24 heures, la concentration en glutathion de la levure du milieu G- ne représente que 9,76 µg/10^8 cellules. Ces résultats révèlent l'effet du milieu sur la synthèse du glutathion. La diminution de la concentration du glutathion pourrait être due à l'arrêt de la synthèse ainsi qu'à la dégradation de cette molécule. La levure utilise probablement l'énergie pour d'autres métabolismes lorsque les nutriments dans le milieu G- deviennent limités. Il semblerait que le glutathion soit dégradé en acides aminés lesquels pourront être utilisés dans d'autres métabolismes de composés souffrés.

En conclusion, le temps optimal de la récolte des levures enrichies en glutathion est de 24 heures où la levure est en phase stationnaire et la concentration en glutathion est maximale pour le milieu G+. De plus, il y a une différence significative entre la concentration en glutathion de la levure cultivée dans le milieu G+ (51,61 µg/10^8 cellules) par rapport au milieu G- (9,76 µg/10^8 cellules). Cela nous permet ainsi d'utiliser le milieu G- comme contrôle négatif pour la suite des expérimentations.

3. Sélection d'une souche fragile et des conditions de déshydratation

La souche diploïde CBS8066 a été utilisée comme modèle pour la mise au point de la méthode d'encapsulation et de la détermination des conditions de culture qui favorisent l'enrichissement en glutathion chez la levure. La résistance des levures est différente en fonction des souches et aussi des conditions de déshydratation. Dans ce travail, l'objectif final est d'améliorer la survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* après déshydratation. Dans cette partie, différentes souches ont été testées afin de sélectionner une souche qui est la plus sensible à la déshydratation. Cela pourra montrer l'intérêt de l'application de l'enrichissement en glutathion sur les souches fragiles qui ne sont pas commercialisées à cause de leur sensibilité au séchage. Ensuite, différentes conditions de déshydratation ont été testées afin de choisir celles pertinentes pour les études plus approfondies.

3.1. Sélection de la souche fragile

La réponse cellulaire à la déshydratation a été testée sur quatre souches : la souche sauvage diploïde CBS8066, la souche sauvage haploïde BY4742 et deux mutants ΔGSH1 et ΔGSH2 qui ne sont pas capables de synthétiser le glutathion puis qu'il leur manque deux gènes essentiels de la régulation de deux enzymes la γ-glutamylcystéine synthétase (GSH1) et la glutathion synthétase (GSH2). Ces deux enzymes ont indispensables dans la biosynthèse du glutathion. L'effet du milieu d'enrichissement en glutathion a été vérifié sur ces quatre souches (figure 20). Les résultats montrent que la concentration en glutathion est plus importante pour la souche CBS8066 que pour la souche BY4742. Cela indique que la synthèse du glutathion est différente en fonction des souches. Le glutathion n'est pas détecté chez les deux mutants ΔGSH1 et ΔGSH2.

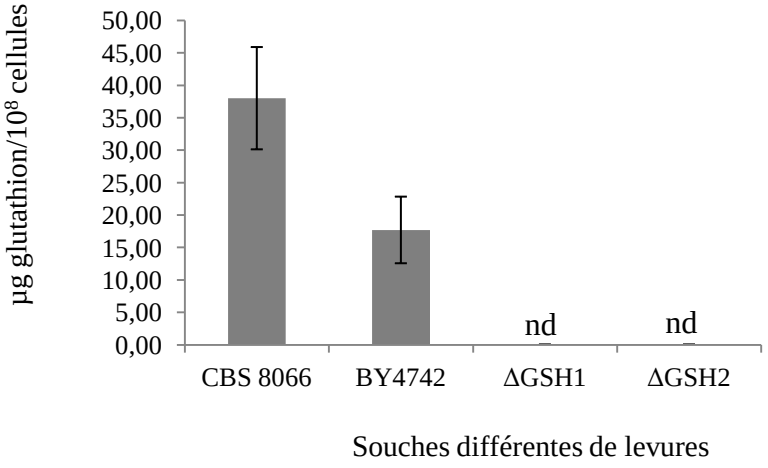


Figure 22. Concentration en glutathion de quatre souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans le milieu G+. nd : non détecté

La sélection de souches fragiles a été réalisée en deux étapes par la survie cellulaire. D'abord, la sélection d'une des deux souches sauvages a été réalisée par l'estimation de leur survie après la déshydratation. Ensuite, la survie de la souche la plus sensible a été comparée avec celle des deux mutants.

Afin de comparer la survie des deux souches sauvages, le milieu YPD a été sélectionné pour la culture. Cela a permis de s'assurer que les deux souches sauvages se développent dans des conditions classiques de culture. Leur survie après la déshydratation est représentée dans la figure 21. Le $\log_{10}$ (N/N_0) indique l'impact du séchage sur la survie des levures. Plus le log10 (N/N_0) est négatif, plus l'impact du séchage sur les levures est important et la survie cellulaire faible. Le résultat montre que la survie de la souche CBS8066 est plus importante que celle de la souche BY4742. Cela peut être expliqué par des différences de propriétés physiologiques de chaque souche. La meilleure résistance de la souche CBS8066 est peut-être due à la capacité de sporulation d'une cellule diploïde dans des conditions défavorables de son environnement (Kondrashov and Crow 1991; Thompson, Desai et al. 2006).

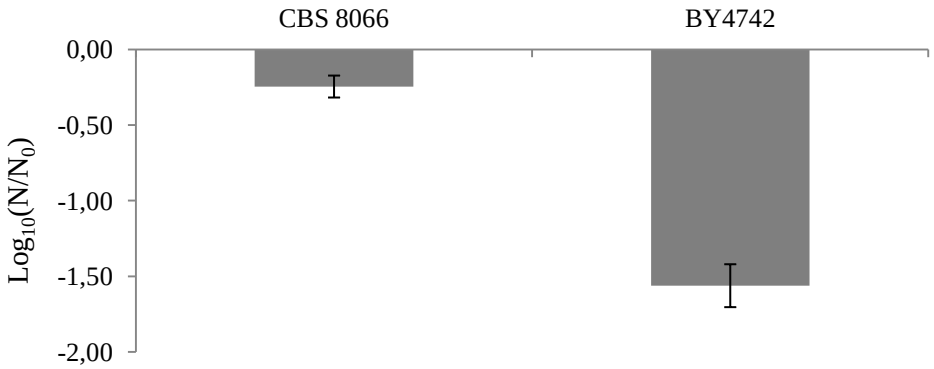


Figure 23. Survie de deux souches sauvages CBS8066 et BY4742 après déshydratation (0,23 aw à 25 °C, réhydratation rapide) représentée par le log10 (N/N_0), où N_0 et N sont les nombres de colonies de levures obtenues avant et après déshydratation.

Pour estimer la sensibilité de la levure à la déshydratation, la survie cellulaire de la souche BY4742 et de deux mutants a été mesurée. Les levures ont été cultivées dans le milieu G- permettant de garder une concentration faible en glutathion. La figure 22 représente la survie de la souche sauvage BY4742 et des deux mutants en milieux G-. Le résultat n'a pas montré de différence de survie après déshydratation. Il indique qu'une faible concentration en glutathion entraine une faible survie de la levure au cours de la déshydratation. Comme les deux mutants ne sont pas capables de synthétiser le glutathion en milieu G+, la souche BY4742 est alors plus adaptée pour étudier l'effet de l'enrichissement sur la résistance de la levure. Donc la souche BY4742 a été sélectionnée pour la suite de notre travail.

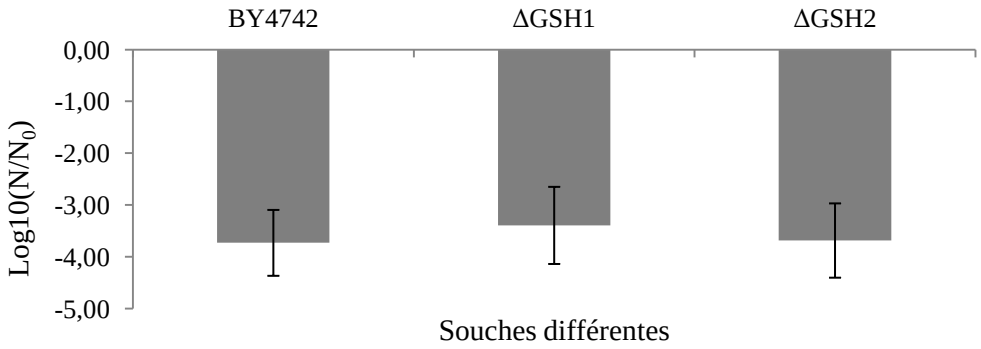


Figure 24. Survie des trois souches BY4742, ΔGSH1 et ΔGSH2 après déshydratation (0,23 aw à 25 °C, réhydratation rapide) est représentée par le $\log_{10}$ (N/N_0), où N_0 et N sont les nombres de colonies des levures obtenues avant et après déshydratation.

3.2. Conditions de déshydratation/réhydratation

La levure BY4742 a été traitée avec différentes conditions de déshydratation/réhydratation. Deux milieux G+ et G- ont été utilisés pour la culture. L'humidité relative de l'environnement a été maintenue à 23% et 45% (en utilisant des solutions saturées de sel). Deux températures 25 °C et 45 °C ont été appliquées pendant la déshydratation. La réhydratation a été réalisée en deux modes rapide et lent à 25 °C. La survie a été mesurée et le résultat est représenté dans le tableau 7. L'expérience a été effectuée une seule fois.

Tableau 7. Survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 dans différentes conditions de déshydratation/réhydratation. Le gradient de couleurs signifie l'effet des conditions sur la survie. Plus la couleur est verte, plus la survie est importante. Plus la couleur est rouge, plus la survie est faible.

Milieux	Réhydratation rapide			Réhydratation lente		
	aw	température	Log(N/N_0)	aw	température	Log(N/N_0)
G+	0,23	25 °C	-2,98	0,23	25 °C	-0,01
	0,45		-2,23	0,45		-0,02
	0,23	45 °C	-4,69	0,23	45 °C	-0,73
	0,45		-4,00	0,45		-0,89
G-	0,23	25 °C	-4,73	0,23	25 °C	-1,22
	0,45		-4,43	0,45		-1,47
	0,23	45 °C	-6,95	0,23	45 °C	-3,40
	0,45		-4,95	0,45		-2,70

Les résultats montrent que la survie des cellules cultivées en milieu G+ est plus importante qu'en milieu G- pour toutes les conditions. La survie maximale (-0,01) est observée lorsque la

levure a été cultivée en milieu G+ et déshydratée dans un environnement contrôlé à 23% humidité relative à 25 °C puis réhydratée lentement. La survie minimale est trouvée dans le cas des cellules cultivées en milieu G- qui ont été déshydratée à 23% humidité relative puis réhydratée rapidement. Donc le milieu G+ permet à la levure d'augmenter sa résistance à la déshydratation/réhydratation

En outre, les résultats montrent que les autres conditions affectent la survie de la levure. Pour le milieu G- ou G+, la survie des cellules est plus faible lorsque l'humidité relative est réduite de 45% à 23%. L'augmentation de température de 25 °C à 45 °C réduit la survie de la levure. La réhydratation rapide entraine une diminution importante de la survie cellulaire. Donc les conditions agressives obtenues sont 23% humidité relative, 45 °C et réhydratation rapide. Dans ces conditions, l'adaptation de la levure à son environnement est faible ou il n'y pas suffisamment de temps pour qu'elle puisse s'adapter.

La suite de notre travail a été de chercher à mieux comprendre l'effet des milieux G- et G+ sur la réponse de la levure aux conditions de déshydratation/réhydratation tels que 23% d'humidité relative à deux températures 25 °C et 45 °C et réhydratation rapide. Les résultats de l'enrichissement en glutathion sur la résistance de la levure sont représentés dans la partie suivante (partie §4). En outre l'effet de l'encapsulation sur la protection de la levure est étudié dans le cas de la déshydratation à 23% d'humidité relative, 45 °C et réhydratation rapide (partie §5).

4. Effet de l'enrichissement en glutathion sur la résistance de la levure dans les conditions de déshydratation retenues (article 2)

La déshydratation est une méthode répandue pour la stabilisation et la conservation des cellules. L'effet de la déshydratation a été largement étudié sur la réponse de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Par contre, il est difficile d'étudier seulement l'effet de la déshydratation sans tenir compte de ceux de la réhydratation. En respectant l'objectif d'étudier *in vitro* la réponse de la levure à la déshydratation, le potentiel de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de la source Synchrotron a été utilisé. Grâce à sa performance élevée, cette technique permet d'acquérir des spectres infrarouges d'une résolution spectrale importante pendant une courte période avec une résolution à l'échelle de la cellule. Cela nous a ainsi permis d'étudier les modifications biochimiques de la levure pendant la déshydratation en temps réel.

Pour souligner l'effet de l'enrichissement en glutathion chez la levure, la modification biochimique et la survie cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans les deux milieux G- et G+ a été mesurée pendant la déshydratation dans différentes conditions de température et d'humidité relative. Les résultats nous ont permis de mieux identifier des différences biochimiques (protéines et lipides) entre les levures G- et G+ responsables de la survie pendant déshydratation.

Article 2:

Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared

Thanh Dat NGUYEN[a], Stéphane GUYOT[a], Caroline PÉNICAUD[b], Stéphanie PASSOT[b], Christophe SANDT[c], Fernanda FONSECA[b], Rémi SAUREL[a] and Florence HUSSON[a1]*

[a]Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

[b]UMR GPMA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

[c]Synchrotron SOLEIL, Gif sur Yvette, F91192, France

Abstract

Although damages leading to cell death during dehydration have been studied, biochemical changes in real time are not yet reported. For the first time, synchrotron infrared was performed on yeast during this process in real time with simultaneously controlling relative humidity and temperature. This leaded us to investigate the biochemical modification in relation to dehydration of *Saccharomyces cerevisiae*. The correlation between hydration level and yeast survival was observed. The results showed that the medium rich in nutriment and glutathione precursor can improve yeast survival during dehydration at 45 °C. This could be related to the high relative amounts of CH_3 methyl groups in lipid composition. The results showed the effect of medium cultures on biochemical modification in lipid composition. High temperature was the factor that affected protein structure of yeast during dehydration. However, the relation between cell survival and protein structure modification was not found according to dehydration conditions. This work demonstrated the feasibility of using S-FTIR for investigating of yeast response to dehydration in real time.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, dehydration, biochemical modification, survival, synchrotron FTIR

Corresponding author Florence Husson

Tel.: +33 03 80 77 23 94; E-mail: florence.husson@u-bourgogne.fr (F. Husson).

**: co-last authors.*

INTRODUCTION

Preservation of cells and biological materials by drying is of practical importance in industry, clinical medicine, and agriculture. Drying is indeed used for yeast biomass stabilization for direct utilization in fermentation process and for manufacturing other products such as oral-administrative tables or capsules, starter culture and functional supplements for food products. It

allows lowering the water content of cells, represents up to 95 % of the weight of organisms, to 3-4 % thus increasing their shelf life. Moreover, it offers the advantages of low volume and ambient temperature transportation and storage. However, drying can involve a lot of perturbations of the environment around yeasts (Beker and Rapoport, 1987).

The removal of large quantity of extracellular and intracellular water during dehydration introduces several stresses in cells like heat stress, osmotic stress, and oxidation (Beker and Rapoport, 1987; Fu and Chen, 2011). Dehydration decreases cell volume leading to a lot of structural changes. Both mechanical and chemical mechanisms take place in cells during drying processes. The plasma membrane has been described as the main target which is deeply injured by the changes of its fluidity and its organization(Crowe, Carpenter et al., 1998; Simonin, Beney et al., 2007; Ragoonanan, Malsam et al., 2008; Lemetais, Dupont et al., 2012). Several previous works carried out in our laboratory have demonstrated the important role of the plasma membrane in cell survival after heat or osmotic stress (Gervais, Marechal et al., 1992; Gervais, Molin et al., 1996; Beney, de Marañón et al., 2001; Gervais, Martínez de Marañón et al., 2003; Guyot, Ferret et al., 2006; Guyot, Gervais et al., 2015). Lipid phase transition and an increase of cell surface-to-volume ratio are the result of plasma membrane condensation and restructuration caused by the stress (Wolfe, Dowgert et al., 1986 ; J H Crowe, F A Hoekstra et al., 1992; Ragoonanan, Malsam et al., 2008). Increase of this ratio can lead to membrane deformation resulting in cell death (Dupont, Beney et al., 2010; Lemetais, Dupont et al., 2012). Likewise, biochemical changes in yeast cells occurring during drying affect cytoplasm, cell wall and vacuoles: changes of nucleic acids, protein compounds, physic state of lipids, and carbohydrate content as well as polyphosphates (Beker and Rapoport, 1987). Furthermore, oxidative stress can be induced because of the increase of contact between cell surface and air containing oxygen molecules (Imlay, 2003; França, Panek et al., 2007; Garre, Raginel et al., 2010; Dupont, Lemetais et al., 2012). Among the elements implicated in the response against dehydration, glutathione which is a tripeptide (γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycine) present in most living cells, has been reported to have a significant role in the system defense of yeasts (Espindola, Gomes et al., 2003).

Although the mechanisms underlying cell damages during drying process have been investigated in previous studies the structural modification of individual yeast cell in real time has not yet been reported. The knowledge of the time evolved biochemical changes at single cell level should help to better understand mechanisms of desiccation tolerance and consequently lead to improve stabilization yeast technologies.

In the last decades, Fourier-Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy has shown to be a powerful analytical tool that is increasingly used to characterize cell metabolism and biochemical composition. In microbiology, FTIR can give useful information on structural and compositional changes of cell macromolecules such as proteins, lipids, nucleic acids and carbohydrates. By monitoring mid-infrared fingerprints it has been possible to simultaneously probe the major biochemical modifications in *Yarrowia lipolytica* cells as a result of dehydration induced by drying/rehydration and freezing/thawing (Pénicaud et al., 2014) as well as during the autolysis of *S. cerevisiae* cells (Burattini, Cavagna et al., 2008). Cavagna et al. proposed a summary of the main infrared spectra absorption bands and assignments for the ATR-FTIR spectra of *Saccharomyces cerevisiae* (**Table 1)** (Cavagna, Dell'Anna et al., 2010). However, FTIR spectroscopy results have been usually performed on cell populations which are characterized by a single spectrum, with no information at microbial-cell scale. This drawback is now resolved by using synchrotron IR beam source which offers 100-1000 times higher brightness than that of a GlobarTM IR source (Miller and Dumas, 2006) and allows investigating biochemical composition at single-cell level (Heraud, Wood et al., 2005). Furthermore, this approach enables the assessment of heterogeneity in biochemical composition within cells among a given microbial population. The potential of synchrotron FTIR (S-FTIR) microspectroscopy for imaging and spatially resolved biochemical analyses at single- cell scale has been evidenced in the pioneer work of Saulou et al (2010) and Jamme et al (2013). Saulou et al assessed the changes in *S. cerevisiae* and the bacterium *Escherichia coli* after exposure to nano-silver coating or free ionic silver, respectively (Saulou, Jamme et al., 2010). Jamme et al (2013) studied the dynamics of lipid storage and cellular carbon fluxes in yeast (Jamme, Vindigni et al., 2013). More recently, an original work reported the first bimodal analysis of bacteria at the single-cell level performed by combining synchrotron-FTIR microspectroscopy and fluorescence microscopy for identifying relevant spectral biomarkers of the cryotolerance of lactic acid bacteria (Passot, Gautier et al., 2015).

In this study, we aimed at investigating the biochemical modifications of *Saccharomyces cerevisiae* strain during dehydration in real time. A media improving intracellular glutathione content was used to investigate the effect of glutathione accumulation on the yeast responses to dehydration conditions at different relative humidity and temperature. S-FTIR experiments were performed on cells issues from both culture conditions, in order to analyze in situ the biochemical structure changes of *S.cerevisiae* at single-cell level. The yeast survival was investigated by the estimation of cell cultivability.

Table 1. Main absorption bands and assignment for the ATR-FTIR spectra of *Saccharomyces cerevisiae* (Cavagna et al., 2010).

cm^{-1}	Main assignment
3400-3500	OH stretching in carbohydrates
3300	NH stretching in proteins
3080	NH stretching in peptides
3100	Amide II overtone
2960	V sym CH_3 lipids and proteins
2925	V sym CH_2 lipids
2890	CH deformation of CH_3 lipids, proteins and peptides
2875	V sym CH_3 lipids and proteins
2855	V sym CH_2 lipids
1740	C=O stretching in lipid esters
1650	Amide I: C=O vibrations of different protein structures
1550	Amide II: N-H and C-N vibrations of the peptide bond in different protein conformations
1470	CH_2 scissoring in lipids
1455	Various CH_2/CH_3 bending vibrations in lipids and proteins
1440	CH_2 deformation mainly in proteins and peptides
1415	C-O-H in plane bending in proteins
1405	$C(CH_3)_2$ stretching mainly in proteins
1390	C=O of COO- symmetric stretching in proteins
1370	CH_2 wagging vibrations in lipids, and β-1,3 glucans
1350	CH_2 wagging vibrations in lipids
1340	CH_2 wagging vibrations in lipids
1250-1300	Amide III: C-N and C-O stretching, N-H and C-N bending
1240	V sym PO_{2-} in DNA, RNA and phospholipids
1215	C-O stretching free nucleotides
1200	C-O-C carbohydrates
1156	C-O, C-OH carbohydrates, various contributions
1135	Mannans and β -1,3 glucans
1108	β -1,3 glucans
1080	V sym PO_{2-} mainly from RNA
1050	Mannans
1025	β -1,4 glucans
998	β -1,6 glucans
972	Mannans
915	Pyranose ring asymmetric vibrations
905	Mannans

880	β -glycosidic linkage vibrations
860	α-glycosidic linkage vibrations
822	Mannans
808	Mannans
780	Pyranose ring symmetric vibrations, GMP ring stretching

MATERIALS AND METHODS

Yeast strain and materials

The yeast strain *S. cerevisiae* Y10000 (BY4742) used in this study was provided by Euroscarf (Frankfurt, Germany). Glucose, potassium acetate, acetone, L-cysteine, and Fluorescein diacetate (FDA) were all obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Yeast extract and agar were obtained from AES laboratory (Bruz, France). Peptone was obtained from Biokar diagnostics (Beauvais, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) was obtained from Prolabo (Leuven, Belgium). Propidium iodide (PI) was obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

Culture conditions

In order to highlight the effect of medium on yeast response referred to dehydration conditions, two different media were used for culture: G- and G+. The medium G+ has proved to increase the glutathione content in yeast cells (Jae-Young Cha 2004). Stocked yeast cells were grown with an initial OD_{600} of 0.2 in 50 mL of the G- medium containing 30 g/L glucose, 3 g/L yeast extract and 0.6 g/L KH_2PO_4 for pre-culture. The cells were then grown in two different media: G- (previously described) and G+ media (30 g/L glucose, 30 g/L yeast extract, 0.6 g/L L-cystein and 0.6 g/L KH_2PO_4). The culture was grown in 250 mL battled Erlenmeyer flasks and shaked in an incubator at 140 rpm and 30 °C for 24 h, respectively. The cells at stationary phase were harvested by centrifugation (2500 g, 22 °C, 5 min) and then washed two times with acetate buffer (pH 3.8) before each drying experiment. Microbiological experiments were carried out once for spectral acquisition and in triplicate at least from independent pre-cultures and cultures for the other analysis.

