



# **Implication de la membrane plasmique dans la survie de *Saccharomyces cerevisiae* lors de perturbations hydriques : rôle clé de l'ergostérol**

Sébastien Dupont

## **► To cite this version:**

Sébastien Dupont. Implication de la membrane plasmique dans la survie de *Saccharomyces cerevisiae* lors de perturbations hydriques : rôle clé de l'ergostérol. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. [〈NNT : 2011DIJOS008〉](#). [〈tel-00692358〉](#)

**HAL Id: tel-00692358**

**<https://theses.hal.science/tel-00692358v1>**

Submitted on 30 Apr 2012

**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.



HAL Authorization

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

**AGROSUP DIJON**

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

# **THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

**Sciences des Aliments**

Option: Génie des Procédés

par **Sébastien DUPONT**

**IMPLICATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DANS LA SURVIE DE  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE LORS DE PERTURBATIONS HYDRIQUES :  
ROLE CLE DE L'ERGOSTEROL**

Soutenue le 11 juillet 2011 devant la Commission d'Examen composée de:

Pr GHOMMIDH  
Pr ORANGE  
Pr GERVAIS  
Dr BENEY  
Dr FERREIRA  
Dr GUEDON

Polytech' Montpellier  
Université de Rouen  
AgroSup Dijon  
AgroSup Dijon  
Université de Poitiers  
ENSAIA Nancy

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

# ***Remerciements***

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de trois années et quelques mois effectué dans le laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires (GPMA) d'AgroSup Dijon. Je souhaiterais en premier lieu exprimer mes remerciements sincères envers le Professeur Patrick Gervais, directeur du laboratoire et directeur de ma thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour s'être montré disponible et pour avoir témoigné d'un intérêt constant envers mon travail. Laurent Beney, maître de conférences à AgroSup Dijon, a co-encadré cette étude et je lui exprime toute ma gratitude pour sa disponibilité et ses conseils. Un grand merci pour tout ce qu'il m'a apporté tant professionnellement qu'humainement.

Je tiens vivement à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour l'intérêt et le regard critique qu'ils ont porté sur mon travail. Merci donc au Professeur Ghommidh et au Professeur Orange, qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci au Docteur Ferreira et au Docteur Guedon pour avoir été présents en tant qu'examineurs.

Merci au Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de Technologie (MENRT) pour le financement de cette thèse.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Françoise Simon-Plas et Alain Hartmann, qui au cours des réunions annuelles m'ont prodigué de précieux conseils.

Je remercie aussi tous les chercheurs extérieurs au laboratoire avec lesquels j'ai collaboré, de près ou de loin, au cours de cette thèse :

- Thierry Ferreira, pour qui les lipides de la levure n'ont plus vraiment de secret ! Merci pour ton aide et ta patience au cours des nombreuses et longues discussions téléphoniques.
- Widmar Tanner et Guido Grossmann qui nous ont offert une nouvelle vision de la membrane plasmique des levures en nous fournissant le plasmide Sur7-GFP.

Je tiens également à adresser un grand remerciement à tout le personnel du laboratoire GPMA comprenant l'ensemble des maîtres de conférences et professeurs. Je n'oublie bien

évidemment pas Sylvie pour sa disponibilité et sa gentillesse. Merci aussi aux secrétaires du laboratoire qui se sont succédés pour leur efficacité à gérer les problèmes administratifs.

Je désire remercier tous ceux qui ont travaillé à mes côtés et qui ont contribué à créer une bonne ambiance au laboratoire. Mes remerciements vont particulièrement à mes voisins et ex-voisins de bureau (Alain, Alexandre, Bruno, Daniele, Guillaume, Momo, Pauline et Stéphane) ainsi qu'aux anciens thésards du laboratoire (Hélène, Hué, Lan, Marwen et Vincent). Merci également à Yann pour ses bonnes blagues... que lui seul comprend ! Merci à vous tous, c'est grâce à vous que ces années passées au laboratoire furent agrémentées de franches rigolades qui resteront gravées dans ma mémoire.

Merci à mes stagiaires, Marie-Lou, Damien, Laëtitia, Kathleen et Bastien avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Cette thèse est aussi leur travail et je les en remercie profondément.

Un grand merci à ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé au cours de ces années de thèse.

Enfin, le plus fort de mes remerciements est pour Pauline. Merci de m'avoir accompagné et soutenu dans cette aventure. En plus de me supporter dans des conditions «normales», ce qui n'est déjà pas une mince affaire, elle a du subir mon humeur de ronchon en fin de thèse et se mettre en retrait. Et pourtant, quelle présence indispensable. Merci d'être là tous les jours !

# SYMBOLES ET ABREVIATIONS

## ***Symboles***

$a_w$  : activité de l'eau

$A$  : surface membranaire ( $m^2$ )

$b$  : volume non osmotique ( $m^3$ )

$C_s$  : concentration en soluté ( $mol.m^{-3}$ )

$dP$  : variation de pression osmotique (Pa)

$dV$  : variation de volume engendrée par la variation de pression osmotique ( $m^3$ )

$\frac{dV}{dt}$  : variation de volume au cours du temps ( $m^3.s^{-1}$ )

$\Delta P$  : gradient de pression hydrostatique transmembranaire (Pa)

$\Delta\Psi_\pi$  : différence de potentiel hydrique osmotique de part et d'autre de la membrane (Pa)

$\Delta\Psi_p$  : différence de potentiel hydrique de pression hydrostatique de part et d'autre de la membrane (Pa)

$\sigma$  : coefficient de réflexion (égal à 0 pour un soluté diffusant à travers la membrane à la même vitesse que le solvant et à 1 pour un soluté incapable de franchir la membrane)

$E$  : potentiel électrique ionique (V)

$\varepsilon$  : module d'élasticité volumique de la paroi de la levure (Pa)

$F$  : constante de Faraday ( $C.mol^{-1}$ )

$\Psi$  : potentiel hydrique (Pa)

$\Psi_g$  : potentiel hydrique gravitationnel (Pa)

$\Psi_p$  : potentiel hydrique de pression (pression hydrostatique) (Pa)

$\Psi_s$  : potentiel hydrique osmotique (Pa)

$\Psi_m$  : potentiel hydrique matriciel (Pa)

$\Psi_p^E$  : potentiel hydrique de pression hydrostatique dans le milieu extracellulaire (Pa)

$\Psi_p^C$  : potentiel hydrique de pression hydrostatique dans le milieu cellulaire (Pa)

$\Psi_s^E$  : potentiel hydrique osmotique dans le milieu extracellulaire (Pa)

$\Psi_s^C$  : potentiel hydrique osmotique dans le milieu cellulaire (Pa)

$\Psi_m^E$  : potentiel hydrique matriciel dans le milieu extracellulaire (Pa)

$\Psi_m^C$  : potentiel hydrique matriciel dans le milieu cellulaire (Pa)

$g$  : accélération de la pesanteur ( $m.s^{-2}$ )

$G$  : énergie libre (J)

$h$  : hauteur (m)

$J_V$  : flux osmotique volumique ( $\text{m.s}^{-1}$ )

$K$  : coefficient de Norrish du soluté utilisé pour augmenter la pression osmotique (1,16 pour le glycérol)

$L_p$  : perméabilité hydraulique de la membrane ( $\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ )

$m_j$  : masse molaire du constituant  $j$  ( $\text{g.mol}^{-1}$ )

$\mu_j$  : potentiel chimique du constituant  $j$  ( $\text{J.mol}^{-1}$ )

$\mu_j^0$  : potentiel chimique du constituant  $j$  à l'état standard initial ( $\text{J.mol}^{-1}$ )

$n_s$  : nombre de moles du soluté (mol)

$n_i$  : nombre de moles des autres constituants (mol)

$N_w$  : fraction molaire en eau

$P$  : pression (Pa)

$P_{\text{int}}$  : proportion de cellules intègres

$P_{\text{perm}}$  : proportion de cellules perméabilisées

$P_{\text{int WT}}$  : proportion de cellules Wild Type intègres

$P_{\text{int ERG6}}$  : proportion de cellules mutantes intègres

$P_{\text{perm WT}}$  : proportion de cellules Wild Type perméabilisées

$P_{\text{perm ERG6}}$  : proportion de cellules mutantes perméabilisées

$\Pi$  ou  $\pi$  : pression osmotique (Pa)

$\mu_w$  : potentiel chimique de l'eau dans la solution ( $\text{J.mol}^{-1}$ )

$\mu_w^0$  : potentiel chimique de l'eau pure ( $\text{J.mol}^{-1}$ )

$\Pi_e$  : pression osmotique extracellulaire (Pa)

$\Pi_i$  : pression osmotique intracellulaire (Pa)

$R$  : constante des gaz parfaits ( $8,31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ )

$S$  : surface ( $\text{m}^2$ )

$T$  : température (K)

$V$  : volume ( $\text{m}^3$ )

$V_{\text{int}}$  : volume moyen d'une cellule intègre ( $\text{m}^3$ )

$V_{\text{obs}}$  : volume moyen observé ( $\text{m}^3$ )

$V_{\text{obs WT}}$  : volume moyen observé pour les cellules Wild Type ( $\text{m}^3$ )

$V_{\text{obs ERG6}}$  : volume moyen observé pour les cellules mutantes ( $\text{m}^3$ )

$V_{\text{perm}}$  : volume moyen d'une cellule perméabilisée ( $\text{m}^3$ )

$V_i$  : volume initial ( $\text{m}^3$ )

$V_f$  : volume final ( $\text{m}^3$ )

$\overline{V}_w$  : volume molaire partiel de l'eau ( $= 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  dans nos conditions)

$X_s$  : fraction molaire

$z_j$  : charge par mole du constituant j

### ***Abréviations***

ADN : acide désoxyribonucléique

AP : acide phosphatidique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine tri-phosphate

CL: cardiolipide

DHAP : dihydroxyacétone-phosphate

FM 4-64 : N-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diéthylamino)phényl)hexatriényl) pyridinium dibromide

FSC : forward scatter

GFP : green fluorescent protein

GPDH : glycérol-3-phosphatase déshydrogénase

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GPP : glycérol-3-phosphatase

$H_I$  : phase hexagonale de type I (micellaire)

$H_{II}$  : phase hexagonale de type II (micellaire inverse)

IP : iodure de propidium

$L_d$  : phase liquide désordonnée

$L_o$  : phase liquide ordonnée

$L_\alpha$  : phase lamellaire liquide-cristal

$L_\beta$  : phase lamellaire gel

MCC : membrane compartment occupied by Can1p

MCP : membrane compartment occupied by Pma1p

MW : milieu Malt Wickerham

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylsérine

rpm : rotation par minute

RFP: red fluorescent protein

RMN: résonnance magnétique nucléaire

SSC : side scatter

STRE : stress response element

UFC : unités formant colonies

VNO : volume non-osmotique

WT : Wild Type (souche sauvage)

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                                                   | <b>1</b>  |
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                                                      | <b>4</b>  |
| <b>1. L'EAU ET LA CELLULE .....</b>                                                        | <b>5</b>  |
| 1.1. L'eau : transporteur de composés dissous et en suspension .....                       | 5         |
| 1.1.1. Mobilité de l'eau dans les cellules biologiques .....                               | 6         |
| 1.1.2. Pouvoir solvant de l'eau sur les molécules polaires .....                           | 7         |
| 1.2. L'eau : élément structurant de la cellule .....                                       | 7         |
| 1.2.1. Les protéines .....                                                                 | 7         |
| 1.2.2. Les acides nucléiques.....                                                          | 8         |
| 1.2.3. Les membranes.....                                                                  | 8         |
| 1.3. L'eau : élément indispensable des réactions biochimiques .....                        | 9         |
| <b>2. IMPACT DE LA DESHYDRATATION SUR LES CELLULES .....</b>                               | <b>10</b> |
| 2.1. Origine des échanges d'eau entre la cellule et son environnement .....                | 10        |
| 2.2. Transitions structurales induites par la déshydratation.....                          | 16        |
| 2.2.1. Dénaturation protéique.....                                                         | 16        |
| 2.2.2. Modifications de l'organisation structurale des membranes .....                     | 17        |
| 2.3. Influence de la déshydratation sur la physiologie et la viabilité des microorganismes | 18        |
| 2.3.1. Acclimatation des cellules lors de stress modérés.....                              | 18        |
| 2.3.2. Effets de déshydratations sévères .....                                             | 19        |
| 2.3.2.1. Conservation cellulaire par déshydratation.....                                   | 20        |
| 2.3.2.2. Mortalité cellulaire induite lors de déshydratations sévères .....                | 21        |
| <b>3. STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DE LA PAROI DE LA LEVURE.....</b>              | <b>25</b> |
| 3.1. Composition et structure des membranes biologiques.....                               | 25        |
| 3.1.1. Généralités.....                                                                    | 25        |
| 3.1.1.1. Lipides membranaires .....                                                        | 26        |
| 3.1.1.2. Protéines membranaires.....                                                       | 29        |
| 3.1.1.3. Dynamique et organisation structurale des membranes .....                         | 30        |
| 3.1.2. Membrane plasmique et paroi de la levure .....                                      | 32        |
| 3.1.2.1. Lipides membranaires .....                                                        | 32        |
| 3.1.2.2. Protéines membranaires.....                                                       | 34        |
| 3.1.2.3. Organisation de la membrane plasmique des levures.....                            | 34        |

|                                   |                                                                                                    |           |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2.4.                          | <i>Paroi cellulaire.....</i>                                                                       | 36        |
| 3.2.                              | Effet de perturbations hydriques sur la membrane plasmique.....                                    | 37        |
| 3.2.1.                            | <i>Impact sur l'organisation structurale de la membrane plasmique.....</i>                         | 37        |
| 3.2.2.                            | <i>Evolution morphologique et déformations de la membrane plasmique .....</i>                      | 37        |
| 3.2.3.                            | <i>Oxydation lipidique.....</i>                                                                    | 39        |
| 4.                                | CONCLUSIONS ET PRESENTATION DES AXES DE LA THESE.....                                              | 41        |
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b> |                                                                                                    | <b>44</b> |
| 1.                                | SOUCHES DE LEVURES ET CONDITIONS DE CULTURE .....                                                  | 45        |
| 1.1.                              | Souches de levures.....                                                                            | 45        |
| 1.1.1.                            | <i>Saccharomyces cerevisiae wild type (WT).....</i>                                                | 45        |
| 1.1.2.                            | <i>Mutants de Saccharomyces cerevisiae.....</i>                                                    | 45        |
| 1.1.2.1.                          | <i>Mutants sur la voie de synthèse de l'ergostérol .....</i>                                       | 45        |
| 1.1.2.2.                          | <i>Intégration d'une GFP membranaire par transformation de levures .....</i>                       | 46        |
| 1.2.                              | Conditions de culture .....                                                                        | 48        |
| 1.2.1.                            | <i>Culture en aérobie .....</i>                                                                    | 48        |
| 1.2.2.                            | <i>Culture en anaérobie .....</i>                                                                  | 48        |
| 2.                                | PROCEDES DE DESHYDRATATION .....                                                                   | 49        |
| 2.1.                              | Déshydratation en milieu liquide .....                                                             | 49        |
| 2.1.1.                            | <i>Préparation de solutions à activité de l'eau contrôlée.....</i>                                 | 49        |
| 2.1.2.                            | <i>Cinétiques de déshydratation des cellules par traitements osmotiques .....</i>                  | 50        |
| 2.1.2.1.                          | <i>Chocs hyperosmotiques.....</i>                                                                  | 50        |
| 2.1.2.2.                          | <i>Rampes hyperosmotiques .....</i>                                                                | 50        |
| 2.1.3.                            | <i>Protocole de réhydratation.....</i>                                                             | 51        |
| 2.1.4.                            | <i>Mesure de la viabilité.....</i>                                                                 | 51        |
| 2.2.                              | Déshydratation en milieu aerien .....                                                              | 52        |
| 2.2.1.                            | <i>Préparation des enceintes de séchage .....</i>                                                  | 52        |
| 2.2.2.                            | <i>Protocole de séchage et de réhydratation des levures.....</i>                                   | 52        |
| 2.2.3.                            | <i>Mesure de la viabilité.....</i>                                                                 | 53        |
| 3.                                | ANALYSE DES MODIFICATIONS FONCTIONNELLES ET STRUCTURALES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES LEVURES..... | 54        |
| 3.1.                              | Estimation de l'intégrité membranaire.....                                                         | 54        |
| 3.1.1.                            | <i>Analyse par cytométrie en flux.....</i>                                                         | 54        |

|                                      |                                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2.                               | <i>Analyse par microscopie à épifluorescence.....</i>                                                                                                | 56        |
| 3.2.                                 | Evolution morphologique des levures .....                                                                                                            | 57        |
| 3.2.1.                               | <i>Observation par microscopie confocale .....</i>                                                                                                   | 57        |
| 3.2.1.1.                             | <i>Marquage membranaire par le FM 4-64 .....</i>                                                                                                     | 58        |
| 3.2.1.2.                             | <i>Marquage de la paroi par le calcofluor .....</i>                                                                                                  | 60        |
| 3.2.1.3.                             | <i>Observation de microdomaines Sur7-GFP .....</i>                                                                                                   | 60        |
| 3.2.2.                               | <i>Observation par microscopie électronique à transmission .....</i>                                                                                 | 61        |
| 3.3.                                 | Mesure de volumes cellulaires.....                                                                                                                   | 62        |
| 3.4.                                 | Quantification des stérols cellulaires .....                                                                                                         | 63        |
| <b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b> |                                                                                                                                                      | <b>64</b> |
| 1.                                   | RECHERCHE DES CONDITIONS DE DESHYDRATATION CONDUISANT A LA SURVIE OU LA MORT DES LEVURES .....                                                       | 65        |
| 2.                                   | IMPLICATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DANS LA MORT CELLULAIRE LORS DE DESHYDRATATIONS BRUTES .....                                                    | 68        |
| 2.1.                                 | Effet du temps de maintien dans l'état déshydraté après un choc hyperosmotique severe sur la survie des levures .....                                | 68        |
| 2.2.                                 | Evolution de la permeabilite membranaire lors de chocs hyperosmotiques.....                                                                          | 69        |
| 2.2.1.                               | <i>Evolution de la perméabilité membranaire au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation .....</i>                                               | 70        |
| 2.2.2.                               | <i>Lien entre viabilité et intégrité membranaire .....</i>                                                                                           | 71        |
| 2.3.                                 | Contraction cellulaire et excès de surface membranaire lors de la déshydratation ..                                                                  | 71        |
| 2.3.1.                               | <i>Variation du volume cellulaire lors de chocs hyperosmotiques .....</i>                                                                            | 71        |
| 2.3.2.                               | <i>Excès de surface membranaire lors de la contraction volumique.....</i>                                                                            | 73        |
| 2.4.                                 | Morphologie de la membrane plasmique lors d'un choc hyperosmotique sévère....                                                                        | 74        |
| 2.4.1.                               | <i>Ultrastructure des levures après un choc hyperosmotique sévère .....</i>                                                                          | 74        |
| 2.4.2.                               | <i>Observation en microscopie confocale de l'évolution de la membrane plasmique au cours du temps de maintien après un choc hyperosmotique .....</i> | 75        |
| 2.5.                                 | Discussion .....                                                                                                                                     | 77        |
| 2.5.1.                               | <i>Perméabilisation membranaire pendant l'étape de déshydratation.....</i>                                                                           | 77        |
| 2.5.2.                               | <i>Perméabilisation membranaire pendant l'étape de réhydratation.....</i>                                                                            | 78        |
| 3.                                   | EVOLUTION STRUCTURALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE EN LIEN AVEC LA SURVIE CELLULAIRE LORS D'UNE DESHYDRATATION PROGRESSIVE .....                         | 80        |

|          |                                                                                                                                    |     |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.     | Préservation de l'intégrité membranaire lors des perturbations progressives .....                                                  | 80  |
| 3.2.     | Déformations de la membrane plasmique.....                                                                                         | 82  |
| 3.2.1.   | <i>Observation en microscopie confocale</i> .....                                                                                  | 82  |
| 3.2.2.   | <i>Observation en microscopie électronique à transmission</i> .....                                                                | 83  |
| 3.3.     | Redistribution latérale de protéines membranaires.....                                                                             | 84  |
| 3.4.     | Discussion .....                                                                                                                   | 87  |
| 4.       | LIEN ENTRE RESISTANCE AU STRESS HYPEROSMOTIQUE ET NATURE DES STEROLS MEMBRANAIRES .....                                            | 89  |
| 4.1.     | Impact de la nature des stérols sur la résistance aux chocs hyperosmotiques .....                                                  | 89  |
| 4.2.     | Evolution de l'intégrité de la membrane plasmique au cours de cycles déshydratation/réhydratation.....                             | 92  |
| 4.2.1.   | <i>Etape de déshydratation</i> .....                                                                                               | 92  |
| 4.2.2.   | <i>Etape de réhydratation</i> .....                                                                                                | 94  |
| 4.3.     | Causes de la perméabilisation membranaire lors des chocs modérés à 30 MPa .....                                                    | 95  |
| 4.3.1.   | <i>Variation du volume lors de cycle de déshydratation/réhydratation</i> .....                                                     | 95  |
| 4.3.2.   | <i>Morphologie des levures mutantes après un choc hyperosmotique modéré</i> ....                                                   | 96  |
| 4.3.2.1. | <i>Observation en microscopie confocale</i> .....                                                                                  | 96  |
| 4.3.2.2. | <i>Observation en microscopie électronique à transmission</i> .....                                                                | 98  |
| 4.4.     | Causes de la perméabilisation membranaire lors des chocs sévères à 166 MPa ....                                                    | 100 |
| 4.4.1.   | <i>Variation du volume cellulaire lors de déshydratations sévères</i> .....                                                        | 100 |
| 4.4.2.   | <i>Comportement de la paroi lors de la contraction volumique</i> .....                                                             | 101 |
| 4.5.     | Discussion .....                                                                                                                   | 105 |
| 4.5.1.   | <i>Perméabilisation membranaire pendant l'étape de déshydratation</i> .....                                                        | 106 |
| 4.5.2.   | <i>Perméabilisation membranaire pendant l'étape de réhydratation</i> .....                                                         | 107 |
| 4.5.3.   | <i>Evolution structurale de la paroi lors de perturbations hydriques</i> .....                                                     | 108 |
| 5.       | ROLE CLE DE L'ERGOSTEROL DANS LA SURVIE AU SECHAGE AERIEN.....                                                                     | 110 |
| 5.1.     | Résistance des mutants $\Delta erg$ lors de séchages à différents niveaux.....                                                     | 110 |
| 5.2.     | Résistance des mutants $\Delta erg$ lors d'un séchage gazeux en absence d'oxygène.....                                             | 112 |
| 5.3.     | Comparaison de l'effet d'un séchage gazeux en absence d'oxygène et d'une déshydratation osmotique sur la viabilité cellulaire..... | 113 |
| 5.4.     | Restauration de la résistance des souches mutantes lors d'une supplémentation en ergostérol.....                                   | 115 |
| 5.5.     | Discussion .....                                                                                                                   | 116 |

|                                         |                                                                                                                                                      |            |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.5.1.                                  | <i>Effet de la structure des stérols sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique .....</i>                                                | <i>117</i> |
| 5.5.2.                                  | <i>Effet de la structure des stérols sur l'oxydation des lipides membranaires ...</i>                                                                | <i>118</i> |
| 5.5.3.                                  | <i>Le passage du milieu liquide au milieu aérien : une force motrice possible pour l'évolution des stérols vers l'ergostérol chez les Fungi.....</i> | <i>120</i> |
| <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>        |                                                                                                                                                      | <b>123</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b> |                                                                                                                                                      | <b>128</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>                    |                                                                                                                                                      | <b>143</b> |

# INTRODUCTION

Au cours des deux premiers milliards d'années qui ont suivi l'apparition de la Terre, la vie s'est formée, développée et multipliée exclusivement dans l'eau (Watanabe et al., 2000). Par la suite, bien que certaines formes de vie aient quitté le milieu marin pour conquérir le milieu aérien, l'eau est restée le composant majoritaire des cellules biologiques. En plus de son rôle de solvant pour les réactions biochimiques, l'eau structure les macromolécules et permet la croissance cellulaire par l'intermédiaire de la pression de turgescence. Cependant, le retrait de l'eau cellulaire peut stabiliser les cellules sur des périodes importantes et ainsi permettre leur conservation sous forme viable et revivifiable. L'application de la déshydratation pour la conservation de microorganismes d'intérêt a été décrite pour la première fois au début du 20<sup>ème</sup> siècle par Hammer qui réussit à conserver des bactéries vivantes pendant 57 jours après l'évaporation de l'eau d'une culture bactérienne. Depuis ces premiers essais, de nombreux travaux ont visé à améliorer les techniques de déshydratation afin d'augmenter le temps de conservation et surtout d'accroître la concentration en microorganismes vivants après réhydratation. En effet, bien que la déshydratation stabilise une partie de la population microbienne, elle engendre généralement la mort d'une fraction de cette population. Les techniques de déshydratation utilisées actuellement pour la préservation de microorganismes d'intérêt sont le séchage, la lyophilisation et la congélation (qui combine un stress thermique et un stress hydrique). Ces différentes techniques permettent d'obtenir des taux de survie et des durées de stockage variables qui dépendent notamment de la souche microbienne.

Depuis maintenant une vingtaine d'années, le laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires (GPMA) travaille sur la réponse physique de cellules soumises à différentes perturbations physiques de leur environnement (basse et haute températures, hautes pressions gazeuses et hydrostatiques, hydratation, composés chimiques et oxydation). Concernant l'effet de la déshydratation sur les cellules, les études réalisées dans ce domaine ont montré que les cinétiques et les amplitudes de déshydratation sont des paramètres cruciaux pour la survie cellulaire à un cycle de déshydratation-réhydratation. Ces études ont relié la mort cellulaire lors de traitements hydriques à la perméabilisation de la membrane plasmique mais les mécanismes conduisant à cette perméabilisation ne sont pas encore totalement élucidés.

L'objectif de ce travail est d'approfondir la compréhension de la réponse physique de la membrane plasmique aux stress hydriques, entreprise par le laboratoire GPMA, dans l'optique de comprendre les mécanismes membranaires impliqués dans la mort et la résistance cellulaire aux

fluctuations hydriques. La compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans l'adaptation et la survie aux fluctuations hydriques intéresse le domaine de la microbiologie environnementale mais aussi le domaine industriel par le biais d'applications utilisant la déshydratation comme moyen de stabilisation de cellules d'intérêt. Dans cette étude, le travail a été réalisé sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, microorganisme décrit comme anhydrobiote qui peut, dans certaines conditions, survivre à des déshydratations sévères.

La première partie de ce mémoire correspond à la synthèse de l'étude bibliographique consacrée à l'eau dans les cellules biologiques. Différents aspects sont abordés tels que les effets de la déshydratation cellulaire ainsi que leurs conséquences sur la physiologie et la survie des cellules. Cette première partie se conclut par la présentation des principaux axes du travail de thèse. La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude. La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion. Enfin, la conclusion générale reprend de manière synthétique l'ensemble des résultats obtenus afin de souligner les avancées scientifiques réalisées au cours de cette étude.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique de ce mémoire présente un état des connaissances sur la déshydratation de cellules biologiques et plus principalement de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette synthèse se divise en trois parties. La première partie est dédiée à la description des propriétés de l'eau et de leurs implications dans les cellules biologiques. La seconde partie est consacrée à l'influence de la déshydratation sur la physiologie cellulaire. La dernière partie décrit l'effet de la déshydratation sur la membrane plasmique, structure cible impliquée dans la mort cellulaire lors de perturbations hydriques.

## 1. L'EAU ET LA CELLULE

L'eau est un composant majeur des cellules biologiques, représentant généralement 40 à 95% du volume des cellules vivantes (Ellis and Minton, 2003). La formule chimique de l'eau pure est  $H_2O$ . C'est une molécule de petite taille dont le volume est équivalent à une sphère dont le diamètre est d'environ 0,28 nm. Les principales propriétés de l'eau proviennent de sa structure dipolaire. En effet, bien que la molécule d'eau soit électriquement neutre, l'atome d'oxygène, chargé négativement, et les deux atomes d'hydrogène, chargés positivement, donnent à la molécule une charge électrique non-homogène (Figure 1).

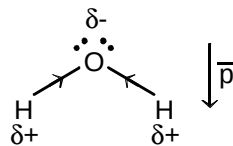


**Figure 1 : Schématisation des charges de la molécule d'eau à l'origine de sa structure dipolaire.**

Cette caractéristique est à l'origine des interactions électrostatiques (liaisons hydrogène) entre les molécules d'eau entre elles mais aussi entre les molécules d'eau avec d'autres molécules. Ainsi, l'eau possède des propriétés thermodynamiques uniques et est un élément de structure et de fonctionnalité cellulaires.

### 1.1. L'EAU : TRANSPORTEUR DE COMPOSES DISSOUS ET EN SUSPENSION

L'un des rôles importants de l'eau intracellulaire est de permettre le déplacement spatial des molécules dissoutes ou en suspension. Cette fonction repose sur la mobilité de l'eau intracellulaire mais également sur sa capacité à dissoudre les molécules polaires. Ces deux aspects sont développés dans les paragraphes suivants.

### 1.1.1. Mobilité de l'eau dans les cellules biologiques

Deux visions divergent sur la mobilité de l'eau à l'intérieur d'une cellule. La première considère que la majorité de l'eau intracellulaire est interfaciale et fait partie intégrante de la structure cellulaire (Pollack, 2001). Cette vision est basée sur la présence d'une concentration importante de macromolécules dans l'espace intracellulaire (environ  $400 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Figure 2). En effet, il est par exemple estimé que l'interface d'interaction directe entre l'eau et les macromolécules représente  $1160 \text{ m}^2$  par gramme de matière cellulaire sèche chez *E. coli*. Ceci est à l'origine d'un encombrement important dans le cytoplasme cellulaire et explique également que l'espace disponible pour les molécules d'eau correspond à des interstices d'une épaisseur moyenne comprise entre 1 et 10 nm. Ce premier point de vue est fondé sur une organisation multicouche de l'eau, impliquant l'existence d'une eau fortement structurée au contact des macromolécules. La seconde vision est plus nuancée et considère qu'une fraction majoritaire de l'eau intracellulaire possède les caractéristiques de l'eau solvante alors que l'autre est impliquée

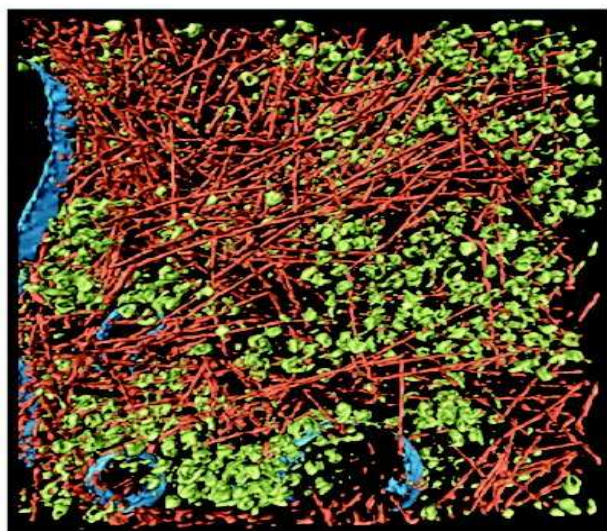


**Figure 2: Représentation de l'encombrement intracellulaire dans une cellule de *Dictyostelium discoideum*. Le cytoplasme est rempli de différents composants macromoléculaires : les filaments d'actine (rouge), les ribosomes et les autres macromolécules (vert) et les membranes (bleu) (Medalia et al., 2002)**

dans des interactions plus fortes et de plus grande durée avec la surface des macromolécules (Jasnin et al., 2008).

L'étude de la mobilité de l'eau intracellulaire *in vivo* par résonance magnétique nucléaire (RMN) révèle l'existence, sur le plan des caractéristiques dynamiques, de deux types de molécules d'eau. En effet, chez la bactérie *Escherichia coli* et l'archae *Haloarcula marismortui*, 85% de l'eau intracellulaire ne présente aucune différence de mobilité avec l'eau pure tandis que les 15% restants ont des mouvements qui sont 15 fois plus lents. Ces deux populations correspondent, pour les plus rapides, aux molécules d'eau éloignées

de la surface des macromolécules et pour les plus lentes à celles en interaction directe avec ces dernières (Persson and Halle, 2008). Ainsi, la deuxième vision prônant une mobilité importante de l'eau intracellulaire semble la plus cohérente avec les mesures de mobilité réalisées par RMN.

### 1.1.2. Pouvoir solvant de l'eau sur les molécules polaires

Les molécules polaires ont une structure asymétrique qui leur confère un caractère dipolaire et leur permet d'établir des interactions avec les ions et d'autres dipôles, comme l'eau. A ce titre, ces molécules sont hydrophiles. Les molécules d'eau s'organisent à la périphérie de ces molécules en établissant des liaisons hydrogènes avec ces dernières. Ceci forme une couche de solvatation, autour du soluté, qui établit d'autres liaisons avec l'eau environnante. Ces interactions sont à l'origine d'un pouvoir de solubilisation très élevé de l'eau. Dans le cas de la solubilisation de cristaux de sels, les cristaux se disloquent et un très grand nombre de molécules d'eau se retrouvent entre les ions composants les cristaux. Les molécules d'eau s'organisent de telle sorte que leur pôle positif s'oriente vers les anions et leur pôle négatif vers les cations. Ainsi, les ions se retrouvent entourés de molécules d'eau, ce qui diminue leur interaction et les éloigne les uns des autres. Cependant, lorsque la concentration en sels atteint de la limite de solubilité, l'eau n'est plus capable de séparer les ions des cristaux.

## 1.2. L'EAU : ELEMENT STRUCTURANT DE LA CELLULE

### 1.2.1. Les protéines

Le rôle structurant de l'eau provient des liaisons hydrogène qu'elle établit avec les groupements hydrophiles mais également de l'impossibilité d'établir cette interaction avec d'autres groupements qualifiés d'hydrophobes. Ces mécanismes participent à l'organisation structurale des protéines en positionnant les groupements hydrophiles des acides aminés vers l'extérieur et les groupements hydrophobes, par répulsion, au cœur des protéines (Tanford, 1997). Il est cependant erroné de penser que l'ensemble des résidus hydrophiles et hydrophobes sont positionnés respectivement à la surface et à l'intérieur des protéines. En effet, les acides aminés ne sont pas suffisamment ségrégés pour permettre une telle structure. La conformation des protéines résultent ainsi de tendances hydrophiles ou hydrophobes de séquences de chaînes d'acides aminés (Lesser and Rose, 1990). En plus de ce rôle d'organisation dans l'espace des chaînes d'acides aminés, l'eau agit comme lubrifiant lors de changements conformationnels des protéines (Shea et al., 2002).

### 1.2.2. Les acides nucléiques

La structure des chaînes d'acides nucléiques est également dépendante de l'eau. Au pH physiologique, les liaisons phosphodiester de l'acide désoxyribonucléique (ADN) unissant les nucléotides sont chargées négativement (anions phosphate  $\text{PO}_4^-$ ). L'ADN est un polyanion qui s'hydrate et se dissout en s'entourant de couches d'eau. Cette hydratation est d'ailleurs nécessaire à la stabilité de la double hélice : les couches d'eau font écran aux charges négatives qu'elles entourent et réduisent les répulsions entre phosphates qui entraîneraient la dénaturation de l'ADN par écartement des brins. L'hydratation de l'eau conditionne notamment les transitions structurales entre les différentes conformations de l'ADN (Fuller et al., 2004; Brovchenko et al., 2007).

Concernant l'acide ribonucléique (ARN), le repliement spatial du simple brin dans sa forme fonctionnelle ressemble à celui des protéines. L'ARN présente des segments hydrophobes et hydrophiles mais la répartition de ces segments est plus régulière en comparaison à celle de protéines. De plus, la séquence de l'ARN permet de réaliser des liaisons hydrogène intramoléculaires conduisant à la formation de structures tige-boucle et à un état replié et compact de l'ARN (Sorin et al., 2005).

### 1.2.3. Les membranes

La fonction structurante de l'eau se manifeste également au niveau d'assemblages macromoléculaires tels que les membranes. Les membranes sont composées notamment de phospholipides qui sont des composés amphiphiles (aussi appelés amphipatiques). Les espèces chimiques amphiphiles possèdent à la fois un groupe polaire et un groupe apolaire. L'équilibre thermodynamique d'un système amphiphile-eau est caractérisé par l'hydratation maximale des groupements polaires et l'optimisation des interactions entre régions hydrophobes. Ceci permet généralement le compactage spatial des groupes hydrophobes aboutissant à la minimisation de leur contact avec l'eau. En phase aqueuse, les lipides ont une tendance naturelle à adopter plusieurs types de phases et cette propriété est appelée le polymorphisme lipidique (Figure 3). L'organisation structurale des lipides dépend naturellement des groupements fonctionnels présents sur le lipide mais aussi de tous les facteurs influençant les interactions de type électrostatique tels que la température, la force ionique, le pH, ou la présence de cations divalents. Deux grands types d'organisation peuvent apparaître : une organisation lamellaire ( $L_\alpha$  et  $L_\beta$ ) et une organisation hexagonale ( $H_I$  et  $H_{II}$ ) (Figure 3).

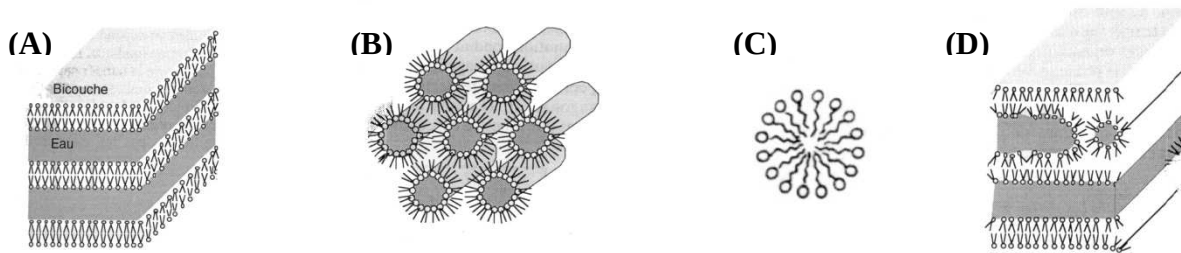


**Figure 3 : Schématisation des diverses phases adoptées par lipides en suspension dans l'eau. (A) Phase multilamellaire composée de bicouches lipidiques, (B) phase hexagonale  $H_{II}$  composée de micelles inverses, (C) phase hexagonale ou micelle et (D) phase intermédiaire. (D'après Schechter E., «Biochimie et biophysique des membranes», 2 édition, Masson, 1997).**

Les membranes biologiques résultent de l'organisation des phospholipides en structure lamellaire composée de deux couches de phospholipides. Dans le cas de la membrane plasmique, la bicouche lipidique est entourée par l'eau du milieu extracellulaire et du cytosol. Des protéines sont également enchâssées à l'intérieur des membranes biologiques. L'eau participe au positionnement de ces protéines intégrales dans cette matrice.