Synchrotron FTIR microspectroscopy (S-FTIR)

S-FTIR was performed at individual cell level in order to identify biochemical composition changes in *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during air-drying processes and to evaluate whether individual cells could exhibit different behaviors. It was performed at the SMIS

beamline at the SOLEIL Synchrotron Facility (Saint-Aubin, France). The beamline is equipped with a Thermo Scientific Continuum infrared microscope coupled with a Thermo Scientific Nicolet 8700 spectrometer. The S-FTIR measurement was performed in Attenuated Total Reflectance (ATR) mode. The spatial resolution was improved by a factor equal to the refractive index of the ZnSe (2.3 in the mid-IR) allowing single cell measurement. The aperture size of S-FTIR microspectroscopy was adjusted to 10 x 10 µm. Due to the refractive index of ZnSe (n = 2.3), a spatial resolution of 4.3 x 4.3 µm could be obtained.(Passot, Gautier et al. 2015) Single yeast cell are around 5 µm in diameter. Individual spectra were acquired at 4 cm^{-1} spectral resolution, with 256 scans encompassing the mid-infrared region from 4000 to 800 cm^{-1}. Because of the time for spectra acquisition, spectra signals of same five cells were collected only at 96 %, 23 % and 8 % RH for each sample. The set of equipment is presented in **figure 1**.

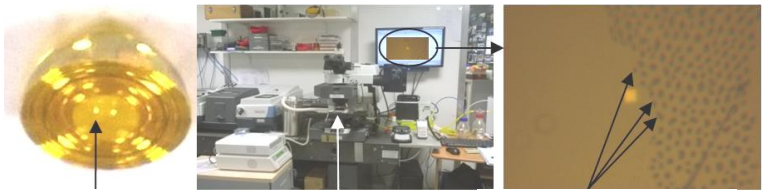


Figure 1. Representation of equipment used for spectra acquisition.

Air-drying process

Yeast cells were air-dried in a multistep process: the relative humidity (RH) was decreased progressively from 96 % to 60 %, 40 %, 23 % and 8 % in a Linkam FTIR600 stage by controlling RH and temperature. Different RH levels were generated by mixing different amounts of air at 99 % RH obtained by air circulation through a water bubbler and air at 1 % RH obtained from a Balston FTIR purge gas generator. The RH level was measured with a Radiospare RS1364 Humidity-Temperature Meter. The yeast cells were maintained for 30 minutes at each RH. Air-drying was performed at two temperatures (25 °C and 45 °C), respectively. The FTIR600 chamber was mounted horizontally on the automated-XY stage of a Thermo Scientific Continuum infrared microscope in order to collect the infrared spectra. A ZnSe hemisphere was used for collecting the spectra in Attenuated Total Reflection (ATR) mode (Passot, Gautier et al. 2015), which improved the spatial resolution by a factor of 2.3 and was used as a support for the drying process.

Two µL of the fully hydrated yeast suspension were deposited on the ZnSe ATR hemisphere and held at room temperature for 30 minutes (25 °C and 25% RH) in order to fixe the

sample on ZnSe hemisphere surface. This induced an obligatory drying step. Before careful insert of sample in the FTIR600 chamber stage for *in situ* analysis, cells were partially rehydrated in an external chamber with relative humidity equilibrated by distilled water for 60 minutes. The sample was then analyzed *in situ* and in real time at a given temperature (25 °C or 45 °C) and following controlled RH air (96 %, 60 %, 40 %, 23 %, 8 %) steps.

For yeast survival and physiological state measurements, cells were dehydrated in an external chamber with water activity controlled in order to reproduce similar experimental dehydration conditions as under the Linkam FTIR600 stage. In this chamber water activity was maintained at 0.96 (96 % RH) by saturating the atmosphere with distilled water and at 0.23 (23 % RH) and at 0.8 (8 % RH) by using à saturated solution of sodium acetate and of lithium chloride. **Figure 2** resumes the air-drying steps and all experimental conditions.

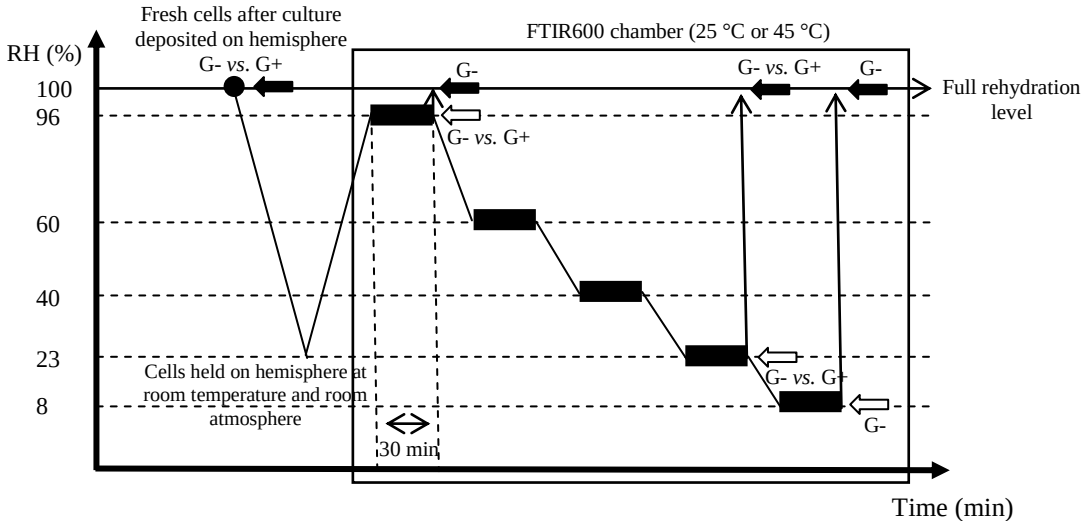


Figure 2. Diagram of drying steps and analysis performed on samples. Up arrows (⇑) indicate that the samples were completely rehydrated. Black arrows (⇐) indicate the samples that cells were complete rehydrated and cultivability was performed. White arrows (⇦) indicate the samples that S-FTIR spectra acquisition were performed in real time. "G-" symbols indicate that the analyses were performed for G- yeast. "G- *vs.* G+" symbols indicate that the analyses were performed for G- and G+ yeasts. In the Linkam FTIR600 specific chamber, the temperature was controlled at 25 °C or 45 °C. The maintained times for each relative humidity were 30 minutes.

Estimation of yeast cultivability by colony forming unit method

Yeast cultivability was estimated using the Colony forming unit (CFU) method. Cells were fully rehydrated and the decimal dilutions were plated in YPDA medium containing 20 g/L glucose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract and 16 g/L of agar. CFUs were counted after incubation for 36 hours at 30 °C. The effect of air-drying processes on yeast cultivability was

presented by the destruction logarithm $\log_{10}(N/N_0)$, where N_0 was the CFUs obtained of fresh cells samples and N was the CFUs obtained of dried cells samples. All of the experiments were carried out in triplicate from different pre-cultures and cultures.

Data analysis

Samples were named according to the following systematic: Culture mediumRelative humidityTemperature. For example, G-2325 means that yeast cells were grown in G- medium and then air-dried at 23 % RH at 25 °C.

Statistical analysis was performed using Turkey test and difference in means was considered significant at $p < 0.05$. The results were presented as mean ± standard deviation.

The spectral results obtained from S-FTIR spectroscopy were recorded using the OMNIC software (version 8.1, Thermo Scientific). Principal component analysis (PCA) of spectra data was performed using UNSCRAMBLER X software (version 10.2, CAMO Process AS, Olso, Norway). Assignment of the principal absorption bands in yeast was performed using data from the literature **(table 1)**. Three main spectral regions were defined: S1 (3650-2800 cm^{-1}), S2 (3050-2800 cm^{-1}: sub-region of S1), and S3 (1800-1500 cm^{-1}). The region S1 and S2 exhibit the OH stretching vibrations in carbohydrates, the stretching vibration of NH from proteins, and lipids CH_2 and CH_3 stretching vibrations. The region S3 dominated by the protein amide bands.

Raw spectra in the S1 regions were first baseline-corrected and then normalized using the Extended Multiplicative Scattering Correction model. Spectra in the region S2 and S3 were pre-processed by calculating the inverted second derivative (Savitsky-Golay, order 3, 11-point smoothing factor), followed by normalization using unit vector normalization model.

We performed dehydration kinetics under the microscope. Each dehydration step was 30 minutes. This constrained the time for spectral acquisition thus, the use of a synchrotron source allowed speeding-up the acquisition and collect 5 or 6 cells in the limited time available for each step. Principal component analysis (PCA) was used to identify specific regions of the FTIR spectra that contribute to the discrimination of these yeast populations during air-drying processes. PCA was carried out on spectra from eight groups (5-6 spectra par group): two levels of RH (96 %, 23 %) of G- and G+ cells combined with two levels of temperature (25 °C and 45 °C) in two spectral region S2 and S3. The PCA was performed using the Singular Value Decomposition algorithm on preprocessed, mean-centered data and the first 6 components were computed.

RESULTS and DISCUSSIONS

Correlation between hydration level and yeast survival

In order to highlight the effect of RH on yeast cultivability, the cultivability of yeast was only performed for G- cells at 25 °C in function of relative humidity. The survival logarithm of G- cells according to the reduction of RH is shown in **figure 3A.** The highest value of $\log_{10}(N/N_0)$ is observed in the case of the G-9625, and the lowest value is obtained from the G-0825. Moreover, a 2.2 fold decrease ($p < 0.05$) was found between the $\log_{10}(N/N_0)$ of G-9625 (-1.34) and G-2325 (-3.02). Thus, it indicates that a decrease of relative humidity of the air used for drying process induced an increase of cell death. However, no significant difference in yeast cultivability was observed when comparing G-2325 to G-0825. It means that the yeast cultivability is no longer affected or only decreased slightly when the relative humidity of air-drying continues to decrease. According to a previous study, a progressive decrease of yeast cultivability is observed for decreased water activities up to 0.30 (30 % RH) (Lemetais, Dupont et al. 2012). Other authors have reported that the kinetics of viability of *Listeria monocytogenes* at 11 % RH were similar to those during drying at 43 % RH (Zoz, Iaconelli et al., 2016).

Thus 23 % RH can be considered to be an adequate threshold for the following comparative study between the effect of temperature and culture medium on yeast cultivability (figure 3B). A significant decrease ($p < 0.05$) of the survival rate (1.94 fold) with an increase in temperature from 25°C to 45°C was observed in the case of G-cells. When considering the cells grown in the G+ medium, no significant difference was obtained in the survival rate at 25 °C (G+2325) as compared to 45 °C (G+2345). Therefore an increase in temperature induced a decrease in survival of G- cells.

The effect of medium culture was only observed at 45 °C. When comparing the $\log_{10}(N/N_0)$ of the G+2325(-2.0) to the G-2325 (-3.0), no significant difference was found. In contrast, the results showed a high decrease in the cell cultivability from -3.23 up to -5.88 between G+2345 and G-2345 ($p<0.05$). It can be thus concluded that the G+ medium better improved the cell tolerance during air-drying at 23% RH and 45 °C.

According to our preliminary results (data not shown), the glutathione content measured in yeast cells grown in G+ medium is approximately 1.4 fold higher than the ones grown in G- medium. Furthermore, the size of G+ cells is also bigger than G- cells (data not shown). Those differences in cells morphology and glutathione metabolism could be reasons for different survival levels of the yeasts. In light of literature, the important role of glutathione in the maintenance of intracellular redox balance and cell response during dehydration has been demonstrated (Izawa, Inoue et al., 1995; Penninckx 2000; Espindola, Gomes et al., 2003; Garre,

Raginel et al., 2010). Nevertheless, to our knowledge, it is the first time that simultaneous variations of temperature and relative humidity were applied for investigation of stress responses to dehydration of cell enhanced in glutathione content.

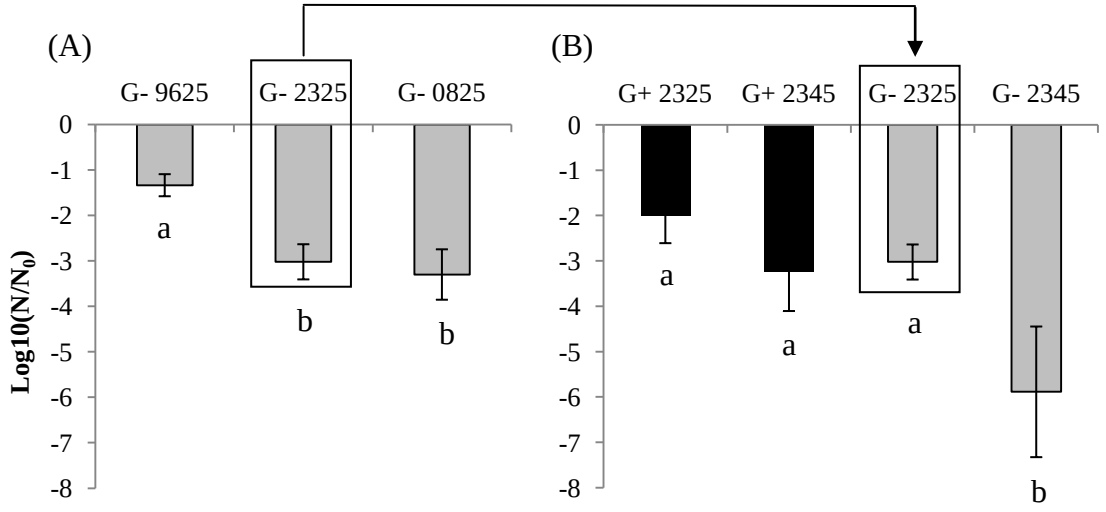


Figure 3. Yeast cultivability of yeast cells: (A) at different RH level 96 %, 23 % and 8 % at 25 °C for the medium G-; (B) after air-drying with 23 % of RH at 25 °C and 45 °C for both mediums G+ and G-. Letters represent statistical contrast between samples at the 95 % level confidence.

The reduction of relative humidity induces the removal of water content in yeast. This led to cell death as described above. The relationship between hydration level and yeast survival is here reported.

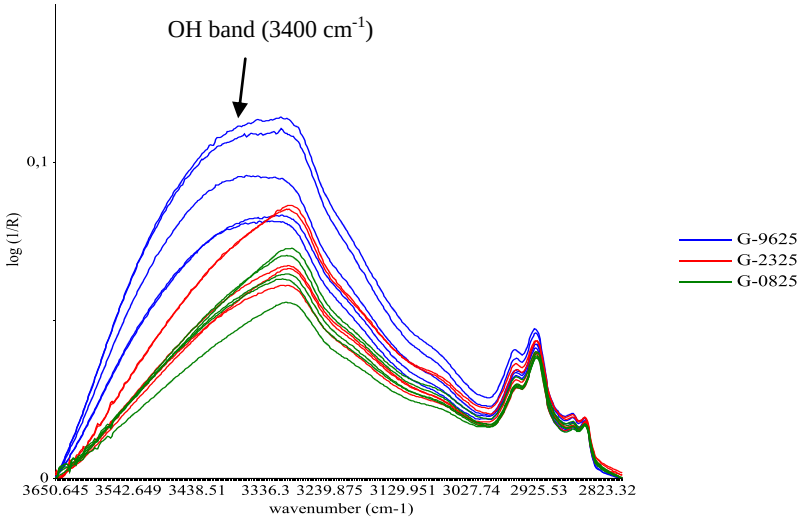


Figure 4. Corrected spectra of yeast grown in G- medium at 96 %, 23 % and 8 %. The dehydration process was performed at 25 °C.

The region S1 (3650-2800 cm^{-1}) can give us the information about water content in cells by the analysis of the OH bands (3500-3400 cm^{-1}). **Figure 4** presents the corrected spectra of G-

9625, G-2325 and G-0823 in S1 region. The results show that the G-9625 is specifically correlated to higher contribution of OH absorption bands (3400 cm^{-1}). The intensity of OH absorption bands can be associated to water:biomass ratios. We found that the OH:CH_3 ratio (water:lipid) of the G-9625 (2.58 ± 0.20) is significant higher than that of the G-2325 (1.86 ± 0.15) and the G-0825 (1.75 ± 0.15). It indicates higher water content within G-9625 sample as compared to G-2325 and G-0825. There is no difference in hydration level between G-2325 and G-0825. Therefore, the yeast cells were well dehydrated at low relation humidity conditions.

The OH:CH_3 ratios were also calculated for G+2325, G+2345 and G-2345. The correlation between dehydration level expressed by OH/CH_3 ratio and the yeast survival is shown in **Figure 5**. A linear relationship was found (R^2=0.91) indicating that a high hydration level is correlated with a preserved cultivability. When considering G- cells, the dehydration level was stabilized from 23 % to 8 % RH at 25 °C corresponding to a stability of cultivability of the yeast in this RH range. Moreover, an increase in temperature induced a decrease in hydration level for a same time length at 23 % RH. Therefore high temperature can as expected accelerate the removal of water content in yeast and this is the stronger factor that resulted cell death according to the dehydration conditions. At 23 % RH and 45 °C, the hydration level of G+ yeast was higher than that of G- yeast. This corresponds to higher yeast survival of G+ cell compared to G- cell.

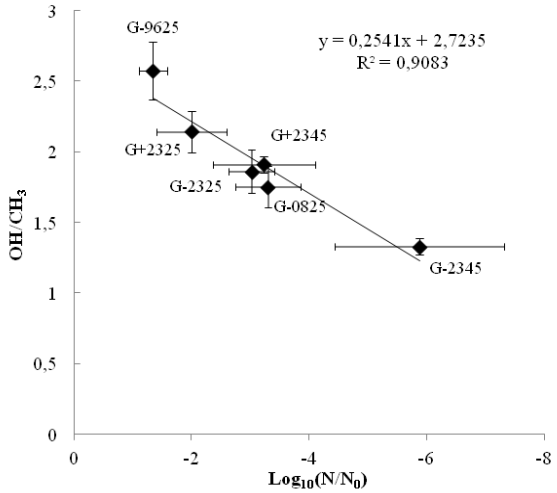


Figure 5. Correlation between water:lipid ratios and survival logarithm of the yeast in different conditions of relative humidity, grown culture and temperature.

Biochemical modification of yeast during dehydration process

S-FTIR spectra assessments of yeast growth in two media culture G- and G+ were performed in real time at 25 °C and 45 °C in order to investigate the effect of medium culture on biochemical modification of cell during dehydration process (from 96% to 23% RH) at two

temperature level. We carried out PCAs on the second derivative to evaluate the spectral heterogeneity in the lipid (3050-2800 cm^{-1}) and protein regions (1800-1500 cm^{-1}). PC1 *vs.* PC2 score plots of the lipid and protein spectral regions computed for the dehydration conditions mentioned above are represented in the figure 6.

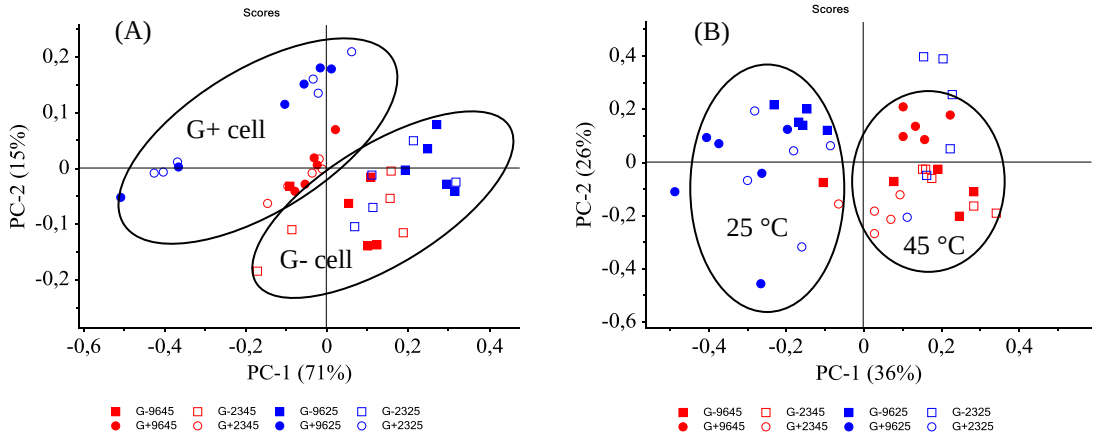


Figure 6. Principal component analysis (PCA) of second derivative infrared spectra obtained during dehydration processes in real time. RH was controlled at 96% and then reduced to 23% and temperature was controlled at 25 °C or 45 °C. Yeast cell was grown in two medium culture G- and G+. PCA was performed in lipid spectral region (A) and protein spectral region (B).

Biochemical modification in lipid composition

When considering the lipid region, cluster separation is only observed according to medium culture (figure 6A). The G+ population was separated from G- population, regardless of temperature and RH considered. It indicates that the spectral variance is related to medium culture corresponding to the effect of this factor on biochemical difference of cell in the lipid region. This could be due to the different composition of two medium cultures. Moreover slight higher heterogeneity within G+ cell (separation according to temperature) was observed as compared to G- cell. In lipid region, spectra present mainly absorption from CH bands of CH_2 and CH_3 peaks of methylene and methyl groups (2960; 2875 cm^{-1} and 2925; 2855 cm^{-1}) in lipid composition. The second derivative of infrared spectra was represented in figure 7. The average of infrared spectral was used for the sake of clarity. In this lipid region, the band position of the symmetric CH stretching vibration of the CH_2 groups is often considered as an indicator of membrane fluidity (Alvarez-Ordóñez, Halisch et al., 2010). In the literature, Passot et al. (2015) have been demonstrated that freezing resulted a shift of the symmetric CH vibration from 2854 cm^{-1} to 2850 cm^{-1} and this was associated with a rigidification of the membrane and a loss of membrane integrity of bacteria cell (Passot, Gautier et al., 2015). However, the results show that no band position shift was observed for either G- or G+ cell at two temperatures (figure 7).

Therefore the modification of membrane fluidity of yeast is not found according to the dehydration conditions. Moreover, the intensity of CH_2 and CH_3 bands was similar between cells at 96% and at 23% RH for either 25 °C or 45 °C. It indicates that there is not modification in CH_2:CH_3 ratios in yeast according to the reduction of RH and the temperature change. Therefore the effect of RH and temperature was not detected by S-FTIR analysis in this region. According to medium culture used, the results show that the G+ cell appeared to be specially correlated to higher relative amounts of CH_3 methyl group while G- cells was characterized by stronger CH_2 methylene group, regardless of RH and temperature considered. The higher absorption in methyl and lower absorption in methylene groups can be related to the higher proportion of saturated fatty acid and lower content of cyclic fatty acid (Passot, Gautier et al., 2015). The difference in lipids can be also observed by the peak at 1745 cm^{-1} of C=O band absorption (figure 8). The G- cell was related to higher contribution of C=O band corresponding to higher relative lipid content as compared to G+ cell. Therefore this reveals that the different compositions of the growth culture media provoke changes in cell composition especially in membrane lipid composition. It has been demonstrated that bacteria cell characterized by higher saturated fatty acid content represented high survival after freezing (Gautier et al., 2013). It suggests that a high proportion of saturated fatty acid can induce an increase in yeast resistance against dehydration. In contrast, the G- yeast presents high lipid content containing mainly cyclic fatty acid. The reduction of survival could be due to higher oxidation level of lipids. Moreover the G- yeast contains low glutathione content (data not shown). In future study, the measure of oxidation level may be interesting in order to clarify this hypothesis.

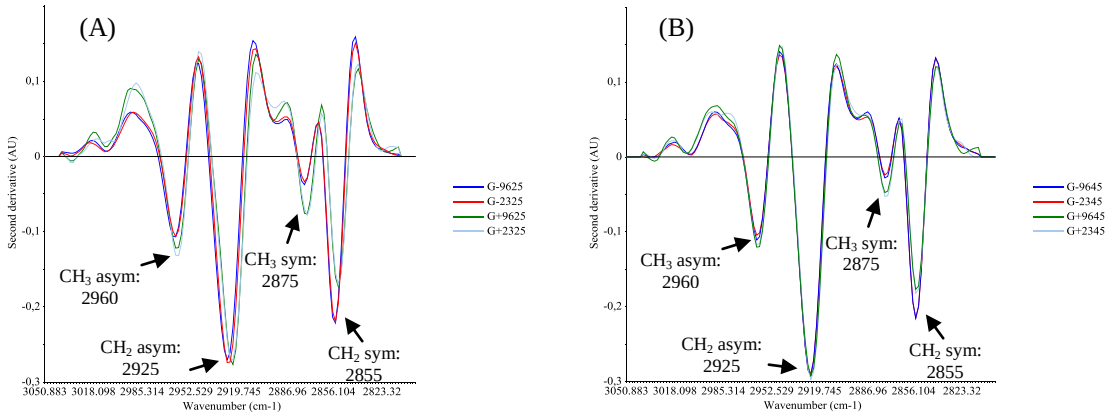


Figure 7. Second derivative of average infrared spectra of yeast grown in two media culture G- and G+ during dehydration process at 25 °C (A) and 45 °C (B) in the lipid spectral region from 3050 to 2800 cm^{-1}. The RH of dehydration process was controlled from 96 % to 23 %. For each temperature and medium culture, infrared spectra assessment of yeast was performed in real time with the same individual cells in function of RH modification.

Biochemical modification in protein composition

When considering protein region from 1800 to 1500 cm^{-1}, cluster separation is observed according to temperature (figure 6B). Yeast dehydrated at 25 °C was separated yeast dehydrated that at 45 °C, except G-2325. It means that temperature affected protein composition of yeast according to dehydration conditions. The reduction of RH did not result biochemical modification in protein region for G+ cell. The effect of RH was only found in the case of G-cell. The heterogeneity observed within cluster could be due to secondary structure of protein. Figure 8 shows the second derivative of infrared spectra of samples during dehydration at two temperature 25 °C and 45 °C in the protein spectral region. In this region, S-FTIR spectra mainly represent the absorption of amide I (1658 to 1637 cm^{-1}) and amide II (1590 to 1550 cm^{-1}) bands of protein. The amide I band vibration is affected by the nature of the side chain that depends on the secondary structure of backbone of protein. The bands at 1653 and 1637 cm^{-1} are described as being feature of α-helix and β-sheet structure (Barth, 2007), respectively. The results show the difference in protein structure of yeast during dehydration processes at two temperatures.

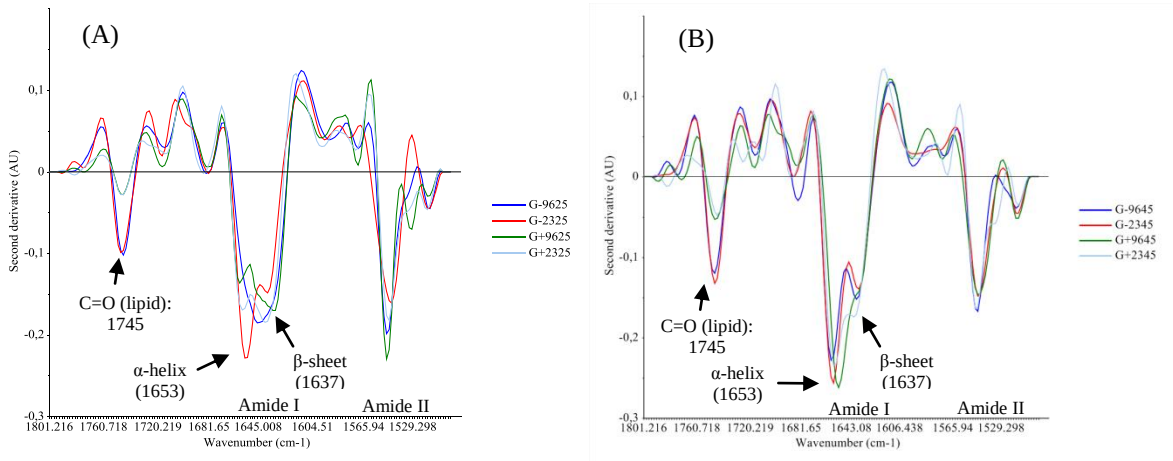


Figure 8. Second derivative of average infrared spectra of yeast grown in two media culture G- and G+ during dehydration process at 25 °C (A) and 45 °C (B) in the protein spectral region from 1800 to 1500 cm^{-1}. The RH of dehydration process was controlled from 96 % to 23 %. For each temperature and medium culture, infrared spectra assessment of yeast was performed in real time with the same individual cells in function of RH modification.

When considering the dehydration at 25 °C, higher intensity of α-helix bands at 1653 cm^{-1} was observed in the case of G-2325 as compared to G-9625. It indicates the modification in protein structure of G- cell during dehydration. However it seems that there is no difference in spectral absorption of both two bands of α-helix and β-sheet between G+9625 and G+2325. For G+ cell, the intensity of β-sheet band was higher that of α-helix, regardless of RH considered. Therefore the protein structure of G+ cell, which is characterized by amide I bands, was not

affected by dehydration. Moreover, it can suggest that the increase in intensity of α-helix bands could be an indicator of the modification of protein structure according to the conditions tested.

When considering the dehydration at 45 °C, the intensity of α-helix band was higher than β-sheet band, regardless of medium considered. It means that the difference in protein structure was not found according to medium culture during dehydration at high temperature. Following dehydration at 45 °C, a wavenumber shift of the amide I band from 1937 to 1953 cm^{-1} was observed, indicating a reduction of β-sheet protein content and an increase in α-helical protein content when comparing with dehydration process at 25 °C. It can confirm that the increase in intensity of α-helix bands could be an indicator of the modification of protein structure according to the conditions tested. Consequently, temperature resulted in protein conformational changes for either G- or G+ cell. However S-FTIR result in protein spectral region cannot help us to explain the difference in survival between G+ and G- yeast at 45 °C. The increase in yeast survival in G+ medium may be not related to protein conformation.

The infrared spectra of dehydrated cell unfortunately appeared to be too noisy in the 1200-900 cm^{-1} region to be correlated targeted by multivariate analysis. The small aperture used in this signal (10 x 10 µm) to reach single-cell spatial resolution strongly increases the noise at the longer wavelengths (wavenumber lower than 1000 cm^{-1}).

CONCLUSION

In conclusion, this work reported biochemical analysis of yeast during dehydration by S-FTIR microspectroscopy. By calculating the hydration level during dehydration processes and the cell survival, the correlation between two factors was shown. The G+ medium, which is rich in nutriment and glutathione precursor, allowed yeast to survive better during dehydration process up at 45 °C as compared to G- cells. This could be related to the high relative amounts of CH_3 methyl groups in lipid composition. We did not find the relation between cell survival and protein structure modification according to dehydration conditions. Furthermore, the cell heterogeneity in biochemical responses to the fermentation and dehydration conditions within yeast population was reported. However further work is needed on larger numbers of cells to confirm the heterogeneity of dehydration behavior between cells. Therefore, this work demonstrated the feasibility of using S-FTIR for investigating of yeast response to dehydration in real time for the first time. The spectra obtained were only related to dehydration. This method can be used for understanding effect of dehydration/rehydration on biochemical modification of yeast.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thanks the French national synchrotron facility SOLEIL (Gif sur Yvette, France) and the SMIS beamline (proposal n^{o} 20140185) for their support in preparing the samples and in performing the Synchrotron FTIR microspectroscopy.

REFERENCES

Alvarez-Ordóñez, A., J. Halisch, et al. (2010). "Changes in Fourier transform infrared spectra of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions." International Journal of Food Microbiology **142**(1–2): 97-105.

Barth, A. (2007). "Infrared spectroscopy of proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1767**(9): 1073-1101.

Beker, M. and A. Rapoport (1987). Conservation of yeasts by dehydration. Biotechnology Methods, Springer Berlin Heidelberg. **35:** 127-171.

Beney, L., I. M. n. de Marañón, et al. (2001). "Osmotic destruction of Saccharomyces cerevisiae is not related to a high water flow rate across the membrane." Biochemical Engineering Journal **9**(3): 205-210.

Burattini, E., M. Cavagna, et al. (2008). "A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae." Vibrational Spectroscopy **47**(2): 139-147.

Cavagna, M., R. Dell'Anna, et al. (2010). "Use of ATR-FTIR Microspectroscopy to Monitor Autolysis of Saccharomyces cerevisiae Cells in a Base Wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(1): 39-45.

Crowe, J. H., J. F. Carpenter, et al. (1998). "The role of vitrification in anhydrobiosis." Annual Review of Physiology **60**(1): 73-103.

Dupont, S., L. Beney, et al. (2010). "Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1798**(5): 975-985.

Dupont, S., G. Lemetais, et al. (2012). "Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?" Evolution **66**(9): 2961-2968.

Espindola, A. d. S., D. S. Gomes, et al. (2003). "The role of glutathione in yeast dehydration tolerance." Cryobiology **47**(3): 236-241.

França, M. B., A. D. Panek, et al. (2007). "Oxidative stress and its effects during dehydration." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **146**(4): 621-631.

Fu, N. and X. D. Chen (2011). "Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes." Food Research International **44**(5): 1127-1149.

Garre, E., F. Raginel, et al. (2010). "Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts." International Journal of Food Microbiology **136**(3): 295-303.

Gervais, P., P. A. Marechal, et al. (1992). "Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability." Biotechnology and Bioengineering **40**(11): 1435-1439.

Gervais, P., I. Martínez de Marañón, et al. (2003). "Cell volume changes during rapid temperature shifts." Journal of Biotechnology **102**(3): 269-279.

Gervais, P., P. Molin, et al. (1996). "Thermodynamics of yeast cell osmoregulation: Passive mechanisms." Journal of Biological Physics **22**(2): 73-86.

Guyot, S., E. Ferret, et al. (2006). "Yeast Survival during Thermal and Osmotic Shocks Is Related to Membrane Phase Change." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(22): 8450-8455.

Guyot, S., P. Gervais, et al. (2015). "Surviving the heat: heterogeneity of response in Saccharomyces cerevisiae provides insight into thermal damage to the membrane." Environmental Microbiology **17**(8): 2982-2992.

Heraud, P., B. R. Wood, et al. (2005). Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy.

Imlay, J. A. (2003). "Pathways of Oxidative Damage." Annual Review of Microbiology **57**(1): 395-418.

Izawa, S., Y. Inoue, et al. (1995). "Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae." FEBS Letters **368**(1): 73-76.

J H Crowe, a. F A Hoekstra, et al. (1992). "Anhydrobiosis." Annual Review of Physiology **54**(1): 579-599.

Jae-Young Cha, J.-C. P., Beong-Sam Jeon, Young-Choon Lee and Young-Su Cho (2004). "Optimal Fermentation Conditions for Enhanced Glutathione Production by Saccharomyces cerevisiae FF-8." The Journal of Microbiology **45**(1): 51-55.

Jamme, F., J.-D. Vindigni, et al. (2013). "Single Cell Synchrotron FT-IR Microspectroscopy Reveals a Link between Neutral Lipid and Storage Carbohydrate Fluxes in S. cerevisiae." PLoS ONE **8**(9): e74421.

Lemetais, G., S. Dupont, et al. (2012). "Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival." Applied Microbiology and Biotechnology **96**(2): 471-480.

Miller, L. M. and P. Dumas (2006). "Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1758**(7): 846-857.

Passot, S., J. Gautier, et al. (2015). "Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies." Analyst **140**(17): 5920-5928.

Penninckx, M. (2000). "A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses." Enzyme and Microbial Technology **26**(9–10): 737-742.

Ragoonanan, V., J. Malsam, et al. (2008). "Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of Geobacter sulfurreducens." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1778**(10): 2283-2290.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2010). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast Saccharomyces cerevisiae after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating." Analytical and Bioanalytical Chemistry **396**(4): 1441-1450.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2007). "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1768**(6): 1600-1610.

Wolfe, J., M. F. Dowgert, et al. "Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions." The Journal of Membrane Biology **93**(1): 63-74.

Zoz, F., C. Iaconelli, et al. (2016). "Control of Relative Air Humidity as a Potential Means to Improve Hygiene on Surfaces: A Preliminary Approach with Listeria monocytogenes." PLoS One **11**(2): e0148418.

Résultats complémentaires

Dans cette partie, l'effet du milieu de culture sur le métabolisme de la levure dans les conditions de déshydratation sélectionnées est décrit. Les cellules ont été cultivées dans les deux milieux de culture G- et G+. Le mode statique (voir la partie de Matériels et Méthodes page 53) de déshydratation a été appliqué. Les conditions de déshydratation sont 23% d'humidité relative finale à 25 °C ou 45 °C. Après déshydratation, les cellules ont été réhydratées rapidement. Pour estimer le métabolisme cellulaire, la concentration en glutathion et en enzyme glutathion réductaseglutathion réductase ont été dosés.

La concentration en glutathion total chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 qui a été cultivée dans les deux milieux G- et G+ avant et après déshydratation est représentée dans la figure 23. Le taux du glutathion réduit/total a été calculé pour étudier l'effet de cette molécule dans la défense de la levure dans les conditions de déshydratation. Le taux de glutathion réduit dans la cellule est utilisé comme un indicateur de l'oxydation (Garre, Raginel et al., 2010). Les résultats montrent que le glutathion chez la levure cultivée en milieu G+ (29,5 µg glutathion/10^8 cellules) est plus important qu'en milieu G- (21,3 µg glutathion/10^8 cellules). Cela confirme que le milieu G+ promeut la biosynthèse du glutathion chez la levure. Par contre, le taux de glutathion réduit chez la levure dans les deux milieux reste faible. Le glutathion réduit représente 10% du glutathion total des cellules à l'état frais. Garre et al. (2010) ont rapporté que le glutathion réduit est plus important que le glutathion oxydé lors que la levure est sous forme de crème (Garre, Raginel et al., 2010). La concentration du glutathion réduit peut varier probablement en fonction de la souche ou/et des conditions opérationnelles.

Le glutathion total diminue après déshydratation et ce dans les deux milieux de culture étudiés et aux deux températures de déshydratation appliquées. Cette perte est associée au rôle du glutathion dans la défense cellulaire contre les stress, en particulier l'oxydation. Pendant la déshydratation, pour protéger les protéines thiols de l'oxydation par les DRO, le glutathion oxydé peut former des ponts disulfures réversibles avec les protéines thiols dans la cellule (Kranner and Grill, 1996). La perte du glutathion total est alors liée à l'association des molécules de glutathion avec les protéines. Cela semble cohérent avec l'augmentation du taux du glutathion réduit/total après déshydratation (figure 23). De plus, le glutathion peut se dégrader en acides aminés lorsqu'il revient sous forme réduite. Les acides aminés sont utilisés dans d'autres voies métaboliques.

Pour la déshydratation à 25 °C, la levure G+25 perd 65% (18,93 µg) alors que la levure G-25 perd 92% (19,80 µg) du glutathion total. Ce résultat indique que la dehydratation entraîne une

perte de glutathion pour les deux levures G- et G+ mais que le milieu G+ permet à la levure de conserver une concentration en glutathion qui est environ 7 fois plus importante que le milieu G-. Bien que le taux de survie entre G+25 et G-25 n'est pas différent significativement (Nguyen et al. 2016, article 2), le glutathion préservé chez la levure G+ est probablement essentiel dans la résistance cellulaire contre le stress oxydatif pendant la conservation. De plus, le taux de glutathion réduit/total de la levure G+25 n'est pas différent significativement de celui du G+. Néanmoins ce taux est augmenté 3,6 fois (10% chez la levure G- à 36% chez la levure G-25). Cette différence peut être expliquée par l'association des molécules de glutathion oxydées aux protéines d'après le modèle de Kranner et Grill (1996) (Kranner and Grill, 1996) (voir partie synthèse bibliographique, page 21-22). Il est suggéré que le mécanisme d'action du couple glutathion réduit et oxydé est différent entre les levures G- et G+. Il semblerait que le rôle antioxydant du glutathion soit basé sur le glutathion réduit dans le cas de la levure G+ alors que l'action du glutathion est basée sur le glutathion oxydé dans celui de la levure G-. Autrement dit, l'action du glutathion oxydé a lieu après celle du glutathion réduit.

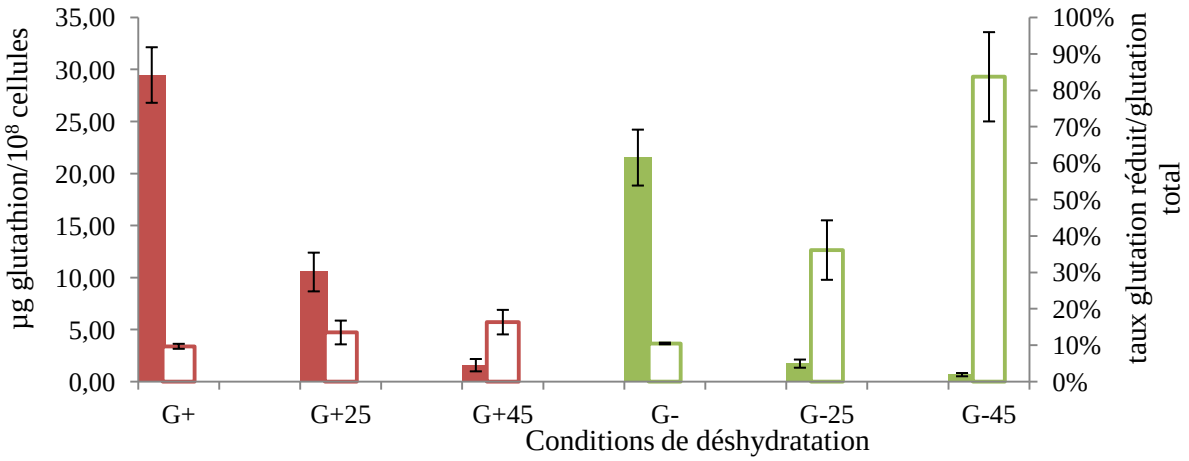


Figure 25. Concentration du glutathion total (barres pleines) et le taux du glutathion réduit/total (barres creuses) de la levure cultivée en deux milieux G- (barres vertes) et G+ (barres rouges). G- et G+ indiquent les levures avant déshydratation. G-25 et G+25 indiquent les levures déshydratées à 25 °C. G-45 et G+45 indiquent les levures déshydratées à 45 °C. L'humidité relative a été maintenue à 23 % pendant la déshydratation.

A 45 °C, les levures G+45 et G-45 perdent 95% (27,88 µg) et 97% (20,86 µg) du glutathion total respectivement. Cela signifie que l'augmentation de température entraine la diminution du glutathion, ce qui est probablement lié à une oxydation cellulaire élevée. Lorsque la température augmente, la fluidité membranaire augmente également (Dynlacht and Fox, 1992). Cela entraine une sensibilité accrue de la membrane à la présence de molécules oxydantes pendant la

déshydratation (Crowe, McKersie et al., 1989). En outre, les résultats montrent que le taux du glutathion réduit/total augmente significativement après déshydratation à 45 °C pour deux milieux G- et G+. Cela indique le retour du glutathion de la forme oxydée à la forme réduite. Cela pourrait confirmer l'hypothèse proposée concernant l'ordre d'action du couple glutathion réduit et oxydé dans le mécanisme de la défense cellulaire. D'une part, la concentration en glutathion réduit est plus importante chez la levure G+ que chez la levure G-. D'autre part, il est possible que d'autres molécules antioxydantes (enzymes antioxydants ou protéines thiols, par exemple) soient présentes en quantité plus importante chez la levure G+ puisque le milieu G+ est plus riche en nutriment que le milieu G-. Par conséquent, l'action du glutathion oxydé serait mise en place lors d'une faible intervention du glutathion réduit (faible quantité). Les autres molécules oxydantes sont également en faible quantité dans le cas de la levure G- à 25 °C et de la levure G- et G+ à 45 °C.