### 1.3. L'EAU : ELEMENT INDISPENSABLE DES REACTIONS BIOCHIMIQUES

L'eau est impliquée dans la majorité des réactions biochimiques intracellulaires au travers de différentes propriétés et fonctions. D'une part, l'eau intracellulaire forme le milieu réactionnel à l'origine de la solubilisation de molécules ainsi que de leur mobilité. Ainsi, elle permet les rencontres et les interactions entre ces molécules qui sont indispensables aux réactions biochimiques. D'autre part, l'eau est également un réactif. En effet, l'eau est le substrat de nombreuses réactions intracellulaires et intervient dans différentes réactions chimiques telles que les hydrolyses, les réactions acido-basiques, les réactions d'oxydo-réduction, les extractions et additions de molécules... Dans le cas des réactions acido-basiques, l'eau peut agir comme base en offrant le partage d'une paire d'électrons libres situés sur l'atome d'oxygène, et comme acide par le biais de liaisons hydrogènes.

**L'ensemble de ces données permet d'attribuer trois fonctions importantes à l'eau intracellulaire. En plus de son rôle essentiel dans les réactions biochimiques se produisant dans le cytoplasme, elle possède un rôle de vecteur et d'élément structurant. Ces trois fonctions majeures de l'eau intracellulaire permettent de la considérer comme un composant actif dans la biologie de la cellule (Ball, 2008).**

## 2. IMPACT DE LA DESHYDRATATION SUR LES CELLULES

### 2.1. ORIGINE DES ECHANGES D'EAU ENTRE LA CELLULE ET SON ENVIRONNEMENT

L'ajout de sels dans un milieu composé d'eau pure conduit à une modification de l'état hydrique du milieu. En effet, la présence de sels dans une solution entraîne un changement de la structure de l'eau. L'association entre l'eau et les solutés dissous conduit à un changement d'organisation de l'eau qui engendre une diminution importante de la quantité d'eau disponible pour les organismes vivants. Ces phénomènes d'interaction induisent des variations d'énergie de l'eau mesurables par l'intermédiaire des paramètres physico-chimiques, tels que le potentiel chimique de l'eau ( $\mu_w$ ), le potentiel hydrique ( $\Psi$ ), la pression osmotique ( $\Pi$ ), ou bien encore l'activité de l'eau ( $a_w$ ).

L'état hydrique du milieu influence directement l'hydratation des cellules biologiques. Les modifications de cet état sont à l'origine des transferts d'eau entre les cellules et le milieu extracellulaire. Sur le plan thermodynamique, ces mouvements sont régis par des gradients de potentiel chimique qui s'établissent à l'interface (membrane plasmique) entre la cellule et le milieu. Le potentiel chimique d'un constituant  $\mu_j$  ( $\text{J.mol}^{-1}$ ) est la fraction molaire d'énergie libre  $G$  (J) de ce constituant lorsque le nombre de moles des autres constituants ( $n_i$ ), la température ( $T$ ), la pression ( $P$ ) et la force ionique ( $E$ ) sont constants:

$$\mu_j = \left( \frac{\partial G}{\partial n_j} \right)_{n_i, T, P, E} \quad (1)$$

La valeur du potentiel chimique est exprimée par rapport à un état standard initial  $\mu_j^0$ :

$$\mu_j = \mu_j^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_j P + z_j F E + m_j g h \quad (2)$$

où  $R$  ( $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) est la constante des gaz parfaits,  $T$  (K) la température,  $\bar{V}$  ( $\text{m}^3.\text{mol}^{-1}$ ) le volume molaire partiel du constituant  $j$ ,  $P$  (Pa) la pression,  $z_j$  la charge par mole de constituant  $j$ ,  $F$  ( $\text{C.mol}^{-1}$ ) la constante de Faraday,  $E$  (V) le potentiel électrique,  $m_j$  ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) la masse molaire de la substance  $j$ ,  $g$  ( $\text{m.s}^{-2}$ ) l'accélération de la pesanteur et  $h$  (m) la hauteur. La constante de Faraday peut être négligée pour les constituants non électrolytes et l'eau. Le terme gravitationnel ( $m_j g h$ ) peut être négligé dans la plupart des situations microbiologiques.

Le potentiel chimique de l'eau dans une solution correspond donc essentiellement à :

$$\mu_w = \mu_w^0 + RT \ln a_w + \bar{V}_w P \quad (3)$$

L'eau pure est la référence pour l'état standard initial  $\mu_w^0$ . L'équation 3 peut donc être transformée :

$$\frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} + P \quad (4)$$

Le terme  $\frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w}$  représente le potentiel de l'eau et est symbolisé par  $\Psi$  (Pa). Le potentiel de l'eau dans une solution liquide résulte de deux composants  $\Psi_s$  (attribuable aux solutés présents dans la solution), et  $\Psi_p$  (résultant de la pression hydrostatique).

$$\psi_s = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} \quad (5)$$

$$\psi_p = P \quad (6)$$

Puisque dans le cas d'une solution considérée comme idéale, l' $a_w$  est égale à la fraction molaire en eau  $N_w$ , l'équation 5 devient :

$$\psi_s = RTC_s \quad (7)$$

où  $C_s$  est la concentration en soluté exprimée en  $\text{mol.m}^{-3}$ .

Dans un environnement plus complexe, deux composants supplémentaires de  $\Psi$ ,  $\Psi_m$  (le potentiel matriciel) et  $\Psi_g$  (le potentiel gravitationnel) peuvent être pris en compte :

$$\psi = \psi_s + \psi_p + \psi_m + \psi_g \quad (8)$$

Le potentiel matriciel en particulier peut être une composante significative du potentiel de l'eau dans des milieux solides. Il représente la capacité d'une structure poreuse à retenir l'eau par capillarité.

$\Psi_s$ , le potentiel résultant de l' $a_w$  de la solution est également appelé potentiel osmotique. Comme le potentiel de l'eau, il a les dimensions d'une pression et s'exprime donc en Pascal (Pa). La pression osmotique  $\Pi$  d'une solution est directement liée au potentiel osmotique par la relation :

$$\Pi = -\Psi_s \quad (9)$$

A l'état d'équilibre hydrique entre la cellule et le milieu, l'absence de flux net d'eau entre ces systèmes s'explique par l'équilibre des potentiels hydriques intra et extra cellulaires. Etant donné

que le potentiel hydrique de chaque compartiment résulte essentiellement de la contribution de 3 potentiels (isostatique, osmotique, matriciel), cet équilibre est décrit par l'équation suivante :

$$\Psi_p^E + \Psi_s^E + \Psi_m^E = \Psi_p^C + \Psi_s^C + \Psi_m^C \quad (10)$$

dans laquelle, les exposants <sup>C</sup> et <sup>E</sup> désignent respectivement le milieu cellulaire et le milieu extracellulaire et les indices <sub>p</sub>, <sub>s</sub> et <sub>m</sub> désignent respectivement les composantes isostatiques, osmotiques et matricielles de ces potentiels.

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 présence de la membrane hémiperméable, perméable à l'eau (une exception pour ce qui concerne les molécules polaires) et faiblement perméable aux solutés hydrophiles, donne lieu à l'expression physique de ce gradient : l'établissement spontané de flux osmotiques (principalement de l'eau) vers l'intérieur des cellules. La résistance à l'étirement de l'enveloppe cellulaire contient cet afflux d'eau qui s'exprime par une augmentation du potentiel isostatique interne (Zimmermann, 1978) par rapport au potentiel isostatique externe et explique la pression de turgescence intracellulaire ( $\Delta P = \Psi_p^C - \Psi_p^E$ ). Cette situation hydrique est associée au métabolisme optimal de croissance cellulaire et ce processus permet l'augmentation du volume cellulaire lorsque la quantité de surface membranaire augmente.

Dans le cas des microorganismes, la pression de turgescence dépend fortement de l'espèce considérée (Tableau 1).

**Tableau 1: Pression de turgescence de différents types de microorganismes.**

| <i>Microorganismes</i>        | <i>Pression de turgescence (MPa)</i> | <i>Référence</i>                   |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Levures</b>                | 0,05 à 0,2                           | (Martinez de Maranon et al., 1996) |
| <b>Bactéries Gram positif</b> | 1,5 à 2,5                            | (Poolman and Glaasker, 1998)       |
| <b>Bactéries Gram négatif</b> | 0,3 à 1,1                            | (Koch, 1988)                       |

A l'issue d'une variation du potentiel hydrique du milieu, qui entraîne une variation du potentiel hydrique intracellulaire, la cellule atteint un nouvel état stationnaire. Ce rééquilibrage des potentiels hydriques résulte de la variation du volume cellulaire. Le volume final atteint est relié à la pression osmotique par la relation de Boyle Van't Hoff:

$$\pi = \Psi_s = R.T.\frac{n_s}{V} \quad (11)$$

car,

$$C_s = \frac{n_s}{V} \quad (12)$$

alors,

$$V = \frac{R.T.n_s}{\pi} \quad (13)$$

Ceci implique que le volume délimité par la membrane sélective est proportionnel à la pression osmotique si le nombre de solutés osmotiquement actifs qu'il contient est constant.

Les composants qui n'influencent pas la pression osmotique forment le volume non osmotique (b):

$$V - b = \frac{R.T.n_s}{\pi} \quad (14)$$

Le volume non osmotique représente environ 15% et 40% du volume cellulaire physiologique d'*Escherichia coli* (Poirier et al., 1998) et de *Saccharomyces cerevisiae* (Martinez de Maranon et al., 1996), respectivement.

La réponse cellulaire immédiate et physique à une variation du potentiel hydrique de son environnement correspond à la phase passive de l'osmorégulation qui aboutit à l'équilibre des potentiels hydriques de part et d'autre de la membrane plasmique (Martinez de Maranon et al., 1996). Dans le cas d'un stress hyperosmotique, l'eau intracellulaire sort de la cellule ce qui a pour conséquence l'annulation de la pression de turgescence puis la diminution du volume cellulaire. La cinétique de cet échange est fonction du gradient de pression transmembranaire, de la perméabilité à l'eau et de la surface de la membrane. Dans ce cas, la variation de volume au cours du temps est décrite par la relation suivante (Kedem and Katchalsky, 1958) :

$$J_V = L_p(\Delta\psi_p + \sigma\Delta\psi_\pi) \quad (15)$$

Avec

$$J_V = -\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (16)$$

où  $L_p$  est le coefficient de perméabilité hydrique de la membrane ( $\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ),  $A$  est la surface membranaire ( $\text{m}^2$ ) supposée constante,  $\frac{dV}{dt}$  est la variation de volume au cours du temps ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ ),  $J_V$  est le flux osmotique volumique ( $\text{m.s}^{-1}$ ),  $\sigma$  est le coefficient de réflexion du soluté considéré (compris entre 0 et 1),  $\Delta\psi_\pi$  est la différence de potentiel osmotique de part et d'autre de la

membrane (Pa) et  $\Delta\psi_p$  est la différence de potentiel de pression hydrostatique de part et d'autre de la membrane (Pa).

La perméabilité hydrique ( $L_p$ ) de la membrane de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été estimée à une valeur supérieure à  $6 \times 10^{-11} \text{ m s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$  (Beney et al., 2001). Ainsi, quand un microorganisme est transféré dans une solution concentrée (faible potentiel chimique de l'eau) l'eau sort de la cellule et entraîne sa contraction. Simultanément, les solutés perméants pénètrent dans la cellule d'autant plus que  $\sigma$  est proche de 0 et réduisent l'ampleur de la contraction volumique. La cinétique de variation du volume en réponse à un gradient de pression osmotique (choc) peut être caractérisée à partir de l'équation de Kedem et Katchalsky (à partir du moment où la pression de turgescence est annulée) :

$$J_v = -\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = L_p \sigma (\Pi_e - \Pi_c) \quad (17)$$

Où  $\Pi_e$  est la pression osmotique extracellulaire et  $\Pi_i$  est la pression osmotique intracellulaire (Pa).

Selon l'équation 5,  $\Pi_i$  est liée au volume au cours du temps et il est donc possible d'écrire :

$$-\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = K \left( \Pi_e - \frac{RTn_s}{V-b} \right) \quad (18)$$

Dont la résolution analytique selon (Berner and Gervais, 1993) donne :

$$\frac{1}{\Pi_e} (V - V_i) + \frac{V_f - b}{\Pi_e} \ln \left[ \frac{V - V_f}{V_i - V_f} \right] = -KAt \quad (19)$$

Où  $V$  est le volume cellulaire à l'instant  $t$  ( $\text{m}^3$ )

$V_i$  et  $V_f$  sont respectivement les volumes initial et final ( $\text{m}^3$ )

$$K = L_p \sigma$$

Cette résolution n'est valable que pour un soluté imperméant ( $\sigma = 1$ ). Dans ce cas, le volume cellulaire subit une décroissance exponentielle au cours du temps en réponse à un choc hyperosmotique (Figure 4).

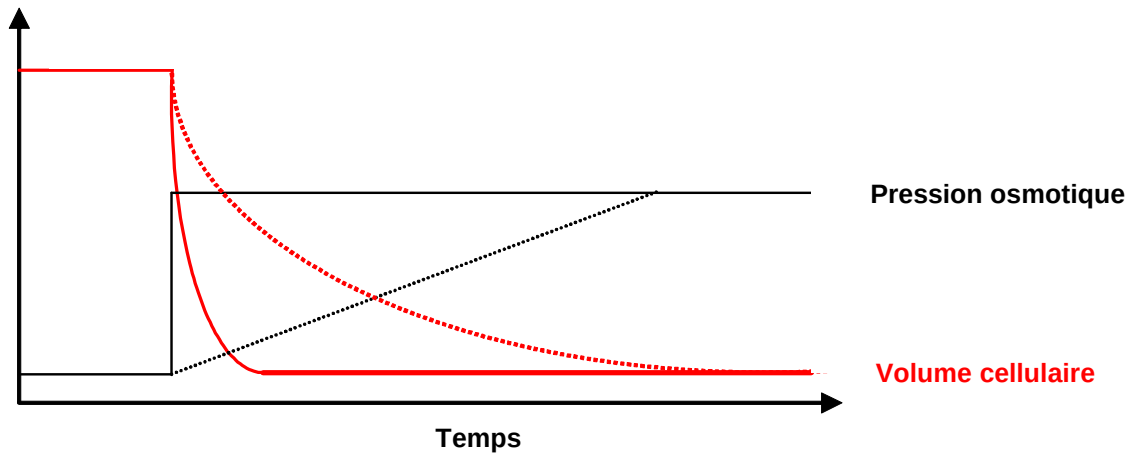


**Figure 4 : Représentation schématique de la variation de pression osmotique (traits noirs) et du volume cellulaire (traits rouges) au cours du temps, lors d'un choc (lignes continues) ou d'une rampe (lignes pointillées) hyperosmotique.**

La principale conséquence du retrait de l'eau intracellulaire, sous l'influence d'un gradient de potentiel hydrique, est la modification du volume cellulaire. Il s'agit d'une particularité des perturbations hydriques (comparées aux autres perturbations telles que la température ou la pression hydrostatique) qui sont à l'origine de transferts de masse entre la cellule et le milieu. Ce phénomène repose sur la dissipation du gradient de potentiel hydrique et peut engendrer une diminution de 85% du volume cellulaire (Poirier et al., 1998). La cinétique de ce phénomène est principalement liée à la résistance qu'oppose la membrane cellulaire au transfert de l'eau et des solutés, au rapport entre la quantité de surface et le volume de la cellule ainsi qu'à la vitesse d'apparition du gradient de potentiel hydrique entre la cellule et le milieu (équations 15 à 17). Dans sa manifestation la plus intense, une diminution de 50 à 85% du volume d'un microorganisme peut intervenir en quelques millisecondes (Martinez de Maranon et al., 1996). Sur le plan pratique, il convient de remarquer qu'il est difficile de réaliser une perturbation dont la cinétique approche celle d'un échelon (variation instantanée de  $\Pi$ ). En effet, la diffusion et les phénomènes de mélange ne permettent pas l'augmentation instantanée de la concentration dans l'ensemble du réacteur expérimental. D'une manière générale, ces perturbations rapides (chocs) peuvent être approchées par immersion d'une très faible quantité de cellules dans un volume important de solution osmotique. Dans ces conditions la cinétique de la réponse volumique est superposée à la cinétique de variation de la pression osmotique dans le milieu extracellulaire (Martinez de Maranon et al., 1996).

## 2.2. TRANSITIONS STRUCTURALES INDUITES PAR LA DESHYDRATATION

Dans le premier chapitre de la synthèse bibliographique, l'effet structurant de l'eau sur les macromolécules et les assemblages macromoléculaires a été décrit. Lors d'une déshydratation, les interactions inter et intramoléculaires peuvent être modifiées de manière importante. Dans ce paragraphe, nous nous sommes focalisés sur l'effet de la déshydratation sur la structure des protéines et l'organisation structurale de la membrane plasmique.

### 2.2.1. Dénaturation protéique

La structure native d'une protéine résulte d'un équilibre fragile entre l'entropie conformationnelle qui tend à déstabiliser l'ensemble et différentes interactions stabilisantes dites forces compensatoires. Ces interactions regroupent les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et les forces de van der Waal's (Privalov and Gill, 1988). Lors du retrait de l'eau intracellulaire par déshydratation, ces interactions sont modifiées pouvant aboutir à la dénaturation de la structure protéique par des changements des structures secondaire, tertiaire et/ou quaternaire. Cette dénaturation est souvent réversible mais peut être irréversible en fonction de la nature des protéines et des paramètres du procédé de déshydratation (Carpenter et al., 1990; Wolkers et al., 1998). 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). Ce phénomène de confinement des macromolécules est aggravé par l'augmentation de la concentration en ions dans le milieu intracellulaire provoquée par la sortie d'eau de la cellule (Garner and Burg, 1994). Il a été montré que la contraction volumique des cellules en réponse à un stress hydrique conduit à une augmentation du pH intracellulaire attribuée à l'augmentation de la concentration intracellulaire en protons (Vindelov and Arneborg, 2002). Ce phénomène pourrait également participer à l'agrégation protéique en modifiant les charges de surface des protéines.

### 2.2.2. Modifications de l'organisation structurale des membranes

Dans les membranes biologiques, les lipides sont organisés en bicouche lipidique sous l'effet structurant de l'eau intra et extracellulaire. Les mouvements au sein de cette matrice lipidique sont possibles grâce à la nature et l'état physique des lipides. Au-dessus de la température de fusion des chaînes acyles lipidiques, température au-dessus de laquelle les chaînes hydrophobes entrent en fusion, le cœur hydrophobe va présenter une viscosité basse, une consistance fluide dite phase fluide  $L_\alpha$  (Figure 5). C'est une condition nécessaire à la vie des cellules, car tous les phénomènes de la physiologie cellulaire impliquent une importante participation de la fluidité membranaire. Au-dessous de cette température de fusion, la membrane adopte une phase gel ( $L_\beta$ ) dans laquelle les mouvements sont ralentis, un état qui serait donc incompatible avec l'activité cellulaire. La température à laquelle les lipides passent d'une conformation ordonnée  $L_\beta$  à une conformation fluide  $L_\alpha$  est la température de transition de phase gel-liquide. Mise à part la température, une diminution de l'hydratation des têtes polaires des phospholipides peut également conduire à une transition de l'état liquide à l'état gel.

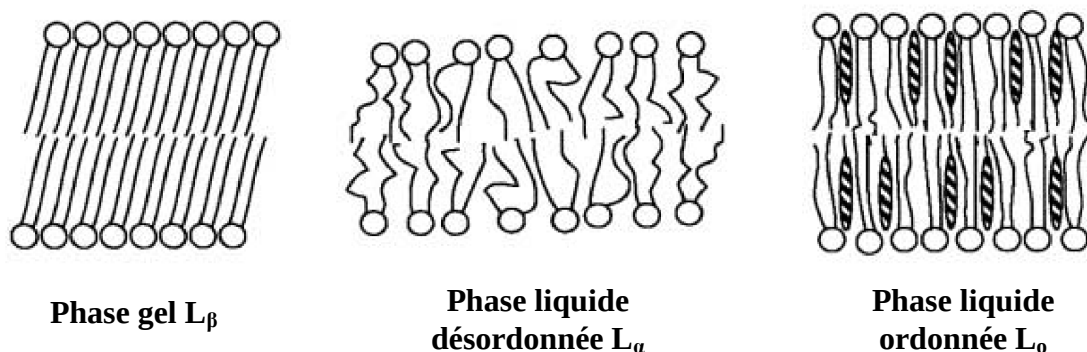


**Figure 5 : Structures des bicouches lipidiques rencontrées dans les membranes biologiques. Dans certaines conditions (basse température, faible hydratation), les phospholipides peuvent adopter une phase gel. La présence de stérols (formes hachurées) dans la bicouche lipidique ordonne la phase liquide ou fluidifie la phase gel pour donner une phase liquide ordonnée (Munro, 2003).**

La température ainsi que le niveau d'hydratation auxquels la transition liquide–gel se produit sont propres à chaque type de lipide (fonction de la nature des têtes polaires, de la longueur et du degré de saturation des chaînes acylées). Ceci provoque la coexistence de différentes phases dans un mélange de phospholipides lors de sa déshydratation. L'immiscibilité entre les différentes phases conduit à la formation de domaines de fluidités différentes dans les membranes modèles (Tokumasu et al., 2003; Veatch and Keller, 2003). Ce processus dynamique est appelé séparation de phases. Selon le système considéré, l'atteinte d'un équilibre peut être réalisé en quelques minutes (Wolkers et al., 1998; Veatch and Keller, 2003) ou à l'échelle de

l'heure (Leckband *et al.*, 1993). Ce phénomène conduit à la réorganisation des lipides dans la membrane en fonction de leur état. Au cours de la réhydratation, les phospholipides membranaires subissent des changements de phases inverses et reviennent en phase liquide.

## 2.3. INFLUENCE DE LA DESHYDRATATION SUR LA PHYSIOLOGIE ET LA VIABILITE DES MICROORGANISMES

### 2.3.1. Acclimatation des cellules lors de stress modérés

Lors de déshydratations modérées à des niveaux plus hydratés que le seuil d'osmorégulation, les microorganismes s'acclimatent et peuvent continuer de se diviser. Cependant, la vitesse de croissance est inférieure à celle observée lors d'une hydratation optimale. Le seuil d'osmorégulation dépend du type cellulaire. Dans le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ce seuil a été déterminé à une valeur de pression osmotique proche de 14 MPa (Marechal *et al.*, 1995). Au-delà de cette amplitude de déshydratation, la division cellulaire n'est plus observée alors que la viabilité cellulaire n'est pas forcément affectée. En effet, un retour à l'état hydraté (1,4 MPa) peut conduire à une reprise de la division cellulaire.

L'acclimatation des levures lors de stress hydriques modérés repose sur des mécanismes cellulaires actifs conduisant à la récupération de la pression de turgescence intracellulaire. En effet, la pression de turgescence est indispensable à la division cellulaire. Elle se définit comme la différence entre les pressions hydrostatiques interne et externe de la levure. En condition physiologique, la pression interne est légèrement supérieure à la pression externe ce qui permet de fournir la force nécessaire pour l'expansion volumique des cellules lors de la division cellulaire. Cette différence de pressions hydrostatiques trouve son origine dans une différence de pressions osmotiques entre les milieux intra et extracellulaires. Lors d'un retrait de l'eau intracellulaire induit par déshydratation, la différence de pression entre les deux compartiments devient inexistante puis le volume cellulaire diminue, expliquant l'arrêt de division cellulaire. Pour les niveaux de déshydratation compris dans la plage d'osmorégulation, les cellules mettent en place des réponses actives permettant un retour au volume cellulaire initial et la récupération de la pression de turgescence. Le déclenchement de l'osmorégulation est lié à l'annulation de la pression de turgescence (de Maranon *et al.*, 1997; Klipp *et al.*, 2005). Le mécanisme général de cette réponse est basé sur l'accumulation intracellulaire de un ou plusieurs solutés spécifiques. Ces solutés compatibles peuvent être accumulés à de fortes concentrations sans inhibition des

activités enzymatiques (Brown, 1978). Ce peuvent être des ions, des acides aminés ou des composés polyhydroxylés. Le glycérol est le principal soluté compatible accumulé chez les levures (Nevoigt and Stahl, 1997). Cette accumulation résulte de deux phénomènes (Figure 6). Le premier consiste en l'augmentation de la synthèse de glycérol à travers la glycolyse et la surexpression de gènes codant pour deux enzymes impliquées dans la synthèse du glycérol. Ces deux enzymes sont la glycérol-3-phosphatase déshydrogénase (GPDH) et la glycérol-3-phosphatase (GPP) qui transforment la dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) en glycérol (Mager and Siderius, 2002). Le second est lié à l'augmentation de la rétention du glycérol intracellulaire par la membrane plasmique induite par la fermeture des canaux membranaires à glycérol Fps1 (Luyten et al., 1995).

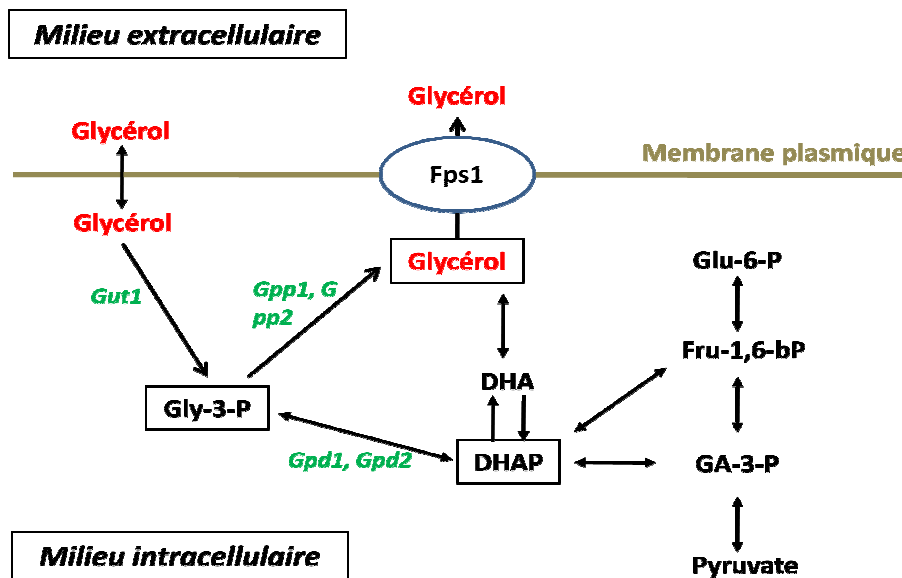


Figure 6 : Schématisation du métabolisme du glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae*. D'après (Mager and Siderius, 2002)

### 2.3.2. Effets de déshydratations sévères

La déshydratation jusqu'à des niveaux d'hydratation très faibles permet la conservation cellulaire sur de longues périodes. Cependant, la phase transitoire permettant de passer d'un état hydraté à de tels niveaux de déshydratation engendre des pertes de viabilité cellulaire importante pouvant aller jusqu'à une destruction quasiment totale de la population microbienne. Cette dualité particulière des traitements hydriques sévères est exposée dans les deux paragraphes suivants.

### 2.3.2.1. Conservation cellulaire par déshydratation

La conservation de cellules dont les microorganismes sur de longues périodes nécessite des niveaux de déshydratation sévères bien supérieurs à ceux permettant les phénomènes d'osmorégulation. En effet, la durée de conservation à l'état déshydraté de microorganismes est liée au niveau de déshydratation et la meilleure préservation cellulaire au cours du temps est observée pour les états très faiblement hydratés. Un exemple de ce phénomène est présenté dans la Figure 7 dans laquelle la survie de *R. japonicum* lors d'un stockage à 28 °C est optimale pour un état déshydraté à une valeur d' $a_w$  de 0,06 (équivalent à environ 300 MPa) tandis que la vitesse de décroissance de la survie au cours du temps augmente avec l'hydratation (Mugnier and Jung, 1985).

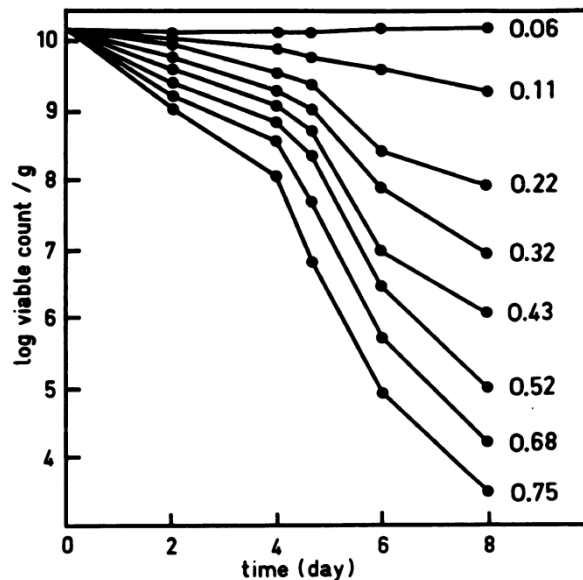


**Figure 7 : Effets de la valeur de l'activité de l'eau sur la survie de *Rhizobium japonicum* USDA 138 lors d'une conservation à 28 °C (Mugnier and Jung, 1985).**

La meilleure survie des microorganismes au cours du stockage pour les états fortement déshydratés est liée à une diminution de la dégradation des cellules. En effet, dans les procédés de stabilisation de cellules par congélation et déshydratation, la concentration de composants cellulaires peut permettre de former une structure amorphe à très forte viscosité dite structure vitreuse. Ceci conduit à une diminution de la mobilité moléculaire et de la vitesse des réactions délétères se produisant pendant le stockage (He et al., 2006). Le phénomène de transition vitreuse est lyotropique et thermotropique. Ainsi, la dégradation de microorganismes lors du stockage sur de longues périodes dépend de l'hydratation et de la température (Santivarangkna et al., 2008) (Figure 8).

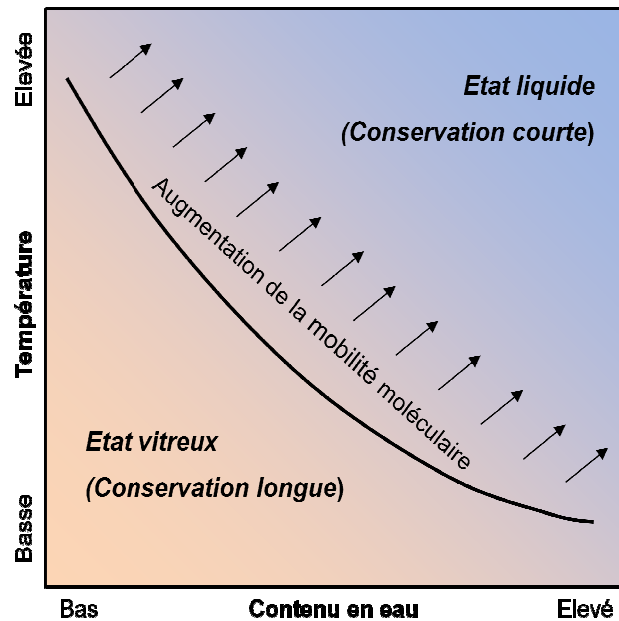


**Figure 8 :** Diagramme simplifié montrant la courbe de transition vitreuse en relation avec la température et le contenu en eau. La mobilité moléculaire et la vitesse des réactions délétères lors du stockage sont fortement réduites dans l'état vitreux. D'après (Santivarangkna et al., 2008).

Une des causes principales avancées pour expliquer la perte de viabilité cellulaire pendant le stockage est l'oxydation conduisant à la formation de radicaux libres (Crowe et al., 1983). Ces radicaux libres peuvent attaquer différents composants cellulaires tels que les protéines (Stadtman, 2006), les acides nucléiques (Halliwell, 1994) ou bien encore les lipides membranaires (Santivarangkna et al., 2008). Les réactions d'oxydation mettant en jeu des radicaux libres sont basées sur des transferts d'électrons et ne sont pas liées à des phénomènes diffusifs. Ainsi, la formation d'un état vitreux lors de déshydratations sévères ne réduit pas la vitesse de ces réactions et ne permet pas d'expliquer la conservation des cellules faiblement hydratées. L'hypothèse principale proposée serait une diminution de la vitesse de diffusion de l'oxygène dans la matrice déshydratée engendrant une diminution de la vitesse de production de radicaux libres (Lievense and van 't Riet, 1994).

#### 2.3.2.2. Mortalité cellulaire induite lors de déshydratations sévères

Bien que les états faiblement hydratés permettent la stabilisation des microorganismes au cours du temps lors du stockage, les étapes transitoires de ces traitements sont cependant à l'origine d'une diminution de la viabilité cellulaire après un cycle comprenant la déshydratation et la réhydratation. Un des facteurs influençant la perte de viabilité au cours de ces traitements est le type de microorganismes. Dans le cas de perturbations hyperosmotiques, il existe un seuil

de pression osmotique sous lequel la viabilité des microorganismes n'est pas affectée. La valeur de ce seuil de résistance est propre à chaque type de microorganisme (Figure 9).

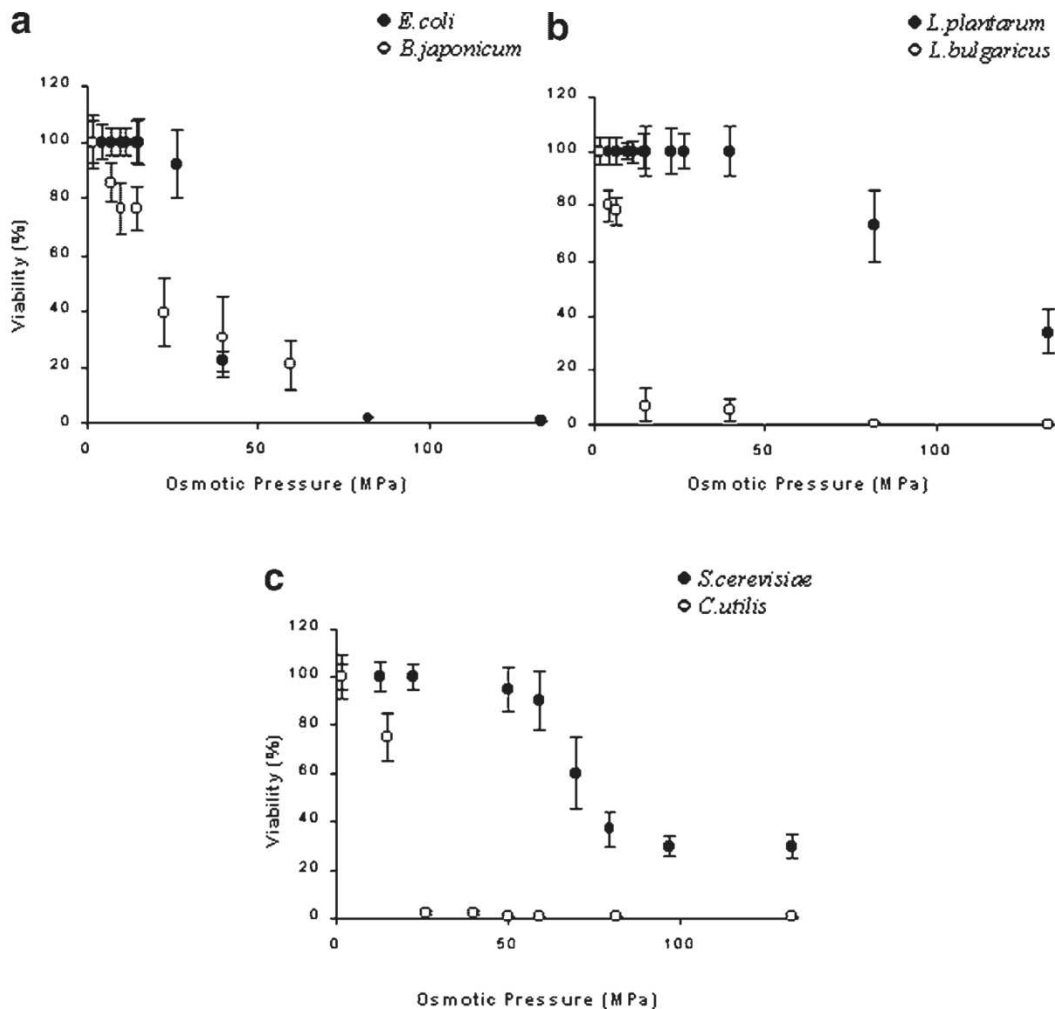


**Figure 9 : Survie de différents types de microorganismes à des chocs hyperosmotiques allant jusqu'à 166 MPa. Chocs osmotiques réalisés par ajout de glycérol à la température physiologique de chaque microorganisme. 37 °C pour les bactéries *E. coli* (gram-), *L. Bulgaricus* (gram+) et *L. plantarum* (gram+). 28 °C pour la bactérie *B. japonicum* (gram-). 22 °C pour la levure *C. utilis*. 25 °C pour *S. cerevisiae* (Mille et al., 2005a).**

Il existe également des différences de survie au sein d'une même espèce. Il a été montré que la souche de levures *S. cerevisiae* 14 est plus résistante au séchage que la souche *S. cerevisiae* Tomskaya (Beker and Rapoport, 1987).

Outre l'impact du type de microorganisme traité, la survie cellulaire est également influencée par des paramètres du cycle déshydratation/réhydratation. Le facteur principal affectant les taux de survie cellulaire lors de déshydratations sévères est la cinétique des étapes de déshydratation et de réhydratation. Dans des plages de pressions osmotiques comprises entre

80 MPa et 300 MPa où la survie cellulaire est fréquemment compromise, de nombreux travaux réalisés au laboratoire GPMA sur différents microorganismes 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; Poirier et al., 1997; Mille et al., 2003). D'autres travaux rapportent que certaines cellules, ne présentant pas d'aptitude particulière (cellules animales), peuvent résister à une forte déshydratation réalisée par séchage lent (Potts, 2001). Ainsi, ces résultats indiquent que la survie à la déshydratation est fortement liée à la maîtrise du procédé.

L'origine de la perte de viabilité lors de perturbations hydriques provient de dommages cellulaires induits par les étapes de déshydratation et de réhydratation. Une première hypothèse repose sur la dénaturation et/ou l'agrégation des protéines. En effet, la déshydratation peut entraîner des modifications conformationnelles irréversibles des protéines conduisant à la perte de leur fonctionnalité. Il est cependant peu probable que ces phénomènes soient des causes primaires de la mort cellulaire. En effet, l'étude de l'impact de la cinétique de déshydratation sur l'intégrité de protéines démontre que, contrairement aux cellules, leur préservation structurale est optimale en condition de séchage rapide qui limite la durée disponible pour les phénomènes d'agrégation (Wolkers et al., 1998). La modification de la flexibilité conformationnelle des protéines entraîne cependant des changements ou l'arrêt des activités protéiques (effet recherché en conservation cellulaire) qui peuvent générer un déséquilibre métabolique. L'arrêt séquentiel et les dysfonctionnements d'enzymes ou de chaînes de transport des électrons provoquent l'accumulation de radicaux libres dans la cellule et sont impliqués dans l'oxydation de ses principaux composants (Billi and Potts, 2002). L'ampleur de ces phénomènes est a priori liée au temps qui leur est imparti et l'atteinte rapide des niveaux de déshydratation poussés permet de les limiter.