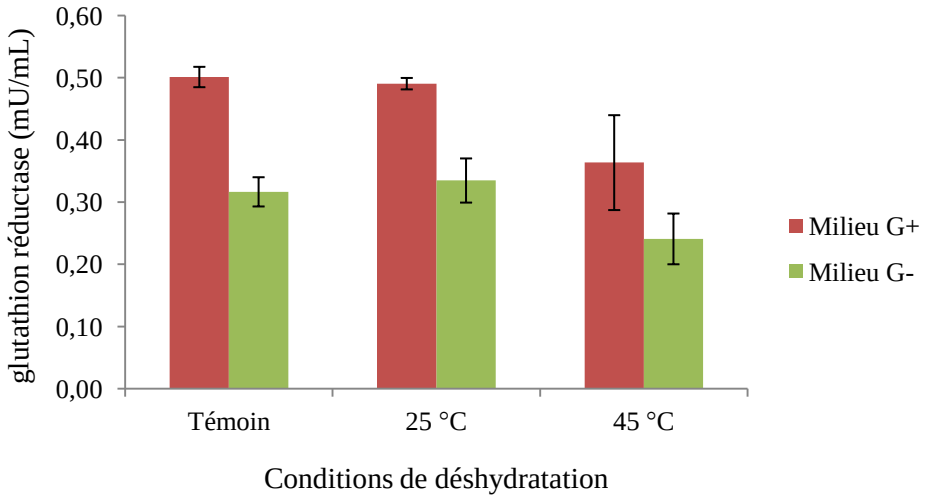


Figure 26. Activité de l'enzyme glutathion réductase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans les deux milieux G- et G+ dans les conditions de déshydratation à deux températures 25 °C et 45 °C.

La glutathion réductase est une enzyme antioxydante qui participe directement à restaurer les formes réduites du glutathion permettant ainsi son intervention dans le mécanisme de réductions des ponts disulfures des protéines thiols (Li, Wei et al., 2004). Le dosage de la concentration de cet enzyme peut permettre d'expliquer l'évolution de glutathion dans la levure avant et après déshydratation. La Figure 24 représente la concentration de l'enzyme glutathion réductase (mU par mL d'extrait) de la levure dans les deux milieux selon les conditions de déshydratation. Les résultats montrent que la concentration de la glutathion réductase est plus importante en milieu G+ qu'en milieu G- pour toutes les conditions testées. Cela est cohérent

avec l'hypothèse que les réactions de réduction des ponts disulfures par le glutathion réduit est plus important en milieu G+ puisque la concentration du glutathion est plus importante en milieu G+ qu'en milieu G-. Ces résultats permettent de clarifier l'observation de l'action du glutathion réduit chez la levure G+ et celle du glutathion oxydé chez la levure G-. En effet, la différence significative de la concentration de la glutathion réductase n'est pas observée chez la levure G- selon les conditions de déshydratation. Il indique une faible intervention du glutathion réduit dans le mécanisme de réaction. Au contraire, la diminution du glutathion réduit dans les conditions de déshydratation à 45 °C est associée à une réduction de la concentration de la glutathion réductase chez la levure G+.

5. Effet de l'encapsulation sur la résistance de la levure à la déshydratation (article 3)

La survie de la levure a été améliorée après déshydratation à 45 °C lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu G+. En respectant l'objectif de protection de la levure pendant la déshydratation, l'encapsulation couche-par-couche a été envisagée pour augmenter l'amélioration de la survie de la levure. De plus, l'effet de l'encapsulation sur la modification biochimique de la levure dans les conditions de déshydratation a été étudié afin de comprendre le mécanisme de la protection.

La levure a été encapsulée par la méthode couche-par-couche. Trois couches de β-lactoglobuline/Alginate/β-lactoglobuline ont été déposées alternativement sur la levure grâce à des attractions électrostatiques. La réponse des cellules encapsulées ou non aux conditions de déshydratation à 45 °C a été étudiée. L'amélioration de la survie de la levure grâce à l'encapsulation a été observée après déshydratation. De plus les résultats de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de la source Synchrotron ont permis d'expliquer partiellement le mécanisme de la protection.

Article 3:

Protective effect of microorganized shells of natural polyelectrolytes on yeast cell response against dehydration using synchrotron infrared microspectroscopy at the single-cell level

Thanh Dat NGUYEN[a], Stéphane GUYOT[a], Caroline PÉNICAUD[b], Stéphanie PASSOT[b], Christophe SANDT[c], Fernanda FONSECA[b], Rémi SAUREL[a*] and Florence HUSSON[a1]

[a]UMR PAM A 02.102, AgroSup Dijon, Université Bourgogne-Franche Comté, 21000, France

[b]UMR GPMA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

[c]SMIS beamline, Synchrotron SOLEIL, Gif sur Yvette, 91192, France

Summary

In the present paper, the layer-by-layer (LbL) self-assembly method using β-lactoglobulin and sodium alginate was performed to individually encapsulate *Saccharomyces cerevisiae* yeast in microorganized shells in order to protect cells against stress during dehydration. The protection of yeast against dehydration was evaluated by the measure of cell survival. In addition, for the first time, the potentiality of Synchrotron-Fourier Transform InfraRed microspectroscopy (S-FTIR) was explored at the single-cell level in order to analyze the contribution of the biochemical composition of non-encapsulated versus encapsulated cells in response to dehydration. For lipid composition, the results highlighted the fact that encapsulated yeast represented a higher contribution of CH_3 methyl groups whereas non-encapsulated yeast was characterized by CH_2 methylene groups. This difference may be related to different levels of yeast survival. The decrease in membrane fluidity was also observed by analyzing spectra in lipid region. However, there is no effect of encapsulation on the variation of membrane fluidity during dehydration. Moreover, no evident link between cell survival and the modification of protein conformation was observed after dehydration, when comparing encapsulated and non-encapsulated yeast. This work helps highlight the protection afforded to yeast by microorganized shells during dehydration and better understand the mechanisms of this protection.

Keywords

Yeast, encapsulation, dehydration, response, synchrotron FTIR

---

1 Corresponding author Florence Husson

Tel.: +33 03 80 77 23 94; E-mail: florence.husson@u-bourgogne.fr (F. Husson).

**: co-last authors.*

Introduction

Saccharomyces cerevisiae is a eukaryotic model organism widely used in many technological applications such as in food industries and in biofuel production. Before use, yeast end-production requires long-term stabilization processes preserving cell viability while maintaining their functionality. The main method used to preserve yeast is dehydration. However, during this process, cells are subjected to several stresses: mechanical, hydric, thermal and oxidative, inducing cell death (Beker and Rapoport 1987; Fu and Chen 2011). Many previous studies have identified the plasma membrane as one of the main targets of cell injury during cell water disturbance (Guyot, Ferret et al. 2006; Simonin, Beney et al. 2007; Dupont, Beney et al. 2011; Penicaud, Landaud et al. 2014). The cell wall, cytoplasmic membrane, nucleoplasm and vacuoles may be irreversibly destroyed during dehydration, as reported elsewhere (Beker and Rapoport 1987). On the other hand, dehydration in the aerobic state increases the contact between cell surfaces and air, thus inducing the accumulation of reactive oxygen species (Gamero-Sandemetrio, Gómez-Pastor et al. 2014). Another study has been shown that cell oxidation levels increase significantly during air-drying desiccation (Pereira de Jusus 2003; Garre, Raginel et al. 2010). It is the origin of oxidation phenomena, which cause damage to cell proteins, lipids and nucleic acids (França, Panek et al. 2007) with severe consequences on overall metabolism (Hansen, Go et al. 2006).

Yeast survival can be improved by using encapsulation methods. Among microencapsulation methods, the layer-by-layer (LbL) self-assembly technique has received particular interest. The LbL multilayer is built by means of the electrostatic attraction between oppositely charged polyelectrolytes forming successive layers deposited around the active core. This technique offers several advantages such as control over the required multilayer thickness (the wall thickness of capsules can be tailored in the nm-µm range by adjusting the counter-ions, polyelectrolyte concentration, pH), a broad selection of shell materials among several types of synthetic/natural colloids, the simplicity of the LbL process and equipment, and good biocompatibility and biodegradability (natural polyelectrolytes) (de Villiers, Otto et al. 2011). Moreover, the shell produced by this method is able to enhance cell resistance to external stress (chemical stress, heat, malnutrition, enzymatic action) and to control cell division (Hong, Park et al. 2013). The protection of yeast cells against dehydration by freezing using the encapsulation method has been demonstrated (Thomas, Vaidyanathan et al. 2014; Nguyen, Guyot et al. 2015).

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy is a powerful technique that reveals information on functional groups or bonds in biochemical components such as proteins, lipids, nucleic acids and carbohydrates of the whole cell, cell wall and membranes. Moreover,

synchrotron InfraRed beam source (S-FTIR) offers 100-1000 times higher brightness than that of a Globar IR source (Miller and Dumas 2006). This new possibility is crucial to examine very small samples, opening up investigation of biochemical composition at the single-cell level and observation of the heterogeneity of cellular behavior dependent on surrounding conditions. The potential of synchrotron FTIR (S-FTIR) microspectroscopy for imaging and spatially resolved biochemical analyses at the single-cell scale was demonstrated in previous works. Saulou et al. assessed the changes in *Saccharomyces cerevisiae* (Saulou, Jamme et al. 2010) and *Escherichia coli* (Saulou, Jamme et al. 2013) after exposure to nano-silver coating and free ionic silver, respectively. This technique provides an opportunity to examine physiological and biochemical state changes during stress conditions in order to identify more precisely molecular biomarkers of stress response. By simultaneously acquiring information on the biochemical and physiological properties of *Lactobacillus delbrueckii* cells, Passot et al. were able to assess relevant spectral biomarkers of the cryotolerance of lactic acid bacteria (Passot, Gautier et al. 2015).

In the present study, *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells were individually encapsulated in microorganized shells of natural polyelectrolytes in order to improve their survival during a dehydration process. The protective effect of the capsule was evaluated by means of cell survival measurements. Moreover, we explored the potentiality of S-FTIR to analyze the biochemical modifications of *Saccharomyces cerevisiae* upon dehydration at the single-cell level. Differences in the contributions of encapsulated and non-encapsulated cell compositions to the InfraRed signal suggest explanations for the stress response and the role of the capsule at the structural level during the dehydration process.

Results

Microorganized shells enhanced yeast survival in response to dehydration and induced biochemical modifications of cells

Saccharomyces cerevisiae cells encapsulated or non-encapsulated were dehydrated at 45 °C. Yeast survival was investigated by estimating cell cultivability. The cell cultivability of encapsulated and non-encapsulated yeast was evaluated before and after dehydration at 45 °C (table1). Results exposed in **table 1** indicate statistical contrasts between samples at the 95% confidence level. Before dehydration at 45 °C, no significant differences ($p<0.05$) in the logarithm of CFU per mL between encapsulated and non-encapsulated cells indicates that encapsulation conditions did not negatively affect yeast cultivability. Authors have demonstrated that yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* preserved their metabolic activities and were able to

divide after encapsulation process using LbL method (Diaspro, Silvano et al. 2002; Drachuk, Shchepelina et al. 2012).

Table 1. Cultivability counts (log CFU/mL) of *Saccharomyces cerevisiae* cells determined before and after dehydration

	Log CFU/mL	
	Before dehydration	After dehydration
Non-encapsulated cells	7.32 ± 0.03^{a}	3.96 ± 0.41^{b}
Encapsulated cells	7.17 ± 0.06^{a}	5.09 ± 0.35^{c}

Superscript letters represent statistical contrasts between samples at the 95% confidence level.

The results showed a decrease in the survival of both encapsulated and non-encapsulated yeast cells after dehydration, indicating the destructive effect of this process. The decrease in cell survival because of dehydration has been historically demonstrated in the literature (Morgan, Herman et al. 2006; Dupont, Beney et al. 2011; Fu and Chen 2011; Lemetais, Dupont et al. 2012). However, the decrease in encapsulated cells (2 log) was lower than that in non-encapsulated cells (3 log). The shell therefore provided a protective effect in the yeast response to dehydration. The protective effect of microorganized shells constructed using the layer-by-layer method was demonstrated on yeast survival to dehydration by freezing and freeze-drying (Thomas, Vaidyanathan et al. 2014; Nguyen, Guyot et al. 2015). To the best of our knowledge, this is the first time that the protection afforded by biopolymer shells against dehydration in air-drying at 45 °C has been reported in yeast.

Furthermore, the presence of biopolymers on yeast surface could induce the biochemical modifications of cells, which were analyzed by S-FITR. The biochemical differences could help us better understand the higher survival of encapsulated yeast compared to non-encapsulated after dehydration process. In our previous study, it was demonstrated that the average shell thickness of three layers (βlg/Alg/βlg) was approximately 140-190 nm (Nguyen, Guyot et al. 2015). This means that the evanescent wave probed the cell wall and the cytoplasm of the cell despite the presence of the microorganized shell.

Principal component analysis (PCA) was used to identify specific regions of the S-FTIR spectra that contribute to the discrimination of the fresh yeast cells (both encapsulated and non-encapsulated). We performed PCAs in the S1 region (3010-2800 cm^{-1}) and the S2 region (1800-1500 cm^{-1}), involving information about lipids and proteins. The first component (PC1) vs. the second component (PC2) score plots and the loading plots are presented in **figure 3**.

The S1 region (3010-2800 cm^{-1}) is dominated by the signal of the C-H stretching vibrations of CH_3 and CH_2 functional groups, corresponding to the fatty acid chains of the various membrane phospholipids and to some amino side-chain vibrations from proteins (Burattini, Cavagna et al. 2008; Passot, Gautier et al. 2015). Although PC1 captured the highest spectral variability (82%) it appeared to be related to the cell dispersion within each sample (figure 3A). This could be ascribed to differences in membrane composition of individual yeast cells.

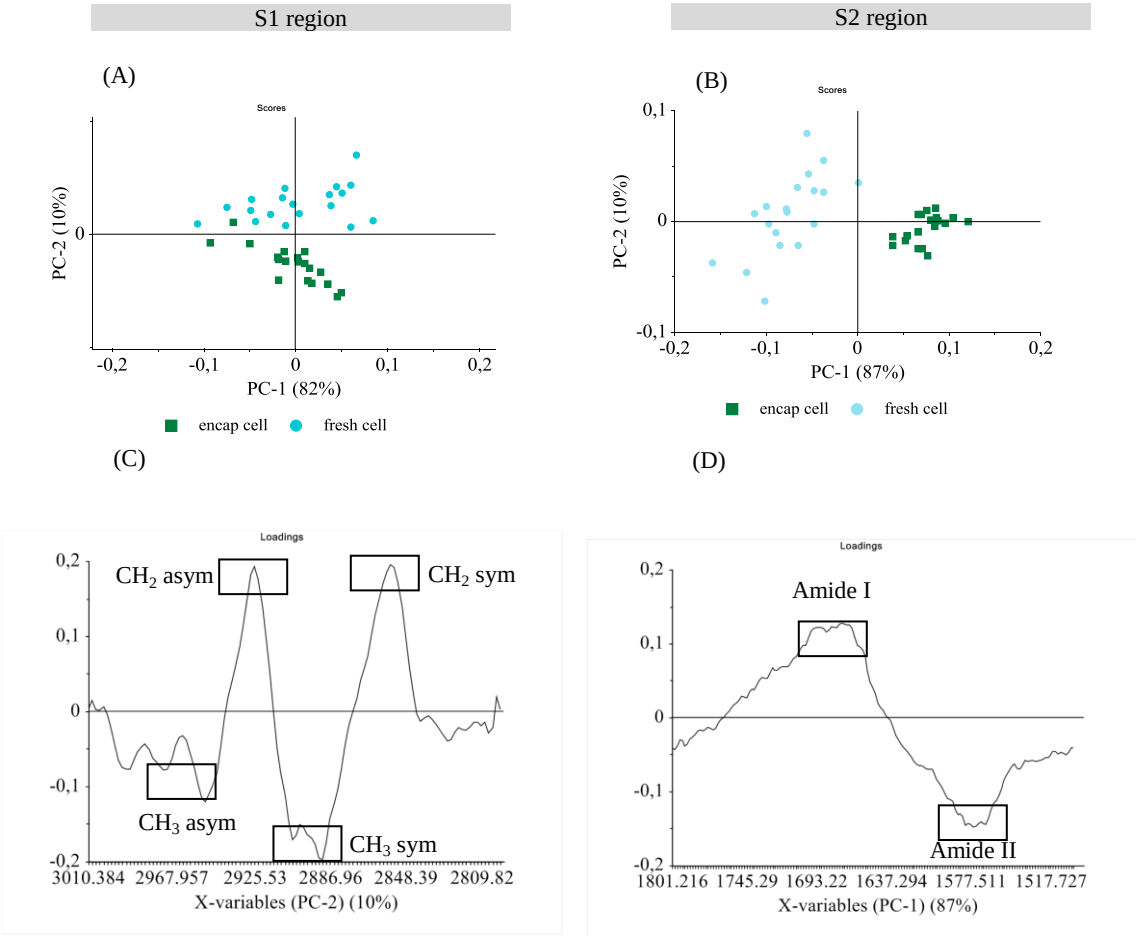


Figure 3. Principal component analysis of S-FTIR spectra obtained for encapsulated and non-encapsulated fresh cells in two spectral regions S1 and S2. PCA score plots (Fig A & B); and PCA loading plots (Fig C & D) of PC1 vs. PC2. The score plots show the discrimination between samples. The loading plots indicate the spectral variance within and between samples.

Although the most important chemical heterogeneity within yeast populations was not related to encapsulation in this spectral region, the PCA score plots showed a near perfect cluster separation according to encapsulation using PC2 with 10% of spectral variance. Non-encapsulated cells (fresh cell) clustered on the positive part, whereas encapsulated cells (encap

cell) clustered on the negative part of the PC2 axis (**figure 3A**). In **figure 3C**, positive peaks in the loading plot of PC2 correspond to spectral features associated with the non-encapsulated cell population and appear to be specifically correlated to the C-H stretching vibration of the CH_2 methylene group (2925 and 2850 cm^{-1}). The encapsulated cells were characterized by CH_3 methyl groups (2960 and 2890 cm^{-1}). The encapsulation process therefore slightly involved biochemical modification in lipids composition of yeast. The change of CH_2:CH_3 ratio could be the consequence of the interactions within the yeast/biopolymers system, in particular at lipid membrane level. Higher contribution of CH_3 bands can be related to higher number of short-chain fatty acids. In contrast, higher contribution of CH_2 bands can reflect the presence of longer and/or more saturated acyl chain (Ami, Natalello et al. 2009; Saulou, Jamme et al. 2013). Yeast response to dehydration could depend on the length and saturation of fatty acid chains. In the study carried out by Passot et al., the authors reported that cells grown in a rich medium presented a high content of the CH_3 groups from lipid chains and high bacteria survival after dehydration by freezing (Passot, Gautier et al. 2015). Freezing-resistant cells exhibited a higher content of unsaturated and cyclic fatty acids (Gautier, Passot et al. 2013). The modification of lipid membrane composition by the presence of microorganized shells could therefore induce a protective effect on yeast during dehydration process.

In the S2 region (1800-1500 cm^{-1}), infrared spectral absorption exhibits the C=O stretching of amide I, C-N stretching and N-H bending of amide II. According to the PCA score plot, PC1 capturing 87% of spectral variability separated encapsulated cell (encap cell) from non-encapsulated cell (fresh cell) clusters (**figure 3B**). Other principal components related to discrimination within the cluster, regardless of population considered. The most important chemical heterogeneity within yeast populations was therefore related to encapsulation in this spectral region. When considering PC1, the positive peaks of the amide I protein range were associated with encapsulated cell clusters, while the non-encapsulated cell population was characterized by the negative peaks of the amide II protein range (**figure 3D**). This evidences a change in the amide I/amide II ratio between the two cell populations. This suggests that the secondary structure of protein in encapsulated cells was different from the secondary structure of protein in non-encapsulated cells. The encapsulation induced changes in the yeast proteome that could result 1) from protein structure changes in existing proteins 2) from the expression of new proteins or 3) from a mix of both. Furthermore, by analyzing second derivative of S-FTIR spectra in this specific region (data not shown) the denaturation of proteins was not observed according to encapsulation.

Dehydration induced biochemical modification in yeast cells

The infrared spectra of individual encapsulated and non-encapsulated cells before (encap cell & fresh cell) and after (dried encap cell & dried cell) high temperature dehydration were monitored in two large regions, S3 (3650-2800 cm^{-1}) and S4 (1800-1500 cm^{-1}), which contain information on the water/biomass ratio and on biomolecules, respectively. These results are represented in figure 4.

The S3 region (3650-2800 cm^{-1}) includes the contribution of O-H stretching in carbohydrates around 3500-3400 cm^{-1}, the N-H stretching in proteins at 3300 cm^{-1}, the amide II overtone around 3100 cm^{-1}, the absorptions mainly assigned to CH_3 and CH_2 functional groups (asymmetric vibrations at 2960 cm^{-1} and 2925 cm^{-1}; symmetric vibrations at 2870 cm^{-1} and 2855 cm^{-1}) (Burattini, Cavagna et al. 2008). In **figure 4A**, the score plot shows the spectral variability along the PC1 axis within the groups. Dried yeast cell populations were separated from fresh yeast cell populations by PC1 with 89% of the spectral variance. Thus, PC1 revealed the effect of dehydration, regardless of whether the cells were encapsulated or not. According to the PC1 loading plot (figure 4C), the negative peak at 3400 cm^{-1} associated with O-H stretching vibration corresponds to the higher water content in the cell populations before dehydration that clustered on the negative part of the PC1 axis. The reduced O-H vibration absorption is thus clearly related to the decreased water content in yeast, resulting in osmotic stress which is one of the causes of the loss of cell cultivability (Gervais, Marechal et al. 1992; Beney, Martínez et al. 2000; Lemetais, Dupont et al. 2012). The higher contribution of proteins and fatty acid bands observed in dried cells could be due to the water:biomass ratios.

The S4 region (1800-950 cm^{-1}) carries the absorption peaks from proteins, lipids, nucleic acids, and cell wall polysaccharides (mannans and glucans) (Burattini, Cavagna et al. 2008; Passot, Gautier et al. 2015). The PCA score plot (figure 4B) shows a clear separation between fresh cell and dried cell populations using PC1 with 90% of the spectral variance. The fresh cells were found on the negative part while the dried cells were positioned on the positive part of the first principal component. Therefore, the spectral variability monitored by PC1 revealed the effect of dehydration in this spectral region.

According to the PC1 loading plot (figure 4D), the negative peaks of amide I (1660 cm^{-1}), polysaccharide (1200-900 cm^{-1}) and phosphate (1247 cm^{-1}) bands appeared to be associated with the fresh cells, while the dried cells were characterized by a higher contribution of amide II (1575 cm^{-1}) and proteins and lipids (1500-1300 cm^{-1}) bands. The discrimination between fresh and dried cells could therefore be ascribed to differences in secondary protein structure, RNA and cell wall composition. Ishida and Griffith reported a strong change in the

amide I/amide II ratio for β-lactoglobulin in solution compared to dehydrated films (Ishida and Griffiths 1993). This could explain the strong amide I/amide II changes at 1660 cm^{-1} and 1575 cm^{-1} in PC1 loadings. Differences in the intensity of proteins, lipids and polysaccharides bands between hydrated and dehydrated cells could be due to the amount of water in samples.

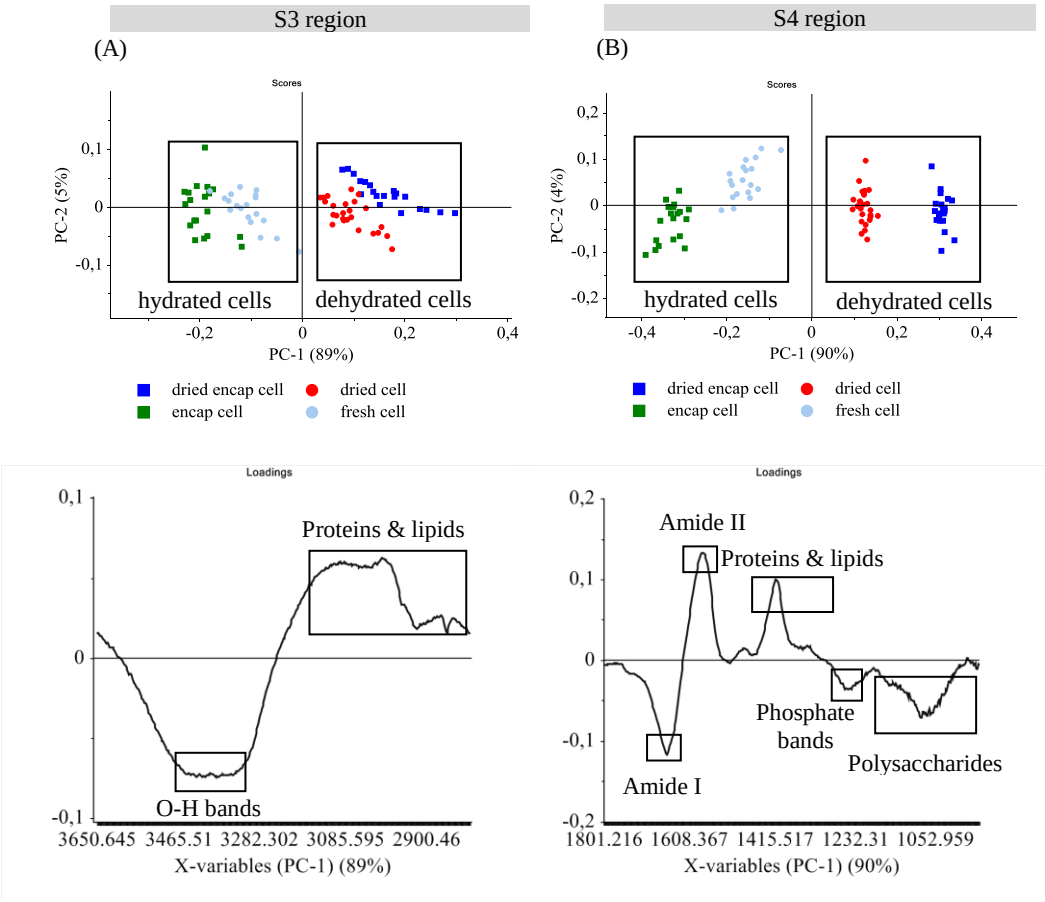


Figure 4. PCA score plots (figure A & B) of S-FTIR spectra of encapsulated and non-encapsulated yeast before and after dehydration in the two regions S3 and S4. PCA score plots (Fig A & B); and PCA loading plots (Fig C & D) of PC1 vs. PC2. The score plots show the discrimination between samples. The loading plots indicate the spectral variance within and between samples.

PCAs results of two large regions S3 and S4 showed clearly differences in yeast response to dehydration. In order to observe more precisely the effect of the dehydration process on yeast composition, we analyzed S-FTIR spectra in specific regions containing lipids and proteins information. The results are showed in figure 5 and 6.

Figure 5 presents the second derivative of averaged spectra for encapsulated and non-encapsulated cells before and after the dehydration process at 45 °C in the specific region (from

2900 to 2830 cm^{-1}) containing the contribution of the symmetric C-H stretching vibration of the CH_2 and CH_3 groups. After dehydration, the intensity of the CH_3 symmetric stretching band at 2875 cm^{-1} increased. This indicates that the ratio of the number of methylene groups to that of methyl groups decreased in dried samples, as compared to hydrated samples (both encapsulated and non-encapsulated cells). The decrease in number of methylene groups could correspond to the reduction of the number of long-chain fatty acids (Ami, Natalello et al. 2009), which could be a consequence of the degradation of lipid by hydrolysis or oxidation (Fuchs, Bresler et al. 2011). This suggests the degradation of the lipid membrane during dehydration process. Burattini et al. (2008) reported the reduction of the $\nu_{sym}(CH_2)/\nu_{sym}(CH_3)$ intensity ratio, which can be attributed to the degradation of fatty acid chains by β-oxidation, in their study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Burattini, Cavagna et al. 2008). Moreover, the difference in the $\nu_{sym}(CH_2)/\nu_{sym}(CH_3)$ intensity ratio of non-encapsulated cells between before and after the dehydration process at 45 °C was higher than that of encapsulated cells. It means that the length of the fatty acid chains of non-encapsulated cells were more negatively affected by the dehydration process at 45 °C than that of encapsulated cells. The presence of microorganized shells can therefore better preserve the lipid composition of yeast during dehydration.

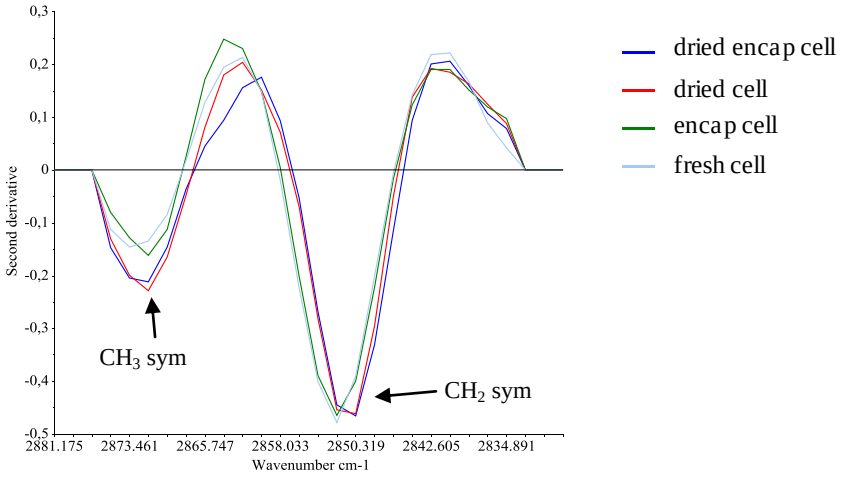


Figure 5. Second derivate of the spectra obtained of the samples in the S1 region.

Furthermore, dehydration can induce the variation in membrane fluidity and can be related to cell death. Authors reported that cell membranes became more rigid between aw 0.88 and 0.37 during dehydration at a constant temperature (Simonin, Beney et al. 2008). The band position of symmetric C-H stretching vibration of the CH_2 groups is reported as indicator of membrane fluidity (Alvarez-Ordóñez, Halisch et al. 2010). In the figure 5A, a shift of the CH_2 bands to a lower wavenumber is observed following dehydration, regardless of whether the cells were

encapsulated or not. This can be associated with the reduction of membrane fluidity. Passot et al. found that freezing resulted in a downshift of the symmetric C-H vibration of the CH_2 methylene groups (Passot, Gautier et al. 2015). Another study reported that the downshift of the symmetric CH_2 stretching peak associated with cell death (Saulou, Jamme et al. 2013). It seems that the presence of microorganized shells cannot preserve membrane fluidity of yeast during dehydration.

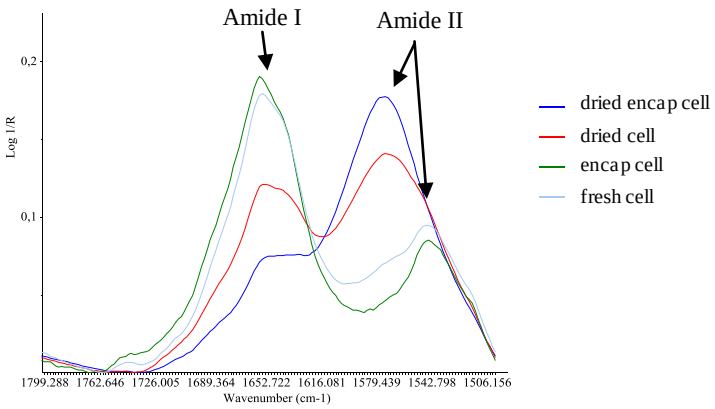


Figure 6. Average spectra of the samples in the S2 region.

Focus on the amide I and amide II protein region (figure 6), the spectral profile of yeast after the dehydration process at 45 °C was different from that of yeast before treatment. After dehydration, the intensity of amide I bands (1660 cm^{-1}) decreased in both encapsulated and non-encapsulated cells. The amide I vibration is hardly affected by the nature of the side chain. It depends instead on the secondary structure of the backbone and presents strong bands at 1653 cm^{-1} and 1633 cm^{-1}. These bands are described in the literature as being features of α-helix and β-sheet structures (Barth 2007). The downshift from 1633 to 1625 cm^{-1} and shoulder appearance have been reported as links to protein denaturation in yeast after dehydration/rehydration (Penicaud, Landaud et al. 2014). Furthermore, the results show that the appearance of the peak at 1575 cm^{-1} was observed after the dehydration process at high temperature in both encapsulated and non-encapsulated cells. Oberg et al. (2004) reported that amide II provides high information content and could be used alone for secondary structure prediction (Oberg, Ruysschaert et al. 2004). The amide II bands are recognized in the main peak at 1550 cm^{-1} (Barth 2007; Burattini, Cavagna et al. 2008; Cavagna, Dell'Anna et al. 2010). However, the data regions which can be used for these amide bands are limited, ranging from 1590 to 1500 cm^{-1} (Oberg, Ruysschaert et al. 2004; Zanyar Movasaghi 2008) or from 1480 to 1575 cm^{-1} (Kong and Yu 2007). The appearance of the peak at 1575 cm^{-1} might therefore be considered as a shift from the peak at

1550 to one at 1575 cm^{-1}, linked to the modification in protein conformation. Spectral analysis in the protein region represented the strong effect of the dehydration process at 45 °C on protein conformation. However, when considering the S-FTIR results in the protein region, no difference in yeast response to dehydration between encapsulated and non-encapsulated cells was observed.

Discussion

This work highlights the protective effect of microorganized shells in the yeast response of *Saccharomyces cerevisiae* strain to the dehydration process at 45 °C. Compared to non-encapsulate yeast, encapsulted yeast presented a significant increase in cell survival. Biochemical modification observed by S-FTIR can be considered as a biomarker of stress responses and can help us better understand the protection of yeast. In the lipid region, differences in the contribution of the C-H stretching of CH_2 and CH_3 vibration were found between encapsulated and non-encapsulated fresh yeast cells. As expected, this could associate with a higher amount of short-chain fatty acid in lipid composition of encapsulated yeast compared to non-encapsulated yeast. After dehydration process, the reduction of the $\nu_{sym}(CH_2)/\nu_{sym}(CH_3)$ intensity ratios could be related to the degradation of lipids in yeast cells. Thus, it seems that the degradation of lipid can be reduced when the chains of fatty acid are short, which were observed in the case of encapsulated yeast. The encapsulation process induced biochemical modification in lipid composition of yeast but this was beneficial for cell survival. The S-FTIR results showed the decrease in membrane fluidity of yeast after dehydration. However, the decrease was observed for both encapsulated and non-encapsulated yeast. There was no effect of the presence of microorganized shells on the variation of membrane fluidity during dehydration. In the protein region, the modifications of protein conformation were observed following dehydration. However, it seems that the effect on protein conformation of dehydration is stronger than that of encapsulation. No evident difference in S-FTIR results between encapsulated and non-encapsulated yeast was obtained in this specific region.

Furthermore, yeast survival has been reported to depend on how progressive dehydration and rehydration are. Authors reported that higher survival was observed when the dehydration/rehydration process was progressive (Lemetais, Dupont et al. 2012). The presence of microorganized shells on yeast could induce physically a protective effect. The shell can be a barrier that reduces the speed of water transfer and the dehydration/rehydration is more progressive, leading to higher cell survival.

Conclusion

This study provided evidence for the application of the LbL encapsulation method on *Saccharomyces cerevisiae* in order to protect yeast cells against dehydration at high temperature and highlighted the mechanism impact of this process on yeast cells. Moreover, the protective mechanism of microorganized shells on yeast responses was elucidated. The encapsulation process induced the modifications in lipid composition, which was beneficial for yeast survival. Moreover, the presence of hydrocolloids like β-lactoglobulin and alginate at the cell interface could be a major factor in the retention of water as they help construct a barrier limiting stress due to water transfer. S-FTIR microspectroscopy can thus be a useful technique to exploit the effect of encapsulation on the biochemical modification of cell to stress at the single-cell level. The LbL method of encapsulation might be a potential technique for stabilizing fragile yeast strains or other microorganisms like probiotics.

Acknowledgements

We would like to thank the French national synchrotron facility SOLEIL (Gif sur Yvette, France) and the SMIS beamline (proposal N° 20140185) for their support in preparing the samples and in performing Synchrotron FTIR microspectroscopy.

Experimental procedures

Yeast strain and materials

The yeast strain *Saccharomyces cereviae* BY4742 (*MATα his3Δ1 leuΔ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) was provided by Euroscarf (Frankfurt, Germany). Glucose, potassium acetate, sodium acetate, purified β-lactoglobulin (βlg, >90% purity) and L-cystein were all obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Yeast extract and Agar were obtained from AES laboratory (Bruz, France). Peptone was obtained from Biokar diagnostics (Beauvais, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) was obtained from Prolabo (Leuven, Belgium). Sodium alginate (Alg) was obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France).

Culture conditions

Stored yeast cells were grown with an initial OD_{600} of 0.2 in 50 mL of a medium containing 30 g/L Glucose, 30 g/L Yeast extract, 0.6 g/L KH_2PO_4, and 0.6 g/L L-Cysteine for pre-culture and culture. It was prepared in 250 mL battled Erlenmeyer flasks and shaken in an incubator at 140 rpm and 30 °C for 24 h. The cells in the stationary phase were obtained by centrifugation, and then were washed twice with an acetate buffer at pH 3.8 before use. All of the microbiological experiments were carried out in triplicate from independent pre-cultures.

Encapsulation procedure

Yeast cells were encapsulated as described in a previous study (Nguyen, Guyot et al. 2015). The cells were suspended in an acetate buffer at pH 3.8. The β-lactoglobulin (βlg) and sodium alginate (Alg) solutions were prepared for encapsulation at concentrations 0.1 % (v/v) and 0.01 % (v/v), respectively. The cells were first incubated with the Blg solution, then the Alg solution and finally the Blg solution. It means that the cells were encapsulated with three layers of biopolymers. The cell suspension (for final cellular concentration of 4.10^7 cells/mL) was maintained under low stirring for 20 min at room temperature for complete adsorption. The polyelectrolytes which were not adsorbed were washed twice with an acetate buffer between steps. At each step, the yeast cells were separated from the supernatant by centrifugation at 2000 × g for 3 min.

Dehydration process

Yeast cells were dehydrated at 45 °C following a previously described process (Lemetais, Dupont et al. 2012). A specific chamber consisted of an airtight plastic box with controlled relative humidity. A saturated salt solution of CH_3COOK was used to control the relative humidity in the chamber at 23 %. Samples were placed on a rack above the salt solution and the area of exposure was kept as large as possible in order to allow free diffusion of water. The chamber was maintained at 45 °C and ventilated to increase mass transfer for 1 hour. The conservation time before experiments lasted about 24 hours, and the samples were kept in the chamber at 23 % relative humidity at 25 °C.

Yeast survival

The yeast survival was investigated via a cell cultivability test using the Colony-Forming Unit (CFU) method. For dehydrated yeast, the cells were rapidly rehydrated in an acetate buffer. Decimal dilutions of samples (hydrated and dehydrated/rehydrated cells) were plated in YPDA medium containing 20 g/L Glucose, 20 g/L Peptone, 10 g/L Yeast extract and 16 g/L of Agar. CFUs were counted after incubation for 36 hours at 30 °C. All of the experiments were carried out in triplicate from independent pre-cultures and cultures.

Synchrotron FTIR microspectroscopy (S-FTIR)

Synchrotron infrared microspectroscopy was performed at the SMIS beamline at the SOLEIL Synchrotron Facility (Saint-Aubin, France). The beamline is equipped with a Thermo Scientific Continuum infrared microscope coupled with a Thermo Scientific Nicolet 5700 spectrometer. The S-FTIR measurement was performed in transmission mode using ZnSe windows. The aperture was adjusted at 5 x 5 μm^2 in order to collect the infrared signal at single

cell level. Single yeast cells are around 5 µm in diameter. The steps of the experiments are illustrated in **figure 1.**

For infrared spectra acquisition, 2 µL of hydrated cells (encapsulated and non-encapsulated cells) were directly deposited on the ZnSe window. Dehydrated cells (encapsulated and non-encapsulated), which were previously dehydrated in the specific chamber at 23 % relative humidity, were rapidly rehydrated in an acetate buffer and then 2 µL of dehydrated/rehydrated cells were deposited on the ZnSe window. Samples stayed on the ZnSe window at room temperature for 15 minutes before spectral acquisition. The room temperature was 25 °C and relative humidity was 25 % (measured by Radiospare RS1364 Humidity-Temperature Meter). Individual spectra were acquired at 4 cm^{-1} spectral resolution, with 256 scans encompassing the mid-infrared region from 4000 to 800 cm^{-1}. The high spatial resolution was obtained without compromising the quality of the infrared signal thanks to the synchrotron infrared radiation. For each condition tested, analyses were carried out on around 20 to 25 individual cells via a map **(figure 2)** using the OMNIC software (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA).

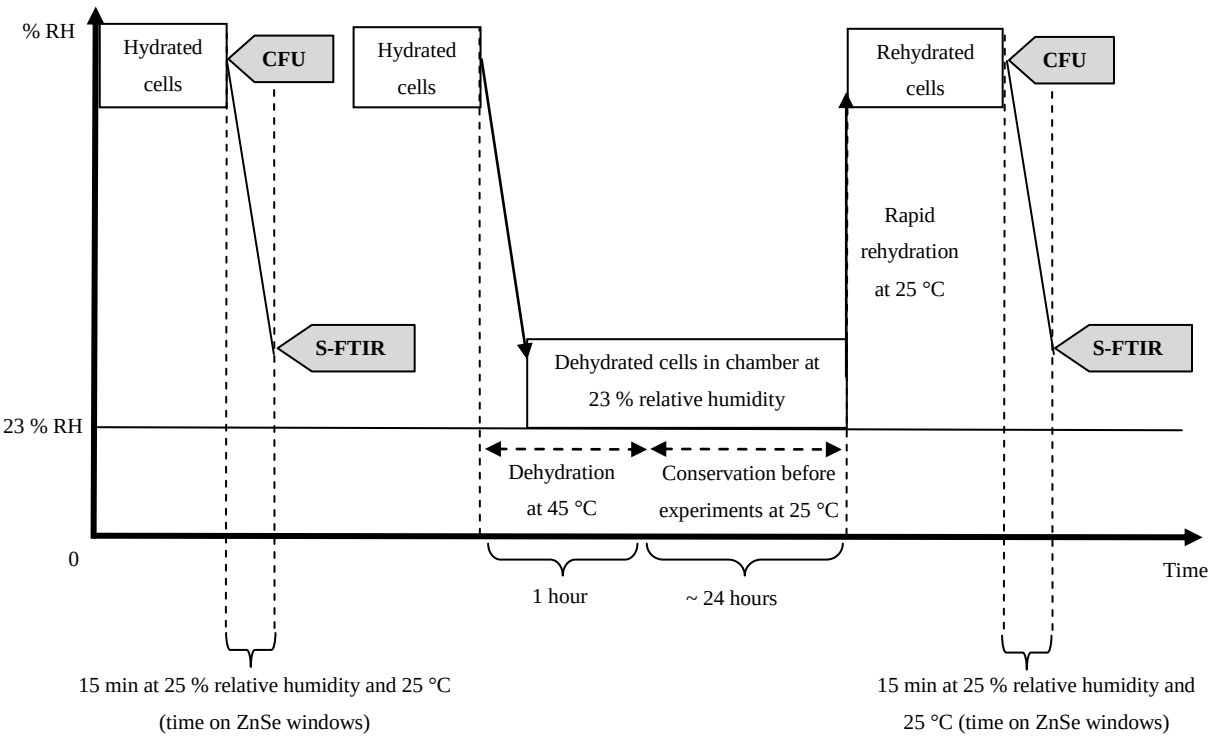


Figure 1. Experimental procedure used and analysis performed on the samples. Hydrated and rehydrated cells represent both encapsulated and non-encapsulated cells before and after the dehydration process at 45 °C. CFU (Colony-Forming Unit) was used to estimate cell cultivability. S-FTIR (Synchrotron FTIR microspectroscopy) was used to assess the biochemical composition of yeast cells. Dehydration and rehydration kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 during air-drying were illustrated in a previous study (Lemetais, Dupont et al. 2012).