La membrane plasmique, de par sa position interfaciale entre les milieux intra et extracellulaires, est une cible privilégiée des perturbations hydriques. En effet, de nombreuses études rapportent que la membrane plasmique perd son intégrité lors des étapes de déshydratation et de réhydratation. Cette perméabilisation de la membrane a été mise en évidence par des mesures de libération d'ions dans le milieu externe mais également par des marquages fluorescents spécifiques. Après réhydratation, la proportion de cellules perméabilisées est corrélée avec la proportion de cellules mortes suggérant que la cause

principale de la mort cellulaire serait la perméabilisation de la membrane plasmique (Simonin et al., 2007).

**La préservation de microorganismes d'intérêt sur de longues périodes nécessite des niveaux de déshydratation sévères conduisant à une diminution des vitesses des réactions cellulaires. Les traitements permettant d'atteindre de tels niveaux de déshydratation sont cependant à l'origine d'une perte de viabilité qui peut représenter une fraction importante de la population microbienne. La membrane plasmique est une cible privilégiée et semble fortement impliquée dans la mort cellulaire lors des phases transitoires de déshydratation et de réhydratation. Le dernier chapitre de la synthèse bibliographique sera consacré à la membrane plasmique de la levure et aux mécanismes impliqués dans la perte d'intégrité de cette structure lors de perturbations hydriques.**

### **3. STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DE LA PAROI DE LA LEVURE**

Les cellules sont définies comme les unités fonctionnelles fondamentales des systèmes vivants. D'une manière générale, l'intégrité de la cellule est préservée grâce à la présence d'une enveloppe externe appelée membrane plasmique. L'existence de cette membrane représente un des fondements majeurs de l'organisation de la vie car elle a permis d'isoler le contenu cellulaire du monde extérieur tout en autorisant des échanges contrôlés. Elle intervient aussi dans une variété de processus biologiques indispensables à la vie tels que les phénomènes de transport, la transduction de signaux ou encore les processus de conversion d'énergie. La membrane plasmique repose de plus sur le cytosquelette, charpente dynamique formée d'un réseau de filaments protéiques contribuant à maintenir la forme de la cellule et servant de guide pour le transport de molécules indispensables à l'activité cellulaire. Chez les organismes eucaryotes, les membranes des organites sont aussi le siège de fonctions spécifiques comme la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries ou la modification post-traductionnelle des protéines dans l'appareil de Golgi.

Au cours de ce chapitre, une présentation générale de la composition et de la structure des membranes biologiques sera réalisée. Nous nous concentrerons ensuite sur les particularités de l'enveloppe de la levure qui est composée de la membrane plasmique mais aussi d'une paroi cellulaire.

#### **3.1. COMPOSITION ET STRUCTURE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES**

##### **3.1.1. Généralités**

Les membranes biologiques sont des structures complexes, d'une épaisseur de 7 à 8 nm, principalement constituées de lipides disposés en double feuillet et de protéines impliquées dans des activités propres à la membrane (Figure 10).

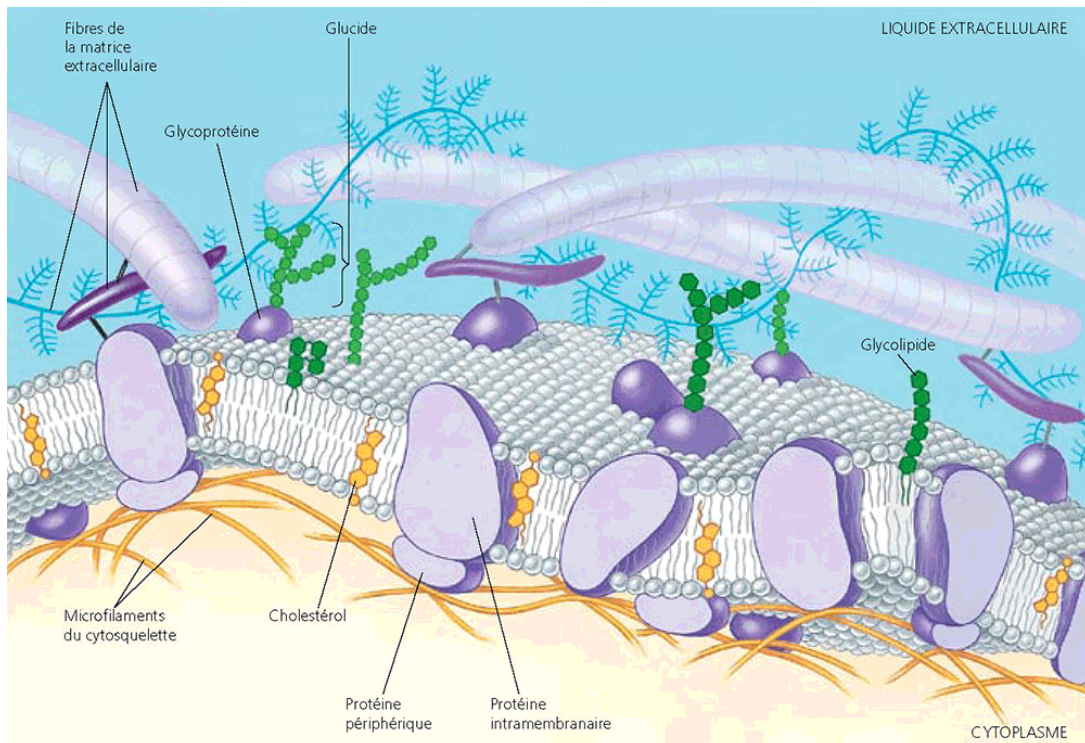


**Figure 10 : Représentation schématique d'une membrane biologique**

#### 3.1.1.1. Lipides membranaires

Les lipides membranaires représentent une proportion importante de la masse des membranes comprise entre 30 et 50%. La variété des espèces lipidiques est très étendue et trois classes majeures de lipides membranaires peuvent être distinguées : les phospholipides, les sphingolipides et les stérols.

- Les phospholipides constituent le groupe le plus abondant des lipides membranaires. Ces lipides sont des triesters de glycérol (*sn*-glycérol-3-phosphate) dont la fonction alcool du carbone 1 est estérifiée par l'acide phosphorique (constituant la tête polaire hydrophile) tandis que les fonctions alcool des deux autres carbones sont estérifiées par des acides gras (constituant la partie hydrophobe) (Figure 11). Les phospholipides sont donc amphiphiles et sont agencés dans la membrane en bicouche, les têtes polaires orientés vers l'extérieur de la bicouche et les chaînes d'acides gras vers l'intérieur.

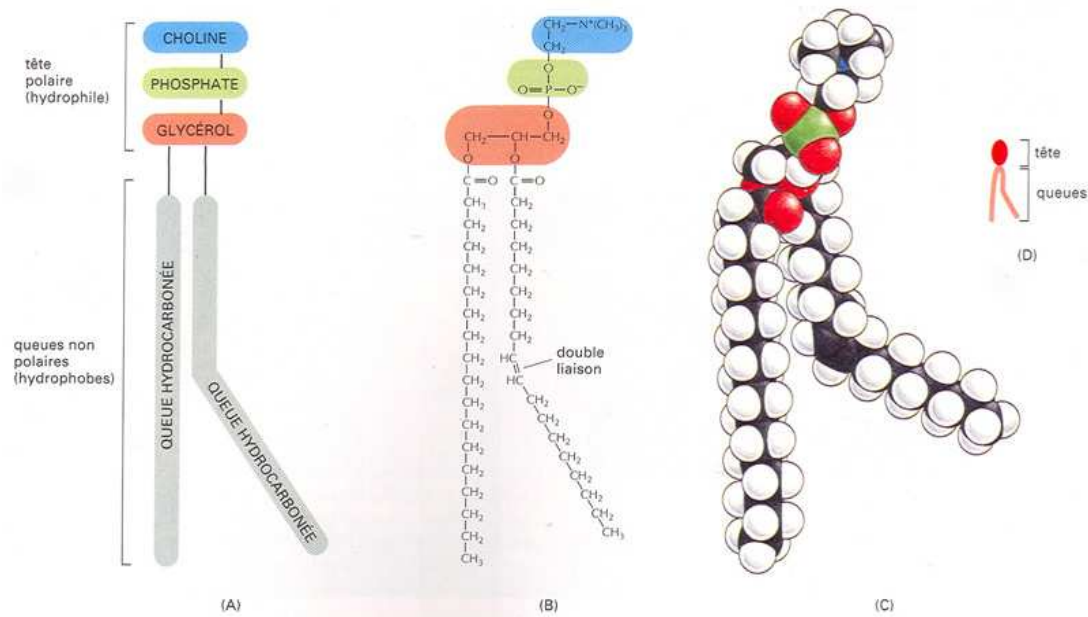
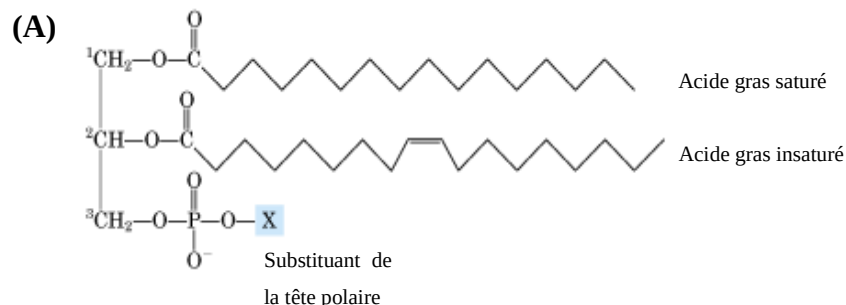


**Figure 11 : Exemple de phospholipide : la phosphatidylcholine. (A) schématisation des différentes parties composant le phospholipide, (B) formule chimique, (C) modèle compact et (D) représentation symbolique d'un phospholipide.**

La grande variété des phospholipides repose sur les nombreuses combinaisons possibles entre la nature des têtes polaires et la longueur et le nombre d'insaturations des chaînes d'acides gras. Les têtes polaires les plus courantes sont l'éthanolamine, la choline, la sérine, le glycérol et l'inositol (Figure 12). Le cardiolipide est un phospholipide particulier formé par l'association de deux molécules phosphatidiques reliées par l'intermédiaire d'une molécule de glycérol. La composition phospholipidique des membranes varie en fonction du type cellulaire mais également au sein d'une même membrane. Il en résulte donc une asymétrie dans la répartition et la distribution des espèces phospholipidiques dans la membrane.



(B)

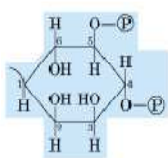
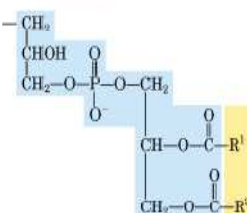
| Phospholipide            | Substituant  | Formule                                              | Phospholipide                         | Substituant               | Formule                                                                             |
|--------------------------|--------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphatidylethanolamine | Ethanolamine | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$             | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate | Inositol 4,5-bisphosphate |  |
| Phosphatidylcholine      | Choline      | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ | Cardiolipide                          | Phosphatidylglycérol      |  |
| Phosphatidylsérine       | Sérine       | $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$ |                                       |                           |                                                                                     |

Figure 12 : Formules chimiques des principaux phospholipides. (A) partie hydrophobe d'un phospholipide. (B) nature des substituants des différents phospholipides.

- Les sphingolipides sont formés par l'association de la sphingosine (amino-alcool possédant une longue chaîne hydrocarbonée insaturée (C18:1)), d'un acide gras et d'un substituant polaire du même type que pour les phospholipides. Comme pour les phospholipides, les sphingolipides constituent une famille très nombreuse en raison de la diversité des groupements polaires. Les sphingolipides sont des éléments structurant de la membrane.

- Les stérols diffèrent des autres classes de lipides membranaires par leur structure hydrocarbonée. Ils possèdent un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupement hydroxyle (Figure 13A).

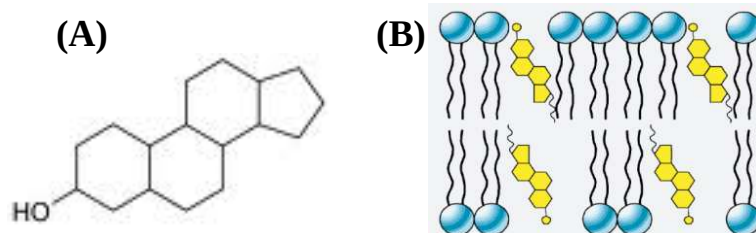


Figure 13 : (A) Structure du noyau de stérane. (B) Insertion des stérols dans une bicouche lipidique. D'après (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/cholesterol.jpg>).

Ces molécules sont beaucoup plus compactes et apolaires que les deux classes de lipides décrites précédemment. Les cycles constituant leur squelette leur confèrent une structure plane et rigide et la seule partie polaire de ces molécules est le groupement hydroxyle. Les stérols s'insèrent dans la bicouche lipidique en présentant ce groupement vers l'interface lipide-eau (Figure 13B). Ils sont présents dans les règnes animal, végétal et chez les champignons.

### 3.1.1.2. Protéines membranaires

En plus des lipides, la membrane plasmique est constituée de protéines. Les protéines membranaires peuvent être très abondantes au niveau de certaines membranes. On peut citer l'exemple de la membrane interne mitochondriale où on détecte 76% de protéines. Les protéines membranaires se classent en deux grandes catégories sur la base de la nature de leurs interactions avec la membrane : les protéines extrinsèques ou périphériques et les protéines intrinsèques ou intégrales (Figure 14).

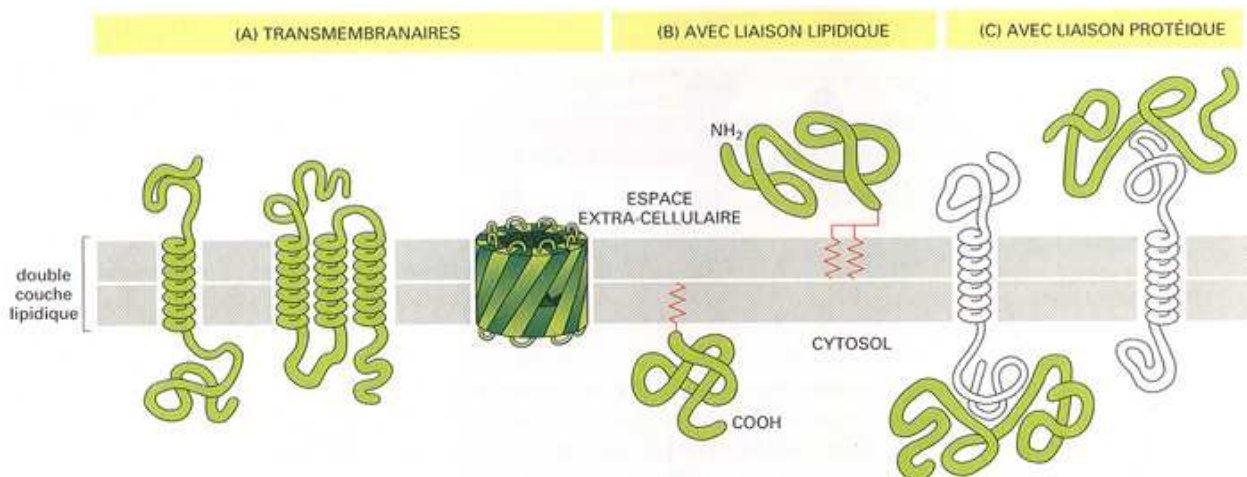


**Figure 14 :** Représentation schématisée des différents types de protéines associées aux membranes biologiques.

Les protéines extrinsèques sont associées à la membrane de manière relativement faible par des interactions électrostatiques avec les parties polaires de lipides ou celles de protéines intrinsèques qui émergent hors de la membrane. Elles sont donc en contact direct avec le milieu aqueux environnant et possèdent des caractéristiques structurales semblables à des protéines solubles. Leur localisation leur permet de participer à des réactions s'effectuant à l'interface entre la membrane et les environnements intra et extracellulaires. Les protéines intrinsèques présentent au moins une partie de leur structure dans la membrane à laquelle elles sont associées par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Certaines protéines intrinsèques possèdent plusieurs segments protéiques de nature hydrophobe localisés à l'intérieur de la bicouche phospholipidique. La plupart d'entre elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la bicouche. D'autres sont ancrées à l'un ou l'autre feuillet de la bicouche par des chaînes hydrocarbonées, auxquelles elles sont reliées de façon covalente. Pour ces protéines, la chaîne polypeptidique ne pénètre pas dans la membrane. Un exemple classique de ce type

d'ancre est le glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui relie certaines protéines à la face exoplasmique de la membrane plasmique.

Les protéines membranaires jouent des rôles essentiels et assurent des fonctions spécifiques au niveau des membranes biologiques. Un de leur rôle principal est le passage de molécules au travers des membranes. Ce passage peut être réalisé de différentes manières et peut impliquer des protéines membranaires. En plus de leur rôle fonctionnel, les protéines membranaires ont également un rôle structural. Elles ont une influence importante sur la fluidité des membranes (D'Antuono et al., 2000). Selon leur nature chimique et leur structure, elles peuvent augmenter ou diminuer la température de transition de phase ou encore faire disparaître ce phénomène (Fahsel et al., 2002; Tomczak et al., 2003). De même, l'environnement lipidique influence l'activité des protéines membranaires. Par exemple, la fluidité membranaire a une influence directe sur la conformation du site actif de certaines enzymes membranaires, ce qui résulte en une modification de l'énergie d'activation de ces enzymes lors d'un changement de fluidité de la membrane (McMurchie and Raison, 1979).

#### *3.1.1.3. Dynamique et organisation structurale des membranes*

Dans une phase liquide, les lipides sont fréquemment soumis à différents types de mouvement (Figure 15) : diffusion latérale par mouvement brownien, rotation libre autour de leur axe, et oscillation sur leur axe (Lipowsky and Sackmann, 1995). Il existe également des mouvements de migration d'un feuillet de la bicouche à l'autre ou « flip-flop » mais se produisant très rarement. Il s'agit en effet d'un processus extrêmement défavorable énergétiquement au sein des bicouches pures de phospholipides car les têtes polaires des lipides doivent dans ce cas être transloquées à travers l'intérieur hydrophobe de la membrane. La diffusion intrinsèque des phospholipides entre les feuillets de la bicouche nécessite alors des temps très longs de l'ordre de l'heure voire du jour selon la nature du phospholipide considéré (Op den Kamp, 1979; Van Meer, 2005). Cette diffusion peut néanmoins avoir lieu au sein des membranes biologiques grâce à la présence de protéines, les « flippases » qui catalysent ce transport indépendamment de l'hydrolyse d'ATP. D'autres protéines, les « translocases » facilitent aussi ce mouvement, mais dans un processus dépendant de l'ATP. Ces protéines sont à l'origine de l'asymétrie de répartition des lipides entre les feuillets.

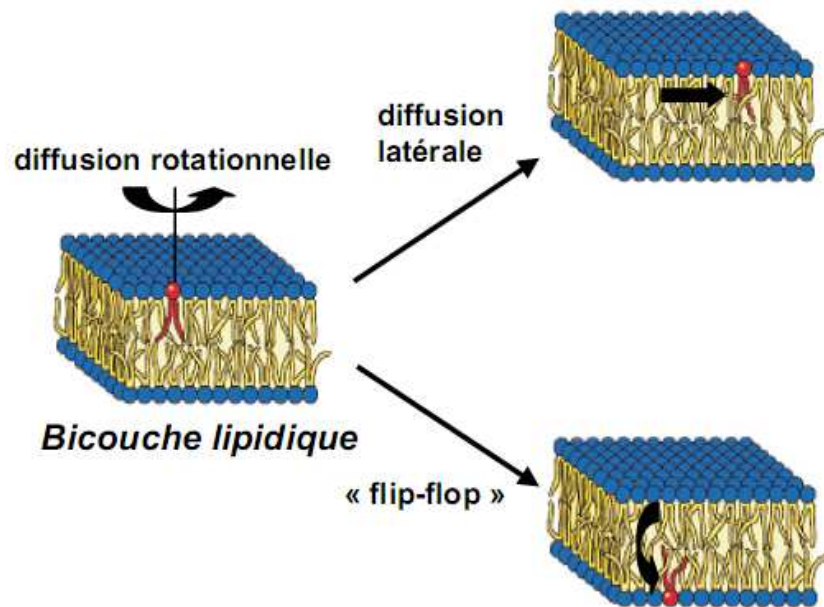


**Figure 15 : Représentation schématique des mouvements des lipides au sein de la bicouche lipidique (Lipowsky and Sackmann, 1995).**

La conformation des lipides et la fluidité de la bicouche sont influencées par la présence de stérols dans la membrane (Parasassi et al., 1994). La présence de stérols membranaires a pour effet de condenser les phospholipides membranaires en phase lamellaire fluide et d'espacer les phospholipides en phase lamellaire gel (Figure 5). Ainsi, ils agissent comme des tampons et minimisent les variations de fluidité membranaire induites par des modifications des paramètres environnementaux. Lorsqu'ils sont présents à des concentrations suffisantes dans des membranes modèles de composition multiple, les stérols ont la capacité d'induire la formation de domaines dans lesquels les lipides sont en phase liquide ordonnée ( $L_o$ ). Dans les membranes biologiques, il est maintenant admis qu'il existe des microdomaines enrichis en stérols. Ces domaines sont de tailles variables et présentent une organisation liquide ordonnée. La présence de stérols, notamment de cholestérol, dans les systèmes modèles peut également induire une transition d'une phase lamellaire ( $L_\alpha$ ) vers hexagonale ( $H_{II}$ ) (Figure 3). En effet, dans les systèmes contenant la phosphatidyléthanolamine, la présence du cholestérol à des concentrations molaires supérieures à 30% favorise la formation de la phase hexagonale  $H_{II}$  au détriment de la phase lamellaire  $L_\alpha$  (Cullis et al., 1978). L'existence de phases  $H_{II}$  dans les membranes biologiques est difficilement appréciable car ces phénomènes sont locaux et transitoires. Ils sont cependant considérés comme indispensables pour la cellule en raison du rôle qu'ils pourraient jouer dans les phénomènes de fusion membranaire impliqués dans l'endocytose et l'exocytose (Lohner, 1996; Morein et al., 1996).

### 3.1.2. Membrane plasmique et paroi de la levure

Une des particularités de l'enveloppe de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est que la membrane plasmique est entourée d'une paroi élastique avec laquelle elle possède de nombreux points d'ancrage. La paroi maintient la structure et la rigidité de la cellule. Ce point sera abordé dans cette partie.

#### 3.1.2.1. Lipides membranaires

La membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est composée de phospholipides, de sphingolipides et de stérols et pourrait même contenir une quantité non négligeable de céramides libres (Schneider et al., 1999).

**Tableau 2 : Composition en phospholipides de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

| Lipides | Composition (%) selon :   |                       |
|---------|---------------------------|-----------------------|
|         | (Patton and Lester, 1991) | (Zinser et al., 1991) |
| PC      | 17,0                      | 16,8                  |
| PE      | 14,0                      | 20,3                  |
| PI      | 27,7                      | 17,7                  |
| PS      | 3,8                       | 33,6                  |
| CL      | 4,2                       | 0,2                   |
| AP      | 2,5                       | 3,9                   |

PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, CL : cardiolipide, AP : acide phosphatidique.

Les phospholipides membranaires sont répartis de manière asymétrique dans les deux monocouches de la membrane plasmique. Ce phénomène contribue à la courbure de la membrane. La monocouche interne est enrichie en PE, PS et PI tandis que la monocouche externe est riche en PC (van der Rest et al., 1995). La composition en phospholipides, estimée lors de deux études différentes, apparaît dans le Tableau 2. Des variations dans la composition de la membrane plasmique sont observables entre ces deux études. La cause de ces variations est attribuable au manque d'uniformité dans les conditions expérimentales (souches, conditions de croissance, procédures d'extraction des lipides, etc). Concernant les chaînes d'acides gras des phospholipides, les principales sont l'acide oléique (C18:1), palmitoléique (C16:1), palmitique

(C16:0) et stéarique (C18:0) (van der Rest et al., 1995). Les chaînes d'acides gras monoinsaturés représentent à elles seules environ 60% de l'ensemble des chaînes.

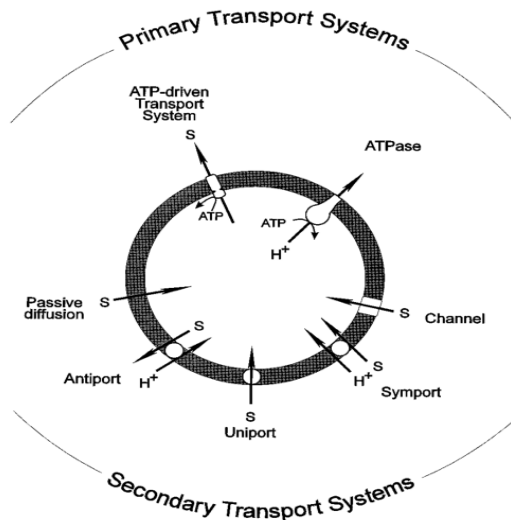
Les sphingolipides sont des constituants ubiquitaires des membranes plasmiques eucaryotes. Chez la levure *S. cerevisiae*, le ratio sphingolipides/phospholipides est de 0,43 (Schneider et al., 1999) et 90% des sphingolipides sont localisés au niveau de la membrane plasmique (Patton and Lester, 1991). L'utilisation d'une souche mutante de levures déficiente pour la synthèse de sphingolipides a montré que ces lipides sont essentiels à la croissance et à la viabilité de la levure *S. cerevisiae* (Wells and Lester, 1983).

Contrairement aux cellules eucaryotes supérieures pour lesquelles le cholestérol est le stérol majoritaire, les levures contiennent principalement de l'ergostérol. Ces deux stérols possèdent une voie de biosynthèse initiale commune jusqu'au lanostérol qui diverge ensuite pour aboutir au cholestérol et à l'ergostérol. Konrad Bloch (Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1964 pour sa découverte de la voie de biosynthèse du cholestérol) a avancé l'hypothèse que l'évolution des voies de synthèse des stérols a permis à ces molécules de satisfaire des fonctions spécifiques différentes (Bloch, 1994). Les études s'intéressant à la capacité des stérols à stabiliser les membranes modèles n'ont pas réussi à mettre en évidence de différences importantes entre ces deux stérols et la cause de cette divergence des voies de biosynthèse est à l'heure actuelle encore inconnue. Chez la levure *S. cerevisiae*, la concentration en ergostérol de la membrane plasmique est un sujet de controverse. Une étude réalisée par Bottema et ses collaborateurs annoncent un ratio molaire ergostérol/phospholipides de 0,365 (ratio massique proche de 0,2) (Bottema et al., 1983) tandis qu'une autre étude avance un ratio massique de 3,31 (Zinser et al., 1993). D'après van der Rest *et al.*, ce dernier chiffre semble peu probable puisqu'il n'est pas possible de former des liposomes avec un ratio massique supérieur à 1 (van der Rest et al., 1995). Une étude plus récente annonce un rapport de 0,46, ratio qui est comparable au ratio cholestérol/phospholipides des cellules eucaryotes supérieures (Schneider et al., 1999). Malgré l'incertitude sur sa concentration dans la membrane plasmique, l'ergostérol est un composant indispensable pour la vie cellulaire et est impliqué dans différentes fonctions biologiques telle que l'endocytose (Heese-Peck et al., 2002). De plus, les stérols membranaires sont impliqués dans la résistance aux stress thermiques et éthanoliques grâce à leur capacité à moduler la fluidité de la membrane (Cress and Gerner, 1980; Swan and Watson, 1999). Les stérols sont des molécules énergétiquement coûteuses à produire et leur voie de biosynthèse comporte de

nombreuses étapes nécessitant la présence d'oxygène. Une hypothèse récente suggère que les stérols pourraient jouer un rôle dans la résistance à l'oxydation (Galea and Brown, 2009). Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'un effet protecteur des stérols, notamment de l'ergostérol, vis-à-vis de la peroxydation des lipides dans des membranes modèles (Wiseman et al., 1993).

### 3.1.2.2. Protéines membranaires

Le nombre de protéines différentes au niveau de la membrane plasmique de *S. cerevisiae* est estimé à environ 150 (Rank and Robertson, 1983). La majeure partie de ces protéines correspond à des protéines de transport.



Il existe différents types de transporteurs impliquant des protéines membranaires. Ces différents types sont présentés dans la Figure 16. La membrane plasmique contient  $10^5$  à  $10^6$  protéines de transport, ce qui pourrait constituer 50% des protéines membranaires (Serrano, 1991). Les autres protéines membranaires sont impliquées dans la synthèse de la paroi, la transduction de signaux ou appartiennent au cytosquelette de la levure.

**Figure 16 :** Systèmes de transport présents au niveau de la membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (van der Rest et al., 1995).

### 3.1.2.3. Organisation de la membrane plasmique des levures

Sur la base du modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson, les membranes biologiques ont tout d'abord été considérées comme des bicouches lipidiques homogènes dans lesquelles les protéines membranaires étaient ancrées (Singer and Nicolson, 1972). Cependant, au cours des 20 dernières années, des preuves ont été accumulées montrant que les membranes biologiques présentent des spécificités locales et sont compartimentées latéralement (Simons and Ikonen, 1997; Edidin, 2003). La membrane plasmique de la levure a fait l'objet de nombreuses études et des microdomaines membranaires de composition spécifique ont été mis en évidence (Figure 17).

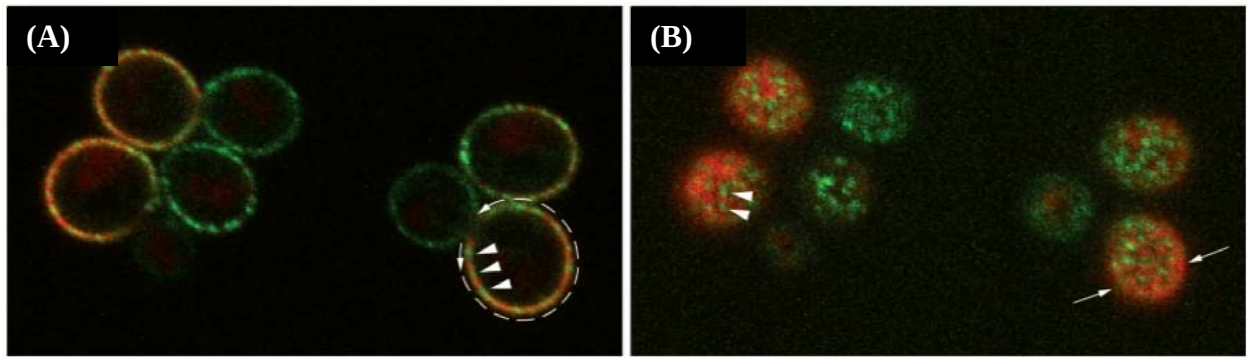


**Figure 17 : Observation simultanée de deux protéines membranaires (Can1-GFP et Pma1-RFP) localisées dans différents domaines de la membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'image (A) correspond à une coupe confocale équatoriale des levures tandis que l'image (B) correspond à une coupe confocale réalisée tangentielle (Malinska et al., 2003).**

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux compartiments membranaires différents ont été mis en évidence par la présence de protéines spécifiques à chacun des compartiments (Malinska et al., 2003). Le premier correspond à des microdomaines d'environ 300 nm comprenant la protéine Can1 (transporteur symport arginine/H<sup>+</sup>) et est appelé MCC (Membrane Compartment occupied by Can1p) tandis que le second compartiment, assimilable au réseau membranaire autour des MCC, est occupé par la protéine Pma1 (pompe à proton ATP dépendante) et est appelé MCP (Membrane Compartment occupied by Pma1p). Ainsi, ces deux compartiments ne se superposent pas et recouvrent à eux deux la majorité de la surface membranaire (Grossmann et al., 2007; Aresta-Branco et al., In press). L'étude de la composition des domaines MCC a révélé qu'ils sont enrichis en ergostérol et que huit autres protéines intégrales étaient également présentes exclusivement dans ce compartiment.

Le mécanisme de formation de ces microdomaines n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, la compartimentation latérale pourrait reposer sur les propriétés physicochimiques des différents lipides membranaires pouvant aboutir à des séparations de phases lipidiques. En effet, certains lipides, tels que les stérols et les sphingolipides, pourraient être présents dans des domaines membranaires organisés en phase liquide ordonnée (L<sub>o</sub>) et seraient exclus de zones membranaires en phase liquide désordonnée (L<sub>d</sub>). Une telle compartimentation a été montrée sur des membranes artificielles (Klose et al., ; Baumgart et al., 2005).

Un des rôles largement décrit des microdomaines membranaires enrichis en stérols chez les cellules de mammifères est la signalisation. Ce rôle est probablement valable pour les microdomaines membranaires de la levure. En plus de ce rôle, il a été montré chez *S. cerevisiae* que la compartimentation de protéines dans des microdomaines permet, lors de l'endocytose, le maintien de protéines spécifiques au niveau de la membrane plasmique (Malinsky et al., 2010).

En effet, l'endocytose est réalisée en dehors des microdomaines MCC et les protéines présentes dans ces compartiments ne sont pas internalisées et échappent ainsi à leur dégradation.

#### 3.1.2.4. Paroi cellulaire

La paroi cellulaire constitue l'enveloppe la plus externe des levures. Elle est constituée de deux couches distinctes. La couche interne, d'une épaisseur d'environ 150 nm, est essentiellement constituée de  $\beta$ -glucanes et de chitine. Elle confère ses propriétés mécaniques à la paroi cellulaire. La couche externe se constitue de mannoprotéines hautement glycosylées qui émanent à la surface de la cellule et sont impliquées, entre autres, dans la fonction de reconnaissance entre les cellules. Elle limite également l'accès à des enzymes présentes dans le milieu extracellulaire à la couche interne. La structure de la paroi est présentée dans la Figure 18.

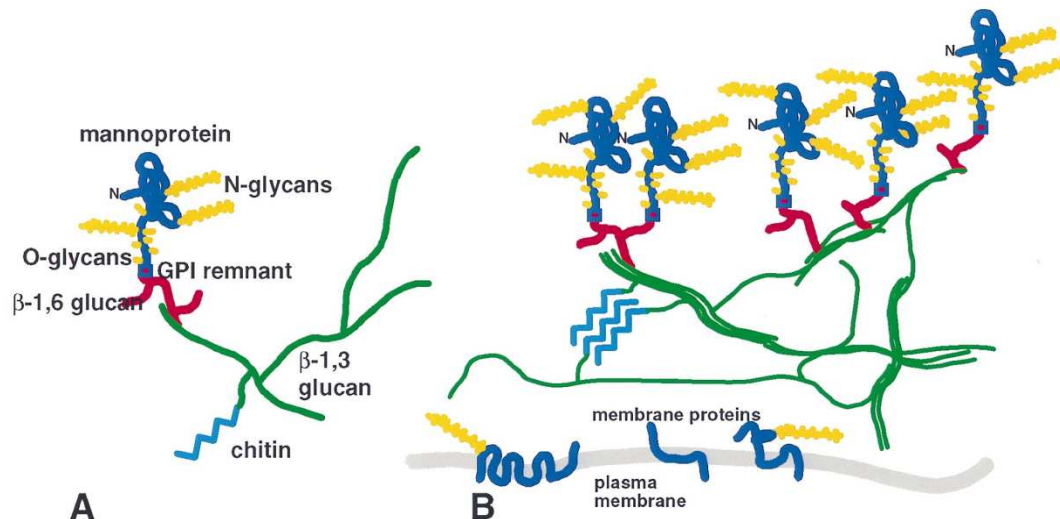


**Figure 18 :** (A) *Structure et relations entre les différents constituants de la paroi de la levure Saccharomyces cerevisiae. Les mannoprotéines (bleu) sont associées à des oligosaccharides (jaune) et sont reliées par l'intermédiaire de  $\beta$ -1,6 glucanes au réseau de  $\beta$ -1,3 glucanes et de chitine.* (B) *Association des constituants de la paroi pour former un réseau tridimensionnel et positionnement par rapport à la membrane plasmique (Lipke and Ovalle, 1998).*

Au pH physiologique, la surface externe de la paroi est chargée négativement. Contrairement à celle des cellules végétales, la paroi des levures est élastique ce qui permet aux levures transférées dans un milieu hyperosmotique de se contracter rapidement sans phénomène important de plasmolyse. Cette élasticité est conférée par le réseau tridimensionnel de  $\beta$ -1,3 glucanes (Lipke and Ovalle, 1998). Enfin, la chitine renforce la structure de la paroi.

### 3.2. EFFET DE PERTURBATIONS HYDRIQUES SUR LA MEMBRANE PLASMIQUE

La cause de la mort des microorganismes pendant les phases transitoires permettant d'atteindre l'état déshydraté (déshydratation) ou de revenir à l'état hydraté (réhydratation) est liée à une perte d'intégrité de la membrane plasmique. Dans cette dernière partie, les différents mécanismes pouvant être impliqués dans la perméabilisation de la membrane lors de perturbations hydriques seront développés.

#### 3.2.1. Impact sur l'organisation structurale de la membrane plasmique

Dans la membrane plasmique et plus généralement dans les membranes, la déshydratation augmente les interactions de van der Waal's entre les phospholipides ce qui peut induire leur passage d'un état lamellaire liquide cristallin à un état lamellaire gel à température ambiante (Figure 5). Ce phénomène appelé transition de phase membranaire, décrit en détail dans le paragraphe 2.2.2, se produit pour les lipides membranaires de la levure *S. cerevisiae* sur une plage de pressions osmotiques comprises entre 60 MPa et 130 MPa à 22 °C (Laroche et al., 2001). Dans le cas de déshydratations sévères supérieures à 130 MPa, cette transition peut conduire à une modification de la perméabilité membranaire et pourrait être une des causes de la mortalité cellulaire (Hays et al., 2001). La diminution de l'hydratation des lipides membranaires peut également conduire à l'apparition de phase hexagonale correspondant un état non lamellaire des phospholipides (Figure 3). Cette modification d'organisation structurale a également été décrite comme pouvant conduire à une perte d'intégrité de la membrane plasmique (McKersie and Stinson, 1980). Au cours de la réhydratation, les phospholipides subissent également une transition de phase dans le sens inverse de celle provoquée par la déshydratation. Cette transition pourrait expliquer la fuite de solutés de la cellule dans cette étape des traitements, provoquant ainsi la mort cellulaire (Van Steveninck and Ledebor, 1974; Crowe et al., 1989; Leslie et al., 1995).

#### 3.2.2. Evolution morphologique et déformations de la membrane plasmique

La déshydratation est à l'origine d'une diminution du volume cellulaire. La contraction volumique peut entraîner un phénomène de plasmolyse membranaire au niveau des cellules présentant une paroi rigide telles que les cellules végétales (Ferrando and Spiess, 2001; Munns,

2002; Assani et al., 2009) et les bactéries négatives à la coloration de gram (Mille et al., 2002). Dans ce type de cellules, la membrane plasmique se sépare de la paroi ne restant associée à celle-ci que par des points d'ancrage. Dans le cas des levures pour lesquelles la paroi est élastique, cette dernière reste solidaire de la membrane lors de la contraction volumique.

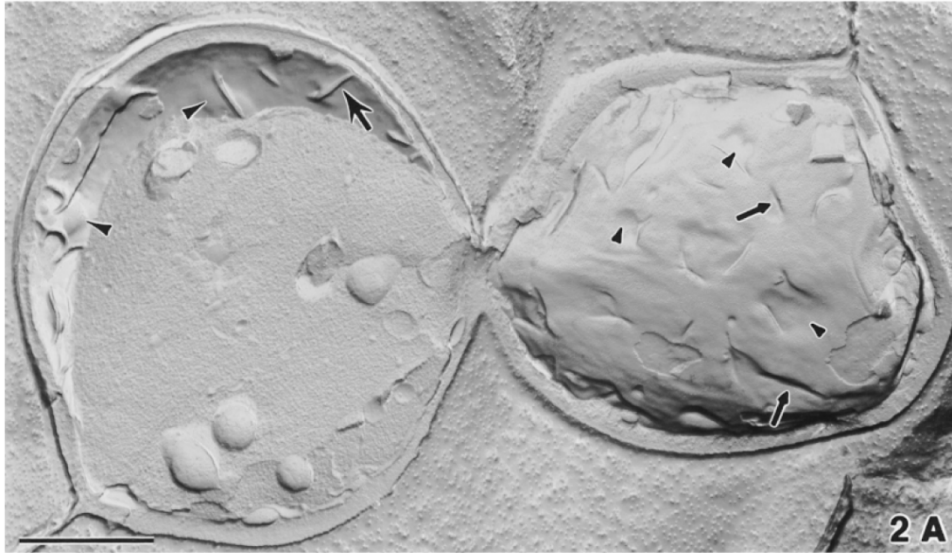


**Figure 19 :** Microphotographie obtenue par cryofracture de *Saccharomyces cerevisiae* incubée pendant une heure dans une solution de KCl à 1 M. Sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (cellule de droite), des invaginations sont visibles. Sur la face externe de la membrane plasmique (cellule de gauche), des renflements et des rides apparaissent. Barre d'échelle = 1  $\mu$ m. D'après (Slaninova et al., 2000).

Chez la levure, le volume cellulaire peut atteindre 40% du volume initial dans le cas d'une déshydratation osmotique sévère (Martinez de Maranon et al., 1996). Une contraction volumique importante a été corrélée à un taux de mortalité cellulaire plus important au cours de la déshydratation (Martinez de Maranon et al., 1996; Vindelov and Arneborg, 2002; Adya et al., 2006). La diminution du volume cellulaire associée à la faible compressibilité latérale de la membrane (Evans et al., 1976) entraîne la déformation de la surface membranaire. Ce phénomène provoque la formation de bourgeons, d'invaginations et de plissements, aussi bien caractérisés sur des liposomes (Lipowsky and Sackmann, 1995; Beney et al., 1998) que sur des cellules biologiques (Figure 19) (Slaninova et al., 2000). Ces modifications morphologiques de la surface membranaire sont gouvernées par l'évolution du rapport S/V, la minimisation de l'énergie due à la courbure et les contraintes formées par la différence de surface des deux feuillets membranaires (Kas and Sackmann, 1991). Ces déformations peuvent conduire à la formation de vésicules membranaires (Mille et al., 2002) qui permettent également de diminuer les contraintes au sein de la membrane. La formation de vésicules est associée à une diminution de la surface membranaire. Une hypothèse concernant la mort des cellules serait que la perte de

surface par la formation de vésicules pourrait conduire à une lyse lors de l'augmentation du volume cellulaire lors de la réhydratation (Simonin et al., 2007).

### 3.2.3. Oxydation lipidique

L'oxydation est un stress critique lors du stockage des microorganismes. Afin de minimiser cet effet, nous avons vu dans le paragraphe 2.3.2.1 qu'il était nécessaire d'atteindre des niveaux de déshydratation très bas. Le séchage des microorganismes représente l'étape transitoire permettant d'atteindre l'état déshydraté propice à la conservation. Cependant, pendant cette étape, il a été montré que des événements d'oxydation se produisent (Pereira Ede et al., 2003; Franca et al., 2007; Garre et al., 2010). Cette oxydation résulte de deux phénomènes. Le premier correspond à l'altération du fonctionnement d'enzymes et/ou de chaînes de transport des électrons lors de la déshydratation pouvant conduire à l'apparition d'un excès de radicaux libres dans la cellule. Les radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives capables de provoquer l'oxydation des lipides membranaires. Le second phénomène intervient lorsque la déshydratation est réalisée par un procédé de séchage à l'air atmosphérique. Lors de ce procédé, l'oxygène de l'air entre en contact direct avec les cellules et favorise les réactions d'oxydation. Des études ont montré que le séchage de levures conduit à une surexpression de gènes impliqués dans la réponse à un stress oxydatif tels que *TRR1* et *GRX5* (codant respectivement pour la thioredoxine et la glutathione/glutaredoxine) et également à une peroxydation des lipides membranaires (Garre et al., 2010).

L'oxydation des lipides aboutit à une diminution de l'hydrophobicité par l'introduction de groupements hydrophiles conduisant à une diminution des interactions hydrophobes entre les lipides eux-mêmes et entre les lipides et les protéines membranaires. Ce phénomène induit une déstabilisation de la bicouche lipidique (Santivarangkna et al., 2008) et peut aboutir à la perméabilisation de la membrane plasmique (Dhindsa et al., 1981). Par conséquent, l'oxydation lipidique semble être un événement crucial pour la survie des levures lors de l'étape de déshydratation.

L'étape transitoire de déshydratation permettant d'amener les cellules dans un état déshydraté propice à la conservation est à l'origine de nombreuses altérations de la membrane plasmique pouvant induire la perte d'intégrité de cette structure et donc, à la mort des cellules. Ces altérations ont pour origine la contraction volumique cellulaire importante associée à des modifications de l'organisation structurale des lipides membranaires. A ces effets s'ajoutent des phénomènes d'oxydation qui se produisent dans le cas de déshydratation par séchage sous air atmosphérique. L'étude bibliographique a révélé que les stérols membranaires peuvent jouer des rôles dans l'organisation structurale de la membrane ainsi que dans la protection contre l'oxydation lipidique. Ces molécules pourraient donc être impliquées dans la résistance des levures à la déshydratation.

#### 4. CONCLUSIONS ET PRESENTATION DES AXES DE LA THESE

L'étude bibliographique montre que la conservation à température ambiante de cellules d'intérêt, dont les microorganismes, nécessite des niveaux de déshydratation sévères. Le principal effet du retrait de l'eau intracellulaire est la diminution de la vitesse des réactions biochimiques permettant ainsi la préservation des structures cellulaires, telles que les protéines, les acides nucléiques et les membranes sur de longues périodes. La déshydratation et la réhydratation sont des étapes transitoires critiques pour la survie des cellules. Il semble donc essentiel de comprendre les mécanismes conduisant à la mort ou à la survie des cellules lors de la déshydratation et de la réhydratation afin d'optimiser cette technique de préservation cellulaire.

Dans le cas des microorganismes, les taux de survie dépendent du type cellulaire mais également des paramètres du traitement de déshydratation. De précédentes études réalisées au laboratoire GPMA ont mis en évidence que la cinétique de déshydratation est un paramètre crucial pour la survie des microorganismes. En effet, il a été montré sur différents microorganismes (levures *Saccharomyces cerevisiae*, bactéries *Escherichia coli*...) que les cinétiques de déshydratation progressives (rampes) conduisent à des viabilités supérieures en comparaison de celles obtenues lors de cinétiques brutales (chocs).

Bien qu'un grand nombre de publications désigne la membrane plasmique comme la cible principale des perturbations hydriques, les mécanismes conduisant à la perte d'intégrité de cette structure pendant les traitements ne sont pas totalement élucidés. Ces publications ont cependant pu mettre en évidence que la membrane plasmique peut subir des changements structuraux importants lors de la déshydratation. Ces changements sont liés à une contraction volumique importante des cellules causée par la sortie d'eau du cytoplasme et à une modification de l'organisation structurale des lipides membranaires. L'hypothèse principale pour expliquer la perméabilisation de la membrane plasmique lors de déshydratations brutales est une diminution de la surface membranaire par des phénomènes d'internalisation de membrane plasmique. Les événements d'internalisation de membrane plasmique après une déshydratation en choc pourraient résulter de la concomitance entre les transitions de phases lipidiques et de la contraction volumique cellulaire. Ce mécanisme mérite cependant une étude plus approfondie afin d'être confirmé. Dans le cas de déshydratations progressives où la survie cellulaire est moins affectée, les modifications membranaires ainsi que les mécanismes associés à la résistance des levures sont pour le moment encore inconnus.

Les stérols représentent une fraction importante des lipides membranaires et sont décrits comme des composants importants pour la stabilité de la membrane plasmique. En effet, outre leurs rôles dans des phénomènes physiologiques tel que l'endocytose, ils sont capables de tamponner les transitions structurales des bicouches lipidiques. Ils sont notamment impliqués dans la résistance des cellules à des perturbations physiques, comme la température, ou des perturbations chimiques ( $H_2O_2$ , cycloheximide). Ces molécules pourraient donc jouer un rôle important dans la résistance des cellules aux fluctuations hydriques puisque ces perturbations sont connues pour déstabiliser la membrane plasmique. De plus, ces molécules ont également été décrites comme pouvant diminuer l'oxydation des lipides. Cette protection contre l'oxydation dépend de la structure chimique des stérols. Ainsi, certains stérols pourraient également influencer la survie cellulaire lors de déshydratations par séchage où l'oxygène de l'air entre en contact direct avec les cellules.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la survie ou la mort de la levure *Saccharomyces cerevisiae* lors de la déshydratation et de la réhydratation. La compréhension des modifications touchant la membrane plasmique lors de ces phases est ainsi particulièrement importante pour optimiser la survie cellulaire. Un intérêt particulier a également été porté sur l'impact de la structure chimique des stérols membranaires dans la résistance des levures à la déshydratation. Les axes de ce travail de thèse, correspondant chacun à un chapitre de la thèse, ont visé à répondre à différentes questions soulevées par l'étude bibliographique :

- Quels sont les événements membranaires qui conduisent à la perméabilisation de la membrane plasmique lors de déshydratations brutales (chocs hyperosmotiques) ?
- Quels sont les mécanismes permettant le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique lors de déshydratations progressives (rampes hyperosmotiques) ?
- Est-ce que la nature des stérols membranaires, lipides majeurs de la membrane plasmique, influence la réponse de la membrane plasmique et la survie cellulaire lors de chocs hyperosmotiques ?
- L'ergostérol, de par son potentiel rôle antioxydant, est-il impliqué dans la résistance des levures lors de la déshydratation par séchage ?

Afin de répondre à ces questions, les méthodes utilisées ont permis de caractériser les modifications fonctionnelles (intégrité) et structurales (organisation latérale de protéines présentes dans les microdomaines riches en stérols, déformations, internalisation) de la membrane plasmique lors de traitements hydriques. Pour cela, des observations en microscopie confocale et en microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur des levures après des traitements hyperosmotiques dont la cinétique et l'amplitude étaient contrôlées. Des mutants déficients en protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, accumulant différents précurseurs de l'ergostérol au niveau de leur membrane plasmique, ont également été utilisés. Ces mutants ont permis d'appréhender l'impact de la nature des stérols sur la résistance à des déshydratations réalisées par des perturbations hyperosmotiques ou par séchage aérien.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. SOUCHES DE LEVURES ET CONDITIONS DE CULTURE

### 1.1. SOUCHES DE LEVURES

L'ensemble des souches de levures utilisées au cours de cette étude ainsi que leur génotype sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3 : Génotypes des différentes souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* utilisées lors de cette étude.**

| Souches                        | Génotypes                                                                                                |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Wild Type</b>               | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0                   |
| <b><math>\Delta</math>erg6</b> | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YML008c::kanMX4 |
| <b><math>\Delta</math>erg2</b> | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YMR202w::kanMX4 |
| <b><math>\Delta</math>erg3</b> | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YLR056w::kanMX4 |
| <b><math>\Delta</math>erg5</b> | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YMR015c::kanMX4 |
| <b><math>\Delta</math>erg4</b> | (Mat) $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1 ; leu2 $\Delta$ 0 ; lys2 $\Delta$ 0 ; ura3 $\Delta$ 0 ; YGL012w::kanMX4 |

#### 1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* wild type (WT)

La souche sauvage (WT) de levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf, Allemagne). Cette souche est très bien caractérisée et fait l'objet d'une bibliographie abondante dans de nombreux domaines. De plus, de nombreux mutants de cette souche sont disponibles sur le marché.

#### 1.1.2. Mutants de *Saccharomyces cerevisiae*

L'ensemble des mutants utilisé lors de l'étude sont issus de la souche sauvage BY4742 ce qui a permis de réaliser des comparatifs raisonnables entre le comportement de la souche sauvage et celui des différents mutants en réponse aux perturbations hydriques.

##### 1.1.2.1. Mutants sur la voie de synthèse de l'ergostérol

Les mutants de la voie de biosynthèse de l'ergostérol utilisés lors de cette étude concernent les cinq dernières étapes de cette voie :  $\Delta$ erg6,  $\Delta$ erg2,  $\Delta$ erg3,  $\Delta$ erg5 et  $\Delta$ erg4. Ces

mutants accumulent différentes natures de stérols (Figure 20) et présentent l'avantage d'être cultivables dans un milieu classique de culture sans supplémentation particulière.

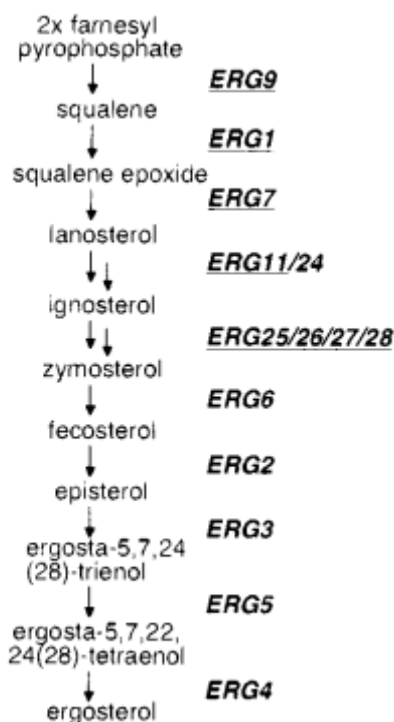


**Figure 20 :** Voie de biosynthèse de l'ergostérol à partir du farnésyl pyrophosphate (Eisenkolb et al., 2002).

#### 1.1.2.2. Intégration d'une GFP membranaire par transformation de levures

Les souches WT et  $\Delta erg6$  ont été transformées afin d'associer une protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) à la protéine membranaire Sur7. Cette protéine est localisée dans des microdomaines riches en ergostérol. Les levures ont été transformées par le plasmide YIp211SUR7GFP après linéarisation par *Eco52I*. Ce plasmide nous a été généreusement donné par Widmar Tanner (Université de Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Allemagne) et a été préalablement amplifié chez *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . La transformation des levures a été réalisée par un traitement à l'acétate de lithium (Ito et al., 1983). La méthode de transformation par l'acétate de lithium consiste à « décaper » la membrane des levures puis à leur faire subir un choc thermique. Cette méthode se divise en deux étapes : la préparation de cellules compétentes puis la transformation proprement dite des levures.

#### Préparation des cellules compétentes :

Le protocole de cette étape est inspiré de celui proposé par Gietz (Gietz and Woods, 1994). 5 mL de milieu Malt Wickerham (MW) modifié sont inoculés avec une colonie et sont placés à 25 °C sous agitation pendant une nuit afin de préparer une préculture de levures. 1 mL de cette préculture sont ajoutés à 100 mL de milieu neuf et les levures sont ensuite cultivées à 25 °C sous agitation jusqu'à une densité cellulaire proche de  $1,5 \cdot 10^7$  cellules par mL. 50 mL de cette culture sont ensuite centrifugés dans des tubes Falcon pendant 5 min à 1500 *g* et le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 20 mL d'eau distillée stérile. Cette suspension est à nouveau centrifugée à 1500 *g* pendant 5 min et le culot est resuspendu dans 1 mL d'eau distillée. La suspension de levures est alors transférée dans un tube Eppendorf qui est à son tour centrifugé à 1500 *g* pendant 5 min. Le surnageant est ensuite retiré et remplacé par une solution d'acétate de lithium (LiAc) à 100 mM préparée fraîchement pour atteindre une densité cellulaire de  $2 \cdot 10^9$  cellules par mL. Les cellules sont ensuite incubées à 30 °C pendant 20 min.

#### Transformation des levures :

500 µL d'ADN de sperme de saumon (ADN entraîneur) à 10 mg/mL sont soniqués et dénaturés par un traitement thermique à 95 °C pendant 3 min puis placés dans de la glace s'ils ne sont pas utilisés rapidement. Dans un tube Eppendorf, 5 µL d'ADN à transformer sont mélangés avec 5 µL d'ADN entraîneur et 50 µL de levures compétentes préalablement préparées. Le tout est vortexé brièvement et mis à incuber à 30 °C pendant 20 min. Pendant ce temps, une solution d'acétate de lithium (100 mM)/polyéthylène glycol 3350 (40%) est préparée. Après les 20 min d'incubation, 300 µL de la solution de LiAc/PEG sont ajoutés et le tube est incubé à 30 °C pendant 20 min. Un choc thermique est ensuite effectué à 42 °C pendant 30 min. Le contenu du tube Eppendorf est ensuite étalé sur deux boîtes de Pétri contenant un milieu sélectif afin d'éviter un nombre trop important de colonies par boîte. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 48 à 72 heures.

## 1.2. CONDITIONS DE CULTURE

### 1.2.1. Culture en aérobie

Les différentes souches de levures sont conservées à -80 °C sous forme d'aliquotes contenant 1 mL d'une culture en phase stationnaire de croissance et supplémentée avec 20% de glycérol (v/v). A partir de ces aliquotes, des souchiers sont préparés par ensemencement sur boîtes de Pétri contenant du milieu MW modifié gélosé. Les souchiers sont utilisables après 48 heures de croissance dans une étuve à 25 °C et sont ensuite conservés à 4 °C. Ces souchiers sont renouvelés tous les mois. Pour les essais expérimentaux, la préculture est réalisée par l'inoculation d'une colonie de levures issue des souchiers dans 100 mL de milieu MW modifié (pour 1 L d'eau distillée : 10 g de glucose, 3 g d'extrait de levures, 3 g de peptone pancréatique, 1,5g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 51,09 g de glycérol ; stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min) placés dans une fiole de 250 mL. Les fioles de préculture sont agitées (250 rpm) pendant 48 h sur une table d'agitation thermostatée à 25 °C. La culture des levures est ensuite réalisée par inoculation de 100 mL de milieu MW modifié placés dans des fioles de 250 mL par 1 mL de préculture. La croissance est menée dans les mêmes conditions que la préculture pendant 24 h pour atteindre le début de la phase stationnaire de croissance. Avant chaque manipulation, les cultures de levures sont lavées deux fois par centrifugation (2800 g, 5 min, 25 °C) et resuspendues dans une solution binaire d'eau/glycérol à une pression osmotique de 1,4 MPa (correspondant à une suspension isotonique par rapport à la pression osmotique intracellulaire des levures).

### 1.2.2. Culture en anaérobie

Pour la culture en anaérobie, la réalisation des précultures se fait de la même manière que pour la culture en aérobie. Pour la culture, 1 mL de préculture est inoculé dans 100 mL de MW modifié placés dans des shots spécifiques pour la culture anaérobie. Ce milieu a été préalablement dégazé par bullage d'azote pendant 12 h. La culture est réalisée à 25 °C pendant 24 h sans agitation dans une enceinte anaérobie (Bactron). Selon les expériences menées au cours de l'étude, le milieu de culture est supplémenté avec de l'ergostérol (125 ou 250  $\mu\text{M}$ ) et du tween 80 (1% ou 2%, v/v).

## 2. PROCEDES DE DESHYDRATATION

### 2.1. DESHYDRATATION EN MILIEU LIQUIDE

Lors de cette étude, nous avons réalisé des déshydratations en milieu liquide par le biais de traitements hyperosmotiques. Le soluté dépresseur utilisé a été le glycérol car il présente l'avantage de pouvoir préparer des solutions à des  $a_w$  très faibles (jusqu'à 0,12). De plus, ce composé est le principal soluté de la levure (Siderius et al., 2000) et est concentré lors d'un séchage par évaporation d'eau. Enfin, la déshydratation par traitement hyperosmotiques à l'aide du glycérol a été utilisée avec succès pour l'optimisation du séchage de bactéries lactiques (Mille et al., 2004).

#### 2.1.1. Préparation de solutions à activité de l'eau contrôlée

Afin de préparer les solutions aux  $a_w$  souhaitées, les concentrations en glycérol nécessaires ont été calculées à partir de l'équation de Norrish (Norrish, 1966):

$$a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s^2},$$

où  $X_s$  est fraction molaire et  $K$  est le coefficient de Norrish du soluté utilisé pour augmenter la pression osmotique. Pour le glycérol, ce coefficient a une valeur de 1,16 (Chirife and Fontan, 1980). La correspondance entre la pression osmotique  $\pi$  (Pa) et l' $a_w$  est donnée par la formule suivante :

$$\pi = - \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w},$$

où  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  la température (K) et  $\bar{V}_w$  le volume molaire partiel de l'eau ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

Les quantités de glycérol utilisées pour préparer les différentes solutions à  $a_w$  contrôlées sont présentées dans le Tableau 4.

L'activité de l'eau des solutions préparées a été vérifiée par un osmomètre à miroir Aqualab 3TE (Decagon Devices, Pullman, WA, USA).

**Tableau 4 : Masses de glycérol utilisées pour les solutions à  $a_w$  contrôlées**

| Pression osmotique (MPa) | Activité de l'eau | Masse de glycérol (g) pour 1000 g d'eau |
|--------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| <b>1,4</b>               | 0,99              | 51                                      |
| <b>7</b>                 | 0,95              | 255                                     |
| <b>15</b>                | 0,9               | 513                                     |
| <b>22</b>                | 0,85              | 781                                     |
| <b>30</b>                | 0,8               | 1063                                    |
| <b>70</b>                | 0,6               | 2440                                    |
| <b>110</b>               | 0,45              | 3986                                    |
| <b>166</b>               | 0,3               | 6654                                    |

### 2.1.2. Cinétiques de déshydratation des cellules par traitements osmotiques

La cinétique de déshydratation conditionne la vitesse à laquelle l'eau sort des cellules. Lors de notre étude, nous avons choisi d'étudier deux cinétiques de déshydratation. La première correspond à une déshydratation brutale (choc osmotique) et la seconde à une déshydratation progressive (rampe osmotique).

#### 2.1.2.1. Chocs hyperosmotiques

Après deux lavages de la culture cellulaire, 1 mL de culture est placé dans un tube Eppendorf puis centrifugé à 5100 *g* pendant 10 min. Le surnageant est ensuite retiré et remplacé par 1 mL de solution à une pression osmotique contrôlée (Tableau 4) permettant de définir l'amplitude de déshydratation. Le culot est rapidement remis en suspension à l'aide d'un vortex. Ce procédé permet de générer des déshydratations de manière très rapide ( $\approx 200 \text{ MPa.s}^{-1}$ ).

#### 2.1.2.2. Rampes hyperosmotiques

Afin de réaliser des cinétiques progressives de déshydratation, 3 mL de culture cellulaire sont placés dans bécher et du glycérol pur est ajouté à un débit contrôlé à l'aide d'un pousse-seringue. Un agitateur magnétique est utilisé afin d'homogénéiser rapidement le glycérol ajouté dans la suspension de cellules. La quantité de glycérol ajoutée à la suspension cellulaire est vérifiée par un suivi de la masse de glycérol ajouté à l'échantillon à l'aide d'une balance électronique. Avec un débit réglé de glycérol à  $0,493 \text{ mL.min}^{-1}$ , la vitesse de déshydratation

était de  $0,086 \text{ MPa.s}^{-1}$ . Avec cette cinétique, l'amplitude la plus forte de déshydratation réalisée au cours de cette étude (166 MPa) était atteinte en environ 32 min.

### 2.1.3. Protocole de réhydratation

L'étape de réhydratation a également été réalisée selon deux modes différents. Le premier consistait en une réhydratation brutale. Pour cela, les cellules traitées osmotiquement sont centrifugées à  $5100 g$  pendant 10 min puis la solution binaire à pression osmotique contrôlée qui a servi à la déshydratation des cellules est enlevée et remplacée par une solution à 1,4 MPa. Le second mode consistait en une réhydratation progressive réalisée par des paliers de réhydratations. Les suspensions cellulaires traitées selon différentes amplitudes de déshydratation sont diluées au  $10^{\text{ème}}$  dans des solutions à des pressions osmotiques de plus en plus faibles. Les différentes pressions osmotiques utilisées pour diluer l'échantillon traité en fonction du niveau de déshydratation sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 5 : Protocole utilisé pour les réhydratations progressives.**

| Niveau de déshydratation | Paliers réalisés lors de la réhydratation |
|--------------------------|-------------------------------------------|
| <b>30 MPa</b>            | 15 MPa – 1,4 MPa                          |
| <b>110 MPa</b>           | 70 MPa – 30 MPa – 1,4 MPa                 |
| <b>166 MPa</b>           | 110 MPa – 70 MPa – 30 MPa – 1,4 MPa       |

### 2.1.4. Mesure de la viabilité

La viabilité des cellules est estimée après réhydratation par la méthode des Unités Formant Colonies (UFC) après dilutions décimales adéquates. Dans le cas des rampes, l'addition de glycérol par le pousse-seringue engendre une dilution de la suspension cellulaire. La viabilité mesurée après les rampes osmotiques est donc multipliée par le facteur de dilution approprié. Chaque résultat est rapporté à un témoin n'ayant subi aucun traitement. Les expériences ont été répétées au minimum trois fois de manière indépendante.

## 2.2. DESHYDRATATION EN MILIEU AERIEN

### 2.2.1. Préparation des enceintes de séchage

Les enceintes de séchage sont composées de chambres hermétiques dans lesquelles sont disposées des solutions salines saturées. En fonction de la nature des sels utilisés, ce dispositif permet d'obtenir une humidité relative contrôlée dans la chambre (Tableau 6).

**Tableau 6: Nature des sels utilisés pour contrôler l'humidité relative des enceintes de séchage**

| Sels utilisés | Humidité relative de l'enceinte | Equivalences Pression Osmotique |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>KCl</b>    | 90%                             | 15 MPa                          |
| <b>NaCl</b>   | 72%                             | 45 MPa                          |
| <b>NaBr</b>   | 60%                             | 70 MPa                          |
| <b>LiBr</b>   | 30%                             | 166 MPa                         |

Un support est placé au fond de la chambre afin de pouvoir disposer les échantillons dans l'enceinte sans que ces derniers soient en contact avec la solution saline. Les enceintes disposent d'une entrée par laquelle la composition de l'ambiance gazeuse peut être contrôlée (air atmosphérique ou azote) et d'une sortie pour évacuer l'excès de pression. Un ventilateur est placé à l'intérieur de l'enceinte afin d'homogénéiser l'ambiance gazeuse et d'optimiser la déshydratation des échantillons.

### 2.2.2. Protocole de séchage et de réhydratation des levures

Le protocole de séchage des levures est résumé dans la Figure 21. 40 mL de suspension cellulaire, préalablement lavés dans l'eau physiologique ( $\text{NaCl}$  à  $9 \text{ g.L}^{-1}$ ), sont filtrés sous vide sur Büchner. Une partie du résidu de filtration contenant les levures est récupéré et étalé en une fine couche sur une lame de microscopie. La quantité de levures étalées est pesée afin de pouvoir par la suite exprimer la viabilité pour une masse d'échantillon donné. Cette lame est ensuite placée dans l'enceinte hermétique dont l'humidité relative est de 72%. Le film fin de levure sur la lame en verre permet de réaliser une déshydratation brutale de l'échantillon jusqu'à une humidité relative de 75%. Après une heure de maintien dans l'enceinte de séchage, la

réhydratation est réalisée de manière rapide en resuspendant le film de levures présent sur la lame dans de l'eau physiologique.

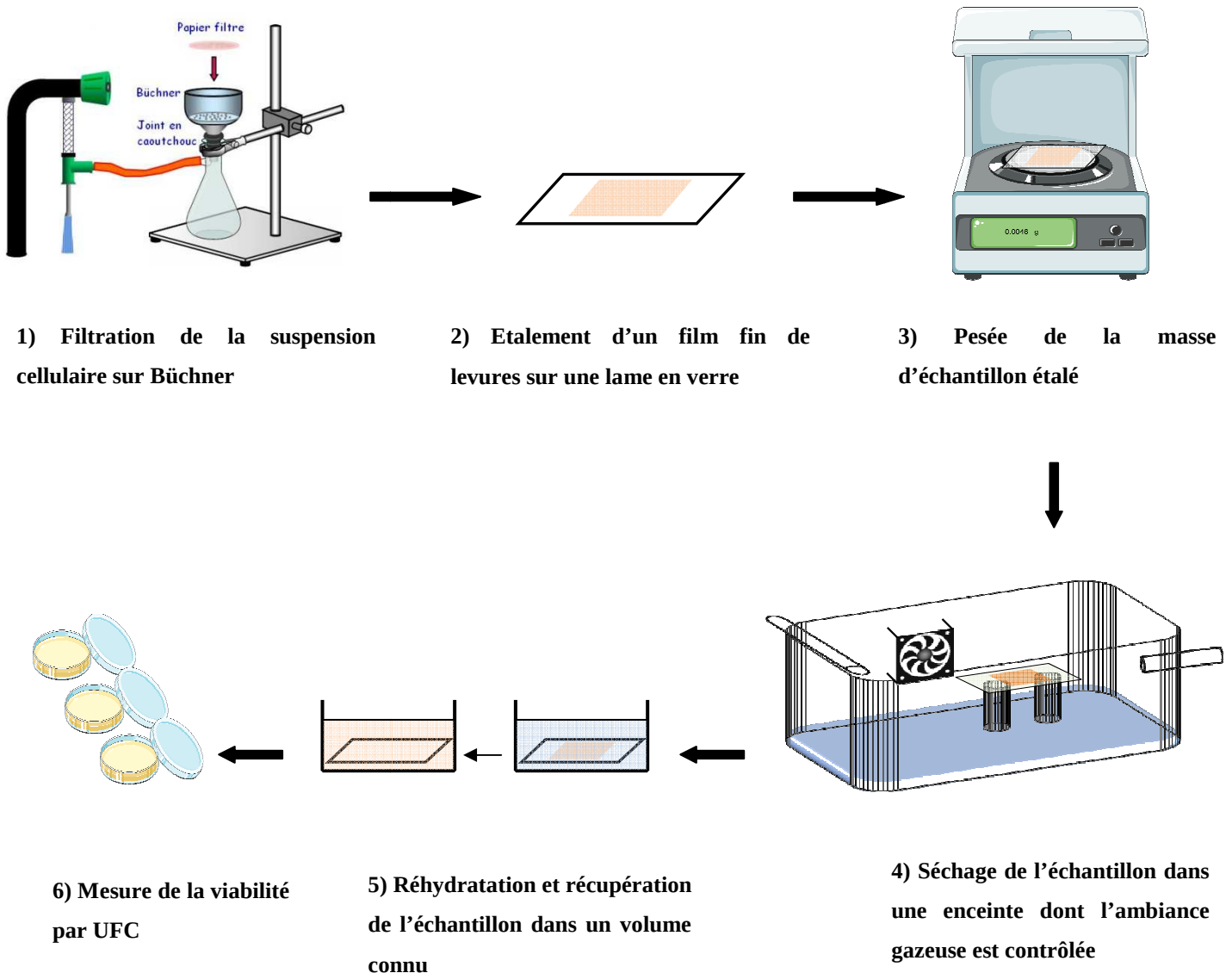


**Figure 21 : Schéma du protocole utilisé afin de réaliser la déshydratation des levures en milieu aérien.**

### 2.2.3. Mesure de la viabilité

La viabilité des cellules réhydratées est estimée par la méthode des Unités Formant Colonies (UFC) après dilutions décimales adéquates et est exprimée en UFC/mL/g d'échantillon. Chaque résultat est rapporté à un témoin n'ayant subi aucun traitement de déshydratation et qui lui aussi est exprimé en UFC/mL/g d'échantillon. Les expériences ont été répétées au minimum trois fois de manière indépendante.

### 3. ANALYSE DES MODIFICATIONS FONCTIONNELLES ET STRUCTURALES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES LEVURES

#### 3.1. ESTIMATION DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE

L'évolution de la perméabilité de la membrane plasmique des levures au cours de perturbations hyperosmotiques a été caractérisée à l'aide de marquages à l'iodure de propidium (IP). L'IP est une sonde qui ne pénètre que dans les cellules perméabilisées et fluoresce lors de sa complexation avec les acides nucléiques intracellulaires. La stratégie utilisée au cours de cette étude était d'introduire la sonde à différents moments du cycle déshydratation/réhydratation afin de caractériser le rôle respectif des principales étapes (déshydratation, temps de maintien, réhydratation) pour l'intégrité de la membrane plasmique au cours de ce cycle (Figure 22). Pour les traitements osmotiques allant jusqu'à 30 MPa, la proportion de cellules perméabilisées a été estimée par le biais de la cytométrie en flux. Au-delà de ce seuil, le milieu est trop visqueux et engendre la formation de microbulles lors de l'aspiration de l'échantillon par le cytomètre ce qui fausse le ratio de cellules marquées par l'IP. Le comptage des cellules marquées a donc été réalisé sur images obtenues par microscopie à épifluorescence pour les suspensions cellulaires dont la pression osmotique était supérieure à 30 MPa.

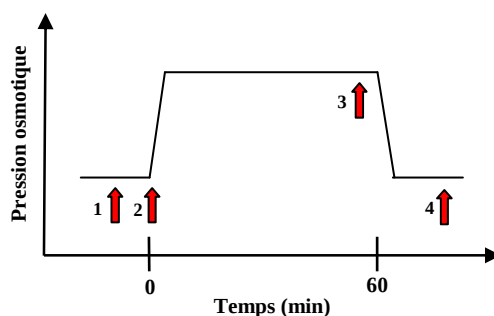


**Figure 22 : Chronologie des marquages des levures à l'iodure de propidium au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation.**

##### 3.1.1. Analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse quantitative et qualitative de cellules et de particules en suspension. Elle permet l'étude de caractéristiques physiques et chimiques telles que la taille, la granulométrie et d'autres composants ou fonctions pouvant être détectés grâce à des sondes fluorescentes spécifiques. Le principe de fonctionnement de la cytométrie en flux est

résumé dans la Figure 23. Les cellules sont entraînées par un flux liquide et défilent à grande vitesse, cellule par cellule, dans le faisceau d'un ou plusieurs lasers (jusqu'à 30000 événements par seconde). La lumière réémise par les cellules (par diffusion ou fluorescence) permet de distinguer des sous-populations selon différents critères. De l'interaction entre le faisceau laser et les cellules, résultent des signaux lumineux, de plusieurs natures :

- La lumière diffusée aux petits angles (FSC : Forward Scatter), collectée dans le prolongement du faisceau excitateur, correspond d'un point de vue physique à de la diffraction, et donne une indication sur la taille des cellules.
- La lumière diffusée aux grands angles (SSC : Side Scatter), collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction, et donne des indications sur la granulométrie des cellules.
- La fluorescence émise peut être une autofluorescence ou résulter, comme c'est le plus souvent le cas, d'un marquage par un fluorochrome spécifique d'un constituant cellulaire particulier, ou d'un immunomarquage fluorescent.

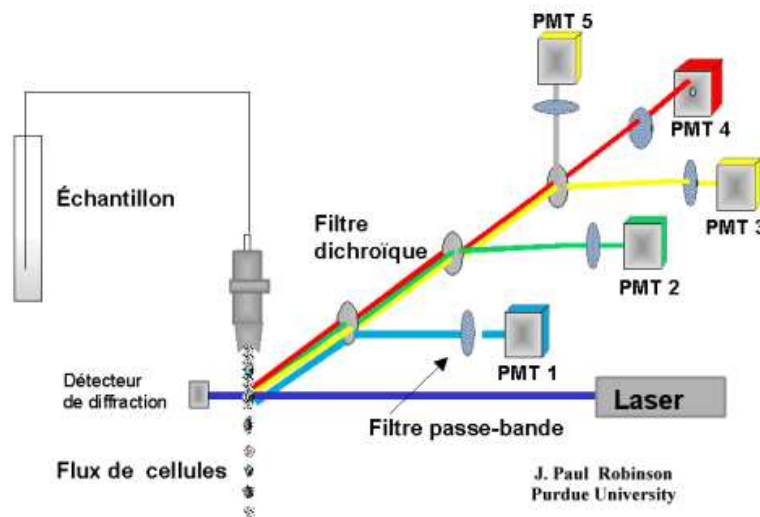


**Figure 23 : Schéma du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux (d'après Robinson J. P., 1999).**

Les signaux lumineux sont collectés par des photo-détecteurs (photodiode pour la diffusion petits angles, photomultiplicateurs pour la diffusion grands angles et la fluorescence) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Ces signaux sont ensuite envoyés à un analyseur multicanaux permettant la représentation de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés.

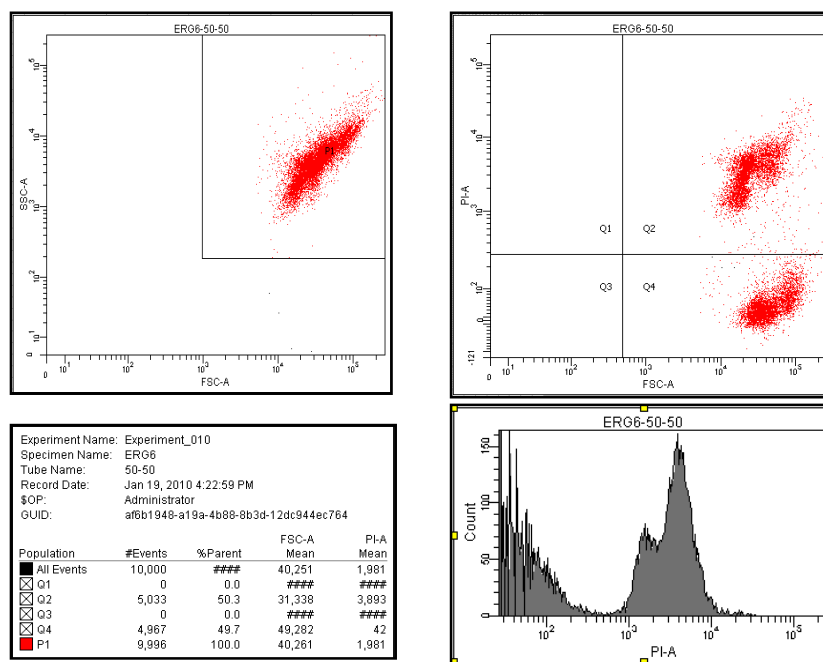


**Figure 24 : Mise en place du protocole de marquage des levures perméabilisées par l'iodure de propidium.**

Afin de marquer les levures par l'IP, une solution stock de sonde est préparée à 10 mg/mL dans de l'eau distillée. Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser la concentration de sonde en fonction de la concentration cellulaire. Pour cela, un mélange 50/50 de cellules intègres et de cellules perméabilisées a été préparé et différentes concentrations d'IP ont été testées (Figure 24). Un marquage optimal est obtenu avec une concentration finale d'IP de 200  $\mu\text{g/mL}$  pour une concentration cellulaire de  $10^8$  cellules/mL. Après marquage, les cellules marquées sont diluées 100 fois avant d'être analysées par le cytomètre afin d'obtenir une concentration cellulaire engendrant une vitesse de défilement des levures compatible avec une analyse fiable des signaux lumineux ( $\approx 1000$  événements par seconde). Pour chaque échantillon, 10000 événements sont collectés par un cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA) équipé d'un laser d'excitation argon à 488 nm. Un filtre optique à 610 nm est utilisé pour récupérer la fluorescence émise par les cellules. Les résultats sont issus au minimum de trois répétitions indépendantes.