Statistical analysis

The analysis of the S-FTIR data was performed using the Unscrambler software (version 10.2, CAMO Process AS, Olso, Norway). The analysis of the S-FTIR data was performed over four spectral regions **(figure 2)**:

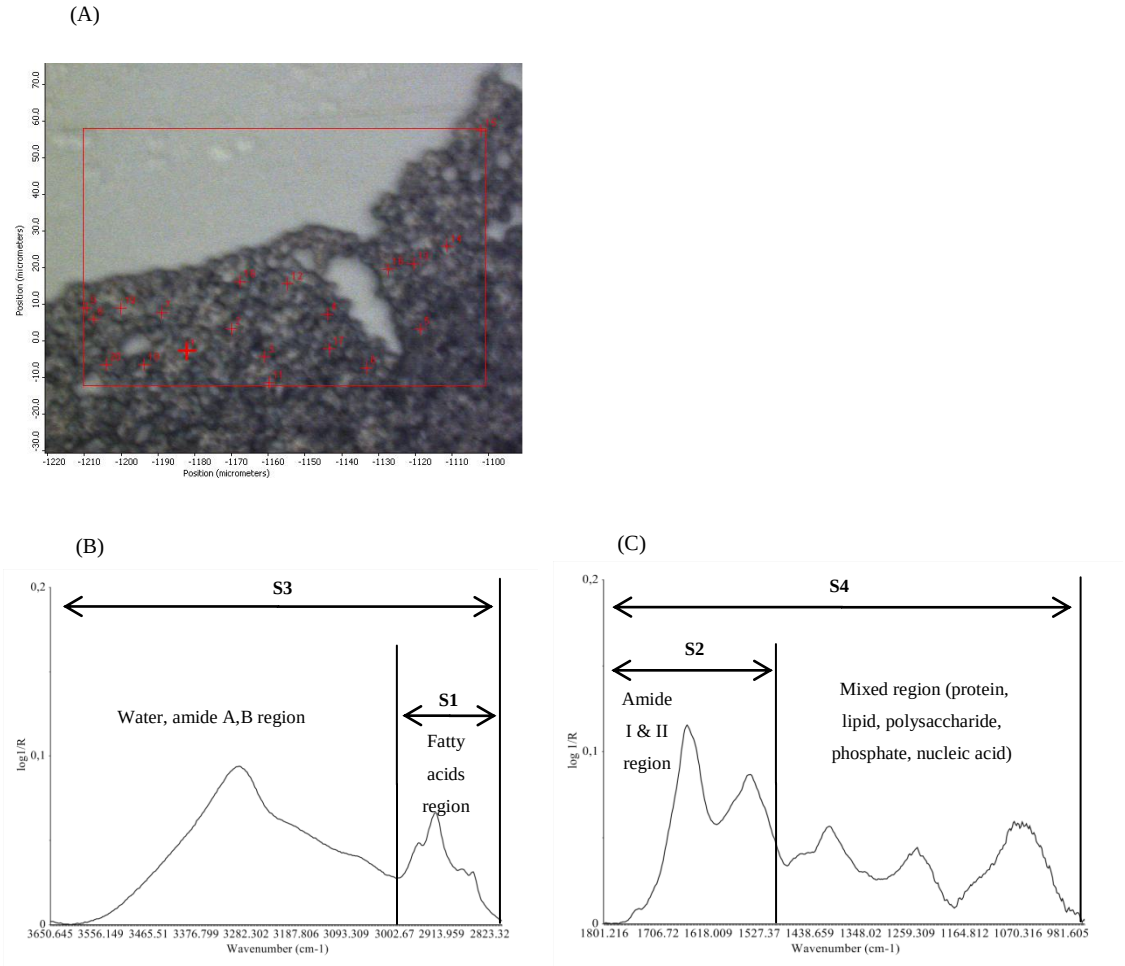


Figure 2. Map of 20 randomly selected individual cells for infrared spectra acquisition (Fig A). Representative corrected FTIR spectra of an individual cell of *Saccharomyces cerevisae* strain (non-encapsulated cell before the dehydration process) in the four spectral regions (S1, S2, S3 and S4) used for data analysis (Fig B & C).

S1 (3010-2800 cm^{-1}): This is the lipid region, exhibiting the C-H stretching vibration of the CH_3 and CH_2 functional groups. The region is dominated by the spectral characteristics of fatty acid chains of the various phospholipid membranes and by some amino side-chain vibrations.

S2 (1800-1500 cm^{-1}): This is the protein region that is dominated by the protein conformation-sensitive amide I and amide II bands.

S3 (3650-2800 cm^{-1}): This large region exhibits the O-H stretching vibrations in carbohydrates, the stretching vibrations of N-H from proteins, and C-H stretching vibrations of methyl and methylene groups (S1 region).

S4 (1800-950 cm^{-1}): The large S4 region is dominated by the protein amide bands (S2 region), by the mannans and glucans C-O-H and C-O-C vibrations, the P=O from phosphates in nucleic acids, and the C-H bending modes from lipids.

The raw spectra were pretreated as previously described (Passot, Gautier et al. 2015). The raw spectra were first baseline-corrected and then normalized using the Unit Vector Normalization of the Unscrambler software. In order to investigate membrane fluidity, the second derivatives of spectra obtained in the spectral region from 2900-2830 cm^{-1} (exhibits the symmetric of C-H stretching vibration of methyl and methylene groups) were calculated (Savitsky-Golay, order 3, 7-point smoothing factor), followed by normalization using unit vector normalization model.

After pre-processing, the data were analyzed by the unsupervised principal component analysis (PCA) method so that the natural variation pattern in the data could be studied. The PCA was carried out on mean centered data using the singular value decomposition algorithm and leverage validation method. 7 principal components were computed and the optimal number of components was 3 or 4. Outliers were eliminated in a first round of PCA.

The score plots show the projection of each spectrum onto the corresponding principal component. The loading plots of principal components relate the behavior of the score plots to the spectral modifications in the sample such as shifts in band position, increase or decrease in absorption band intensities. These variations can, in turn, be related to biochemical changes within the individual groups.

References

Alvarez-Ordóñez, A., J. Halisch, et al. (2010). "Changes in Fourier transform infrared spectra of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions." International Journal of Food Microbiology 142(1–2): 97-105.

Ami, D., A. Natalello, et al. (2009). "Effects of recombinant protein misfolding and aggregation on bacterial membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1794(2): 263-269.

Barth, A. (2007). "Infrared spectroscopy of proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1767(9): 1073-1101.

Beker, M. and A. Rapoport (1987). Conservation of yeasts by dehydration. Biotechnology Methods, Springer Berlin Heidelberg. 35: 127-171.

Beney, L., d. M. I. Martínez, et al. (2000). "Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast Saccharomyces cerevisiae." International Journal of Food Microbiology 55(1–3): 275-279.

Burattini, E., M. Cavagna, et al. (2008). "A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae." Vibrational Spectroscopy 47(2): 139-147.

Cavagna, M., R. Dell'Anna, et al. (2010). "Use of ATR-FTIR Microspectroscopy to Monitor Autolysis of Saccharomyces cerevisiae Cells in a Base Wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(1): 39-45.

de Villiers, M. M., D. P. Otto, et al. (2011). "Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly." Advanced Drug Delivery Reviews 63(9): 701-715.

Diaspro, A., D. Silvano, et al. (2002). "Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells." Langmuir 18(13): 5047-5050.

Drachuk, I., O. Shchepelina, et al. (2012). "pH-Responsive Layer-by-Layer Nanoshells for Direct Regulation of Cell Activity." ACS Nano 6(5): 4266-4278.

Dupont, S., L. Beney, et al. (2011). "Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1808(6): 1520-1528.

França, M. B., A. D. Panek, et al. (2007). "Oxidative stress and its effects during dehydration." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 146(4): 621-631.

Fu, N. and X. D. Chen (2011). "Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes." Food Research International 44(5): 1127-1149.

Fuchs, B., K. Bresler, et al. (2011). "Oxidative changes of lipids monitored by MALDI MS." Chemistry and Physics of Lipids 164(8): 782-795.

Gamero-Sandemetrio, E., R. Gómez-Pastor, et al. (2014). "Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast." Biotechnology Journal 9(8): 1055-1064.

Garre, E., F. Raginel, et al. (2010). "Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts." International Journal of Food Microbiology 136(3): 295-303.

Gautier, J., S. Passot, et al. (2013). "A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus CFL1." Journal of Dairy Science 96(9): 5591-5602.

Gervais, P., P. A. Marechal, et al. (1992). "Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability." Biotechnology and Bioengineering 40(11): 1435-1439.

Guyot, S., E. Ferret, et al. (2006). "Yeast Survival during Thermal and Osmotic Shocks Is Related to Membrane Phase Change." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(22): 8450-8455.

Hansen, J. M., Y.-M. Go, et al. (2006). "Nuclear and mitochondrial compartentation of oxidative stress and redox signaling." Annual Review of Pharmacology and Toxicology 46(1): 215-234.

Hong, D., M. Park, et al. (2013). "Artificial spores: cytoprotective nanoencapsulation of living cells." Trends in Biotechnology 31(8): 442-447.

Ishida, K. P. and P. R. Griffiths (1993). "Investigation of Polysaccharide Adsorption on Protein Conditioning Films by Attenuated Total Reflection Infrared Spectrometry." Journal of Colloid and Interface Science 160(1): 190-200.

Kong, J. and S. Yu (2007). "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures." Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39(8): 549-559.

Lemetais, G., S. Dupont, et al. (2012). "Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival." Applied Microbiology and Biotechnology 96(2): 471-480.

Miller, L. M. and P. Dumas (2006). "Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1758(7): 846-857.

Morgan, C. A., N. Herman, et al. (2006). "Preservation of micro-organisms by drying; A review." Journal of Microbiological Methods 66(2): 183-193.

Nguyen, T. D., S. Guyot, et al. (2015). "Protection of living yeast cells by micro-organized shells of natural polyelectrolytes." Process Biochemistry 50(10): 1528-1536.

Oberg, K. A., J.-M. Ruysschaert, et al. (2004). "The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra." European Journal of Biochemistry 271(14): 2937-2948.

Passot, S., J. Gautier, et al. (2015). "Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies." Analyst 140(17): 5920-5928.

Penicaud, C., S. Landaud, et al. (2014). "Physiological and biochemical responses of Yarrowia lipolytica to dehydration induced by air-drying and freezing." PLoS One 9(10): e111138.

Pereira de Jusus, E. P., Anita Dolly, Eleutherio, Elis Cristina Araujo (2003). "Protection against oxidation during dehydration of yeast." Cell Stress & Chaperones 8(2): 120-124.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2013). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of Escherichia coli at single-cell scale under silver-induced stress conditions." Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(8): 2685-2697.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2010). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast Saccharomyces cerevisiae after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating." Analytical and Bioanalytical Chemistry 396(4): 1441-1450.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2007). "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1768(6): 1600-1610.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2008). "Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments." Biotechnology and Bioengineering 100(2): 325-333.

Thomas, M. B., M. Vaidyanathan, et al. (2014). "Enhanced viability of probiotic Saccharomyces boulardii encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes." Journal of Food Engineering 136: 1-8.

Zanyar Movasaghi , S. R. a. I. u. R. (2008). "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues." Applied Spectroscopy Reviews 43(2): 45.

Résultats complémentaires

Deux milieux G- et G+ ont été utilisés pour la culture cellulaire. Après la fermentation, la levure a été ensuite encapsulée par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer). Trois couches de biopolymère (β-lactoglobuline/alginate/β-lactoglobuline) ont été déposées sur la levure. L'effet de l'encapsulation sur le métabolisme de la levure a été étudié dans les conditions de déshydratation les plus drastiques à 45 °C. L'humidité relative finale de déshydratation a été fixée à 23 %. Pour l'estimation du métabolisme cellulaire, la concentration en glutathion a été suivie.

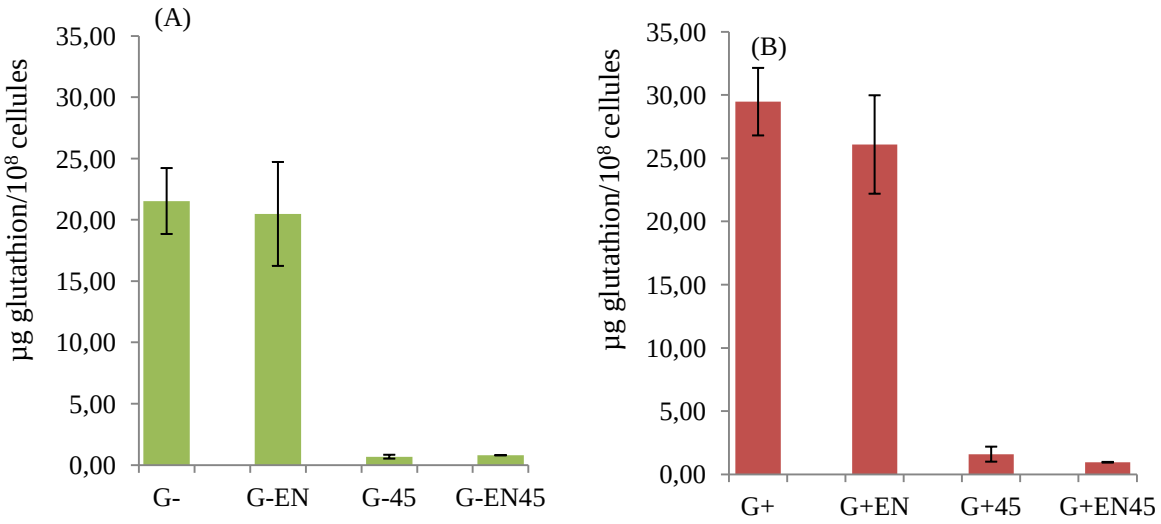


Figure 27. Concentration en glutathion de la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée en milieu G- (A) et G+ (B). G+ et G+45 correspondent aux cellules non-encapsulées. G+EN et G+EN45 correspondent aux cellules encapsulées. Les abréviations sont similaires pour le milieu G-.

La figure 25 représente l'effet de l'encapsulation sur la concentration en glutathion de la levure dans les conditions de déshydratation. Avant déshydratation, la concentration en glutathion est équivalente chez les levures encapsulées et non-encapsulées. En effet, G-EN contient 20,48 µg glutathion et G- contient 21,25 µg glutathion (figure 25A). En milieu G+, le glutathion diminue légèrement de 29,47 µg.10^8 cellules pour G+ à 26,08 µg.10^8 cellules pour G+EN mais la différence n'est pas significative (figure 25B). Donc, l'encapsulation n'affecte pas la concentration en glutathion chez la levure. Après déshydratation, une diminution très importante du glutathion est observée chez les levures encapsulées et non-encapsulées dans les deux milieux de culture. De plus, il n'y a pas de différence significative de la concentration en glutathion entre les levures encapsulées et non-encapsulées. Cela indique que l'évolution de la concentration en glutathion n'est pas influencée par la présence des couches biopolymériques sur la levure pendant la déshydratation. D'après les résultats obtenus, le rôle du glutathion (Nguyen

et al., 2016, article 2) et de l'encapsulation (Nguyen et al., 2016, article 3) ont été démontré sur l'amélioration de la survie de la levure dans les conditions de déshydratation en particulier à 45 °C. Donc l'effet protecteur de l'encapsulation et du glutathion sur la survie de la levure est indépendant.

CHAPITRE 4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'une action transversale inter équipes de l'UMR PAM. Il s'agit de réunir des compétences récentes développées par les équipes constitutives de l'unité (notamment PMB et PAPC). De plus, ces travaux font partie intégrante du projet Cell ExtraDry (Institut Carnot Qualiment) qui a pour le but de produire des levures sèches actives enrichies en molécules antioxydantes pendant la fermentation. L'objectif global de cette thèse était de construire un système protégeant la levure des stress environnementaux et de comprendre le mécanisme de cette protection ainsi que la réponse cellulaire en particulier à la déshydratation. Pour cela, un système de micro-encapsulation de la levure par la méthode couche-par-couche (layer-by-layer) en utilisant deux biopolymères (β-lactoglobuline et alginate) a été réalisé. Et d'autre part, les conditions de milieu de culture permettant d'enrichir les levures en glutathion, une molécule antioxydante intracellulaire (glutathion), ont été étudiées. Ainsi, deux modes de protection de la levure ont été envisagés : la protection intracellulaire (enrichissement en glutathion) et la protection extracellulaire (construction d'une barrière de biopolymères).

Caractérisation de la méthode d'encapsulation couche-par-couche

Pour construire le système protégeant la levure par la méthode couche-par-couche en utilisant deux biopolymères, il a été nécessaire de caractériser les propriétés physico-chimiques de la barrière biopolymérique. D'abord, le succès du dépôt des biopolymères à l'interface des levures en suspension a été étudié afin de pouvoir conclure que la levure a bien été encapsulée en respectant les principes de la méthode couche-par-couche. La zétamétrie qui mesure le potentiel zéta des particules dans un milieu liquide a permis de déterminer le pH adéquat (pH 3,8-4,0) de la solution d'encapsulation et de vérifier la charge de la surface du système levure/biopolymère. Dans cette gamme de pH, la charge négative de la levure, positive de la β-lactoglobuline et négative de l'alginate ont permis l'adsorption alternative des couches sur la surface cellulaire. Trois couches de biopolymère (β-lactoglobuline/alginate/β-lactoglobuline) ont été déposées une par une et le résultat de la zétamétrie a montré un changement de la charge correspondant à celle de chaque couche. Différentes techniques de microscopie électronique ont été utilisées pour observer la présence des couches et vérifier l'encapsulation individuelle de la levure. Les résultats de microscopie électronique à balayage ont montré la présence des biopolymères sur la surface de la levure après le dépôt des trois couches avec une épaisseur moyenne des trois couches de 160 à 190 nm. Les résultats ont également montré que les cellules ont bien été encapsulées individuellement. De plus, la présence de la β-lactoglobuline de la première et la

troisième couche a été confirmée par immunomarquage observé en microscopie électronique à transmission. Donc tous ces résultats ont démontré clairement le succès de l'encapsulation de la levure par la méthode couche-par-couche. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été utilisée pour caractériser les interactions du système levure/biopolymères. D'après les résultats obtenus, les interactions électrostatiques ont été soulignées comme interactions principales entre la levure et les biopolymères. La présence des biopolymères n'a pas affecté les propriétés biochimiques de la levure au niveau de sa paroi. Après encapsulation, la levure a été capable de se diviser dans un milieu liquide ; cela indique la capacité de libération des cellules de la capsule dans un milieu souhaité.

Potentiel de l'encapsulation pour protéger la levure

La levure encapsulée a été traitée dans les conditions de stress chimique (oxydation) et mécanique (congélation) afin de tester la protection de la barrière sur la viabilité cellulaire. Pour cela, la perméabilité de la barrière a été mesurée par cytométrie en utilisant le marqueur iodure de propidium qui indique aussi l'intégrité membranaire des cellules. A l'état frais, l'encapsulation n'a pas affecté l'intégrité membranaire de la levure. L'augmentation des cellules encapsulées marquées par l'iodure de propidium après les différents traitements signifie que la barrière est perméable. La protection par cette barrière a été trouvée dans les conditions de congélation et de combinaison de la congélation et de l'oxydation par H_2O_2 alors qu'aucun effet protecteur n'a été observé dans le cas de l'oxydation seule. Il semble que la protection par la capsule ait été efficace par rapport au stress mécanique grâce à la propriété cryoprotective des biopolymères utilisés.

Détermination des conditions d'enrichissement du glutathion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Pour sélectionner les conditions optimales de l'enrichissement en glutathion chez la levure, plusieurs milieux de culture sélectionnés d'après la littérature ont été testés. Néanmoins, les conditions de culture reportées dans les divers travaux antérieurs sont très différentes les unes des autres et l'efficacité de chaque méthode est reportée pour une souche particulière. Nous avons alors appliqué les meilleures conditions sur notre souche modèle. Un milieu riche en nutriments et précurseurs de la biosynthèse de glutathion se composant de 30 g/L de glucose, 30 g/L d'extraire de levure, 0,6 g/L de KH_2PO_4 et 0,6 g/L de L-cystéine a été retenu (milieu G+). Les autres paramètres comme l'addition supplémentaire d'acides aminés et la modulation de température n'ont pas été nécessaires puisqu'ils n'ont pas amélioré significativement la concentration en glutathion et la biomasse. La levure a été cultivée en milieu G+ à 30 °C avec une vitesse d'agitation de 140 rpm (amplitude d'orbital de 27 mm). En milieu G+, la levure a atteint la phase stationnaire et la concentration maximale du glutathion après 10 heures et 24

heures d'incubation. Un autre milieu (milieu G-) a été réalisé comme milieu témoin avec une composition en nutriments plus faible et sans précurseurs. Une différence significative entre la concentration du glutathion de la levure cultivée dans le milieu G+ (51,61 µg/10^8 cellules) et G- (9,76 µg/10^8 cellules) a permis d'utiliser le milieu G- comme contrôle négatif.

Impact des conditions de déshydratation

La souche BY4742 a été sélectionnée comme souche sensible et adéquate pour l'étude de l'effet des milieux sur la réponse cellulaire à la déshydratation. Puisque l'effet de la déshydratation sur la réponse cellulaire est très complexe, des conditions pertinentes de déshydratation ont été déterminées. Les résultats ont montré que la survie cellulaire a été diminuée lors d'une réduction de l'humidité relative de 96 % à 23 %. Toutefois, la stabilité de la survie de la levure a été observée au cours de la déshydratation dans la plage de 23 % à 8 % d'humidité relative. En respectant l'objectif d'étudier *in vitro* la réponse de la levure à la déshydratation, le potentiel de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de la source Synchrotron a été utilisé. Grâce à sa performance élevée, cette technique permet d'acquérir de spectres infrarouges d'une résolution spectrale importante pendant une courte période. Cela nous a permis d'étudier les modifications biochimiques de la levure pendant la déshydratation en temps réel et à l'échelle de la cellule unique. L'effet de la déshydratation a été estimé à 25 °C. Pour estimer l'effet de température pendant la déshydratation, la levure a été déshydratée à 45 °C. L'effet de la réhydratation n'a pas été rapporté dans notre travail. Les échantillons ont été réhydratés de manière rapide.