### 3.1.2. Analyse par microscopie à épifluorescence

L'observation des cellules marquées par l'IP a été réalisée par un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse TE 2000 E (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra spectrale Nuance

CRI. Les images ont été acquises avec un objectif Plan Apo  $\times 40$  (ouverture numérique : 0,95) (Nikon) et collectées avec le logiciel Nuance. Une première image est réalisée en lumière blanche permettant d'observer la totalité des cellules puis une seconde image est réalisée en épifluorescence pour observer les cellules marquées par l'IP. Le ratio de ces deux nombres permet d'obtenir la proportion de cellules perméabilisées. Un minimum de 300 cellules a été observé par échantillon. L'excitation (540-580 nm) et la récupération de l'émission du fluorochrome (600-660 nm) est réalisée par un filtre monochromatique.

### 3.2. EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES LEVURES

#### 3.2.1. Observation par microscopie confocale

Une des limitations de la microscopie est la faible profondeur de champs de l'image. La zone observée de mise au point est nette alors que les zones immédiatement au dessus et au dessous sont floues et perturbent l'image observée. Ainsi, il y a une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de pallier à cet inconvénient en réalisant des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de ne visualiser que l'image fluorescente émise dans le plan focal (Matsumoto, 1993; Pawley and Masters, 2008). En faisant varier ce plan, il est possible d'obtenir une succession de coupes donnant des informations nettes et précises dans les trois dimensions de l'objet observé (Figure 25).

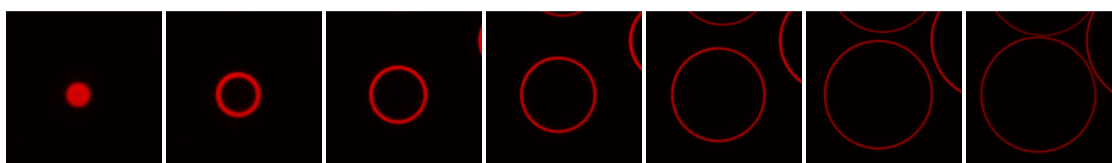


**Figure 25 : Exemple d'observation d'un objet par microscopie confocale en fonction de la position en z.**

Le principe de fonctionnement d'un microscope confocal est résumé dans la Figure 26. Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur des molécules particulières d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable (pinhole), il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant

d'autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs. Le signal reçu est enfin converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image, codée sur 8 bits typiquement, voire 12 bits ou 16 bits.

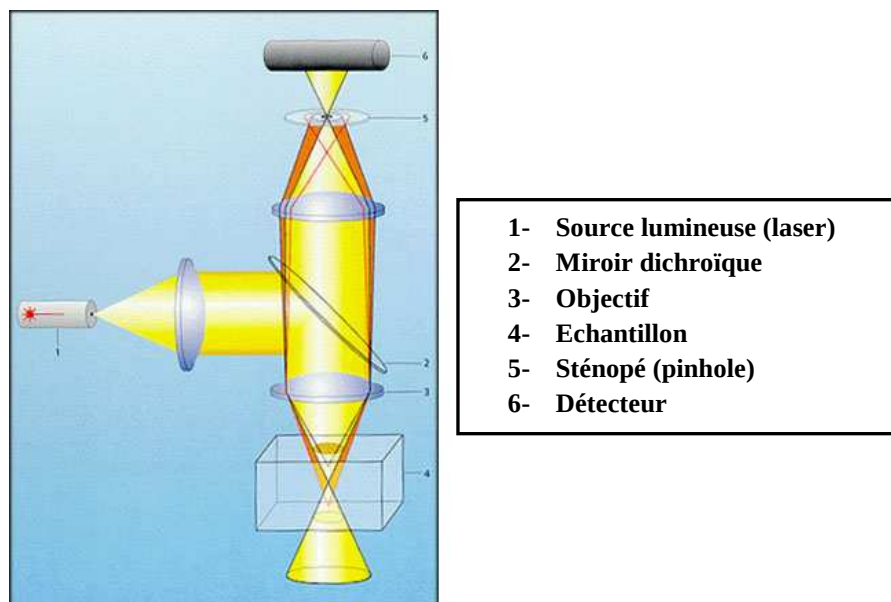


**Figure 26 : Principe de fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.**

Pour l'ensemble des observations réalisées en microscopie confocale, le microscope utilisé est un microscope Nikon Eclipse TE 2000 U équipée d'une tête confocale multispectrale D Eclipse C1. Les images sont acquises avec un objectif Nikon Plan Apo  $\times 60$  (ouverture numérique : 0,95) pour les images avec un grand nombre de cellules par champ et avec un objectif à immersion dans l'huile Nikon Plan Apo  $\times 100$  (ouverture numérique : 1,4) pour les images de détails des levures. L'ensemble des images est collecté avec le logiciel EZ-C1 3.50 (Nikon). Les conditions d'excitation et d'émission des sondes fluorescentes seront précisées dans les paragraphes suivants qui sont dédiés aux fluorochromes utilisés lors de notre étude.

#### 3.2.1.1. Marquage membranaire par le FM 4-64

Les sondes fluorescentes FM sont des composés styryl lipophiles utilisées dans de nombreuses études afin de marquer la membrane plasmique et de suivre les événements d'endocytose. Ces sondes, solubles dans l'eau, présentent l'avantage d'être non toxiques pour les cellules et de ne fluorescer que lorsqu'elles sont intégrées dans les membranes. Dans le travail

proposé ici, la sonde utilisée pour observer des modifications morphologiques de la membrane plasmique au cours des traitements hydriques est le N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM 4-64). Chez la levure, cette sonde a déjà été utilisée pour caractériser la dynamique de l'endocytose (Vida and Emr, 1995) et pénètre au niveau intracellulaire de manière temps, température et énergie dépendante (Riezman, 1985). Dans un premier temps, nous avons cherché à stopper cette internalisation de FM 4-64 car celle-ci perturbe les observations de l'effet des perturbations hydriques sur la membrane, notamment lors des rampes qui nécessitent environ 30 minutes pour atteindre l'état déshydraté. Pour cela, nous avons réalisé un pré-traitement hydrique de faible amplitude (15 MPa) qui n'affecte pas la viabilité des levures. En condition physiologique (1,4 MPa), la membrane plasmique est internalisée au cours du temps par endocytose. Ce phénomène est visualisé par un marquage par le FM 4-64 (Figure 27).

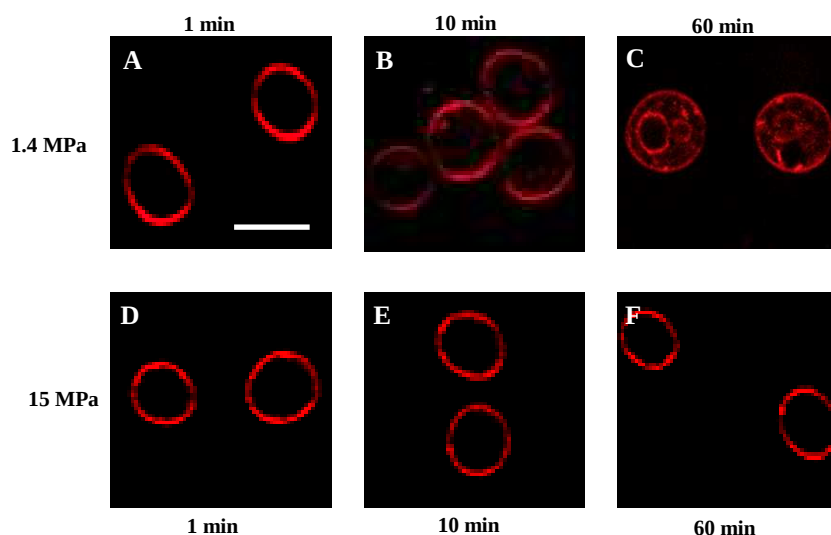


**Figure 27: Effet d'une augmentation de la pression osmotique à 15 MPa sur l'endocytose de la membrane plasmique.** Les images présentées ont été obtenues par microscopie confocale et sont représentatives des événements observés sur la population de cellules. Ces images présentent l'évolution du marquage des levures par le FM 4-64 au cours du temps à 1,4 et 15 MPa. Les observations ont été réalisées à 1, 10 et 60 minutes après le marquage à 25 °C. Barre d'échelle = 5  $\mu$ m.

Lorsque la pression osmotique est augmentée à 15 MPa, le marquage par le FM 4-64 reste localisé au cours du temps dans la membrane plasmique suggérant que cette élévation de la pression osmotique à un niveau non létal permet de stopper l'endocytose. C'est donc à partir de ce niveau que nous avons ensuite réalisé des perturbations hyperosmotiques selon différentes cinétiques afin de pouvoir observer leur impact sur la délocalisation membranaire en nous affranchissant de l'endocytose naturelle.

Afin de marquer les levures avec le FM 4-64, une solution stock de sonde est préparée à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans de l'eau distillée.  $10^8$  cellules sont marquées avec  $20 \text{ } \mu\text{g}$  de sonde. La sonde est excitée par un laser He/Ar à  $488 \text{ nm}$  et le signal d'émission est récupéré entre  $550$  et  $700 \text{ nm}$ .

### 3.2.1.2. Marquage de la paroi par le calcofluor

Le calcofluor est une sonde fluorescente se fixant spécifiquement sur les polysaccharides avec des liaisons  $\beta(1-4)$  comme la cellulose et la chitine (Maeda and Ishida, 1967). Il est utilisé pour observer la paroi des levures et présente l'avantage de se dissoudre dans l'eau. La concentration de sonde utilisée pour le marquage des cellules a été de  $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  pour une concentration de levure proche de  $10^8$  cellules par mL. L'observation a été réalisée avec une excitation à  $408 \text{ nm}$  à l'aide d'une diode et l'émission a été récupérée entre  $430$  et  $460 \text{ nm}$ .

### 3.2.1.3. Observation de microdomaines Sur7-GFP

La protéine Sur7 est une protéine membranaire localisée dans les microdomaines MCC riches en ergostérol. La transformation génétique que nous avons réalisée a permis de greffer une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein) à cette protéine afin de visualiser sa répartition dans la membrane plasmique des levures et, d'une manière plus générale, de visualiser la distribution des microdomaines MCC au niveau de la membrane (Figure 28).

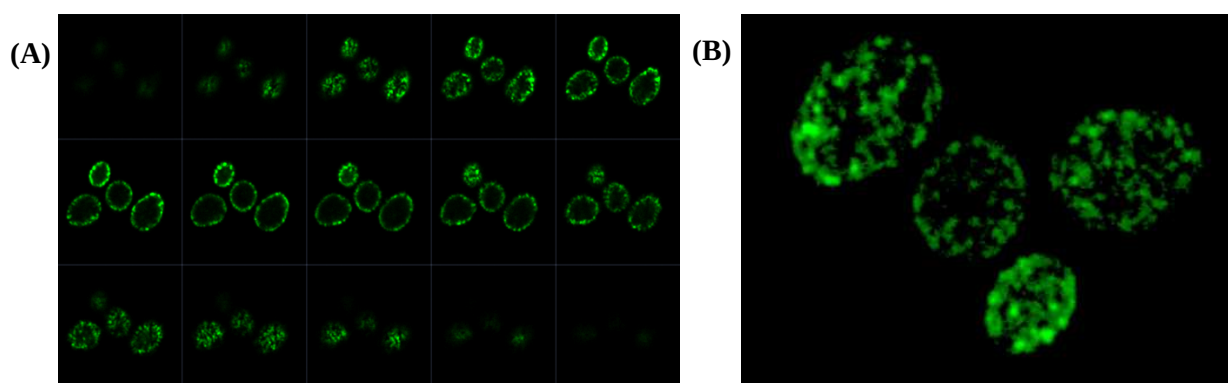


**Figure 28 : Observations de la protéine Sur7-GFP au niveau de différents plans focaux (A) et reconstruction d'une image 3D (B) de la distribution des microdomaines des levures.**

L'excitation de la GFP a été réalisée par un laser Helium/Argon à  $488 \text{ nm}$  et l'excitation était récupérée entre  $510$  et  $525 \text{ nm}$ .

### 3.2.2. Observation par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission présente deux avantages majeurs par rapport à la microscopie optique. Le premier est que cette méthode permet d'obtenir des agrandissements d'images pouvant aller jusqu'à 160000 fois. Le second est que la résolution d'un microscope électronique est voisine de 0,2 nm. Cette technique consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons, et d'utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image de l'échantillon sur un écran fluorescent qui transforme l'image électronique en image optique.

Dans le cadre de l'étude de l'impact de perturbations hyperosmotiques sur la morphologie de la membrane plasmique des levures, il était important d'observer l'ultrastructure des levures après différentes cinétiques et amplitudes de traitements à l'aide de la microscopie électronique. Cette méthode nécessite cependant une préparation des échantillons dont les principales étapes sont décrites ci-après:

- Fixation des cellules: la fixation a été réalisée à l'aide d'un mélange glutaraldéhyde (3%) / paraformaldéhyde (2%). Cette fixation est réalisée à 4 °C pendant 12 heures. Dans le cas des chocs hyperosmotiques, les fixateurs sont ajoutés dans la solution hyperosmotique afin de fixer les levures le plus rapidement possible après le traitement. Dans le cas des rampes hyperosmotiques, les levures sont déshydratées progressivement par ajout de glycérol à l'aide d'un pousse-seringue puis ces levures sont culotées par centrifugation (6000 *g*, 5 min). Un mélange comportant les fixateurs à la même pression osmotique que celle atteinte lors de la déshydratation préalable est alors ajouté sur le culot cellulaire et les cellules sont remises en suspension.

- Inclusion des levures dans l'agar: les levures sont alors culotées et le surnageant est retiré et est remplacé par de l'agar « basse température » préalablement chauffé. Après refroidissement et prise du gel d'agar, les culots cellulaires sont découpés en petits cubes. La mise en agar des culots cellulaires permet de faciliter les étapes suivantes puisqu'elle permet de modifier l'environnement de l'échantillon sans avoir besoin de centrifuger l'échantillon.

- Postfixation des cellules: Après deux lavages avec du tampon phosphate (0,1 M), les levures sont postfixées au tétraoxyde d'osmium à 0,5% dans du tampon phosphate à pH 7,2 à 4 °C pendant 60 min à l'obscurité. A l'issue de cette étape, les échantillons de levures sont rincés avec du tampon phosphate.

- Déshydratation: cette déshydratation ne concerne pas le traitement de l'échantillon lui-même mais vise à éliminer l'eau résiduelle qui pourrait empêcher l'inclusion en résine. Cette déshydratation est réalisée par immersion des cubes de levures dans des bains d'alcool de degré croissant jusqu'à de l'éthanol pur.

- Substitution par l'oxyde de propylène: l'éthanol est ensuite remplacé par de l'oxyde de propylène.

- Inclusion dans la résine et polymérisation: les cubes de levures passent ensuite dans des bains oxyde de propylène/résine Epon avec une concentration de résine croissante pour atteindre un dernier bain de résine pure. Chaque cube d'agar contenant les levures est alors disposé dans un moule de polymérisation. La polymérisation est ensuite réalisée par incubation des moules à 60 °C pendant 48 h.

- Découpe de coupes ultrafines: les petits blocs de résine obtenus contenant les levures sont alors découpés au moyen d'un ultramicrotome Ultracut E (Reichert) pour obtenir des coupes d'une épaisseur de 90 nm. Ces coupes sont alors déposées sur des grilles Cuivre/Palladium.

- Contraste des coupes: les coupes sont contrastées sur les grilles par du citrate de plomb et de l'acétate d'uranyle. Les grilles sont alors conservées en piluliers jusqu'à observation.

Les observations des coupes de levures ont été réalisées au Centre de Microscopie Université de Bourgogne/INRA de Dijon à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi 7500 (utilisé à 80 kV) équipé d'une caméra AMT pilotée par un logiciel AMT.

### 3.3. MESURE DE VOLUMES CELLULAIRES

Les mesures de volumes cellulaires ont été réalisées après des chocs hyperosmotiques de différentes amplitudes allant de 7 MPa jusqu'à 166 MPa mais également après différents niveaux de réhydratation après des chocs hyperosmotiques à 30 et 166 MPa. Pour l'observation de l'impact de la déshydratation sur le volume cellulaire, différentes solutions hyperosmotiques préparées avec du glycérol à des pressions osmotiques contrôlées sont ajoutées sur un culot de levures. Après remise en suspension du culot, 7 µL sont prélevés et déposés entre lame et lamelle pour observation au microscope. Dans le cas de l'observation de cellules ayant subi une déshydratation puis une réhydratation, les cellules sont déshydratées avec un choc hyperosmotique comme décrit précédemment et sont maintenues pendant une heure dans la solution hyperosmotique. Les levures sont ensuite centrifugées et la solution de déshydratation

est remplacée par une solution à une pression osmotique plus faible. Le contrôle de la pression osmotique de cette solution permet de maîtriser le niveau de réhydratation des levures.

L'observation microscopique des levures a été réalisée avec un microscope Nikon Eclipse TE 2000 E (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra spectrale Nuance CRI. Les images ont été acquises avec un objectif Plan Apo  $\times 40$  (ouverture numérique : 0,95) (Nikon) et collectées avec le logiciel Nuance. Un minimum de 300 levures est observé par échantillon en prenant soin de réaliser toujours la même mise au point entre les différents échantillons. Le volume cellulaire est déterminé par analyse d'images (Image J). Les cellules sont analysées individuellement et leur surface projetée est mesurée. Le volume est calculé en supposant que les cellules sont sphériques (Berner and Gervais, 1993).

### 3.4. QUANTIFICATION DES STEROLS CELLULAIRES

Une extraction lipidique a été réalisée à partir de  $\approx 5 \cdot 10^8$  levures préalablement congelées après croissance jusqu'au début de la phase stationnaire. Les cellules ont été décongelées puis lavées avec de l'eau distillée et reprises dans 1 mL d'eau froide. Les cellules ont ensuite été lysées par agitation à l'aide d'un mini beadbeater<sup>TM</sup> (Biospec Products) pendant 1 min à 5000 tours  $\text{min}^{-1}$  avec 500  $\mu\text{L}$  de billes de verre (diamètre 0,3 à 0,4 mm; Sigma). Les lipides cellulaires ont ensuite été extraits avec une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) comme décrit par Folch et al. (Folch et al., 1957). La dernière phase organique a été évaporée et les stérols ont été dissous dans 100  $\mu\text{L}$  d'hexane. Les différentes espèces de stérols ont ensuite été séparées par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne capillaire AT-1 de dimension 25 m  $\times$  0,32 mm (Alltech) puis identifiées selon leur temps de rétention par rapport au cholestérol utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en nmol de stérols pour  $10^9$  cellules.

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'évolution structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de perturbations hydriques afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la survie ou la mort des cellules lors de ce type de perturbations. La cinétique de déshydratation est un paramètre déterminant pour la survie des levures. D'une manière générale, les cinétiques de déshydratations brutales (chocs) sont associées à la mort des levures tandis que les cinétiques de déshydratation progressives (rampes) permettent des taux de survie cellulaire plus importants. La première partie de ce travail est une étude préliminaire ayant pour but de rechercher les conditions de déshydratation (amplitude, cinétique) conduisant à la mort ou à la survie des levures. Dans le second chapitre de ce travail, nous nous sommes attachés aux mécanismes membranaires impliqués dans la mort des levures se produisant lors de perturbations hydriques brutales. La troisième partie est dédiée à l'étude de l'évolution structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique au cours de déshydratations progressives permettant la survie des levures. A l'aide d'un mutant de levures ( $\Delta erg6$ ) accumulant des stérols de structures chimiques différentes au niveau de sa membrane plasmique, nous nous sommes intéressés dans une quatrième partie à l'impact de la nature des stérols sur la survie et la réponse passive de la membrane lors de chocs hyperosmotiques. Enfin, la dernière partie est consacrée à l'étude de la survie des levures lors de déshydratations induites par le passage d'un milieu liquide à un milieu aérien. Cette partie est importante d'un point de vue biotechnologique mais aussi d'un point de vue environnemental puisque ce processus intervient dans les procédés industriels de stabilisation par séchage mais aussi dans l'environnement (alternance de pluie et de soleil). Le rôle de la structure des stérols sera également étudié dans la résistance à ce type de déshydratation.

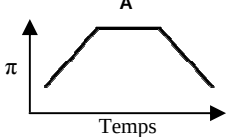
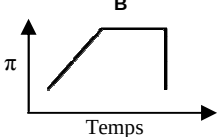
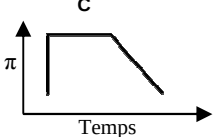
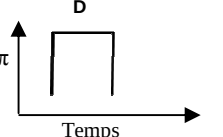
## **1. RECHERCHE DES CONDITIONS DE DESHYDRATATION CONDUISANT A LA SURVIE OU LA MORT DES LEVURES**

Dans cette première partie sont présentées des expériences préliminaires dont le but est de cribler différents paramètres susceptibles de moduler la survie de la souche de levures utilisée dans cette étude (*Saccharomyces cerevisiae* BY 4742) lors de perturbations hydriques. La cinétique et l'amplitude de déshydratation sont les deux paramètres cruciaux influant sur la survie des microorganismes lors de perturbations hydriques. L'influence de ces paramètres dépend du type et de la souche de microorganismes. Ainsi, ces résultats sont essentiels afin de définir un champ d'étude et de cibler les manipulations nécessaires pour la compréhension des

mécanismes impliqués dans la mort ou dans la survie des cellules lors de cycle de déshydratation/réhydratation.

Trois niveaux de déshydratation ont été étudiés : le premier, à 30 MPa, correspond à une déshydratation modérée. Ce niveau est légèrement supérieur au seuil d'osmorégulation qui est proche de 15 MPa chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le second, à 166 MPa, correspond à une déshydratation sévère. Cette amplitude de déshydratation est représentative des conditions nécessaires à la stabilisation et à la conservation de microorganismes. Enfin, un niveau intermédiaire, à 110 MPa, a également été testé. La déshydratation des levures a été réalisée selon deux cinétiques : progressive ( $0,086 \text{ MPa.s}^{-1}$ ) ou brutale ( $200 \text{ MPa.s}^{-1}$ ). La réhydratation a elle aussi pu être réalisée progressivement ou brutalement. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

**Tableau 7: Impact de l'amplitude et des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la survie de la levure. Les levures sont maintenues 60 min en conditions hyperosmotiques (30, 110 ou 166 MPa) avant réhydratation.**

| Amplitudes     | Profils de cinétiques                                                               |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                | A                                                                                   | B                                                                                   | C                                                                                    | D                                                                                     |
|                |  |  |  |  |
| <b>30 MPa</b>  | 86,0% (3,6)                                                                         | 86,2% (3,9)                                                                         | 88,2% (8,4)                                                                          | 83,5% (2,5)                                                                           |
| <b>110 MPa</b> | 86,9% (11,6)                                                                        | 67,7% (4,7)                                                                         | 41,7% (12,7)                                                                         | 12,5% (9,1)                                                                           |
| <b>166 MPa</b> | 78,7% (3,6)                                                                         | 42,6% (3,6)                                                                         | 19,2% (1,1)                                                                          | 0,3% (0,2)                                                                            |

$\pi$  correspond à la pression osmotique du milieu extracellulaire. (A) Déshydratation progressive et réhydratation progressive, (B) déshydratation progressive et réhydratation brutale, (C) déshydratation brutale et réhydratation progressive, (D) déshydratation brutale et réhydratation brutale. Les taux de survie ont été mesurés par la méthode UFC après réhydratation à 1,4 MPa. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois manipulations indépendantes.

Pour le niveau de déshydratation modérée (30 MPa), les cinétiques de déshydratation et de réhydratation n'ont pas d'influence sur la viabilité cellulaire et le taux de survie des levures reste à un niveau élevé proche de 85% quelque soit le profil des cinétiques de déshydratation et de réhydratation utilisé. En revanche, lorsque l'amplitude du traitement est augmentée à 110 et 166 MPa, des différences dans la survie des levures sont observées en fonction des cinétiques de déshydratation et de réhydratation utilisées. Pour une amplitude de 110 MPa, le profil de traitement conduisant à la survie la plus faible est une déshydratation rapide suivie d'une réhydratation rapide (12,5%) alors que la viabilité la plus élevée est obtenue lorsque les deux

étapes sont réalisées progressivement (86,9%). Les profils dans lesquels seulement une des deux étapes est réalisée progressivement conduisent à des viabilités intermédiaires : 67,7% lorsque la déshydratation est réalisée progressivement et 41,7% lorsque la réhydratation est progressive. Les levures présentent un comportement similaire pour le traitement de forte amplitude (166 MPa). La survie est maximale lorsque les deux étapes du cycle déshydratation/réhydratation sont progressives (78,7%) tandis qu'elle atteint une valeur minimale de 0,3% lorsqu'elles sont brutales. Ces résultats indiquent qu'il existe un effet des cinétiques de déshydratation et de réhydratation sur la viabilité cellulaire pour les perturbations de fortes amplitudes. Ces résultats sont accord avec des précédentes études menées au laboratoire (Gervais and Marechal, 1994; Beney et al., 2000) mais également dans d'autres équipes de recherche (Ragoonanan et al., 2008). La cinétique n'est cependant pas le seul paramètre influençant les taux de survie des levures lors de perturbations hydriques. Pour un profil cinétique de traitement donné, l'amplitude de déshydratation influe également sur la viabilité des levures. Par exemple, lorsque la déshydratation et la réhydratation sont réalisées rapidement, la survie cellulaire est de 83,5%, 12,5% et de 0,3% respectivement pour des traitements de 30, 110 et 166 MPa. Ainsi, la perte de viabilité est d'autant plus grande que l'amplitude de déshydratation est importante. Ce phénomène s'observe également lorsque seule l'une des deux étapes du cycle déshydratation/réhydratation est rapide. En revanche, lorsque ces deux étapes sont réalisées progressivement, le niveau de déshydratation n'affecte que faiblement la viabilité cellulaire et les taux de survie des levures restent à un niveau proche de 80% quelque soit l'amplitude de déshydratation atteinte. Ces résultats montrent qu'il y a un impact de l'amplitude de déshydratation sur la viabilité des levures lorsque les perturbations hydriques sont réalisées de manière brutale.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Les résultats obtenus dans cette partie nous permettent de déterminer des conditions de déshydratation conduisant à la mort ou à la survie des levures. La mort des levures est associée aux chocs hyperosmotiques de fortes amplitudes (110 et 166 MPa) tandis que les rampes osmotiques à ces mêmes niveaux permettent des taux de survie significativement supérieurs. Dans le cas de perturbations modérées (30 MPa), la survie cellulaire n'est pas affectée par la cinétique et reste à un niveau élevé.</b></p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## **2. IMPLICATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DANS LA MORT CELLULAIRE LORS DE DESHYDRATATIONS BRUTALES**

Dans cette partie, des manipulations ont été réalisées dans le but de comprendre les mécanismes membranaires conduisant à la mort des levures lors de perturbations brutales. Pour cela, différents aspects cellulaires ont été étudiés tels que l'intégrité de la membrane plasmique, les variations de volume cellulaire ou bien encore la morphologie des levures au cours de chocs hyperosmotiques sévères (166 MPa) réalisés avec du glycérol.

### **2.1. EFFET DU TEMPS DE MAINTIEN DANS L'ETAT DESHYDRATE APRES UN CHOC HYPEROSMOTIQUE SEVERE SUR LA SURVIE DES LEVURES**

Nous avons observé dans le premier chapitre qu'un choc hyperosmotique à 166 MPa suivi d'un temps de maintien de 60 min conduit à un taux de survie très faible des levures. Suite à cette observation, nous nous sommes demandés si les mécanismes conduisant à la mort des levures lors d'un choc hyperosmotique sévère étaient immédiats ou si ces mécanismes se produisaient au cours du temps de maintien avant la réhydratation des levures. Pour cela, nous avons estimé la viabilité des levures après différents temps de maintien dans l'état déshydraté après un choc à 166 MPa (Figure 29).

Lorsque les levures sont réhydratées rapidement après le début du choc hyperosmotique à 166 MPa (temps de maintien de 1 et 2 min), la survie des levures atteint respectivement 49% et 39% (Figure 29). Lorsque le temps de maintien est augmenté à 15 min, la survie des levures décroît de manière plus importante pour atteindre environ 3%. Enfin, la survie des levures atteint 0,4% pour un temps de maintien de 60 min.

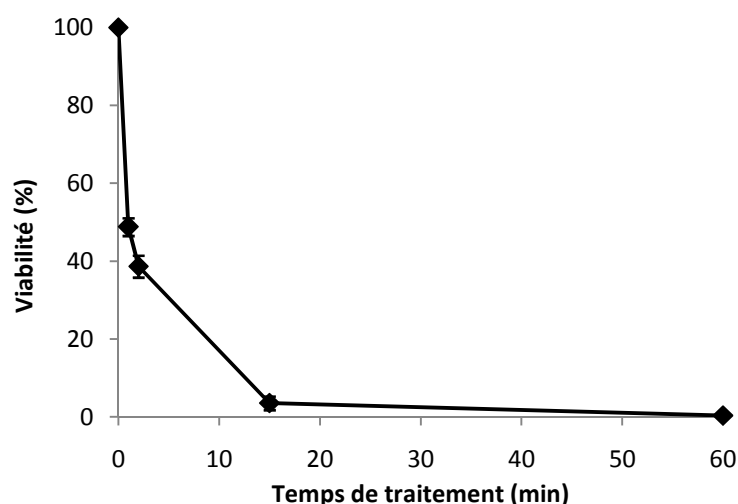


**Figure 29 : Effet du temps de maintien dans l'état déshydraté sur la survie des levures après un choc hyperosmotique à 166 MPa. Les levures ont été réhydratées brutalement après différents temps de maintien (1, 2, 15 ou 60 min) après un choc hyperosmotique à 166 MPa. Les mesures de viabilité ont été réalisées par UFC.**

Ces résultats montrent que le temps de maintien dans l'état déshydraté après un choc hyperosmotique sévère influe sur la survie des levures. Ils suggèrent également qu'une partie des cellules meurt rapidement lors d'une déshydratation brutale puis qu'une seconde partie des levures meurt au cours du temps de maintien. Cette seconde partie augmente avec la durée de temps de maintien avant réhydratation.

## 2.2. EVOLUTION DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE LORS DE CHOCS HYPEROSMOTIQUES

Les mesures de survie cellulaire par la méthode UFC permettent d'estimer la survie des levures après un cycle entier comprenant l'étape de déshydratation, le temps de maintien dans l'état déshydraté mais aussi l'étape de réhydratation. Cependant, cette méthode ne permet pas d'estimer la part de chacune de ces étapes dans la mort des levures. La perte d'intégrité de la membrane plasmique est souvent évoquée comme cause de la mort lors de stress hydriques. Dans notre étude, l'intégrité de la membrane plasmique des levures a été estimée à différents moment du cycle déshydratation/réhydratation afin de mieux cerner la chronologie de l'évolution de la perméabilité membranaire. Les résultats obtenus seront ensuite mis en regard avec les viabilités observées lors des chocs hyperosmotiques sévères.

### 2.2.1. Evolution de la perméabilité membranaire au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation

L'impact des différentes étapes d'un cycle déshydratation/réhydratation a été estimé par des marquages des levures à l'IP réalisés à différents moments de ce cycle (Figure 30).

Sans traitement hydrique, les levures présentent une très faible proportion de cellules perméabilisées, proche de 2%. Le marquage réalisé pendant le choc hyperosmotique à 166 MPa conduit à une proportion de cellules perméabilisées d'environ 46%. Lorsque le marquage est réalisé 60 min après le choc, cette proportion n'est pas significativement différente de cette dernière et est proche de 31%. En revanche, lorsque les cellules sont réhydratées à 1,4 MPa après ce maintien de 60 min, la proportion de cellules perméabilisées augmente jusqu'à 86% (Figure 29).

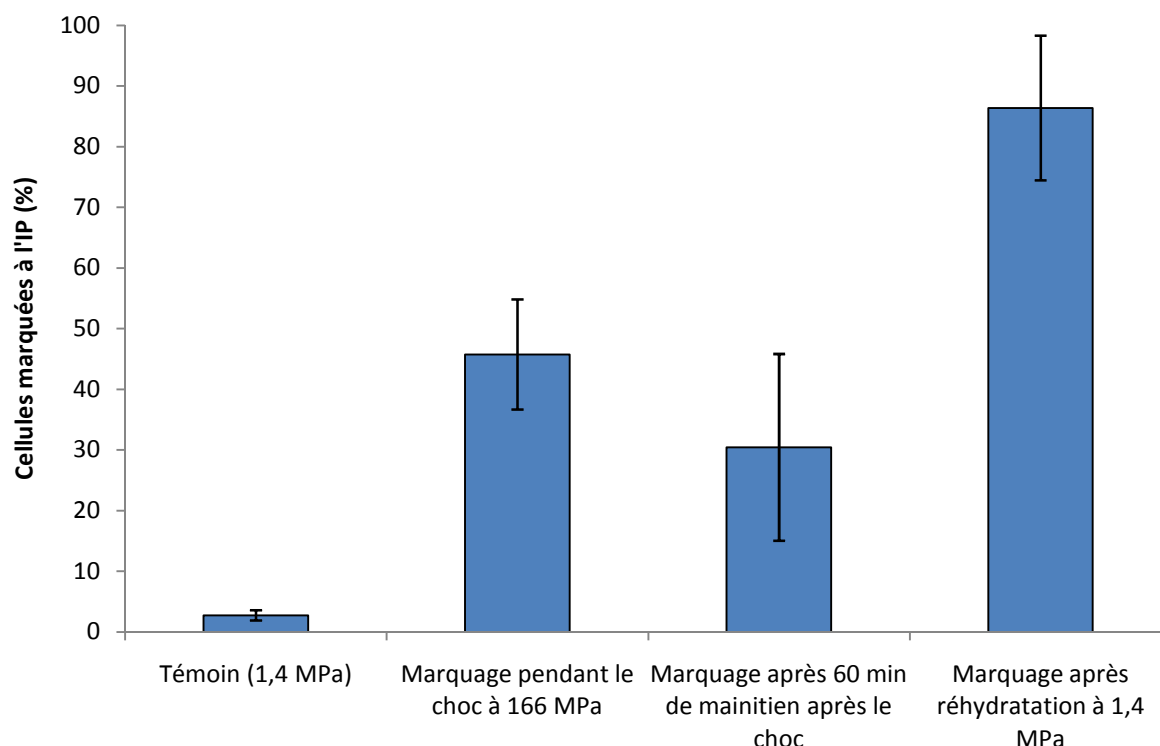


**Figure 30 : Evolution de la proportion de cellules perméabilisées (marquées par l'IP) au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation. Les levures ont été marquées à différents moments du cycle : avant la déshydratation (témoin), pendant le choc hyperosmotique à 166 MPa, 60 min après le choc hyperosmotique et après réhydratation brutale à 1,4 MPa après le maintien de 60 min dans l'état déshydraté.**

Ces résultats montrent qu'une partie des levures ( $\approx 40\%$ ) est perméabilisée rapidement lors du choc hyperosmotique à 166 MPa et que le temps de maintien n'a pas d'effet sur l'intégrité de la membrane plasmique. Par contre, l'étape de réhydratation est à l'origine d'une

perméabilisation membranaire supplémentaire qui touche environ 45% des levures qui n'étaient pas perméabilisées par l'étape de déshydratation.

### 2.2.2. Lien entre viabilité et intégrité membranaire

L'ensemble des résultats obtenus par l'étude de la perméabilité membranaire au cours d'un cycle composé d'une déshydratation en choc suivie d'une réhydratation permet de conclure que la mort des levures lors de perturbations hydriques est associée à une perméabilisation de la membrane plasmique. En effet, la faible viabilité observée après un choc hyperosmotique sévère est corrélée avec une proportion importante de cellules perméabilisées après réhydratation. Ces résultats montrent également que l'étape de déshydratation mais aussi l'étape de réhydratation sont critiques pour l'intégrité de la membrane plasmique. Le temps de maintien après le choc hyperosmotique est un paramètre crucial pour la survie cellulaire. La mise en regard de la viabilité et de l'intégrité membranaire des levures révèle que la diminution de viabilité, croissante avec le temps, n'est pas liée à une perméabilisation membranaire progressive se produisant pendant le temps de maintien. En effet, bien que la viabilité mesurée après réhydratation diminue avec le temps de maintien, l'intégrité de la membrane plasmique n'évolue pas au cours de ce temps. Ceci suggère que les levures ne sont pas dans un état figé et que des événements cellulaires se produisent pendant le temps de maintien. Ces événements conduisent à la perméabilisation des levures lors de l'étape de réhydratation. La nature de l'évolution des levures pendant le temps de maintien dans l'état déshydraté n'est pas connue. Dans les parties suivantes de ce chapitre, nous allons donc tenter de comprendre les mécanismes membranaires intervenant au cours de la déshydratation, du temps de maintien et de la réhydratation afin de cerner les événements aboutissant à la perméabilisation membranaire lors de perturbations hydriques.

## 2.3. CONTRACTION CELLULAIRE ET EXCES DE SURFACE MEMBRANAIRE LORS DE LA DESHYDRATATION

### 2.3.1. Variation du volume cellulaire lors de chocs hyperosmotiques

Lors de la déshydratation, le transfert d'eau du cytoplasme des cellules vers l'environnement conduit à des variations du volume des levures. Lors de notre étude, les

variations de volume ont été estimées par des analyses d'images réalisées en microscopie optique. Cette méthode permet de mesurer le volume délimité par la paroi des levures.

Les volumes cellulaires ont tout d'abord été mesurées après des chocs de différentes amplitudes jusqu'à 166 MPa (Figure 31). A 30 MPa, le volume atteint correspond environ à 62% du volume initial mesuré à 1,4 MPa. Au-delà de cette amplitude, le volume diminue à 50,3% du volume initial après un choc à 70 MPa puis ne varie que très peu pour les amplitudes de déshydratation supérieures : le volume après un choc à 166 MPa correspond à 51,5% du volume initial (Figure 31).

Le profil de variation de volume de la souche sauvage se divise en deux phases : une première phase correspondant à une décroissance exponentielle du volume cellulaire (entre 1,4 et 30 MPa) suivie d'une phase où le volume cellulaire évolue plus faiblement pour atteindre un plateau (entre 70 et 166 MPa). Ce type de profil est largement rapporté dans la bibliographie : la cellule se comporte comme un osmomètre dans une plage de déshydratation modérée pour atteindre un volume minimum. Ce volume minimum atteint lors de traitements hyperosmotiques sévères, correspond au rapprochement vers le volume cytosolique solide et est appelé le volume non-osmotique (VNO). Dans notre étude, ce volume est proche de 50% du volume initial. Cette valeur est en adéquation avec d'autres études rapportant un VNO compris entre 33% et 49% pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Meikle et al., 1988; Schaber et al., 2010).

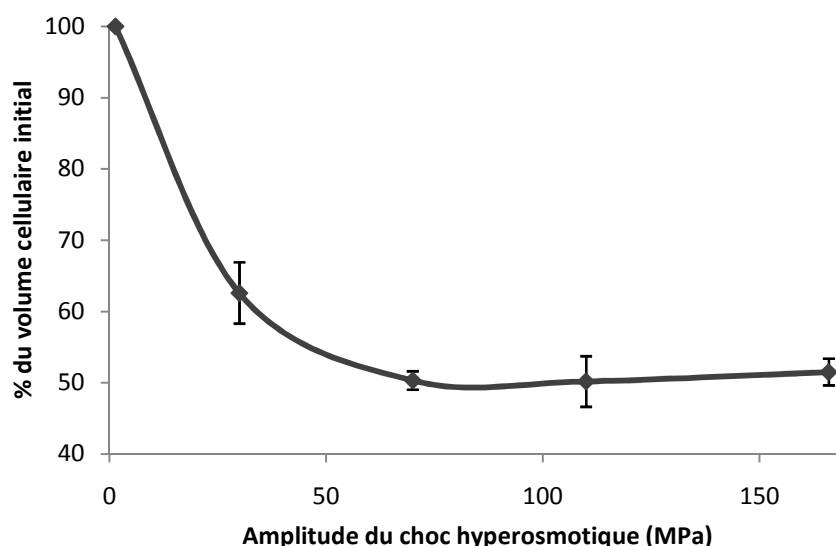


**Figure 31 : Variation du volume cellulaire des levures en fonction de l'amplitude des chocs hyperosmotiques.**

## 2.3.2. Excès de surface membranaire lors de la contraction volumique

La membrane plasmique présente un très faible taux de compressibilité latérale (Evans et al., 1976; Wolfe and Steponkus, 1981). Lors des variations volumiques engendrées par la déshydratation, il y a donc une augmentation du rapport surface/volume (S/V) de la levure et un excès de surface membranaire apparaît. Dans cette partie, nous avons calculé l'excès théorique de surface membranaire se produisant lors d'une contraction volumique avec conservation d'une forme sphérique des levures.

En assimilant les levures à des sphères de 4,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, nous avons pu calculer une surface initiale de membrane plasmique en posant l'hypothèse que cette surface est tendue. Connaissant les variations volumiques induites par les différents niveaux de déshydratation, nous avons pu calculer la surface de membrane nécessaire pour couvrir le volume atteint à chaque niveau de déshydratation et ainsi déduire la surface en excès en retranchant cette valeur à la surface membranaire estimée dans les conditions physiologiques. Les différentes informations sont regroupées dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : Excès de surface membranaire engendré par la contraction volumique pour maintenir une forme sphérique de la levure lors de la déshydratation**

| Pression osmotique (MPa) | Volume (% du volume initial) | Excès de surface (% de la surface initiale) | Excès de surface ( $\mu\text{m}^2$ ) |
|--------------------------|------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1,4                      | 100                          | 0                                           | 0                                    |
| 30                       | 62,6                         | 26,8                                        | 17,1                                 |
| 70                       | 50,3                         | 36,7                                        | 23,4                                 |
| 110                      | 50,1                         | 36,9                                        | 23,5                                 |
| 166                      | 51,5                         | 35,8                                        | 22,7                                 |

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que l'excès de surface membranaire théorique atteint une valeur supérieure au tiers de la surface initiale pour maintenir une forme sphérique de la levure lors de déshydratations sévères.

## 2.4. MORPHOLOGIE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE LORS D'UN CHOC HYPEROSMOTIQUE SEVERE

Compte tenu de la faible compressibilité des membranes biologiques, l'excès de surface membranaire important généré par la diminution du volume cellulaire doit se manifester par des déformations de la membrane plasmique. Afin d'appréhender ces déformations, des observations en microscopie électronique à transmission et en microscopie confocale ont été réalisées après des chocs hyperosmotiques sévères. L'observation de ces déformations pourrait apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes conduisant à la mort des cellules lors de déshydratations brutales.

### 2.4.1. Ultrastructure des levures après un choc hyperosmotique sévère

Les levures ont été observées en microscopie électronique à transmission immédiatement après un choc à 110 MPa (Figure 32). Le traitement n'a pas pu être réalisé à 166 MPa car la viscosité élevée de la solution interfère lors de la fixation des échantillons. Cependant, à 110 MPa, le taux de mortalité cellulaire est important (82,5%) (Tableau 7) et la contraction volumique est similaire à celle observée à 166 MPa (Figure 31). Ceci permet de penser que les mécanismes aboutissant à la mort des levures seront visibles à cette amplitude de déshydratation.

Dans les conditions physiologiques, la membrane plasmique des levures présente un aspect lisse et régulier avec quelques invaginations d'une profondeur d'environ 50 nm (Figure 32 A et B). Ces invaginations ont déjà été observées et localisées au niveau de microdomaines membranaires riches en ergostérol (Stradalova et al., 2009). Après un choc hyperosmotique à 110 MPa, l'aspect de la membrane plasmique est ondulé et des invaginations, différentes de celles présentes en conditions physiologiques, sont visibles. Ces invaginations sont plus profondes ( $\approx 200$  nm) que celles des cellules témoins et sont resserrées au niveau de leur base (Figure 32 C et D).

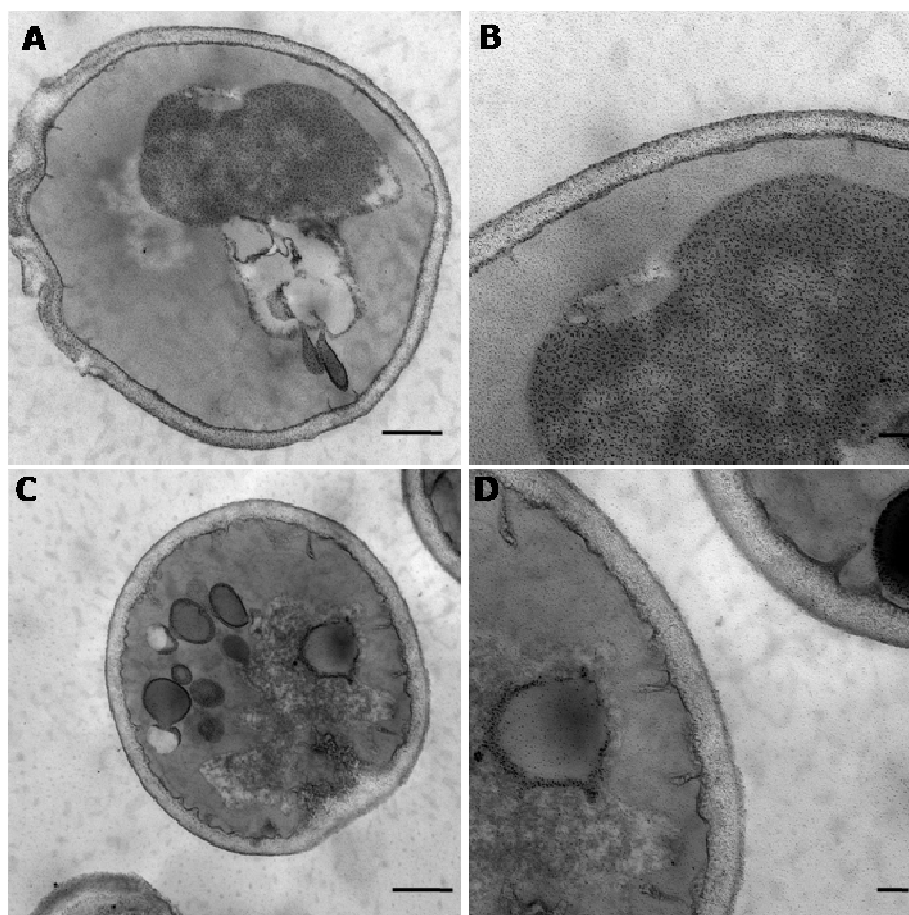


**Figure 32 :** Observation par microscopie électronique à transmission de l'impact d'un choc hyperosmotique à 110 MPa sur la morphologie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sauvage. Les photographies (A) et (B) correspondent au témoin dans les conditions physiologiques (1,4 MPa), (C) et (D) correspondent aux levures après un choc hyperosmotique à 110 MPa. Les barres d'échelle sont égales à 500 nm pour (A) et (C), et à 100 nm pour (B) et (D).

#### 2.4.2. Observation en microscopie confocale de l'évolution de la membrane plasmique au cours du temps de maintien après un choc hyperosmotique

L'effet de chocs hyperosmotiques à 30, 110 et 166 MPa sur la membrane plasmique a été observé par microscopie confocale avec un marquage membranaire par le FM 4-64 (Figure 33). Ces observations ont été réalisées à différents temps après les chocs hyperosmotiques (1, 10 et 60 min) afin d'évaluer l'évolution de la membrane plasmiques après les traitements.

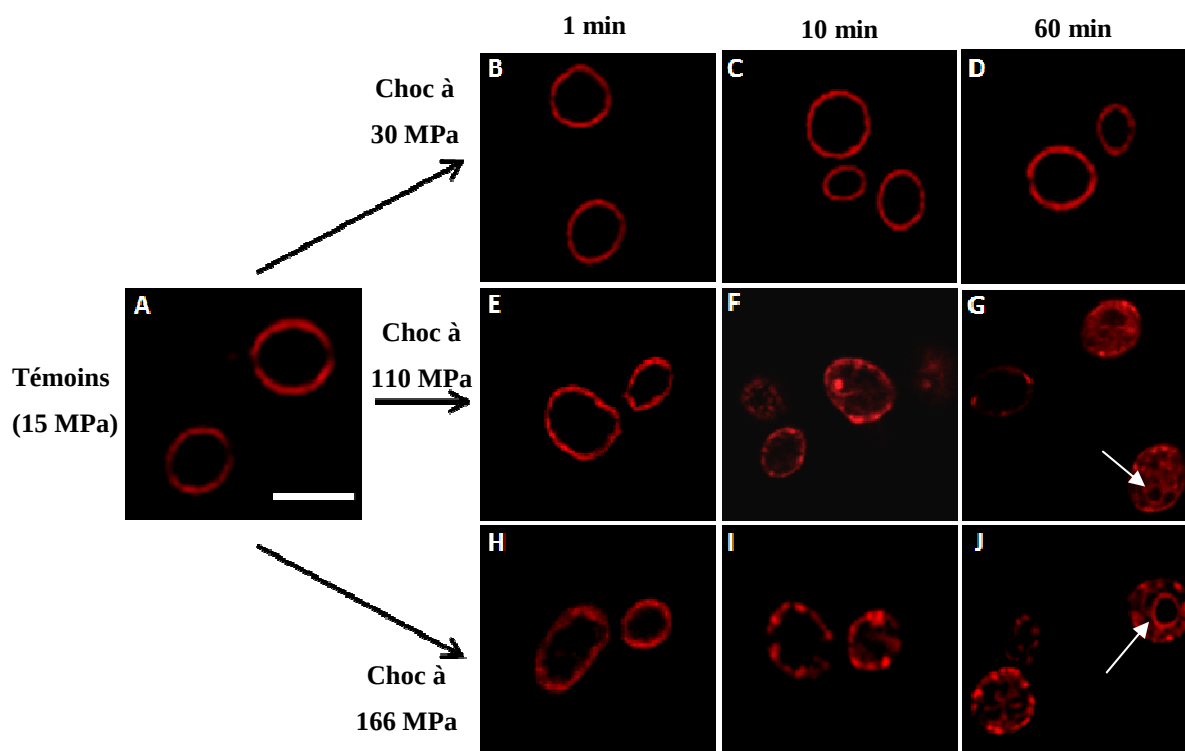


**Figure 33 : Observations de l'effet de chocs hyperosmotiques à 30, 110 et 166 MPa sur l'évolution du marquage membranaire par le FM 4-64 au cours du temps. Les observations ont été réalisées 1, 10 et 60 min après les chocs hyperosmotiques. Les flèches blanches montrent les membranes vacuolaires. Barre d'échelle = 5 $\mu$ m.**

Avant le marquage par le FM 4-64, les cellules sont placées à 15 MPa afin de stopper l'internalisation de sonde causée par l'endocytose (voir Matériel et Méthodes, section 3.2.2.1) et qui perturberait les observations des effets des traitements sur l'évolution du marquage membranaire. Ainsi, les cellules témoins pour cette manipulation sont des levures placées à 15 MPa (Figure 33 A) et présentent un marquage homogène de la membrane plasmique qui n'évolue pas au cours du temps.

Dans le cas d'un choc hyperosmotique modéré (30 MPa) qui affecte faiblement la viabilité, le marquage membranaire est similaire à celui des cellules témoins (Figure 33 B, C et D). Dans le cas de chocs de plus fortes amplitudes (110 et 166 MPa), les images réalisées 1 min après les traitements montrent un marquage qui reste essentiellement membranaire (Figure 33 E et H). En revanche, ce marquage évolue au cours du temps et une internalisation du FM 4-64, reflétant une internalisation membranaire, est observée pendant le temps de maintien dans les conditions hyperosmotiques. En effet, des spots de sonde sont observables au niveau intracellulaire près de la membrane plasmique 10 min après les chocs à 110 et 166 MPa (Figure

33 F et I) puis la sonde est internalisée plus profondément pour atteindre notamment la vacuole après 60 min de maintien dans les conditions hyperosmotiques (Figure 33 G et J).

## 2.5. DISCUSSION

L'objectif des travaux réalisés dans ce chapitre était de mettre en évidence les événements membranaires conduisant à la mort des levures lors de perturbations hydriques rapides (chocs). Pour cela, nous avons caractérisé les étapes critiques du cycle déshydratation/réhydratation en estimant l'intégrité membranaire à différents moments de ce cycle. En parallèle, nous avons observé les variations volumiques et les modifications morphologiques de la membrane plasmique induites par des chocs sur les levures.

Les mesures d'intégrité membranaire, réalisées à différents moments du cycle déshydratation/réhydratation, incluant un choc hyperosmotique sévère, ont permis d'associer la mort des levures à une perte d'intégrité de la membrane plasmique qui intervient lors de l'étape de déshydratation ou lors de la réhydratation. Lors d'un choc hyperosmotique de forte amplitude (166 MPa), la perméabilisation de la membrane plasmique se produit principalement pendant la phase de réhydratation bien qu'une partie de la population de levures ( $\approx 32\%$ ) est perméabilisée pendant la déshydratation. Ainsi, les deux étapes du cycle déshydratation/réhydratation peuvent être critiques pour l'intégrité de la membrane plasmique et donc pour la survie de la levure. Les événements membranaires conduisant à la perméabilisation de la membrane plasmique sont décrits dans les deux paragraphes suivants et schématisés dans la Figure 34.

### 2.5.1. Perméabilisation membranaire pendant l'étape de déshydratation

Lors de la réalisation de chocs hyperosmotiques, il se produit une rapide sortie d'eau intracellulaire vers le milieu extracellulaire conduisant à l'équilibre entre les pressions osmotiques interne et externe. Cette sortie d'eau provoque la diminution rapide du volume des levures. Il a été montré que le volume des levures pouvait diminuer de 60% en quelques millisecondes lors de chocs hyperosmotiques (Gervais and Beney, 2001). En accord avec ce résultat, la mesure du volume cellulaire réalisée lors de cette étude a révélé que le volume des levures non perméabilisées atteignait environ 50% du volume initial pour les chocs hyperosmotiques à 166 MPa (Figure 31). Ceci conduit à une augmentation importante du rapport S/V des cellules et à la déformation de la membrane plasmique. En plus des effets mécaniques

sur la membrane plasmique, les perturbations hyperosmotiques de fortes amplitudes influent sur l'organisation structurale de la membrane. En effet, il a été montré que les lipides de la membrane plasmique des levures subissent une transition de phase (phase liquide désordonnée vers phase liquide ordonnée) lors de la déshydratation. Cette transition se produit à partir de 60 MPa chez la levure lors de perturbations osmotiques réalisées avec du glycérol (Laroche et al., 2005) et est connue pour affecter la résistance de la membrane aux forces de cisaillement (Garcia-Manyes et al., 2005). La conjonction de ces événements peut expliquer la perméabilisation de la membrane plasmique qui intervient pendant la phase de déshydratation en choc à 166 MPa pour une partie de la population de levures.

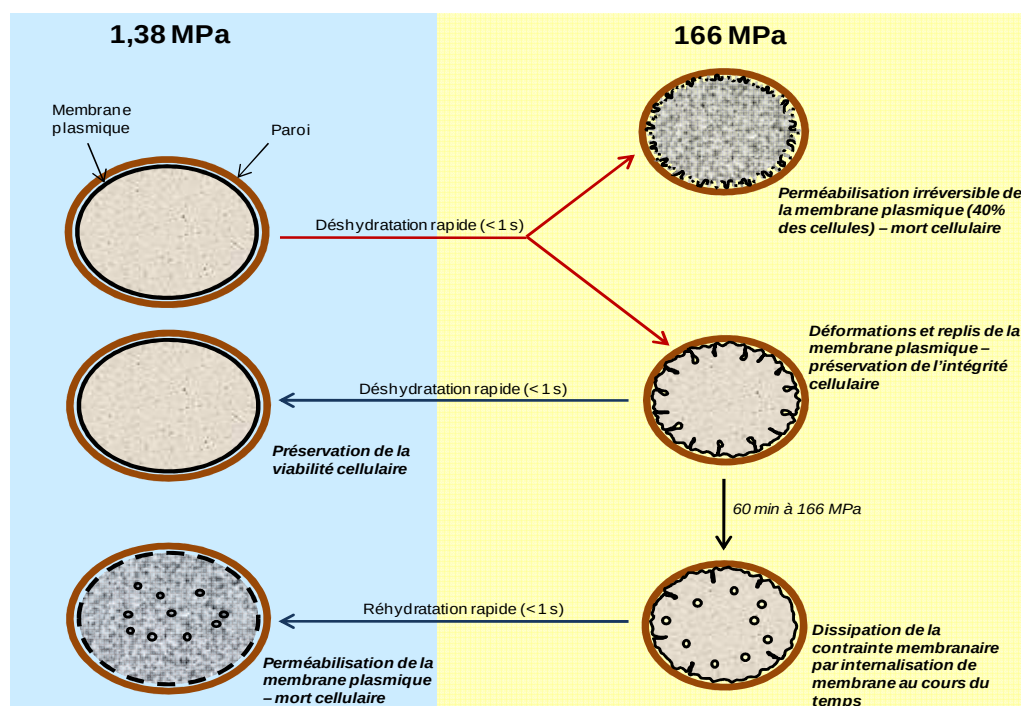


**Figure 34 : Schéma des événements membranaires conduisant à la perte de l'intégrité membranaire de la souche sauvage de levures lors d'une déshydratation à 166 MPa réalisée brutalement suivie d'une réhydratation rapide.**

### 2.5.2. Perméabilisation membranaire pendant l'étape de réhydratation

La réhydratation est une étape critique pour l'intégrité de la membrane plasmique après un choc à 166 MPa suivi d'un maintien de 60 min dans l'état déshydraté. Ce phénomène peut s'expliquer par le manque de surface membranaire conduisant à la rupture de la membrane plasmique lors du gonflement cellulaire causé par la réhydratation. Ainsi, les cellules ne peuvent retrouver leur volume initial. De précédentes études ont montré que la surface membranaire de bactéries pouvait être réduite par formation de vésicules internes après un traitement

hyperosmotique (Schwarz and Koch, 1995; Mille et al., 2002). Après un choc à 166 MPa, la déformation particulière de la membrane plasmique des levures conduit à l'internalisation de membrane pendant le temps de maintien dans les conditions hyperosmotiques. L'internalisation membranaire pourrait être la cause de la diminution de surface et expliquer la perméabilisation à la réhydratation qui suit un choc à 166 MPa. Ce scénario est confirmé par l'observation d'une survie des levures plus importante lorsque le temps de maintien après le choc hyperosmotique est court. En effet, la diminution de surface de la membrane plasmique due à l'internalisation membranaire nécessite du temps. Ceci permettrait d'expliquer la raison pour laquelle les levures peuvent être réhydratées sans perdre leur intégrité pour des temps de maintien courts (1 et 2 min) (Figure 29).

**Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis d'identifier des mécanismes membranaires conduisant à la perte d'intégrité de la membrane plasmique lors de perturbations hydriques brutales. Ces mécanismes sont principalement basés sur les contraintes mécaniques que subit la membrane lors des variations brutales du volume cellulaire. Ces contraintes sont à l'origine de l'internalisation de membrane plasmique pendant le maintien des cellules dans l'état déshydraté conduisant à une perméabilisation membranaire lors de la réhydratation. Ainsi, il a été mis en évidence qu'il existe un lien entre les deux étapes des traitements hydriques (déshydratation et réhydratation). Ces deux étapes transitoires sont critiques pour le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. L'ensemble de ces résultats étaye l'hypothèse largement admise que la membrane plasmique des levures est une structure cible des perturbations hydriques.**

### **3. EVOLUTION STRUCTURALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE EN LIEN AVEC LA SURVIE CELLULAIRE LORS D'UNE DESHYDRATATION PROGRESSIVE**

La cinétique de déshydratation est connue pour être un paramètre influençant la survie des microorganismes (Gervais and Marechal, 1994; Mille et al., 2005b). Cet effet a également été observé sur la souche de levures utilisée dans ce travail puisque les levures déshydratées progressivement présentent des taux de survie supérieurs à ceux obtenus lors de traitements brutaux (Tableau 7). Le lien entre la cinétique de déshydratation et la survie des cellules n'est cependant pas encore élucidé et mérite donc d'être investigué. Ce chapitre traite de l'effet de la cinétique de perturbation osmotique sur l'évolution structurale et morphologique de la membrane plasmique. Le but est de comprendre le mécanisme permettant aux levures de subir des déshydratations jusqu'à des niveaux sévères tout en préservant leur intégrité membranaire. Pour cela, nous avons réalisé une étude comparative entre l'effet de traitements brutaux (chocs) et de traitements progressifs (rampes) sur l'état structural (déformation, distribution latérale de microdomaines riches en ergostérol) et fonctionnel (intégrité) de la membrane plasmique des levures. Un schéma hypothétique des événements membranaires se déroulant lors des perturbations progressives a été ensuite proposé.

#### **3.1. PRESERVATION DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE LORS DES PERTURBATIONS PROGRESSIVES**

La première manipulation réalisée dans cette partie a consisté à observer l'évolution de l'intégrité membranaire de levures au cours d'un cycle hydrique composé d'une déshydratation jusqu'à un niveau sévère (166 MPa) suivi d'un maintien dans les conditions hyperosmotiques puis d'une réhydratation rapide jusqu'à 1,4 MPa. La déshydratation a été réalisée progressivement (rampe d'une vitesse de  $0,086 \text{ MPa.s}^{-1}$ ) ou brutalement (choc d'une vitesse d'environ  $200 \text{ MPa.s}^{-1}$ ) afin d'observer l'effet de la vitesse de déshydratation sur la perméabilité membranaire des levures. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 35.

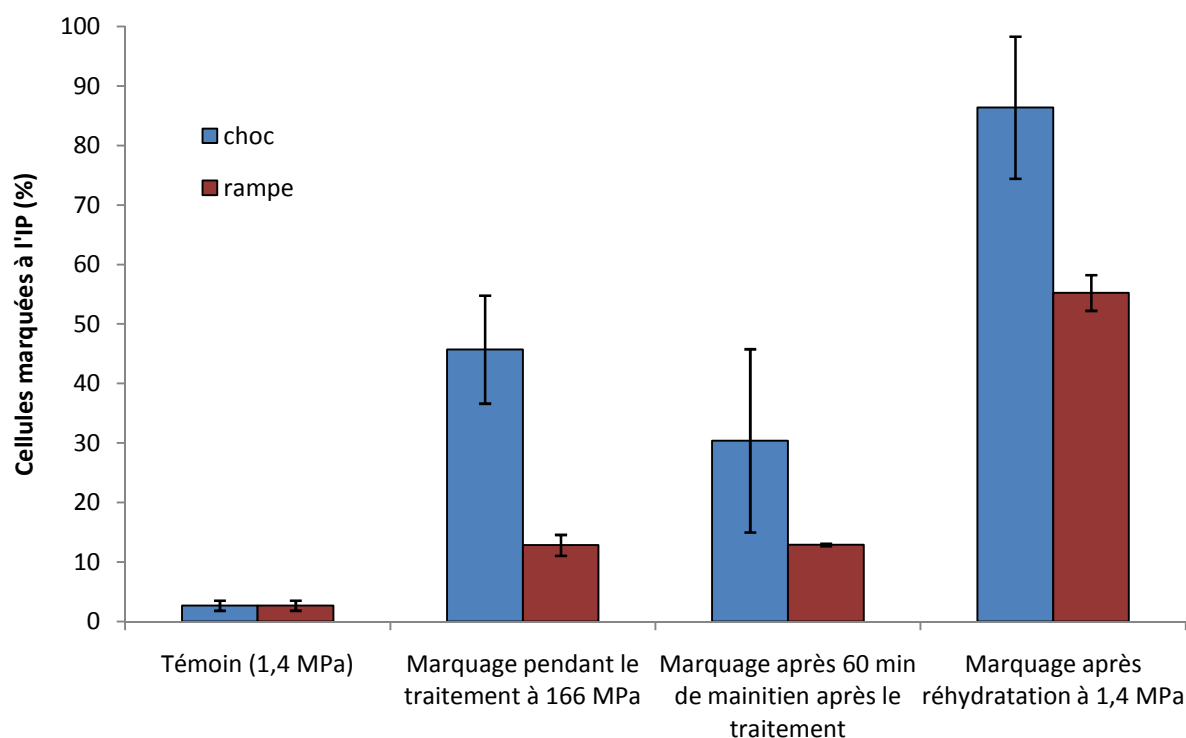


**Figure 35 :** Evolution de l'intégrité de la membrane plasmique des levures au cours d'un cycle composé d'une déshydratation progressive ou brutale à 166 MPa suivie d'une heure de maintien dans les conditions hyperosmotiques puis d'une réhydratation brutale à 1,4 MPa. L'intégrité membranaire a été estimée par des marquages à l'iodure de propidium réalisés à différents moments du cycle déshydratation/réhydratation (voir Figure 22).

Pour observer l'évolution de la perméabilité membranaire induite par le traitement hyperosmotique (choc ou rampe), l'iodure de propidium est présent dans la solution hyperosmotique utilisée pour la déshydratation et l'observation du marquage est réalisée immédiatement après la fin du traitement. Après la rampe à 166 MPa, la proportion de cellules perméabilisées est d'environ 10% alors qu'elle atteint 45% après un choc à cette même amplitude. Ce résultat montre qu'une déshydratation brutale déstabilise de manière plus importante la membrane plasmique qu'une déshydratation progressive. L'effet du temps de maintien dans les conditions hyperosmotiques après une rampe ou un choc sur l'évolution de l'intégrité de la membrane plasmique a également été apprécié par un marquage 60 min après la fin des traitements à 166 MPa. Bien que la proportion de cellules perméabilisées diminue légèrement au cours du temps de maintien après le choc, les résultats obtenus ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec le marquage réalisé pendant les perturbations. Ceci suggère que la membrane est déstabilisée pendant la phase transitoire de déshydratation et que son intégrité n'est pas affectée pendant le maintien après un choc ou une rampe. La réhydratation brutale après les deux cinétiques de déshydratation engendre une augmentation de la proportion de cellules perméabilisées jusqu'à 50% et 85% respectivement après une rampe et

un choc à 166 MPa. Ceci indique que la réhydratation brutale affecte la membrane plasmique après une rampe ou un choc.

### 3.2. DEFORMATIONS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Il a été observé que le volume des levures atteint après une rampe ou un choc hyperosmotiques est le même pour une amplitude de déshydratation donnée et ainsi, que la cinétique de déshydratation n'influe pas sur la variation de volume engendrée par le traitement (Gervais and Marechal, 1994). De par sa faible compressibilité latérale, la membrane plasmique devrait donc subir des déformations lors de la diminution volumique engendrée par la déshydratation. Afin d'observer l'évolution morphologique de la membrane, des observations ont été réalisées en microscopie confocale et en microscopie électronique à transmission après des rampes hyperosmotiques. Ces observations seront comparées aux observations réalisées après des chocs hyperosmotiques.

#### 3.2.1. Observation en microscopie confocale

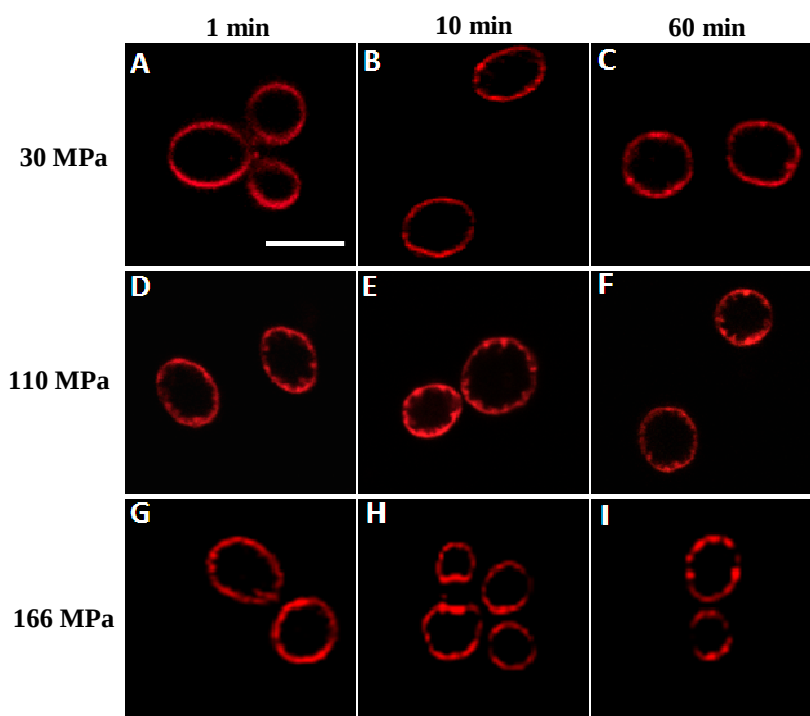


**Figure 36 : Observations de l'effet de rampes hyperosmotiques à 30, 110 et 166 MPa sur l'évolution du marquage membranaire par le FM 4-64 au cours du temps. Les observations ont été réalisées 1, 10 et 60 min après les chocs hyperosmotiques. Barre d'échelle = 5  $\mu$ m.**

Après marquage de la membrane plasmique par le FM 4-64, les levures ont été observées au cours du temps après des rampes hyperosmotiques de différentes amplitudes (Figure 36).

Après une rampe hyperosmotique à 30 MPa, l'aspect du marquage membranaire n'évolue pas au cours du temps (Figure 36 A, B et C) et est similaire à celui de cellules témoins (Figure 33 A). Après des rampes hyperosmotiques de plus fortes amplitudes (110 et 166 MPa), le marquage par le FM 4-64 est moins régulier et des spots de sonde sont observables sur la membrane plasmique. Ces spots sont observables dès la fin des rampes hyperosmotiques (Figure 36 D et G) et le marquage n'évolue pas au cours du temps de maintien (Figure 36 E, F, H et I). Contrairement à l'effet des chocs osmotiques réalisés à 110 et 166 MPa (Figure 33), il n'y pas d'internalisation de membrane plasmique au cours du temps de maintien après déshydratation progressive à ces faibles niveaux d'hydratation.

### 3.2.2. Observation en microscopie électronique à transmission

Afin d'observer plus finement l'évolution de la membrane plasmique au cours de rampes hyperosmotiques, des observations de levures en microscopie électronique à transmission ont été réalisées après une rampe à 110 MPa (Figure 37). Ces observations montrent que la membrane plasmique forme quelques gros replis se recourbant vers la membrane. Ces déformations sont très différentes de celles observées après un choc de même amplitude : les invaginations formées après une rampe sont moins nombreuses mais plus profondes en comparaison à celles induites par un choc et elles ne présentent pas de resserrement au niveau de leur base.

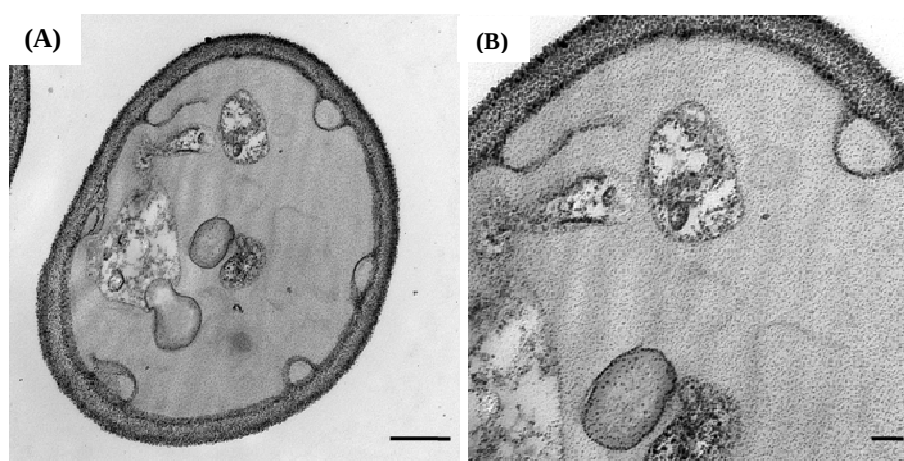


**Figure 37: Observation en microscopie électronique à transmission des levures sauvages après une rampe hyperosmotique jusqu'à 110 MPa. La fixation des levures a été réalisée à la fin de la rampe. La barre d'échelle est égale à 500 nm pour (A) et à 100 nm pour (B).**

### 3.3. REDISTRIBUTION LATÉRALE DE PROTEINES MEMBRANAIRES

Nous avons donc pu observer que la cinétique de déshydratation conditionne le type de déformations induit au niveau de la membrane plasmique lors de la contraction volumique des levures. Une hypothèse pouvant expliquer la différence de comportement membranaire lors d'une rampe ou d'un choc est que la rampe, de par sa durée (environ 30 min pour atteindre 166 MPa), pourrait permettre une réorganisation latérale des composants membranaires aboutissant à la déformation particulière de la membrane plasmique. Afin de vérifier cette hypothèse, l'effet de la cinétique de déshydratation sur la distribution d'une protéine localisée dans des microdomaines membranaires a été observé. Pour cela, nous avons greffé une protéine fluorescente GFP sur la protéine Sur7 décrite pour être positionnée exclusivement dans les microdomaines riches en ergostérol (Grossmann et al., 2007).

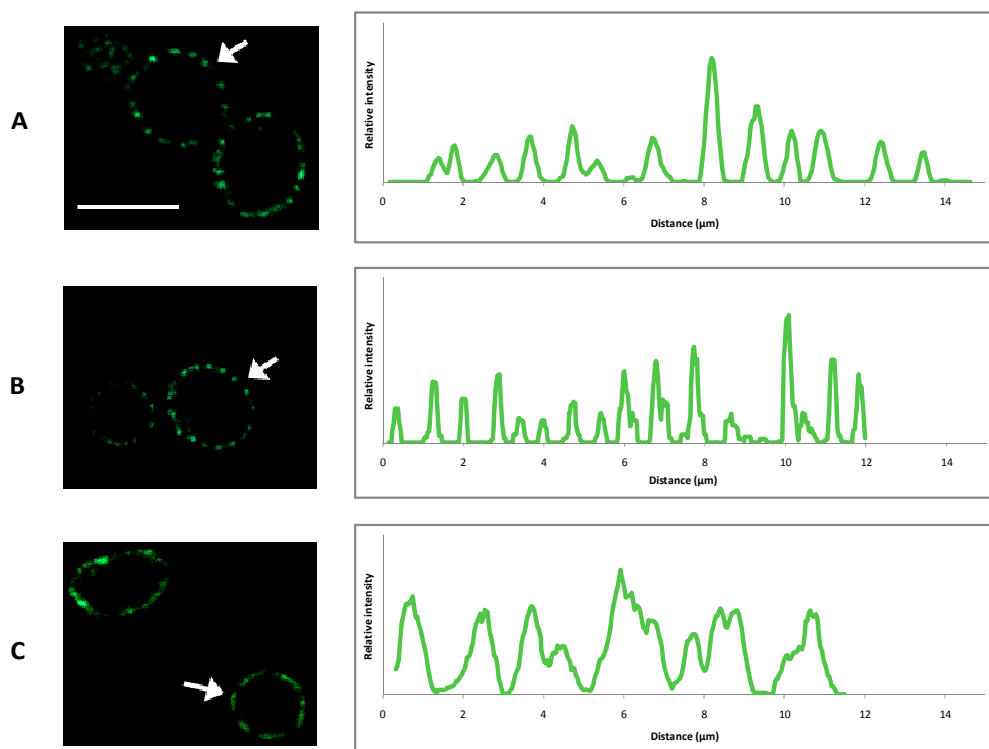


**Figure 38: Impact de la cinétique de déshydratation à 166 MPa sur la répartition des domaines membranaires Sur7-GFP de la levure *S. cerevisiae* observée en microscopie confocale. (A) levures témoins, (B) levures après déshydratation en choc à 166 MPa, et (C) levures après déshydratation progressive à 166 MPa. Sur la gauche de la figure, coupes optiques médianes de levures. Sur la droite, profils représentatifs d'intensité de fluorescence mesurés sur une coupe confocale médiane de levure. Chaque profil correspond à la levure indiquée par la flèche blanche. Un seuillage moyen a été appliqué sur les courbes obtenues pour réduire le bruit présent dans les données brutes et les courbes ont été normalisées à la même valeur maximale. Barre d'échelle = 5 µm.**

Dans les conditions physiologiques, l'observation en microscopie confocale de coupes médianes de levures révèle que la protéine Sur7 n'est pas répartie homogènement sur l'ensemble

de la membrane plasmique mais est distribuée en microdomaines (Figure 38 A) comme précédemment observé dans d'autres études (Young et al., 2002; Grossmann et al., 2007). L'analyse de profils d'intensité de fluorescence réalisés sur 20 coupes médianes de levures permet d'estimer un nombre moyen de 11 microdomaines par coupe de levure avec une taille moyenne d'environ 500 nm (Tableau 9). Cette taille est légèrement supérieure à celle estimée dans d'autres études ( $\approx 300$  nm) (Malinska et al., 2003). Cette différence peut provenir du seuil utilisé pour limiter l'observation de la diffusion de fluorescence de la GFP ainsi que du microscope et des objectifs utilisés.