Après déshydratation, la survie de la levure est diminuée. Une corrélation entre le niveau d'hydratation des cellules et la survie de la levure a été trouvée. Donc le retrait de l'eau est le premier facteur qui affecte la survie de la levure pendant la déshydratation. D'après la courbe de corrélation élaborée entre le niveau d'hydratation et le logarithme de survie, la levure cultivée en milieu G- déshydratée à 45 °C représente le niveau d'hydratation le plus faible correspondant à la plus faible survie. L'augmentation de température a alors permis l'accélération de l'élimination de l'eau pendant la déshydratation et affecté la survie cellulaire. De plus, la simulation de différentes conditions montre l'effet de la température et de l'humidité relative sur les propriétés biochimiques de la levure pendant déshydratation. L'impact de ces facteurs a été trouvé principalement au niveau de la structure secondaire des protéines. La diminution de l'humidité relative et l'augmentation de température ont entrainé la modification de la proportion d'hélice α et feuillet β des protéines. En outre, la réduction de la concentration du glutathion intracellulaire de la levure a été trouvée après déshydratation aux deux températures testées. De plus, la diminution de l'activité glutathion réductase a été observée chez la levure cultivée en milieu G- à

45 °C. Donc selon les conditions testées, la déshydratation à 45 °C a affecté extrêmement la survie, les propriétés biochimiques et le métabolisme de la levure.

Amélioration de la survie de la levure par enrichissement en glutathion et encapsulation

Les résultats ont montré que la survie de la levure cultivée en milieu G+ est améliorée significativement après déshydratation jusqu'à 23 % d'humidité relative à 45 °C en comparant avec celle de la levure cultivée en milieu G-. Donc la protection intracellulaire par l'enrichissement en glutathion a été observée après déshydratation. La double protection a été réalisée par encapsulation des levures enrichies en glutathion. Les résultats ont montré que la survie de la levure enrichie en glutathion a encore été améliorée grâce à la barrière protectrice de biopolymères après la déshydratation à 23 % humidité relative et 45 °C. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 8.

Tableau 8. Récapitulatif de la survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* après déshydratation à 23 % d'humidité relative et à 45 °C en fonction des niveaux de protection

Protection	**Sans**	**Externe**	**Interne**	**Double**
Description	G-	G- encapsulée	G+	G+ encapsulée
$Log_{10}(N/N_0)$	-5,88 ± 1,44	-3,05 ± 0,41	-3,36 ± 0,33	-2,08 ± 0,32
Gain de survie	0	2,84	2,52	3,81

Hypothèses des mécanismes de protection du système

Les résultats de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de la source Synchrotron ont souligné l'effet des milieux sur les modifications biochimiques de la levure au niveau de la membrane lipidique. La levure G- contient une quantité de lipides plus importante que la levure G+, ce qui est représenté par une proportion plus élevée du groupement méthyle (CH_3). Alors que la levure du milieu G- est caractérisée par le groupement méthylène (CH_2). La proportion des acides gras saturés est alors plus importante chez la levure G+ que chez la levure G-. De plus, la levure G+ encapsulée montre une proportion d'acides gras saturés plus importante que la levure G+. D'après nos observations, plus la proportion d'acides gras saturés est importante, plus la survie cellulaire est importante. Il est possible que cette différence soit associée au niveau d'oxydation des lipides de la levure qui est lui-même lié à la survie de la levure.

La survie de la levure G+ a été améliorée grâce à sa concentration en glutathion plus importante en comparant avec celle de la levure G-. De plus, le mécanisme de protection du couple glutathion réduit/oxydé contre l'oxydation pendant la déshydratation s'est révélé différent

entre les levures G- et G+. Les résultats ont suggéré que l'action antioxydante est basée principalement sur le glutathion réduit chez la levure G+. Au contraire, elle a été basée sur le glutathion oxydée chez la levure G-. Il semblerait que l'action du glutathion oxydé ait été mise en place après l'intervention de glutathion réduit. Donc le rôle du glutathion dans la protection de la levure a été mis en évidence pendant déshydratation. Par contre, l'effet protecteur de l'encapsulation est indépendant de celui du glutathion. La barrière biopolymérique n'a pas préservé la concentration en glutathion de la levure après déshydratation. La protection par le glutathion a été démontrée dans la défense contre le stress chimique (oxydation) alors que la protection par l'encapsulation a été demontrée dans la défense contre le stress mécanique. Dans le cas de la congélation ou de la déshydratation, la membrane cellulaire est endommagée par le retrait ou la cristallisation des molécules d'eau. La barrière des couches a protégé la membrane cellulaire grâce aux propriétés hydrophiles des biopolymères utilisés. Les biopolymères ont pu remplacer les molécules d'eau afin de maintenir la fluidité membranaire et réduire ainsi la vitesse de transfert de l'eau ce qui affectent la survie cellulaire pendant la déshydratation.

2. Perspectives

Les résultats de la thèse ont montré l'amélioration de la survie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par l'enrichissement en glutathion et l'encapsulation utilisant des biopolymères après déshydratation. Cette stratégie pourra être utilisée pour la production des levures fragiles actives. Néanmoins d'autres expériences sont à envisager afin de clarifier le mécanisme de la protection. Il a nécessité d'étudier les propriétés des biopolymères afin de mieux comprendre leurs rôles dans la protection de la levure. Par exemple, pendant la déshydratation, la dénaturation de la β-lactoglobuline déposée sur la levure pourra être vérifiée par électrophorèse. Cela nous permettra d'observer l'effet de la déshydratation sur la barrière protectrice. De plus, la protection de la levure par la construction de la barrière pourra être probablement améliorée en augmentant le nombre de couches déposées puisque la vitesse de transfert d'eau serait encore ralentie entrainant la diminution de désorganisation de la membrane cellulaire. Par contre, un seuil adéquat du nombre de couches devra être déterminé car un nombre très important des couches qui peuvent aussi perturber le métabolisme cellulaire. En outre, l'oxydation pourra être mesurée par microscopie confocale en utilisant des marqueurs spécifiques comme le 2,7-dichlorofluorescéine diacétate. Différentes observations microscopiques permettant de mesurer l'état global d'oxydation de la levure nous aideront à comprendre si les couches ont un effet réel sur l'action des oxydants dans la levure pendant la déshydratation cellulaire. Ensuite, les cibles principales des dérivés réactifs de l'oxygène pourront être étudiées de façon plus approfondie. Il s'agira de

mesurer l'oxydation lipidique et de doser la concentration des protéines thiols de la levure, par exemple. Cela permettra de mettre en évidence le rôle de chaque type de protection (interne par glutathion ou externe par encapsulation). Enfin, l'effet de deux types de protection sur la conservation et l'activité fermentaire de la levure déshydratée restera à étudier.

Les résultats de la thèse pourront être utiles pour la recherche des nouvelles technologies de production et de protection des levures fragiles actives. En industrie, la levure pourra être cultivée dans un milieu riche qui contient une proportion équilibrée de sources de carbone et d'azote avec addition des précurseurs (optionnel car la cystéine coûte cher). En effet, ce type de milieu pourra augmenter la biomasse et la concentration en glutathion intracellulaire. De plus, la levure enrichie en glutathion pourra mieux résister dans des conditions de déshydratation à l'échelle industrielle. Cette stratégie pourra être surtout utilisée pour les souches de levures fragiles à la déshydratation mais capables de biosynthétiser le glutathion. Une double protection interne et externe pourra être envisagée afin d'améliorer la survie de la levure après déshydratation. En outre, la protection externe par l'encapsulation seule pourrait être une solution afin de protéger les souches fragiles qui ne sont pas capables de synthétiser le glutathion. La méthode couche-par-couche présente un avantage industriel car la concentration des polymères utilisés est relative faible. De plus les biopolymères pourront être utilisés pour encapsuler la levure.

LISTE COMPLÈTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aa, E., J. P. Townsend, et al. (2006). "Population structure and gene evolution in Saccharomyces cerevisiae." FEMS Yeast Research 6(5): 702-715.

Adamczyk, Z., B. Jachimska, et al. (2009). "Structure of poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) in electrolyte solutions: Theoretical modeling and measurements." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 343(1–3): 96-103.

Aguilera, F., R. A. Peinado, et al. (2006). "Relationship between ethanol tolerance, H+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains." International Journal of Food Microbiology 110(1): 34-42.

Ai, H., S. A. Jones, et al. (2003). "Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles." Cell biochemistry and biophysics 39(1): 23-43.

Akbari, H., K. Karimi, et al. (2012). "Optimization of baker's yeast drying in industrial continuous fluidized bed dryer." Food and Bioproducts Processing 90(1): 52-57.

Alfafara, C., K. Miura, et al. (1992). "Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae." Applied Microbiology and Biotechnology 37(2): 141-146.

Alvarez-Ordóñez, A., J. Halisch, et al. (2010). "Changes in Fourier transform infrared spectra of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions." International Journal of Food Microbiology 142(1–2): 97-105.

Alvarez-Ordóñez, A., J. Halisch, et al. (2010). "Changes in Fourier transform infrared spectra of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions." International Journal of Food Microbiology 142(1–2): 97-105.

Ami, D., A. Natalello, et al. (2009). "Effects of recombinant protein misfolding and aggregation on bacterial membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1794(2): 263-269.

Anand K. Bachhawat , D. G., Jaspreet Kaur , Neha Kasturia, Anil Thakur , Hardeep Kaur, Akhilesh Kumar , and Amit Yadav (2009). "Glutathione Production in Yeast." Yeast Biotechnology: Diversity and Applications(260-278).

Antipov, A. A. and G. B. Sukhorukov (2004). "Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability." Advances in Colloid and Interface Science 111(1–2): 49-61.

Antipov, A. A., G. B. Sukhorukov, et al. (2002). "Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 198–200: 535-541.

Attfield, P. V. (1997). "Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast." Nat Biotech 15(13): 1351-1357.

Aysun SENER, A. C., M. Ümit ÜNAL (2007). "The Effect of Fermentation Temperature on the Growth Kinetics of Wine Yeast Species." Turkish Journal of Agriculture and Forestry 31: 349-354.

Balkundi, S. S., N. G. Veerabadran, et al. (2009). "Encapsulation of bacterial spores in nanoorganized polyelectrolyte shells." Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 25(24): 14011-14016.

Ball, P. (2008). "Water as an active constituent in cell biology." Chemical Reviews 108: 74-108.

Barbara Dunn, C. R., Daniel J. Kvitek, Tom Pugh, and Gavin Sherlock (2012). "Analysis of the Saccharomyces cerevisiae pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments." Genome research 22: 908-924.

Barth, A. (2007). "Infrared spectroscopy of proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1767(9): 1073-1101.

Bayrock, D. and W. M. Ingledew (1997). "Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast." Food Research International 30(6): 417-425.

Beker, M. and A. Rapoport (1987). Conservation of yeasts by dehydration. Biotechnology Methods, Springer Berlin Heidelberg. 35: 127-171.

Benaroudj, N., D. H. Lee, et al. (2001). "Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals." Journal of Biological Chemistry 276(26): 24261-24267.

Beney, L., d. M. I. Martínez, et al. (2000). "Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast Saccharomyces cerevisiae." International Journal of Food Microbiology 55(1–3): 275-279.

Beney, L., de Marañón, I. M. n. et al. (2001). "Osmotic destruction of Saccharomyces cerevisiae is not related to a high water flow rate across the membrane." Biochemical Engineering Journal 9(3): 205-210.

Bhatia, S. R., S. F. Khattak, et al. (2005). "Polyelectrolytes for cell encapsulation." Current Opinion in Colloid & Interface Science 10(1–2): 45-51.

Birch, R. M. and G. M. Walker (2000). "Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of Saccharomyces cerevisiae." Enzyme and Microbial Technology 26(9–10): 678-687.

Bleoanca, I., A. R. C. Silva, et al. (2013). "Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains." Journal of Bioscience and Bioengineering 116(6): 697-705.

Brovchenko, I., Krukau, A., Oleinikova, A., and Mazur, A.K. (2007). "Water clustering and percolation in low hydration DNA shells." The Journal of Physical Chemistry B 111: 3258-3266.

Burattini, E., M. Cavagna, et al. (2008). "A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae." Vibrational Spectroscopy 47(2): 139-147.

Burgain, J., C. Gaiani, et al. (2011). "Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications." Journal of Food Engineering 104(4): 467-483.

Buron, C. C. and C. Filiâtre (2014). "Overshoots of adsorption kinetics during layer-by-layer polyelectrolyte film growth: Role of counterions." Journal of Colloid and Interface Science 413: 147-153.

Calahan, D., M. Dunham, et al. (2011). "Genetic Analysis of Desiccation Tolerance in Saccharomyces cerevisiae." Genetics 189(2): 507-519.

Catalino G. Alfafara, A. K., Toru Shioi, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya, and Ken-ichi Suga (1992). "Effect of amino acids on glutathione production by Naccharomyces cereei iae." Applied Microbiology Biotechnology 36: 538-540.

Cavagna, M., R. Dell'Anna, et al. (2009). "Use of ATR-FTIR Microspectroscopy to Monitor Autolysis of Saccharomyces cerevisiae Cells in a Base Wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(1): 39-45.

Chen, M.-J. and K.-N. Chen (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, Blackwell Publishing: 83-112.

Cook, M. T., G. Tzortzis, et al. (2013). "Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration." Journal of Materials Chemistry B 1(1): 52-60.

Costa, V. and P. Moradas-Ferreira (2001). "Oxidative stress and signal transduction in Saccharomyces cerevisiae: insights into ageing, apoptosis and diseases." Molecular Aspects of Medicine 22(4–5): 217-246.

Coutinho, C., E. Bernardes, et al. (1988). "Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains." Journal of Biotechnology 7(1): 23-32.

Crowe J. H., C. L. M., Chapman D. (1984). "Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose." Science 223(4637): 701-703.

Crowe, J. H., B. D. McKersie, et al. (1989). "Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 979(1): 7-10.

Crowe, J. H., Crowe, L.M., and Mouradian, R. (1983). "Stabilization of biological membranes at low water activities." Cryobiology 20: 346-356.

Crowe, J. H., J. F. Carpenter, et al. (1998). "The role of vitrification in anhydrobiosis." Annual Review of Physiology 60(1): 73-103.

David, S. S., V. L. O'Shea, et al. (2007). "Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage." Nature 447(7147): 941-950.

Davidson, J. F. and R. H. Schiestl (2001). "Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in Saccharomyces cerevisiae." Molecular and Cellular Biology 21(24): 8483-8489.

de Iñigo Martinez, Maréchal, P.-A., Gervais P. (1996). "Passive Response of Saccharomyces cerevisiae to Osmotic Shifts: Cell Volume Variations Depending on the Physiological State." Biochemical and Biophysical Research Communications 227(2): 519-523.

de Villiers, M. M., D. P. Otto, et al. (2011). "Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly." Advanced Drug Delivery Reviews 63(9): 701-715.

Dean, R. T., S. Fu, et al. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochemical Journal 324(Pt 1): 1-18.

Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." Science 277: 1232-1237.

Decher, G., J. D. Hong, et al. (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces." Thin Solid Films 210–211, Part 2: 831-835.

Decher, G., Y. Lvov, et al. (1994). "Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films." Thin Solid Films 244(1–2): 772-777.

Diaspro, A., D. Silvano, et al. (2002). "Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells." Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 18(13): 5047-5050.

Ding, J., X. Huang, et al. (2009). "Tolerance and stress response to ethanol in the yeast Saccharomyces cerevisiae." Applied Microbiology and Biotechnology 85(2): 253-263.

Dong, A., J. Matsuura, et al. (1996). "Infrared and Circular Dichroism Spectroscopic Characterization of Structural Differences between β-Lactoglobulin A and B†." Biochemistry 35(5): 1450-1457.

Drachuk, I., O. Shchepelina, et al. (2012). "pH-Responsive Layer-by-Layer Nanoshells for Direct Regulation of Cell Activity." ACS Nano 6(5): 4266-4278.

Drachuk, I., O. Shchepelina, et al. (2013). "Cell Surface Engineering with Edible Protein Nanoshells." Small 9(18): 3128-3137.

Driks, A. (2002). "Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat." Trends in Microbiology 10(6): 251-254.

Dupont, S., G. Lemetais, et al. (2012). "Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?" Evolution 66(9): 2961-2968.

Dupont, S., L. Beney, et al. (2010). "Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1798(5): 975-985.

Dupont, S., L. Beney, et al. (2011). "Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1808(6): 1520-1528.

Dynlacht, J. R. and M. H. Fox (1992). "Heat-Induced Changes in the Membrane Fluidity of Chinese Hamster Ovary Cells Measured by Flow Cytometry." Radiation Research 130(1): 48-54.

Eleutherio, E. C. A., P. S. Araujo, et al. (1993). "Protective Role of Trehalose during Heat Stress in Saccharomyces cerevisiae." Cryobiology 30(6): 591-596.

Ellis, R. J., and Minton, A.P. (2003). "Cell biology: join the crowd." Nature 425: 27-28.

Espindola, A. d. S., D. S. Gomes, et al. (2003). "The role of glutathione in yeast dehydration tolerance." Cryobiology 47(3): 236-241.

Fakhrullin, R. F., A. I. Zamaleeva, et al. (2009). "Living Fungi Cells Encapsulated in Polyelectrolyte Shells Doped with Metal Nanoparticles." Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 25(8): 4628-4634.

Fay, J. C. and J. A. Benavides (2005). "Evidence for Domesticated and Wild Populations of Saccharomyces cerevisiae." PLoS Genet 1(1):e5 0066-0071.

Folmer, V., N. Pedroso, et al. (2008). "H2O2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778(4): 1141-1147.

França, M. B., A. D. Panek, et al. (2005). "The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of Saccharomyces cerevisiae." Cell Stress & Chaperones 10(3): 167-170.

França, M. B., A. D. Panek, et al. (2007). "Oxidative stress and its effects during dehydration." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 146(4): 621-631.

Franz, B., S. S. Balkundi, et al. (2010). "Layer-by-Layer Nano-Encapsulation of Microbes: Controlled Cell Surface Modification and Investigation of Substrate Uptake in Bacteria." Macromolecular Bioscience 10(2): 164-172.

Fu, N. and X. D. Chen (2011). "Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes." Food Research International 44(5): 1127-1149.

Fuchs, B., K. Bresler, et al. (2011). "Oxidative changes of lipids monitored by MALDI MS." Chemistry and Physics of Lipids 164(8): 782-795.

Fuller, W., Forsyth, T., and Mahendrasingam, A. (2004). "Water-DNA interactions as studied by Xray and neutron fibre diffraction." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 359: 1237-1247.

Gamero-Sandemetrio, E., R. Gómez-Pastor, et al. (2014). "Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast." Biotechnology Journal 9(8): 1055-1064.

Garre, E., F. Raginel, et al. (2010). "Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts." International Journal of Food Microbiology 136(3): 295-303.

Gautier, J., S. Passot, et al. (2013). "A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus CFL1." Journal of Dairy Science 96(9): 5591-5602.

Gbassi, G. K., T. Vandamme, et al. (2012). "Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins." International Journal of Food Microbiology 129(1): 103-105.

Germain, M., P. Balaguer, et al. (2006). "Protection of mammalian cell used in biosensors by coating with a polyelectrolyte shell." Biosensors and Bioelectronics 21(8): 1566-1573.

Gervais, P. and Beney, L. (2001). "Osmotic mass transfer in the yeast Saccharomyces cerevisiae." Cellular and Molecular Biology 47(5): 831-839.

Gervais, P., I. Martínez de Marañón, et al. (2003). "Cell volume changes during rapid temperature shifts." Journal of Biotechnology 102(3): 269-279.

Gervais, P., P. A. Marechal, et al. (1992). "Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability." Biotechnology and Bioengineering 40(11): 1435-1439.

Gervais, P., P. Molin, et al. (1996). "Thermodynamics of yeast cell osmoregulation: Passive mechanisms." Journal of Biological Physics 22(2): 73-86.

Gharsallaoui, A., G. Roudaut, et al. (2007). "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview." Food Research International 40(9): 1107-1121.

Gibson, B. R., S. J. Lawrence, et al. (2007). "Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling." FEMS Microbiology Reviews 31(5): 535-569.

Gongyuan Wei, Y. L., Guocheng Du & Jian Chen (2003). "Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by Candida utilis." Bioctechnology Letters 25: 887-890.

Gu, X., J. Wang, et al. (2013). "Layer-by-layer assembled polyaspartamide nanocapsules for pH-responsive protein delivery." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 108: 205-211.

Gunasekaran, S., S. Ko, et al. (2007). "Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications." Journal of Food Engineering 83(1): 31-40.

Guyot, S., E. Ferret, et al. (2005). "Responses of Saccharomyces cerevisiae to thermal stress." Biotechnology and Bioengineering 92(4): 403-409.

Guyot, S., E. Ferret, et al. (2006). "Yeast Survival during Thermal and Osmotic Shocks Is Related to Membrane Phase Change." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(22): 8450-8455.

Guyot, S., P. Gervais, et al. (2015). "Surviving the heat: heterogeneity of response in Saccharomyces cerevisiae provides insight into thermal damage to the membrane." Environmental Microbiology 17(8): 2982-2992.

Hallsworth, J. E., Y. Nomura, et al. (1998). "Ethanol-induced water stress and fungal growth." Journal of Fermentation and Bioengineering 86(5): 451-456.

Hansen, J. M., Y.-M. Go, et al. (2006). "Nuclear and mitochondrial compartentation of oxidative stress and redox signaling." Annual Review of Pharmacology and Toxicology 46(1): 215-234.

Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, et al. (2006). "Characterization of β-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study." Food Hydrocolloids 20(5): 577-585.

Heraud, P., B. R. Wood, et al. (2005). Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy.

Herdeiro, R. S., M. D. Pereira, et al. (2006). "Trehalose protects Saccharomyces cerevisiae from lipid peroxidation during oxidative stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1760(3): 340-346.

Herrero, E., J. Ros, et al. (2008). "Redox control and oxidative stress in yeast cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1780(11): 1217-1235.