Après un choc hyperosmotique à 166 MPa, la distribution en patches de la protéine Sur7 est toujours observable (Figure 38 B). Le nombre de domaine n'est pas modifié mais ces patches sont cependant légèrement plus petits (Tableau 9). Après une rampe hyperosmotique jusqu'à ce même niveau de déshydratation, la répartition de cette protéine est modifiée : la protéine est localisée dans des domaines membranaires plus grands et moins nombreux (Figure 38 C). En effet, l'analyse des profils d'intensité de fluorescence montre que le nombre moyen de domaine est réduit à environ 6 avec une taille moyenne de 1,1  $\mu\text{m}$  (Tableau 9). Cette observation suggère que la déshydratation progressive conduit à une réorganisation latérale de la protéine Sur7 et plus généralement, à une réorganisation des composants membranaires qui n'intervient pas lors d'une déshydratation brutale.

**Tableau 9: Impact de la cinétique de déshydratation à 166 MPa sur le nombre et la taille des microdomaines contenant la protéine Sur7-GFP.**

|                       | Nombre moyen de domaines observés<br>par coupe médiane de cellule | Taille moyenne des<br>domaines ( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Témoin 1,4 MPa</b> | 11,0 (0,6)                                                        | 0,56 (0,05)                                      |
| <b>Choc 166 MPa</b>   | 11,0 (1,6)                                                        | 0,49 (0,02)                                      |
| <b>Rampe 166 MPa</b>  | 6,3 (0,8)                                                         | 1,13 (0,24)                                      |

Les écarts types ont été calculés à partir de l'observation de coupes confocales médianes réalisées sur 20 levures.

La distribution de la protéine Sur7-GFP a également été étudiée après réhydratation. Deux conditions ont été testées : la première consistait en une réhydratation brutale après une déshydratation brutale et la seconde en une déshydratation progressive suivie d'une réhydratation progressive. Ces conditions ont été choisies car la première conduit à viabilité très faible tandis

que la seconde aboutit à un taux de survie important. Ainsi, la comparaison de l'évolution de la répartition de la protéine Sur7 entre un cycle conduisant à la mort et un à la survie des cellules sera possible. Les résultats sont présentés dans la Figure 39.

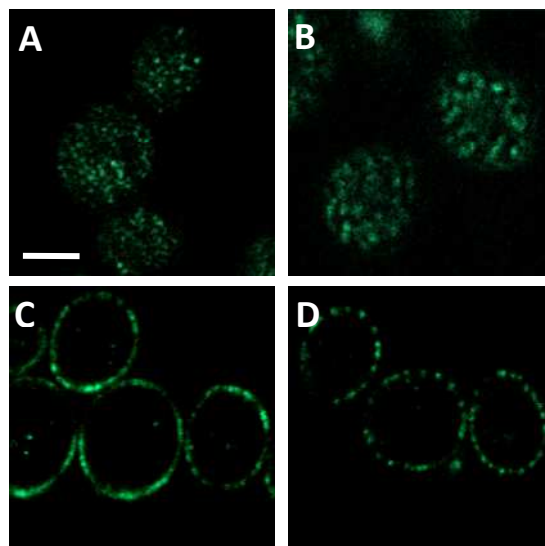


**Figure 39: Observation de la répartition de fluorescence de la protéine Sur7-GFP après réhydratation. (A) et (B) correspondent à des levures ayant subi un choc à 166 MPa suivi d'un maintien de 60 min à cette amplitude avant d'être réhydratées brutalement à 1,4 MPa. (C) et (D) correspondent à des levures ayant subi une rampe à 166 MPa suivie d'un maintien de 60 min à cette amplitude avant d'être réhydratées progressivement. (A) et (C) ont été observées juste après réhydratation tandis que (B) et (D) ont été observées 90 min après retour à 1,4 MPa. Barre d'échelle = 5  $\mu$ m.**

Après le choc hyperosmotique à 166 MPa suivi d'une réhydratation brutale à 1,4 MPa, la protéine Sur7 perd sa localisation purement membranaire pour être observable au niveau cytosolique. Ce marquage n'évolue pas au cours du temps. Cette localisation aberrante de la protéine pourrait être le reflet de la lyse des levures qui intervient lors de la réhydratation après une déshydratation en choc. Après la réhydratation progressive réalisée après une rampe de déshydratation jusqu'à 166 MPa, la protéine Sur7-GFP reste localisée dans la membrane plasmique mais ne retrouve pas immédiatement la distribution de la protéine observée sur les cellules témoins à l'état physiologique. Juste après la réhydratation en rampe, la protéine est présente dans de larges domaines mais retrouve une distribution équivalente à celle des cellules témoins au cours du temps. Ce résultat suggère que la reformation des microdomaines intervient après la réhydratation et nécessite du temps. Le mécanisme n'est pas élucidé mais une hypothèse possible serait que des phénomènes actifs pourraient être impliqués dans la reformation de ces domaines. Des investigations complémentaires devront être menées afin de mieux comprendre ce mécanisme.

### 3.4. DISCUSSION

Dans ce chapitre de la thèse, nous avons cherché à comprendre comment la cinétique de déshydratation pouvait influencer sur la survie de la levure lors de traitements hydriques sévères. Les manipulations ont porté sur l'évolution de la membrane plasmique lors de déshydratations réalisées en rampe. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus lors de chocs hydriques létaux afin de comprendre comment l'intégrité de la membrane plasmique est préservée au cours d'une déshydratation progressive.

Dans le cas des chocs hyperosmotiques, une des causes majeures de la perméabilisation de la membrane plasmique est la diminution de surface membranaire, causée par l'internalisation de membrane, conduisant à la lyse des cellules lors de la réhydratation. Les observations réalisées en microscopie confocale ont montré que la surface membranaire est maintenue après une rampe hyperosmotique. Ce maintien de la surface permet d'expliquer le maintien de l'intégrité de la membrane lors de la réhydratation après une rampe (Figure 40). La cinétique de réhydratation est également un paramètre crucial puisque la viabilité est également dépendante de la vitesse de réhydratation. La réhydratation progressive permet d'obtenir des taux de survie plus importants que la réhydratation brutale. Ainsi, le retour à une membrane tendue à partir de la membrane présentant des replis se réalise de manière optimale lorsque la réhydratation, et donc le retour au volume initial, sont progressifs.

Contrairement aux petits replis étroits observés lors des chocs hyperosmotiques (Figure 32), la déformation particulière de la membrane plasmique en larges replis au cours de traitements progressifs (Figure 37) permet une diminution du volume des levures sans perte de surface. La déformation différente de la membrane se produisant pendant les rampes pourrait trouver son origine dans la réorganisation latérale des composants membranaires. Cet événement a été mis en évidence dans notre étude par la redistribution de la protéine Sur7-GFP qui n'intervient seulement que dans le cas des rampes hyperosmotiques (Figure 38). Lors de perturbations hyperosmotiques, les lipides membranaires subissent des transitions de phases d'une phase liquide désordonnée vers une phase liquide ordonnée. Cette transition se déroule entre 60 MPa et 130 MPa chez la levure lors de perturbations osmotiques réalisées avec du glycérol (Laroche et al., 2001). La transition progressive entre ces deux états structuraux pourrait expliquer une réorganisation latérale de l'ensemble des composants membranaires lors du phénomène de séparation de phase et donc être la cause des déformations de la membrane observées lors de la rampe hyperosmotique.

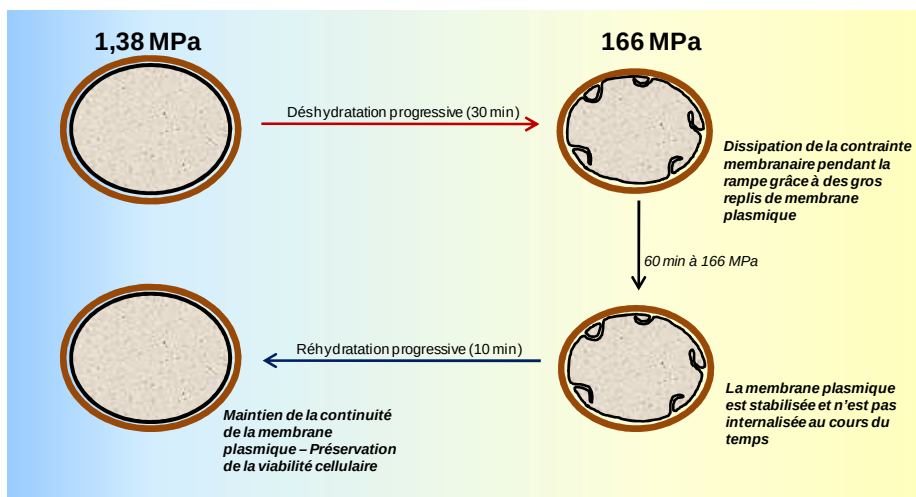


**Figure 40 : Schéma des événements membranaires conduisant au maintien de l'intégrité membranaire lors d'une déshydratation à 166 MPa réalisée progressivement.**

L'étude réalisée dans cette partie de notre travail montre pour la première fois que la cinétique d'une perturbation conditionne l'évolution structurale de la membrane plasmique. Dans le cas des déshydratations progressives, la réorganisation latérale des composants membranaires permet d'aboutir à des déformations particulières de la membrane plasmique associées à un maintien de la surface membranaire. Ces événements sont à l'origine du maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et de l'effet bénéfique des cinétiques progressives de déshydratation sur la survie des levures.

#### 4. LIEN ENTRE RESISTANCE AU STRESS HYPEROSMOTIQUE ET NATURE DES STEROLS MEMBRANAIRES

La composition lipidique de la membrane plasmique est un facteur pouvant influencer la tolérance et la résistance des levures aux perturbations environnementales : par exemple, la nature des phospholipides polaires module la résistance à différents stress tels que la congélation, la présence d'éthanol ou bien encore le froid (Calcott and Rose, 1982; You et al., 2003; Rodriguez-Vargas et al., 2007). Ce lien entre nature des phospholipides et résistance est dû à l'impact des phospholipides sur les propriétés physiques de la membrane plasmique. Les stérols sont les lipides majoritaires des membranes eucaryotes et l'une de leur fonction est de stabiliser la membrane plasmique lors de perturbations environnementales. Pourtant, peu d'études se sont intéressées à l'impact de la nature des stérols sur la résistance aux perturbations hydriques. Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de la nature des stérols membranaires sur la survie des levures lors d'un stress hyperosmotique. Chez la levure, le stérol principalement accumulé est l'ergostérol. Afin de pouvoir estimer l'impact de la nature des stérols sur la survie à la déshydratation, nous avons comparé la résistance de la souche sauvage de levure avec le mutant  $\Delta erg6$ . Ce mutant accumule principalement deux autres stérols que celui présent chez la souche sauvage : le zymostérol et le cholesta-5, 7, 24-trienol (Zinser et al., 1993; Munn et al., 1999).

##### 4.1. IMPACT DE LA NATURE DES STEROLS SUR LA RESISTANCE AUX CHocs HYPEROSMOTIQUES

La déshydratation des souches de levures sauvage et mutante  $\Delta erg6$  a été réalisée rapidement (chocs hyperosmotiques) grâce à des solutions binaires d'eau-glycérol jusqu'à 30 ou 166 MPa. Les résultats concernant les taux de survie obtenus pour les deux souches sont consignés dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Effet de la mutation  $\Delta erg6$  sur la survie de *S. cerevisiae* lors de déshydratations brutales.**

|         | <i>Wild Type</i> | <i><math>\Delta erg6</math></i> |
|---------|------------------|---------------------------------|
| 1,4 MPa | 100%             | 100%                            |
| 30 MPa  | 83,50% (2,5)     | 3,3% (1,6)                      |
| 166 MPa | 0,35% (0,18)     | 0,011% (0,003)                  |

Après une déshydratation en choc jusqu'à 30 MPa, la souche mutante présente une viabilité de 3,3% tandis que la souche sauvage conserve une viabilité importante de l'ordre de 80%. Pour les chocs sévères (166 MPa), la survie des levures est faible et les valeurs de viabilité obtenues sont de 0,35% et de 0,011% respectivement pour la souche sauvage et la souche  $\Delta erg6$ . Bien que ces taux de survie soient faibles pour les deux souches, la souche sauvage est de nouveau plus résistante que la souche mutante. Ces résultats suggèrent donc qu'une mutation au niveau d'une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol influe sur la viabilité de la levure lors d'un choc hyperosmotique. Cette sensibilité de la souche mutante s'observe même à 30 MPa qui correspond à un niveau modéré de déshydratation.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'hypersensibilité de la souche  $\Delta erg6$  est la modification des propriétés de la membrane plasmique causée par le changement de la nature des stérols membranaires. Cependant, afin de vérifier que cette hypersensibilité n'est pas un effet secondaire de la mutation, nous avons regardé si l'incorporation d'ergostérol dans la souche mutante permettait de retrouver une sensibilité normale lors de chocs hyperosmotiques jusqu'à 30 MPa (Figure 41). Avec une supplémentation du milieu en ergostérol lors de la croissance aérobie des levures, les taux de survie ne sont pas modifiés et sont respectivement de 80% et de 3% pour la souche sauvage et la souche mutante. Ce résultat s'explique par le phénomène d'exclusion des stérols en aérobie (« aerobic sterol exclusion ») : en condition de croissance aérobie, les levures synthétisent des stérols et n'incorporent pas de stérols exogènes (Lorenz and Parks, 1991). En revanche, la croissance des levures en anaérobie permet l'incorporation de stérols exogènes dans les cellules car les levures sont incapables de les fabriquer en absence d'oxygène et deviennent auxotrophes pour ces molécules. Après croissance anaérobie en présence d'ergostérol dans le milieu de culture (250  $\mu$ M), la viabilité des souches sauvages et mutantes sont proches de 66% après le choc à 30 MPa.

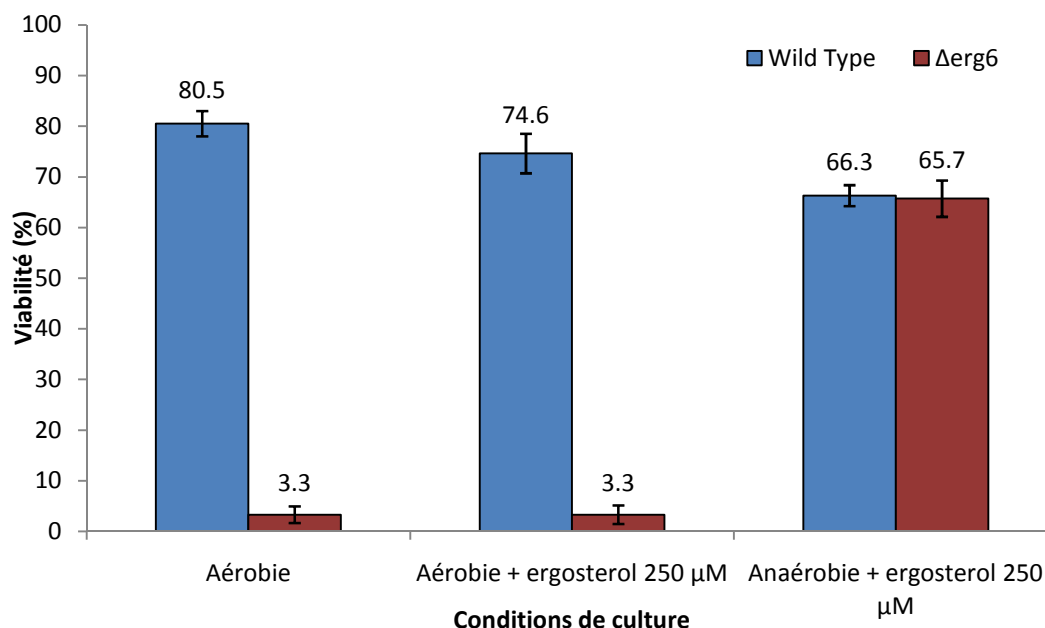


**Figure 41 : Effet de la supplémentation du milieu en ergostérol lors de la croissance des levures (aérobie ou anaérobie) sur leur résistance à un choc hyperosmotique à 30 MPa.**

Afin de vérifier que l'effet observé sur la viabilité est bien la conséquence de l'incorporation d'ergostérol dans les levures, nous avons réalisé des analyses qualitatives et quantitatives des stérols libres cellulaires (Figure 42).

En condition de croissance aérobie, la souche sauvage accumule majoritairement de l'ergostérol et quelques uns de ses précurseurs en quantités mineures (squalène, lanostérol, zymostérol, and ergosta-5,7) alors que la souche  $\Delta erg6$  accumule principalement du zymostérol et du cholesta-5, 7, 24-trienol (Figure 42), en accord avec de précédentes études (Munn et al., 1999) (Figure 20). Par contre, lors de croissance anaérobie en présence d'ergostérol, les profils de composition en stérols deviennent très similaires pour les deux souches : elles accumulent majoritairement de l'ergostérol à un niveau proche de celui observé pour la souche sauvage en condition aérobie. Une accumulation de squalènes est également observée pour les deux souches en anaérobie. Ce résultat n'est pas surprenant car l'époxydation du squalène, qui est l'étape de transformation du squalène dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, nécessite de l'oxygène (Jahnke and Klein, 1983). Ces résultats révèlent que la résistance aux chocs hyperosmotiques est liée à la présence d'ergostérol cellulaire puisque les levures qui poussent dans des conditions leur permettant d'accumuler de l'ergostérol (anaérobie pour  $\Delta erg6$  ; aérobie et anaérobie pour la souche sauvage) sont résistantes à un choc hyperosmotique à 30 MPa.

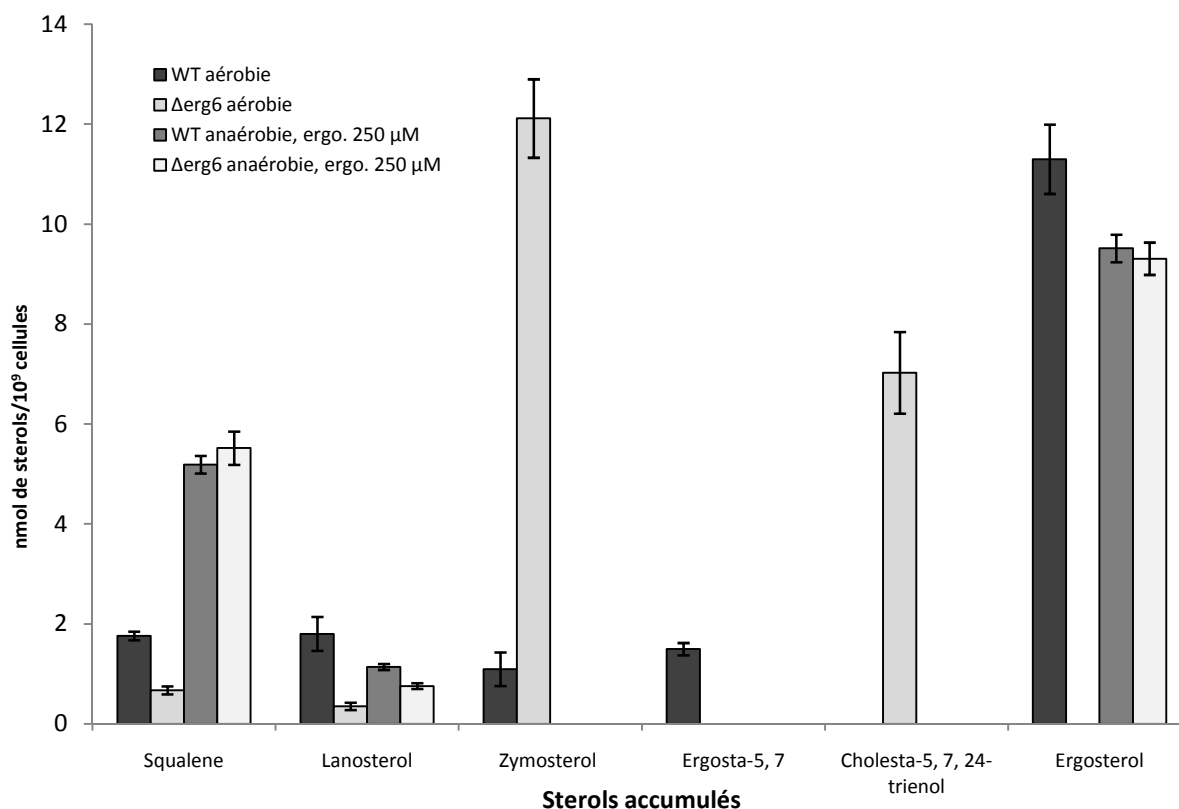


**Figure 42 : Composition en stérols des levures sauvages et *Δerg6* en fonction des conditions de culture.** Après une extraction des lipides, les quantités de stérols sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse et en utilisant le cholestérol comme standard d'identification et de quantification. Les stérols sont présents le long de l'axe des abscisses en fonction de leur ordre d'apparition dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, à l'exception du cholesta-5, 7, 24-trienol. Ce stérol, qui a une structure proche de l'ergostérol, est un sous-produit accumulé dans la souche *Δerg6*.

L'ensemble de ces résultats suggère que la résistance de la levure aux perturbations osmotiques est directement liée à la nature des stérols et que l'ergostérol est une molécule clé dans la survie aux traitements hydriques.

## 4.2. EVOLUTION DE L'INTEGRITE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE AU COURS DE CYCLES DESHYDRATATION/REHYDRATATION

### 4.2.1. Etape de déshydratation

L'impact de l'étape de déshydratation a été estimé par la mesure de la perméabilité membranaire après des chocs hyperosmotiques allant de 30 MPa à 166 MPa (Figure 43).

Sans traitement hydrique, les deux souches présentent une très faible proportion de cellules perméabilisées proche de 2%. Concernant la souche sauvage, les chocs hyperosmotiques de 30 et 70 MPa affectent faiblement l'intégrité membranaire. Au-delà de cette plage de déshydratation, la proportion de cellules perméabilisées augmente pour atteindre environ 26% et

32% pour les traitements de 110 et 166 MPa, respectivement. L'évolution de la perméabilité de la souche  $\Delta erg6$  en fonction de l'amplitude de déshydratation est différente : le nombre de cellules ayant perdu leur intégrité augmente avec le niveau de déshydratation pour atteindre des proportions de cellules perméabilisées très importantes. Par exemple, le taux de cellules perméabilisées est supérieur à 90% après choc hyperosmotique à 166 MPa.

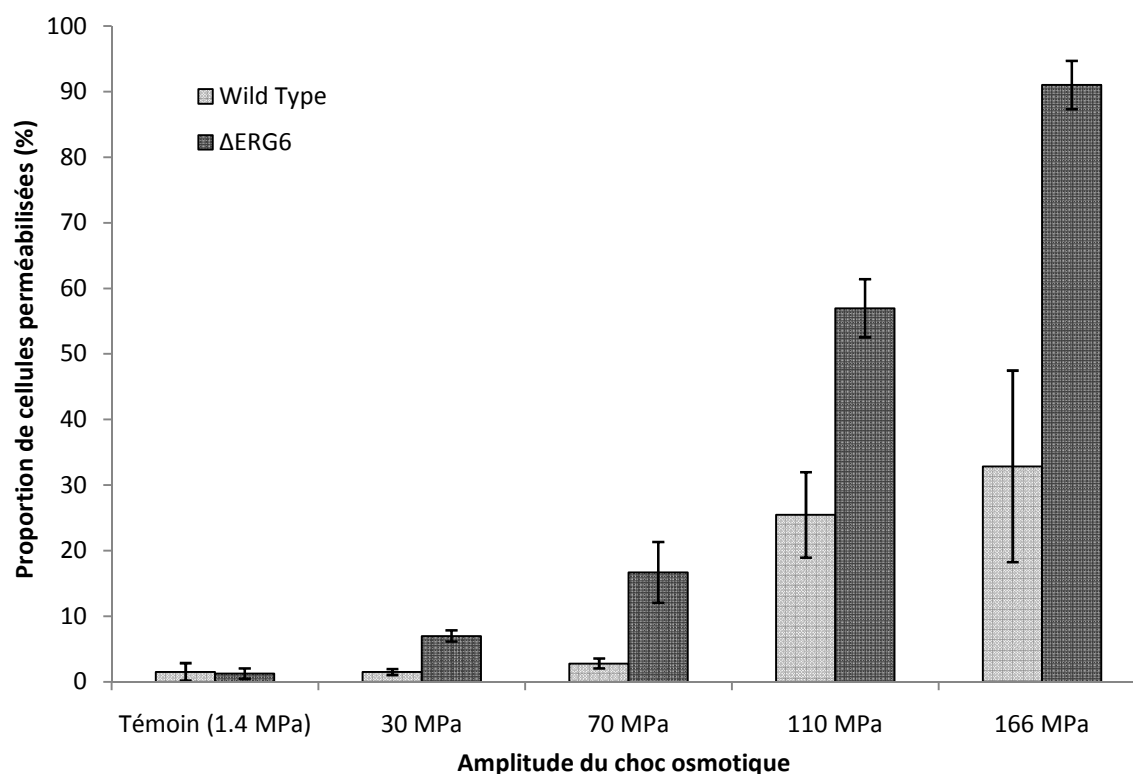


**Figure 43 : Proportion de cellules perméabilisées en fonction de l'amplitude du choc hyperosmotique pour les souches de levures sauvage et  $\Delta erg6$ .**

La forte perméabilisation de la souche  $\Delta erg6$  lors de traitements sévères, en comparaison avec celle de la souche sauvage, permet d'expliquer la faible survie observée pour cette souche pour un traitement à 166 MPa. Ainsi, l'étape de déshydratation est critique pour le maintien de l'intégrité membranaire et la survie de la souche  $\Delta erg6$  lors des chocs de fortes amplitudes. En revanche, les taux de perméabilisation induits par la déshydratation à 30 MPa pour la souche  $\Delta erg6$  n'expliquent pas la faible survie de cette souche qui est de 3,3% pour ce traitement (Tableau 10). Nous pouvons donc exclure que la cause du faible taux de survie de la souche mutante pour les chocs de 30 MPa est directement reliée à une perte d'intégrité membranaire se produisant pendant l'étape de déshydratation.

#### 4.2.2. Etape de réhydratation

Les mesures de viabilité des levures sont réalisées après un cycle comprenant la déshydratation puis une étape de réhydratation. Afin de corréler la viabilité après un choc à 30 MPa avec l'intégrité membranaire, la perméabilité de la membrane plasmique a donc également été mesurée après un choc à 30 MPa suivi d'une réhydratation à 1,4 MPa. Différents niveaux de réhydratation ont été testés à partir de levures traitées préalablement par un choc à 30 MPa (Figure 44).

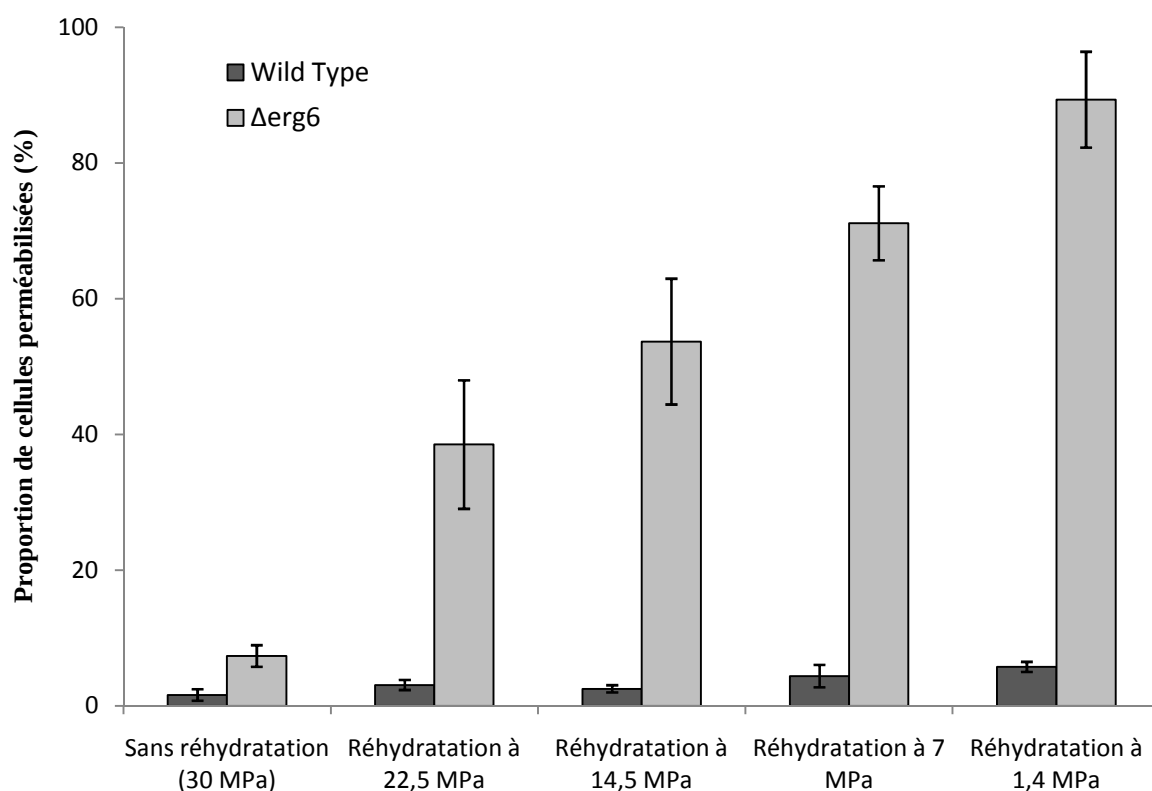


**Figure 44 : Impact de l'amplitude de réhydratation sur la perméabilité membranaire des levures sauvages et  $\Delta erg6$  après un choc hyperosmotique à 30 MPa.**

Après un choc à 30 MPa, les levures de la souche sauvage et de la souche  $\Delta erg6$  ont été réhydratées à différents niveaux : 22,5 MPa ; 14,5 MPa ; 7MPa ou 1,4 MPa qui correspond à une réhydratation totale (Figure 44). Concernant la souche sauvage, l'amplitude de réhydratation à partir de ce choc modéré a peu d'effet sur l'intégrité membranaire et la perméabilité des levures n'est pas affectée par la réhydratation. Après la réhydratation avec la plus forte amplitude (1,4 MPa) par rapport à l'état déshydraté, la proportion de cellules perméabilisées est inférieure à 10%. Dans le cas de la souche mutante, la proportion de cellules perméabilisées augmente avec le niveau de réhydratation : elle passe de 7%, initialement après le choc à 30 MPa, à 38%, 53%,

72% et 89% respectivement pour les niveaux de réhydratation croissants allant jusqu'à 1,4 MPa. Ce résultat suggère que l'étape de réhydratation est critique pour l'intégrité membranaire de la souche  $\Delta erg6$  après un choc à une amplitude modérée (30 MPa).

#### 4.3. CAUSES DE LA PERMEABILISATION MEMBRANAIRE LORS DES CHOCS MODERES A 30 MPa

##### 4.3.1. Variation du volume lors de cycle de déshydratation/réhydratation

Les mécanismes de perméabilisation membranaire peuvent trouver leur cause dans l'évolution du rapport S/V lors de chocs hyperosmotiques. Nous avons réalisé une comparaison des volumes cellulaires atteints par les souches sauvage et  $\Delta erg6$  au cours de chocs hyperosmotiques de différentes amplitudes jusqu'à 30 MPa. L'impact du niveau de réhydratation après un choc hyperosmotique à 30 MPa sur le volume cellulaire a également été étudié. Le volume des levures des souches sauvage et  $\Delta erg6$  a été mesuré après un choc à 30 MPa suivi de réhydratations à différents niveaux (Figure 45B) et est comparé au volume atteint à ces mêmes niveaux lors de la déshydratation (Figure 45A).

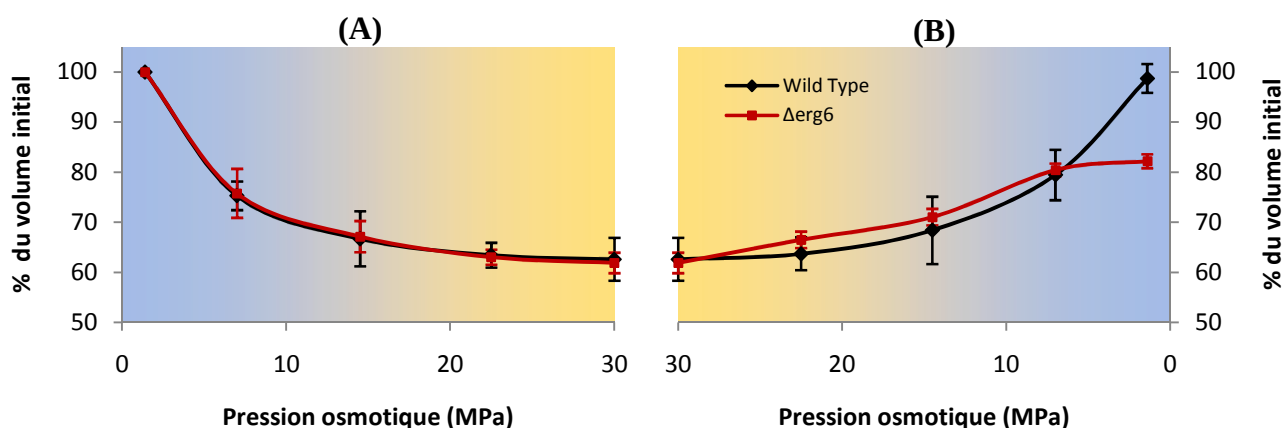


**Figure 45 :** Variation du volume cellulaire en fonction de l'amplitude de déshydratation (A) et en fonction de l'amplitude de réhydratation après un choc à 30 MPa (B).

Sur une plage de déshydratation allant jusqu'à 30 MPa, l'analyse des variations de volumes en fonction du niveau de choc hyperosmotique révèle qu'il n'y a pas de différence entre les deux souches et que la majorité de la variation volumique est accomplie sur une plage comprise entre 1,4 et 15 MPa (Figure 45A). Lors de la réhydratation qui suit un choc à 30 MPa, le volume cellulaire de la souche sauvage retrouve les mêmes valeurs, pour une pression osmotique donnée, que les volumes mesurés lors de la déshydratation indiquant ainsi une

variation volumique totalement réversible pour cette souche. En revanche, concernant la souche  $\Delta erg6$ , les volumes observés à la déshydratation et à la réhydratation ne sont pas identiques. En effet, la réhydratation à 1,4 MPa conduit à un volume inférieur au niveau volumique initial. Ceci s'explique par la perméabilisation de la membrane plasmique qui se produit lors de la réhydratation pour la souche mutante (Figure 44). La rupture de la membrane plasmique ne permet plus les phénomènes d'osmose et donc, le gonflement de la cellule jusqu'à son niveau initial.

#### 4.3.2. Morphologie des levures mutantes après un choc hyperosmotique modéré

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à comprendre les mécanismes conduisant à la perméabilisation des levures  $\Delta erg6$  se produisant lors de la réhydratation après un choc à 30 MPa. Une des hypothèses serait qu'un choc modéré puisse engendrer une diminution de la surface membranaire de la souche mutante conduisant à la lyse de la levure lors de l'expansion volumique causée par la réhydratation, comme cela l'a été observé pour la souche sauvage pour les chocs de fortes amplitudes. Nous avons pour cela réalisé des observations en microscopie confocale et en microscopie électronique afin de visualiser l'évolution morphologique de la souche mutante lors de chocs à 30 MPa et de la comparer avec celle de la souche sauvage.

##### 4.3.2.1. Observation en microscopie confocale

Les observations en microscopie confocale de la souche sauvage après un choc hyperosmotique sévère (166 MPa) ont permis de visualiser une perte de surface membranaire par internalisation de membrane plasmique au cours du temps. Nous avons donc utilisé ce même protocole afin de savoir si ce même phénomène se produit lors d'un choc à 30 MPa sur la souche mutante.

Le marquage au FM 4-64 des cellules témoins des deux souches se manifeste par une fluorescence homogène de la membrane plasmique (Figure 46). Juste après un choc hyperosmotique à 30 MPa, les levures des deux souches présentent un marquage qui reste au niveau de la membrane plasmique mais des amas de fluorescence sont observables au niveau cette membrane. Ces spots de fluorescence pourraient correspondre à des replis membranaires. Le temps de maintien dans l'état déshydraté n'a pas d'effet sur le marquage et aucune

internalisation de membrane n'est observée pour les deux souches. Ainsi, ce n'est pas un phénomène d'internalisation de membrane qui peut expliquer la lyse à la réhydratation de la souche mutante après un choc à 30 MPa.

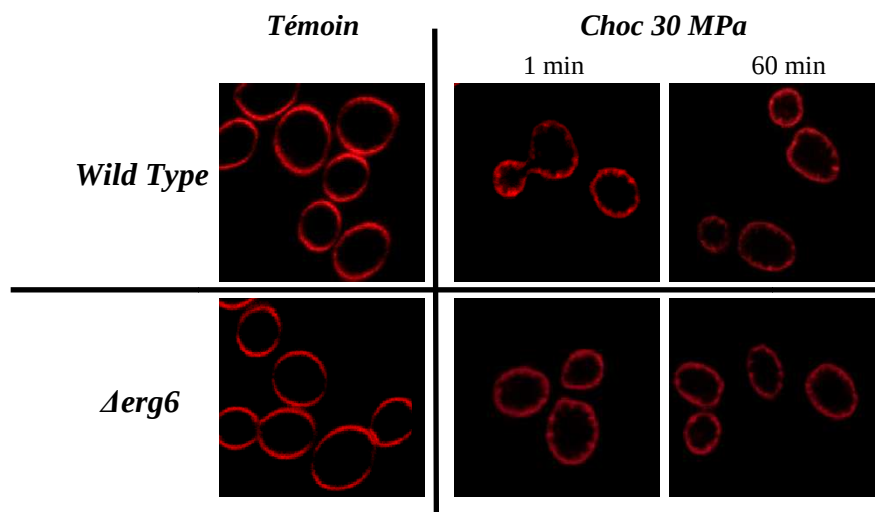


**Figure 46 :** Observation confocale de l'évolution du marquage membranaire au FM 4-64 après un choc à 30 MPa sur les souches sauvage et  $\Delta erg6$ . Les levures ont été observées juste après le traitement ou après 60 min de maintien à 30 MPa.

Nous avons également observé l'évolution de la distribution de la protéine membranaire Sur7-GFP, présente dans les domaines MCC riches en stérols, au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation sur les deux souches de levures (Figure 47).

Les cellules témoins des deux souches présentent une distribution en patches de la protéine Sur7-GFP au niveau de la membrane plasmique. Néanmoins, cette répartition est un peu moins nette sur la souche  $\Delta erg6$  que sur la souche sauvage et l'analyse des images révèle que cette protéine est également présente au niveau cytoplasmique chez le mutant. Après un choc hyperosmotique à 30 MPa, les domaines incluant la protéine Sur7 sont moins bien délimités chez les deux souches. De plus, chez la souche mutante, la présence de la protéine Sur7 au niveau cytosolique devient clairement visible. Cette observation correspond probablement à une augmentation de la concentration en protéines causée par la diminution importante du volume cellulaire.