Hillberg, A. L. and M. Tabrizian (2006). "Biorecognition through Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly: In-Situ Hybridization on Living Cells." Biomacromolecules 7(10): 2742-2750.

Hiltunen, J. K. (1991). "Peroxisomes and β-Oxidation of Long-Chain Unsaturated Carboxylic Acids." Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 51(sup204): 33-46.

Hirasawa, T., K. Yoshikawa, et al. (2007). "Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to Saccharomyces cerevisiae based on DNA microarray data analysis." Journal of Biotechnology 131(1): 34-44.

Hong, D., M. Park, et al. (2013). "Artificial spores: cytoprotective nanoencapsulation of living cells." Trends in Biotechnology 31(8): 442-447.

Hu, X. H., M. H. Wang, et al. (2007). "Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae." Genetics 175(3): 1479-1487.

Ibáñez, C., R. Pérez-Torrado, et al. (2014). "Comparative genomic analysis of Saccharomyces cerevisiae yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies." International Journal of Food Microbiology 171: 129-135.

Imlay, J. A. (2003). "Pathways of Oxidative Damage." Annual Review of Microbiology 57(1): 395-418.

Ishida, K. P. and P. R. Griffiths (1993). "Investigation of Polysaccharide Adsorption on Protein Conditioning Films by Attenuated Total Reflection Infrared Spectrometry." Journal of Colloid and Interface Science 160(1): 190-200.

Ishida, K. P. and P. R. Griffiths (1993). "Investigation of Polysaccharide Adsorption on Protein Conditioning Films by Attenuated Total Reflection Infrared Spectrometry." Journal of Colloid and Interface Science 160(1): 190-200.

Izawa, S., Y. Inoue, et al. (1995). "Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae." FEBS Letters 368(1): 73-76.

Izawa, S., Y. Inoue, et al. (1996). "Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic Saccharomyces cerevisiae." Biochemical Journal 320(Pt 1): 61-67.

J H Crowe, a. F A Hoekstra, et al. (1992). "Anhydrobiosis." Annual Review of Physiology 54(1): 579-599.

Jae-Young Cha, J.-C. P., Beong-Sam Jeon, Young-Choon Lee and Young-Su Cho (2004). "Optimal Fermentation Conditions for Enhanced Glutathione Production by Saccharomyces cerevisiae FF-8." The Journal of Microbiology 42: 51-55.

Jamieson, D. J. (1998). "Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae." Yeast 14: 1511-1527.

Jamieson, D. J., S. L. Rivers, et al. (1994). "Analysis of Saccharomyces cerevisiae proteins induced by peroxide and superoxide stress." Microbiology 140(12): 3277-3283.

Jamme, F., J.-D. Vindigni, et al. (2013). "Single Cell Synchrotron FT-IR Microspectroscopy Reveals a Link between Neutral Lipid and Storage Carbohydrate Fluxes in S. cerevisiae." PLoS ONE 8(9): e74421.

Jasnin, M., Moulin, M., Haertlein, M., Zaccai, G., and Tehei, M. (2008). "Down to atomic-scale intracellular water dynamics." EMBO Reports 9: 543-547.

Jespersen, L. (2003). "Occurrence and taxonomic characteristics of strains of Saccharomyces cerevisiae predominant in African indigenous fermented foods and beverages." FEMS Yeast Research 3(2): 191-200.

Kahraman, M., A. I. Zamaleeva, et al. (2009). "Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering." Analytical and Bioanalytical Chemistry 395(8): 2559-2567.

Kang, A., J. Park, et al. (2014). "Cell encapsulation via microtechnologies." Biomaterials 35(9): 2651-2663.

Karreman, R. J., E. Dague, et al. (2007). "The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast Saccharomyces cerevisiae cell wall." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1774(1): 131-137.

Khattak, W. A., M. Ul-Islam, et al. (2014). "Yeast cell-free enzyme system for bio-ethanol production at elevated temperatures." Process Biochemistry 49(3): 357-364.

Kilan, K. and P. Warszyński (2014). "Thickness and permeability of multilayers containing alginate cross-linked by calcium ions." Electrochimica Acta 144: 254-262.

Kim, I.-S., H.-S. Yun, et al. (2006). "A knockout strain of CPR1 induced during fermentation of Saccharomyces cerevisiae KNU5377 is susceptible to various types of stress." Journal of Bioscience and Bioengineering 102(4): 288-296.

Klis, F. M., A. Boorsma, et al. (2006). "Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae." Yeast 23(3): 185-202.

Knop, M. (2011). "Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations." Comptes Rendus Biologies 334(8–9): 599-606.

Kolkman, A., M. Slijper, et al. (2005). "Development and application of proteomics technologies in Saccharomyces cerevisiae." Trends in Biotechnology 23(12): 598-604.

Kondrashov, A. S. and J. F. Crow (1991). "Haploidy or diploidy: which is better?" Nature 351(6324): 314-315.

Kong, J. and S. Yu (2007). "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures." Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39(8): 549-559.

Kranner, I. (2002). "Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens." New Phytologist 154(2): 451-460.

Kranner, I. and D. Grill (1996). "Significance of Thiol-Disulfide Exchange in Resting Stages of Plant Development." Botanica Acta 109(1): 8-14.

Kranner, I., S. Birtić, et al. (2006). "Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death?" Free Radical Biology and Medicine 40(12): 2155-2165.

Krasaekoopt, W., B. Bhandari, et al. (2003). "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt." International Dairy Journal 13(1): 3-13.

Krol, S., M. Nolte, et al. (2005). "Encapsulated Living Cells on Microstructured Surfaces." Langmuir 21(2): 705-709.

Krol, S., O. Cavalleri, et al. (2003). "Encapsulated yeast cells inside Paramecium primaurelia: a model system for protection capability of polyelectrolyte shells." Journal of Microscopy 212(3): 239-243.

Lee, H., D. Hong, et al. (2015). "Layer-by-Layer-Based Silica Encapsulation of Individual Yeast with Thickness Control." Chemistry – An Asian Journal 10(1): 129-132.

Lee, J., J. Choi, et al. (2014). "Cytoprotective Silica Coating of Individual Mammalian Cells through Bioinspired Silicification." Angewandte Chemie International Edition 53(31): 8056-8059.

Leitch, J. M., P. J. Yick, et al. (2009). "The Right to Choose: Multiple Pathways for Activating Copper, Zinc Superoxide Dismutase." The Journal of Biological Chemistry 284(37): 24679-24683.

Lemetais, G. (2012). "Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche." Agricultural sciences. Université de Bourgogne NNT : 2012DIJOS070.

Lemetais, G., S. Dupont, et al. (2012). "Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival." Applied Microbiology and Biotechnology 96(2): 471-480.

Li, H., M.-L. Ma, et al. (2012). "Metabolic responses to ethanol in Saccharomyces cerevisiae using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 44(7): 1087-1096.

Li, Q. a. D., E.T. and Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A. (1992). "Applications and Properties of Chitosan." Journal of Bioactive and Compatible Polymers 7: 370-397.

Li, W., X. Li, et al. (2012). "Nanofibrous mats layer-by-layer assembled via electrospun cellulose acetate and electrosprayed chitosan for cell culture." European Polymer Journal 48(11): 1846-1853.

Li, Y., G. Wei, et al. (2004). "Glutathione: a review on biotechnological production." Applied Microbiology and Biotechnology 66(3): 233-242.

Liochev, S. I. and I. Fridovich (2005). "Cross-compartment protection by SOD1." Free Radical Biology and Medicine 38(1): 146-147.

Liu, C.-H., C.-F. Hwang, et al. (1999). "Medium optimization for glutathione production by Saccharomyces cerevisiae." Process Biochemistry 34(1): 17-23.

Livney, Y. D. (2010). "Milk proteins as vehicles for bioactives." Current Opinion in Colloid & Interface Science 15: 10.

Lu, F., Y. Wang, et al. (2005). "Adaptive response of Saccharomyces cerevisiae to hyperosmotic and oxidative stress." Process Biochemistry 40(11): 3614-3618.

Luft, J. H. (1961). "Improvements In Epoxy Resin Embedding Methods." Biophysic and Biochem Cytol 9: 409-414.

Ma, M. and Z. L. Liu (2010). "Mechanisms of ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae." Applied Microbiology and Biotechnology 87(3): 829-845.

Madeo, F., E. Fröhlich, et al. (1999). "Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast." The Journal of Cell Biology 145(4): 757-767.

Mansouri, S., Y. Merhi, et al. (2011). "Investigation of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes on Fully Functional Human Red Blood Cells in Suspension for Attenuated Immune Response." Biomacromolecules 12(3): 585-592.

Marechal, P. A., de Maranon, I.M., Molin, P., and Gervais, P. (1995). "Yeast cell responses to water potential variations." International Journal of Food Microbiology 28: 277-287.

Martin Müller, T. R., Paul L. Dubin, Klaus Lunkwitz (2001). "Selective Interaction Between Proteins and the Outermost Surface of Polyelectrolyte Multilayers: Influence of the Polyanion Type, pH and Salt." Macromolecular Rapid Communication 22: 5.

Matsuzawa, A., M. Matsusaki, et al. (2013). "Effectiveness of Nanometer-Sized Extracellular Matrix Layer-by-Layer Assembled Films for a Cell Membrane Coating Protecting Cells from Physical Stress." Langmuir 29(24): 7362-7368.

Message, J. L., A. Assifaoui, et al. (2012). "Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins–sodium alginate–water ternary system." Food Hydrocolloids 28(2): 333-343.

Michael Breitenbach, J. D. B., Stanley Brul, Ian W. Dawes, J. Richard Dickinson, Piet de Groot, Gino Heeren, Klaas Hellingwerf (2004). "The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae." CRC Press Second edition(Edited by J.Richard Dickinson and Michael Schweizer).

Miller, L. M. and P. Dumas (2006). "Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1758(7): 846-857.

Mishra, P. and R. Prasad (1989). "Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of Saccharomyces cerevisiae." Applied Microbiology and Biotechnology 30(3): 294-298.

Moraitis, C. and B. P. G. Curran (2004). "Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast Saccharomyces cerevisiae." Yeast 21(4): 313-323.

Moraitis, C. and B. P. G. Curran (2007). "Can the different heat shock response thresholds found in fermenting and respiring yeast cells be attributed to their differential redox states?" Yeast 24(8): 653-666.

Morgan, C. A., N. Herman, et al. (2006). "Preservation of micro-organisms by drying; A review." Journal of Microbiological Methods 66(2): 183-193.

Mori, Y., H. Suzuki, et al. (1986). "Freezing injury in the yeast respiratory system." Cryobiology 23(1): 64-71.

Morris G.J., Winters L. W., G . E. Couloson G . E. and K. J. Clarke K. J. (1983). "Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast Saccharomyces cerevisiae." Journal of General Microbiology 129: 2023-2034.

Nedovic, V., A. Kalusevic, et al. (2011). "An overview of encapsulation technologies for food applications." Procedia Food Science 1: 1806-1815.

Nguyen, T. D., S. Guyot, et al. (2015). "Protection of living yeast cells by micro-organized shells of natural polyelectrolytes." Process Biochemistry 50(10): 1528-1536.

Oberg, K. A., J.-M. Ruysschaert, et al. (2004). "The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra." European Journal of Biochemistry 271(14): 2937-2948.

Odagescu, V. M. (2005). "Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Physique de la matière et du rayonnement."

ÖZer, B., Y. S. Uzun, et al. (2008). "Effect of Microencapsulation on Viability of Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium bifidum BB-12 During Kasar Cheese Ripening." International Journal of Dairy Technology 61(3): 237-244.

Paramera, E. I., S. J. Konteles, et al. (2011). "Microencapsulation of curcumin in cells of Saccharomyces cerevisiae." Food Chemistry 125(3): 892-902.

Park Jaejung, C. Y.-W., Kim Kyungbae, Chung Hoed, Sohn Daewon (2008). "Aggregation Processes of a Weak Polyelectrolyte, Poly(allylamine) Hydrochloride." Korean Chemical Society 29: 104-110.

Park, J. K. and H. N. Chang (2000). "Microencapsulation of microbial cells." Biotechnology Advances 18(4): 303-319.

Passot, S., J. Gautier, et al. (2015). "Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies." Analyst 140(17): 5920-5928.

Penicaud, C., S. Landaud, et al. (2014). "Physiological and biochemical responses of Yarrowia lipolytica to dehydration induced by air-drying and freezing." PLoS One 9(10): e111138.

Penninckx, M. (2000). "A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses." Enzyme and Microbial Technology 26(9–10): 737-742.

Pereira de Jusus, E. P., Anita Dolly, Eleutherio, Elis Cristina Araujo (2003). "Protection against oxidation during dehydration of yeast." Cell Stress & Chaperones 8(2): 120-124.

Pérez-Torrado, R., J. M. Bruno-Bárcena, et al. (2005). "Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of Saccharomyces cerevisiae Strains Used for Wine Making." Applied and Environmental Microbiology 71(11): 6831-6837.

Pérez-Torrado, R., R. Gómez-Pastor, et al. (2009). "Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth." Applied Microbiology and Biotechnology 81(5): 951-960.

Perrone, G. G., S.-X. Tan, et al. (2008). "Reactive oxygen species and yeast apoptosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1783(7): 1354-1368.

Pham-Hoang, B. N., C. Romero-Guido, et al. (2013). "Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells." Applied Microbiology and Biotechnology 97(15): 6635-6645.

Picart, C., J. Mutterer, et al. (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(20): 12531-12535.

Pócsi, I., R. A. Prade, et al. (2004). Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. Advances in Microbial Physiology, Academic Press. Volume 49: 1-76.

Pollack, G. H. (2001). "Is the cell a gel--and why does it matter?" The Japanese Journal of Physiology 51(649-660).

Poolman, B., and Glaasker, E. (1998). "Regulation of compatible solute accumulation in bacteria." Molecular Microbiology 29: 397-407.

Priya, A. J., S. P. Vijayalakshmi, et al. (2011). "Enhanced Survival of Probiotic Lactobacillus acidophilus by Encapsulation with Nanostructured Polyelectrolyte Layers through Layer-by-Layer Approach." Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(21): 11838-11845.

Quinn, J. F. and F. Caruso (2004). "Facile Tailoring of Film Morphology and Release Properties Using Layer-by-Layer Assembly of Thermoresponsive Materials." Langmuir 20(1): 20-22.

Ragoonanan, V., J. Malsam, et al. (2008). "Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of Geobacter sulfurreducens." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778(10): 2283-2290.

Rathore, S., P. M. Desai, et al. (2013). "Microencapsulation of microbial cells." Journal of Food Engineering 116(2): 369-381.

Redmann, K., H. L. Jenssen, et al. (1974). "Experimental and functional changes in transmembrane potential and zeta potential of single cultured cells." Experimental Cell Research 87(2): 281-289.

Richards, A. B., S. Krakowka, et al. (2002). "Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies." Food and Chemical Toxicology 40(7): 871-898.

Roland, J. C. and B. Vian (1991). 1 - General Preparation and Staining of Thin Sections. Electron Microscopy of Plant Cells. J. L. Hall and C. Hawes, Academic Press: 1-66.

Rollini, M. and M. Manzoni (2006). "Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by Saccharomyces cerevisiae." Process Biochemistry 41(7): 1501-1505.

Rowley, J. A., G. Madlambayan, et al. (1999). "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials." Biomaterials 20(1): 45-53.

Rupeš, I. (2002). "Checking cell size in yeast." Trends in Genetics 18(9): 479-485.

Saharan, R. K., S. Kanwal, et al. (2010). "Role of glutathione in ethanol stress tolerance in yeast Pachysolen tannophilus." Biochemical and Biophysical Research Communications 397(2): 307-310.

Santagapita, P. R., F. Kronberg, et al. (2007). "Exploring differential scanning calorimetry as a tool for evaluating freezing stress sensitivity in Baker's yeasts." Thermochimica Acta 465(1–2): 67-72.

Santivarangkna, C., Kulozik, U., and Foerst, P. (2008). "Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes." Journal of Applied Microbiology 105: 1-13.

Sartori, C., D. S. Finch, et al. (1997). "Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy." Polymer 38(1): 43-51.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2010). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast Saccharomyces cerevisiae after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating." Analytical and Bioanalytical Chemistry 396(4): 1441-1450.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2010). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast Saccharomyces cerevisiae after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating." Analytical and Bioanalytical Chemistry 396(4): 1441-1450.

Saulou, C., F. Jamme, et al. (2013). "Synchrotron FTIR microspectroscopy of Escherichia coli at single-cell scale under silver-induced stress conditions." Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(8): 2685-2697.

Schönhoff, M. (2003). "Self-assembled polyelectrolyte multilayers." Current Opinion in Colloid & Interface Science 8: 86-95.

Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." Free Radical Biology and Medicine 27(9–10): 916-921.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2007). "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1768(6): 1600-1610.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2008). "Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments." Biotechnology and Bioengineering 100(2): 325-333.

Skoneczna, A., A. Miciałkiewicz, et al. (2007). "Saccharomyces cerevisiae Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species." Free Radical Biology and Medicine 42(9): 1409-1420.

Stanley, D., A. Bandara, et al. (2010). "The ethanol stress response and ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae." Journal of Applied Microbiology 109(1): 13-24.

Stark, G. (2005). "Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage." The Journal of Membrane Biology 205(1): 1-16.

Sugiyama, K.-i., A. Kawamura, et al. (2000). "Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of Saccharomyces cerevisiae." Biochemical Journal 352(1): 71-78.

Sugiyama, K.-i., S. Izawa, et al. (2000). "The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of Saccharomyces cerevisiae." Journal of Biological Chemistry 275(20): 15535-15540.

Sukhishvili, S. A. (2005). "Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly." Current Opinion in Colloid & Interface Science 10(1–2): 37-44.

Sukhorukov, G. B., H. Möhwald, et al. (1996). "Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations." Thin Solid Films 284–285: 220-223.

Svaldo-Lanero, T., S. Krol, et al. (2007). "Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells." Ultramicroscopy 107(10–11): 913-921.

Ta, T., L. Cao-Hoang, et al. (2010). "New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium." Applied Microbiology and Biotechnology 87(3): 1089-1099.

Tanford, C. (1997). "How protein chemists learned about the hydrophobic factor." Protein Science 6: 1358-1366.

Tang, K. and N. A. M. Besseling (2016). "Formation of polyelectrolyte multilayers: ionic strengths and growth regimes." Soft Matter 12(4): 1032-1040.

Tedeschi, C., H. Möhwald, et al. (2001). "Polarity of Layer-by-Layer Deposited Polyelectrolyte Films As Determined by Pyrene Fluorescence." Journal of the American Chemical Society 123(5): 954-960.

Temple, M. D., G. G. Perrone, et al. (2005). "Complex cellular responses to reactive oxygen species." Trends in Cell Biology 15(6): 319-326.

Thomas, M. B., M. Vaidyanathan, et al. (2014). "Enhanced viability of probiotic Saccharomyces boulardii encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes." Journal of Food Engineering 136: 1-8.

Thompson, D. A., M. M. Desai, et al. (2006). "Ploidy Controls the Success of Mutators and Nature of Mutations during Budding Yeast Evolution." Current Biology 16(16): 1581-1590.

Toda, T., M. Nakamura, et al. (2010). "Proteomic approaches to oxidative protein modifications implicated in the mechanism of aging." Geriatrics & Gerontology International 10: S25-S31.

Toledano, M. B., A. Delaunay, et al. (2003). Oxidative stress responses in yeast. Yeast Stress Responses. S. Hohmann and W. H. Mager. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 241-303.

Tuong, S. D., H. Lee, et al. (2008). "Chemical fixation of polyelectrolyte multilayers on polymer substrates." Macromolecular Research 16(4): 373-378.

van Roermund, C. W., E. H. Hettema, et al. (1998). "Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in Saccharomyces cerevisiae: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions." The EMBO Journal 17(3): 677-687.

Veal, E. A., A. M. Day, et al. (2007). "Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling." Molecular Cell 26(1): 1-14.

Veerabadran, N. G., P. L. Goli, et al. (2007). "Nanoencapsulation of Stem Cells within Polyelectrolyte Multilayer Shells." Macromolecular Bioscience 7(7): 877-882.

Wang, B., P. Liu, et al. (2008). "Yeast Cells with an Artificial Mineral Shell: Protection and Modification of Living Cells by Biomimetic Mineralization." Angewandte Chemie International Edition 47(19): 3560-3564.

Wen, S., T. Zhang, et al. (2004). "Utilization of amino acids to enhance glutathione production in Saccharomyces cerevisiae." Enzyme and Microbial Technology 35(6–7): 501-507.

Wen, S., T. Zhang, et al. (2005). "Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation." Process Biochemistry 40(11): 3474-3479.

Wen, S., T. Zhang, et al. (2006). "Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae." Process Biochemistry 41(12): 2424-2428.

Werner-Washburne, M., E. Braun, et al. (1993). "Stationary phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae." Microbiological Reviews 57(2): 383-401.

Wolfe, J., M. F. Dowgert, et al. "Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions." The Journal of Membrane Biology 93(1): 63-74.

Wolkers, W. F., Tablin, F., and Crowe, J.H. (2002). "From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells." Comparative Biochemistry and Physiology 131: 535-543.

Yang, Y., Q. He, et al. (2007). "Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application." Biomaterials 28(20): 3083-3090.

Yantasee, W., C. L. Warner, et al. (2007). "Removal of Heavy Metals from Aqueous Systems with Thiol Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles." Environmental Science & Technology 41(14): 5114-5119.

Zamaleeva, A. I., I. R. Sharipova, et al. (2009). "Polyelectrolyte-Mediated Assembly of Multiwalled Carbon Nanotubes on Living Yeast Cells." Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 26(4): 2671-2679.

Zanyar Movasaghi , S. R. a. I. u. R. (2008). "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues." Applied Spectroscopy Reviews 43(2): 45.

Zhao, X. Q. and F. W. Bai (2009). "Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production." Journal of Biotechnology 144(1): 23-30.

Ziegelhoffer, E. C. and T. J. Donohue (2009). "Bacterial responses to photo-oxidative stress." Nat Rev Micro 7(12): 856-863.

Zoz, F., C. Iaconelli, et al. (2016). "Control of Relative Air Humidity as a Potential Means to Improve Hygiene on Surfaces: A Preliminary Approach with Listeria monocytogenes." PLoS One 11(2): e0148418.