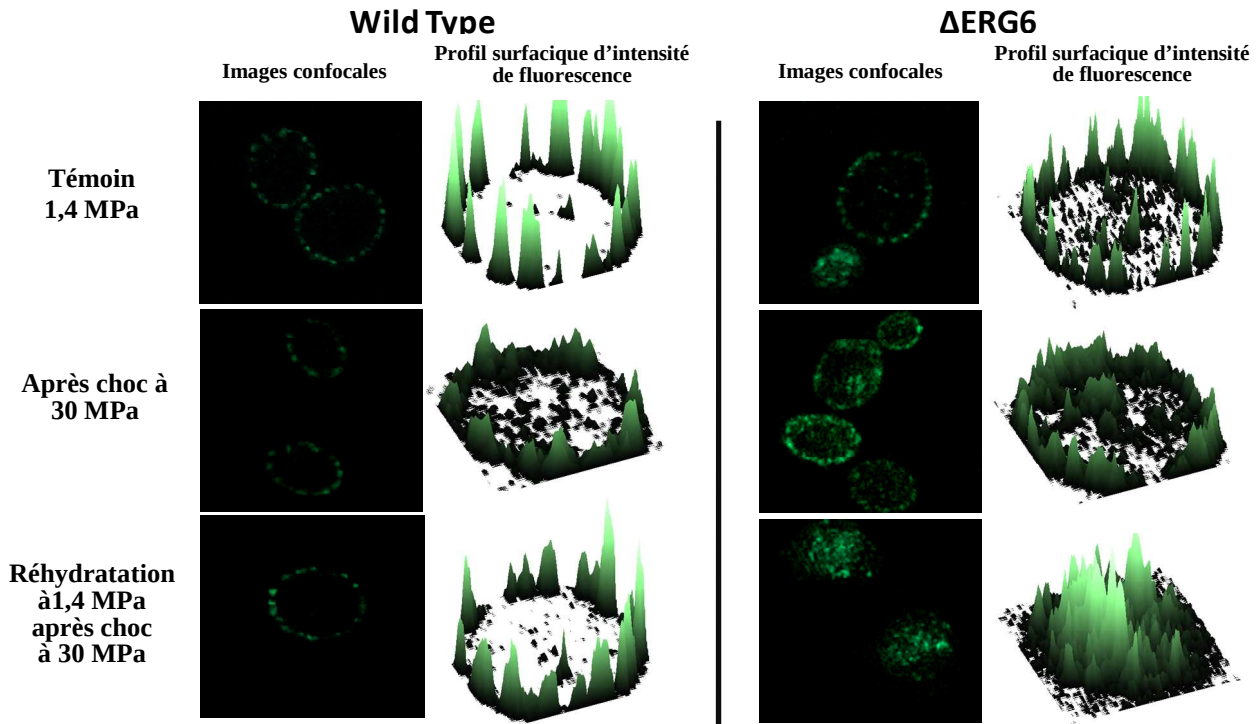


**Figure 47 : Evolution de la répartition de la protéine Sur7-GFP des souches sauvage et  $\Delta$ erg6 au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation incluant un choc à 30 MPa. Les levures ont été observées après un choc à 30 MPa ou après réhydratation à 1,4 MPa.**

Après réhydratation à 1,4 MPa, les levures de la souche sauvage retrouvent une distribution de Sur7-GFP similaire à celle des cellules témoins. En revanche, pour la souche mutante, la fluorescence de la protéine est principalement observée au niveau intracellulaire et n'est plus présente au niveau du contour de la cellule. Cette localisation aberrante de la protéine peut s'expliquer par la lyse de la membrane qui intervient lors de la réhydratation. Cette observation conforte l'hypothèse d'une lyse de la levure mutante lors de la réhydratation après un choc à 30 MPa.

#### 4.3.2.2. Observation en microscopie électronique à transmission

Afin de comprendre l'hypersensibilité de la souche  $\Delta$ erg6 aux chocs hyperosmotiques, des observations en microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta$ erg6 après un choc hyperosmotique à 30 MPa (Figure 48).

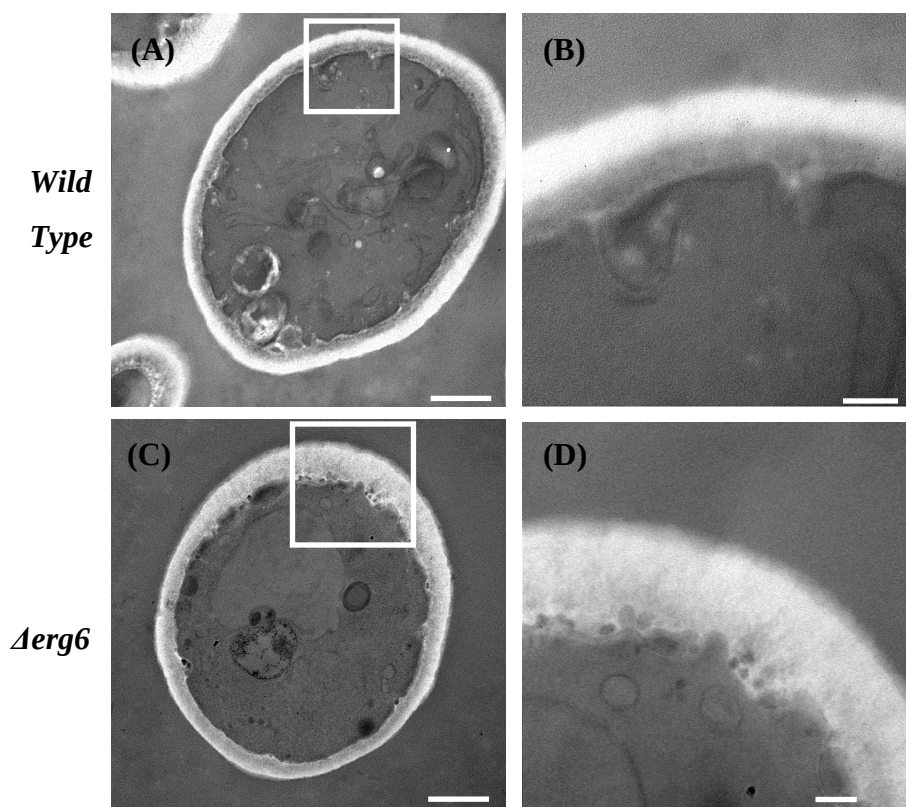


**Figure 48 : Observation en microscopie électronique à transmission des levures sauvage et  $\Delta erg6$  après un choc hyperosmotique à 30 MPa. Les photographies (A) et (B) correspondent aux levures témoins, et (C) et (D) aux levures mutantes  $\Delta erg6$  après un choc à 30 MPa. Les barres d'échelle sont égales à 500 nm pour (A) et (C), et à 100 nm pour (B) et (D).**

La souche sauvage présente quelques grandes invaginations de membrane plasmique avec un aspect plutôt lisse de la membrane entre ces replis membranaires. Les invaginations sont différentes de celles observées pour les chocs de fortes amplitudes. En effet, elles ne sont pas resserrées en leur base et sont recourbées vers la paroi (Figure 48 A et B). L'observation de la souche mutante après un choc hyperosmotique à 30 MPa révèle une déformation de la membrane plasmique très différente en comparaison à celle observée pour la souche sauvage. En effet, des vésicules externes au cytoplasme sont observables entre la paroi et la membrane plasmique des levures (Figure 48 C et D).

#### 4.4. CAUSES DE LA PERMEABILISATION MEMBRANAIRE LORS DES CHOCS SEVERES A 166 MPa

##### 4.4.1. Variation du volume cellulaire lors de déshydratations sévères

Les volumes cellulaires ont été mesurés sur les souches sauvage et  $\Delta erg6$  après des chocs de différentes amplitudes jusqu'à 166 MPa (Figure 49). Jusqu'à 30 MPa, il n'y a pas de différence de comportement entre les deux souches et le volume atteint à 30 MPa correspond environ à 62% du volume initial mesuré à 1,4 MPa.

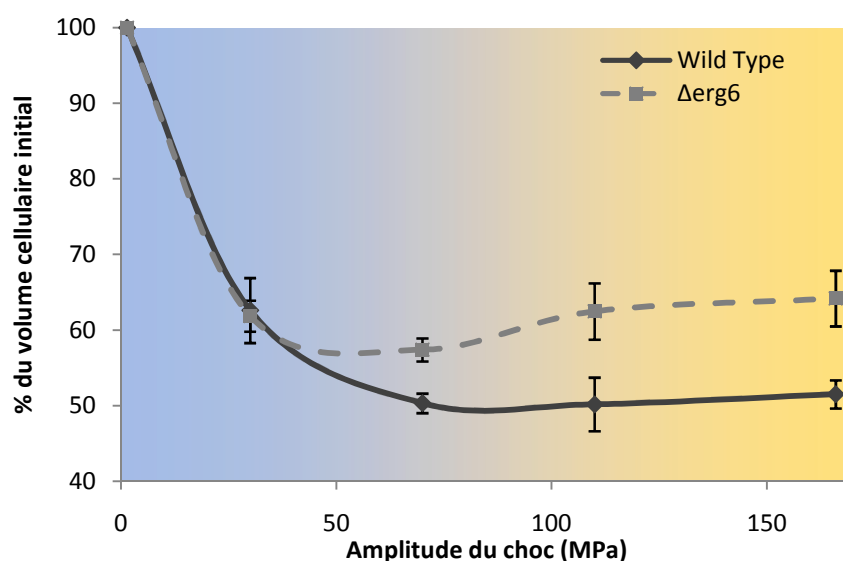


**Figure 49 : Variation du volume cellulaire des levures sauvage et  $\Delta erg6$  en fonction de l'amplitude de choc hyperosmotique.**

Au-delà de cette amplitude, les courbes de volume des deux souches divergent. Pour la souche sauvage, le volume diminue à environ 50% du volume initial après un choc à 70 MPa puis ne varie plus pour les amplitudes de déshydratation supérieures. Dans le cas de la souche  $\Delta erg6$ , le volume mesuré à 70 MPa atteint 57,4% et réaugmente de manière significative pour les amplitudes de déshydratation supérieures pour atteindre 64,2% après un choc à 166 MPa. Pour la souche mutante, la réaugmentation du volume cellulaire pour les conditions sévères de déshydratation peut s'expliquer par les forts taux de perméabilisation membranaire observés pour de tels traitements (Figure 43) : la perte d'intégrité membranaire entraîne la perte de réponse osmotique des levures et le volume cellulaire revient à un niveau correspondant au volume délimité par la paroi cellulaire à l'état relaxé. En revanche, les taux de perméabilisation sont très faibles chez la souche sauvage. Dans ce cas, la paroi est attirée par la membrane plasmique et est contractée lors des fortes diminutions du volume des levures. L'attraction de la

paroi lors de déshydratations sévères engendre une augmentation de la tension dans la membrane plasmique et provoque une contrainte d'étirement au niveau de cette membrane. Il a été montré qu'il y a un impact de la nature des stérols sur la résistance de la membrane à l'étirement (Hossack and Rose, 1976). Ceci pourrait expliquer la perméabilisation plus importante lors de l'étape de déshydratation de la souche  $\Delta erg6$  par rapport à la souche sauvage dans le cas de chocs hyperosmotiques sévères.

#### 4.4.2. Comportement de la paroi lors de la contraction volumique

Dans cette partie, nous allons préciser le comportement de la paroi des levures au cours d'un cycle déshydratation/réhydratation. Bien que la paroi ne participe pas au phénomène d'osmose et donc aux variations de volumes induites par les perturbations hyperosmotiques, les mesures de volumes cellulaires réalisées à différents moments du cycle déshydratation/réhydratation montrent que la paroi influe sur le volume cellulaire observé lorsque la membrane plasmique est perméabilisée. Il semble donc important de comprendre l'évolution structurale de la paroi puisqu'elle peut influencer sur le comportement de la membrane plasmique de par son interaction directe avec elle.

Lors de l'analyse des variations de volume des souches de levures sauvage et  $\Delta erg6$ , nous avons pu observer que les deux souches présentaient le même comportement volumique lors de déshydratations sur une plage de pressions osmotiques comprise entre 1,4 et 30 MPa. Au-delà, leur comportement divergeait et cette différence est attribuable à la perméabilisation de la membrane plasmique et à la relaxation de la paroi cellulaire. Nous allons donc dans un premier temps estimer le volume cellulaire délimité par la paroi lorsque celle-ci se trouve à l'état relaxé en estimant le volume d'une cellule perméabilisée. Les mesures de volumes réalisées lors de notre étude correspondent à un volume moyen entre le volume des cellules intègres et le volume des cellules perméabilisées. Ainsi, le volume observé peut être résumé dans l'équation suivante :

$$V_{obs} = P_{int} \cdot V_{int} + P_{perm} \cdot V_{perm}$$

avec  $V_{obs}$  le volume moyen observé,  $V_{int}$  le volume moyen d'une cellule intègre,  $V_{perm}$  le volume moyen d'une cellule perméabilisée,  $P_{int}$  la proportion de cellules intègres et  $P_{perm}$  la proportion de cellules perméabilisées.

Puisque les deux souches ont le même comportement osmotique lorsque la membrane plasmique n'est pas perméabilisée, il semble raisonnable de poser l'hypothèse que le volume d'une cellule intègre pour un niveau de déshydratation donné et le volume d'une cellule perméabilisée sont les mêmes pour les deux souches. Connaissant les proportions de cellules perméabilisées pour les deux souches, nous pouvons donc ainsi poser un système à deux équations avec deux inconnues,  $V_{int}$  et  $V_{perm}$ , pour un niveau de déshydratation donné :

$$\begin{cases} V_{obs\ WT} = P_{int\ WT} \cdot V_{int} + P_{perm\ WT} \cdot V_{perm} \\ V_{obs\ ERG6} = P_{int\ ERG6} \cdot V_{int} + P_{perm\ ERG6} \cdot V_{perm} \end{cases}$$

Nous avons ensuite résolu ce système pour le niveau de déshydratation à 110 MPa. Ce niveau a été choisi car les proportions de cellules perméabilisées et de cellules intègres sont approximativement équivalentes ce qui permet de déterminer des volumes moyens sur un nombre de cellules important. En effet, la majorité des cellules sont intègres à 70 MPa tandis que le niveau de 166 MPa induit une forte proportion de cellules perméabilisées. Le volume d'une cellule perméabilisée a ainsi été estimé à 72,73% du volume d'une cellule en condition physiologique (1,4 MPa). Ce volume correspond au volume délimité par la paroi lorsqu'elle est dans son état relaxé. Ce résultat est en adéquation avec différentes études montrant que des levures perméabilisées thermiquement ont un volume inférieur au volume caractéristique de l'état physiologique (Martinez de Maranon et al., 1999; Guyot et al., 2005; Tibayrenc et al., 2010). A partir du volume d'une cellule perméabilisée, nous avons ensuite pu estimer le volume pour chaque niveau de déshydratation d'une cellule intègre en retirant la proportion de cellules perméabilisées qui intervenait lors de l'observation du volume moyen des levures (Figure 50).

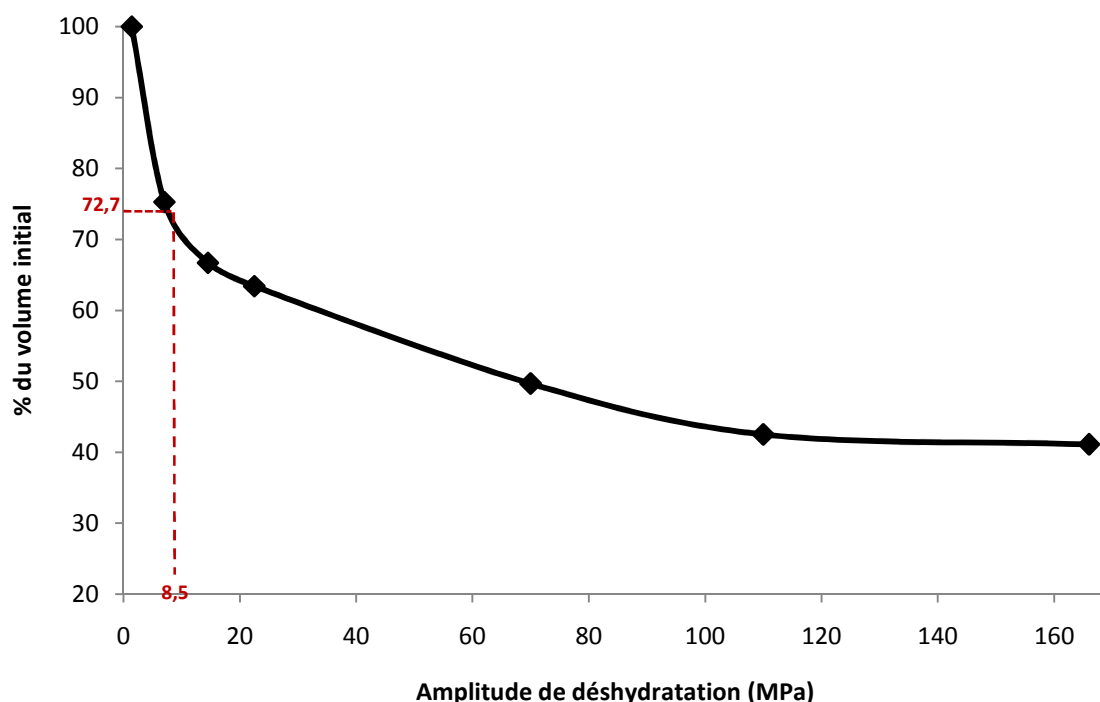


**Figure 50 : Estimation de l'évolution du volume d'une cellule intègre lors de chocs hyperosmotiques croissants jusqu'à 166 MPa.**

Le volume délimité par la paroi relaxée nous donne des informations sur l'état de la paroi au cours des variations volumiques de la levure. Initialement, dans les conditions physiologiques (1,4 MPa), la paroi est étirée. Sur la plage de déshydratation allant de 1,4 à 8,5 MPa, l'étirement de la paroi diminue pour devenir nul lorsque la levure atteint 72,7% du volume initial. En observant la variation volumique sur cette plage, il est possible de calculer le module d'élasticité volumique ( $\varepsilon$ ) de la paroi de levure donné par la relation suivante (Zimmermann, 1978) :

$$\varepsilon = dP \cdot \frac{V}{dV}$$

avec  $dP$  la variation de pression osmotique (MPa),  $V$  le volume et  $dV$  la variation de volume engendrée par la variation de pression. Dans notre étude, le module d'élasticité de la paroi a été estimé à environ 19 MPa. Cette valeur est en accord avec les résultats obtenus dans une autre étude publiée récemment qui trouvait un module à  $14,3 \text{ MPa} \pm 10,4 \text{ MPa}$  (Schaber et al., 2010).

Au-delà du seuil de 8,5 MPa et jusqu'à 110 MPa, le volume délimité par la paroi continue de décroître mais avec une pente beaucoup moins forte. Ce résultat suggère que la paroi est tractée par la membrane plasmique sous l'effet de la diminution volumique du cytoplasme causée par la sortie d'eau. Pour des déshydratations avec une amplitude supérieure à 110 MPa, le volume évolue très peu et reste à une valeur proche de 41% du volume initial. Ce volume minimum atteint lors de traitements hyperosmotiques sévères, proche du volume cytosolique

solide, est appelé le volume non-osmotique (VNO). La valeur trouvée pour ce volume lors de notre étude est en adéquation avec d'autres études rapportant un VNO compris entre 33% et 49% pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Meikle et al., 1988; Schaber et al., 2010).

Afin d'observer l'impact de la déshydratation sur la morphologie de la paroi, nous avons réalisé un marquage au calcofluor et observé les levures en microscopie confocale (Figure 51). L'observation du marquage au calcofluor n'a cependant été possible que pour des niveaux de déshydratation modérés allant jusque 30 MPa. Au-delà, aucune fluorescence de la paroi n'était visible. Ce résultat peut être le reflet de l'état contracté de la paroi qui peut exclure la sonde de sa structure ou bien encore générer des phénomènes de quenching par rapprochement des fluorophores. Cet élément est une preuve supplémentaire que la paroi est dans un état contracté lors des perturbations hydriques sévères. Une étude avait déjà remarqué une modification de l'état structurale de la paroi lors de perturbations hyperosmotiques en observant une efficacité moins importante des enzymes de digestion de la paroi lorsque la levure était déshydratée (Morris et al., 1986).

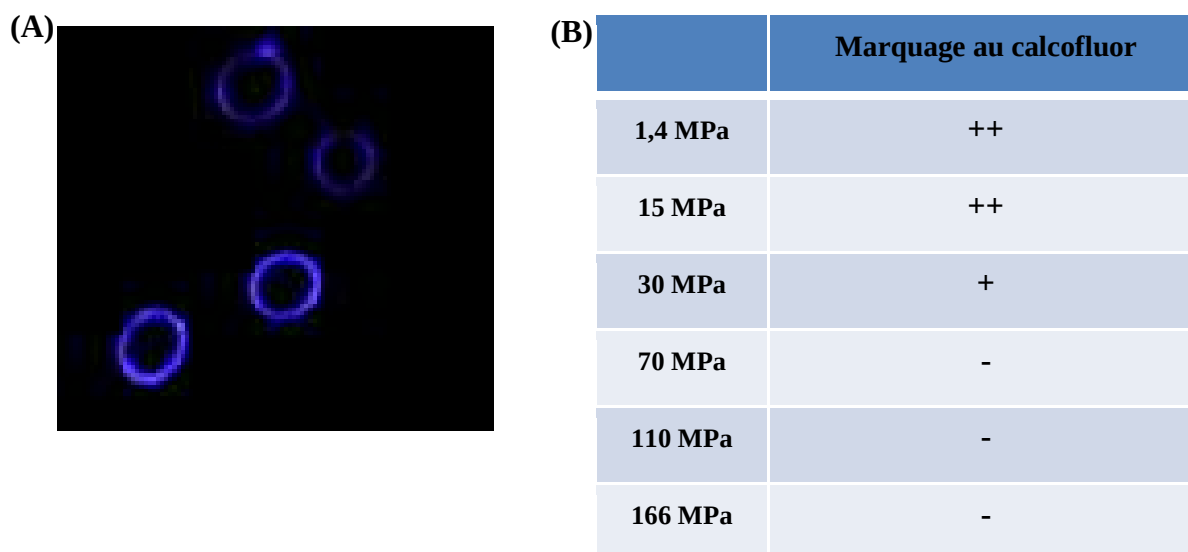


**Figure 51 : (A) Observation de la paroi de la levure sauvage à 1,4 MPa en microscopie confocale après un marquage au calcofluor. (B) Etat du marquage au calcofluor en fonction de l'amplitude de déshydratation : (++) marquage intense, (+) marquage faible, (-) absence de marquage.**

Au cours d'observations de levures ayant subi un choc hyperosmotique à 110 MPa en microscopie électronique à transmission, quelques cellules présentaient une paroi rompue (Figure 52). La paroi rompue semble s'être détendue autour du cytoplasme de la levure et confirme un état contracté de cette structure lors de contractions volumiques importantes.

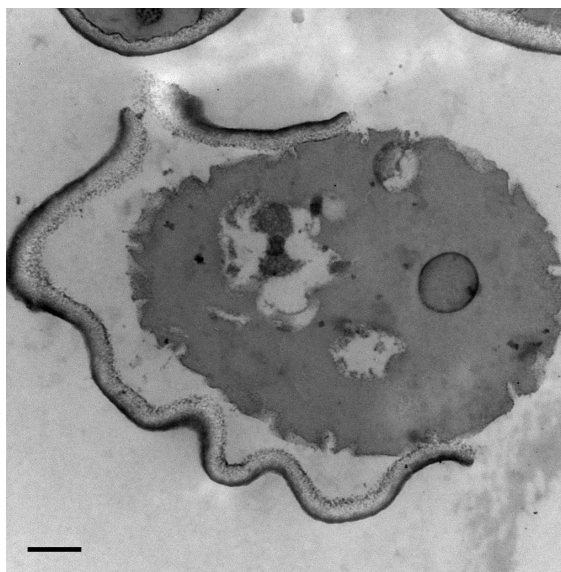


**Figure 52 : Observation en microscopie électronique à transmission de la paroi rompue d'une levure après un choc hyperosmotique à 110 MPa. Barre d'échelle = 500 nm.**

#### 4.5. DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons cherché à comprendre les événements membranaires conduisant à la mort des levures lors de perturbations rapides pour une souche mutante de levures dont la composition membranaire en stérols est modifiée. Pour cela, nous avons caractérisé les étapes critiques du cycle déshydratation/réhydratation en estimant l'intégrité membranaire à différents moments de ce cycle. En parallèle, nous avons observé les variations volumiques et les modifications morphologiques de la membrane plasmique induites par des chocs sur la souche mutante et la souche sauvage de levures.

Les mesures d'intégrité membranaire sur les souches sauvage et mutante, réalisées après des chocs hyperosmotiques de différentes amplitudes ou après l'étape de réhydratation, ont permis de relier la mort de la souche  $\Delta erg6$  à une perte d'intégrité de la membrane plasmique qui peut intervenir lors de l'étape de déshydratation ou lors de la réhydratation. Pour les chocs hyperosmotiques de faibles amplitudes (30 MPa), l'intégrité de la membrane plasmique des levures de la souche sauvage est préservée alors que la membrane de la souche mutante est perméabilisée lors de la réhydratation qui suit le choc. Dans le cas de chocs hyperosmotiques de fortes amplitudes (166 MPa), la perte d'intégrité membranaire intervient pendant la déshydratation pour la souche mutante. Ainsi, les deux étapes du cycle déshydratation/réhydratation peuvent être critiques pour l'intégrité de la membrane plasmique et donc pour la survie de la levure  $\Delta erg6$ . Les résultats obtenus sur la variation du volume cellulaire

lors de la déshydratation et de la réhydratation a également permis de comprendre l'évolution structurale de la paroi des levures pendant ces traitements.

#### 4.5.1. Perméabilisation membranaire pendant l'étape de déshydratation

Lors de la réalisation d'un choc hyperosmotique, il se produit une rapide sortie d'eau intracellulaire vers le milieu extracellulaire conduisant à l'équilibre entre les pressions osmotiques internes et externes. Cette sortie d'eau s'accompagne d'une diminution du volume des levures qui s'effectue brutalement dans le cas des chocs hyperosmotiques. Il a été montré que le volume des levures pouvait diminuer de 60% en quelques millisecondes lors de chocs hyperosmotiques (Gervais and Beney, 2001). En accord avec ce résultat, l'analyse des volumes cellulaires réalisée lors de notre étude a révélé que le volume des levures non perméabilisées atteignait environ 41% du volume initial pour les chocs hyperosmotiques à 166 MPa (Figure 50). Ceci conduit à une augmentation importante du rapport S/V des cellules. La membrane plasmique n'étant que très peu compressible (Evans et al., 1976), il y a donc un excès de surface membranaire important et une déformation de cette structure est nécessaire pour maintenir une forme sphérique. De plus, nous avons également observé que la membrane plasmique des levures tracte la paroi lors des contractions volumiques supérieures à environ 73% du volume initial. Ceci conduit à des contraintes mécaniques importantes au niveau de la membrane plasmique. Ces contraintes sont d'autant plus importantes que le volume final est faible et donc que l'amplitude de déshydratation est grande. En plus des effets mécaniques sur la membrane plasmique, les perturbations hyperosmotiques de fortes amplitudes influent également sur l'organisation structurale de la membrane. En effet, il a été montré que les lipides de la membrane plasmique des levures subissent une transition de phase d'une phase liquide désordonnée vers une phase liquide ordonnée lors de la déshydratation. Cette transition se produit à partir de 60 MPa chez la levure lors de perturbations osmotiques réalisées avec du glycérol (Laroche et al., 2005) et est connue pour affecter la résistance de la membrane aux forces de cisaillement (Garcia-Manyes et al., 2005). La conjonction de ces événements peut expliquer la perméabilisation de la membrane plasmique qui intervient pendant la phase de déshydratation en choc à 166 MPa pour une partie de la population de levures sauvages et pour la majorité des levures mutantes  $\Delta erg6$ . La différence entre les deux souches de levures peut s'expliquer par l'influence de la structure des stérols sur les propriétés mécaniques de la membrane. En effet, la nature des stérols influence la résistance de la membrane plasmique à

l'étirement (Hossack and Rose, 1976). De plus, les stérols modulent les transitions de phases lipidiques différemment en fonction de leur structure (Barenholz, 2002; Czub and Baginski, 2006).

#### 4.5.2. Perméabilisation membranaire pendant l'étape de réhydratation

La réhydratation est une étape critique pour l'intégrité de la membrane plasmique après un choc à 30 MPa pour la souche mutante  $\Delta erg6$ . La perméabilisation de la membrane après ce traitement est croissante avec le niveau de réhydratation suggérant que la perte d'intégrité membranaire est liée au regonflement des levures causé par l'entrée d'eau dans le cytoplasme. Ce phénomène peut s'expliquer par un manque de surface de la membrane plasmique ne permettant pas aux cellules de retrouver leur volume initial et qui conduit à la rupture de la membrane plasmique lors de la réhydratation. Dans le cas de la souche mutante et pour les traitements à 30 MPa, la cause de perte de surface membranaire pourrait être la formation de vésicules entre la paroi et la membrane plasmique. Ces vésicules sont observables en microscopie électronique (Figure 48). Lors d'une réhydratation rapide, ces vésicules ne peuvent être réincorporées dans la membrane et la surface membranaire est alors insuffisante pour que la levure retrouve son volume initial sans perdre son intégrité (Figure 53). La formation de vésicules extracytoplasmiques lors de la contraction volumique, ne se produisant que dans le cas de la levure  $\Delta erg6$ , peut trouver son origine dans l'influence de la structure des stérols sur les rayons de courbure membranaire. En effet, il a été montré que les stérols pouvaient induire des courbures positives ou négatives sur des liposomes en fonction de leur structure (Bacia et al., 2005).

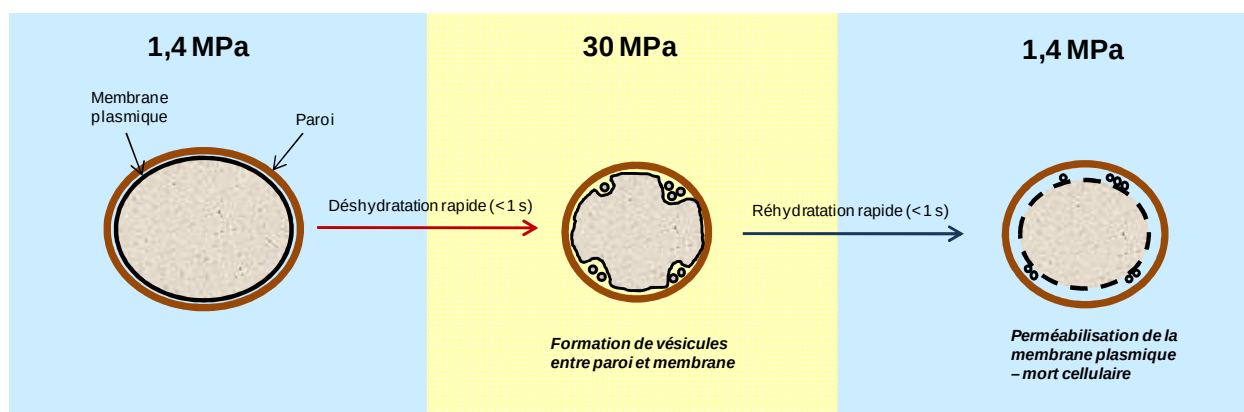


**Figure 53 : Schéma des événements membranaires conduisant à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique de la souche mutante  $\Delta erg6$  lors d'une déshydratation à 30 MPa réalisée brutalement suivie d'une réhydratation rapide.**

## 4.5.3. Evolution structurale de la paroi lors de perturbations hydriques

La mesure de l'évolution du volume cellulaire, à partir d'observations microscopiques de la surface cellulaire délimitée par la paroi, a révélé que la paroi des levures subit des modifications structurales lors de perturbations hydriques. Ces modifications structurales sont liées aux variations volumiques des levures et sont schématisées dans la Figure 54.

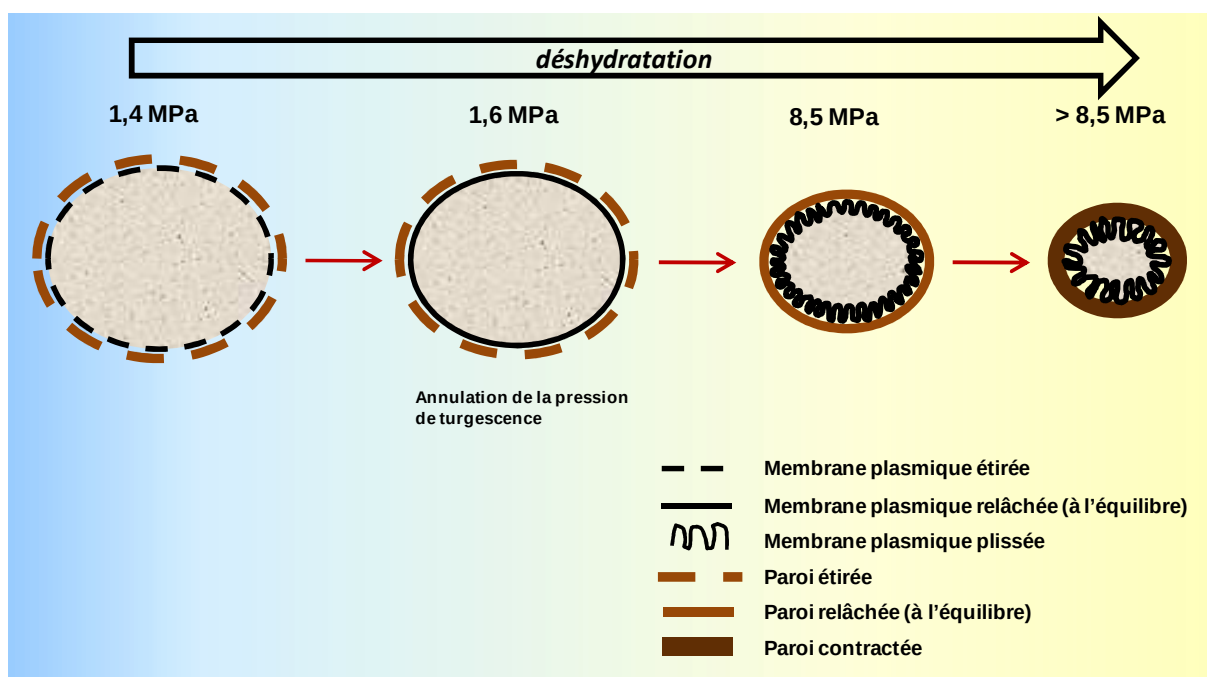


**Figure 54 : Schéma de l'évolution de la structure de la paroi des levures lors de la contraction volumique induite par la déshydratation.**

A l'état physiologique, la paroi des levures ainsi que la membrane plasmique sont étirées en raison de la pression de turgescence. Lorsque cette pression annulée par l'augmentation de la pression osmotique jusqu'à une valeur de 1,6 MPa, la membrane plasmique est dans un état relâché alors que la paroi est toujours dans un état étiré. La pression osmotique correspondant à l'état relâché d'équilibre de la paroi de la levure se situe à un niveau d'environ 8,5 MPa. A cette pression, la membrane plasmique se déforme sous l'effet de la variation importante du volume cellulaire (73% du volume dans l'état physiologique) (Figure 50). Lors des variations de volumes induites par des traitements supérieurs à 8,5 MPa, la membrane plasmique tracte la paroi grâce aux ancrages existant entre ces deux structures et la conduit ainsi dans un état contracté. Ainsi, ces observations montrent que l'enveloppe des levures est composée de deux structures aux propriétés mécaniques différentes qui répondent de manière différente lors des variations du volume cellulaire.

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la mutation d'une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol conduit à une augmentation de la sensibilité des levures aux chocs hyperosmotiques. La supplémentation en ergostérol lors de la culture anaérobie de cette souche mutante permet de trouver la résistance de la souche sauvage. Ainsi, la composition chimique de la membrane, et plus précisément la nature des stérols membranaires, influence la survie des levures à un choc hyperosmotique. L'effet de la nature des stérols sur la résistance des levures s'explique par les modifications des propriétés mécaniques de la membrane plasmique (résistance à l'étirement, déformations) conduisant à des réponses membranaires différentes lors d'un choc hyperosmotique. Ces résultats nous ont également permis de décrire, pour la première fois, l'évolution de la paroi des levures lors de contraintes osmotiques sévères. Ils ont révélé que la paroi est étirée en situation physiologique puis contractée lors de déshydratations sévères.

## 5. ROLE CLE DE L'ERGOSTEROL DANS LA SURVIE AU SECHAGE AERIEN

Nous avons vu précédemment que la délétion du gène *erg6* entraîne chez la levure une hypersensibilité face aux perturbations hyperosmotiques et ainsi montrer que la nature des stérols membranaires, de par leurs effets sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique, affecte la survie lors d'une déshydratation réalisée en milieu liquide. Lors d'un séchage, en plus des contraintes mécaniques membranaires liées à la perte d'eau intracellulaire, les levures entrent en contact avec l'air lorsque l'ensemble de l'eau extracellulaire n'est plus présente. Ce phénomène intervient dans l'environnement naturel des levures ainsi que dans les procédés utilisés pour leur conservation sur des périodes prolongées. Ce type de déshydratation est rapporté pour induire des phénomènes d'oxydation, notamment une peroxydation des lipides membranaires. Dans ce dernier chapitre, nous avons donc cherché à observer si la nature des stérols membranaires influait sur la résistance des levures à un séchage réalisé en milieu aérien et également à comprendre les paramètres pouvant affecter la survie des levures lors de ce type de déshydratation. Nous avons pour cela travaillé avec les cinq derniers mutants de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Figure 20) et observé leur survie lors de séchages en milieu aérien à différents niveaux. Chacun de ces mutants accumule des stérols de natures différentes. Deux ambiances gazeuses (air atmosphérique ou azote) ont été testées lors des séchages et les résultats obtenus ont été mis en regard avec la résistance osmotique des levures.

### 5.1. RESISTANCE DES MUTANTS $\Delta$ ERG LORS DE SECHAGES A DIFFERENTS NIVEAUX

La déshydratation en milieu aérien a été réalisée dans des enceintes hermétiques contenant des solutions saturées avec différents sels afin de maîtriser le niveau de déshydratation des échantillons (voir la section Matériel et Méthodes, 2.2.1). L'étalement des échantillons en couches fines sur des lames de verre permet de réaliser une déshydratation très rapide proche de la vitesse de déshydratation obtenue lors de chocs hyperosmotiques. La viabilité des levures est mesurée après maintien de 60 min dans l'état déshydraté suivi d'une réhydratation brutale.

Les différentes souches de levures ont été déshydratées à 15, 45, 70 et 166 MPa. Les viabilités obtenues sont présentées dans la Figure 55. Les souches sont présentées sur l'axe des abscisses selon la place de la mutation dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Ainsi, les

souches présentant des stérols avec une structure proche de l'ergostérol sont placées sur la droite de la figure, près de la souche WT. Les souches situées sur la gauche de la figure sont les souches dont le stérol majoritaire a une structure éloignée de celle de l'ergostérol.

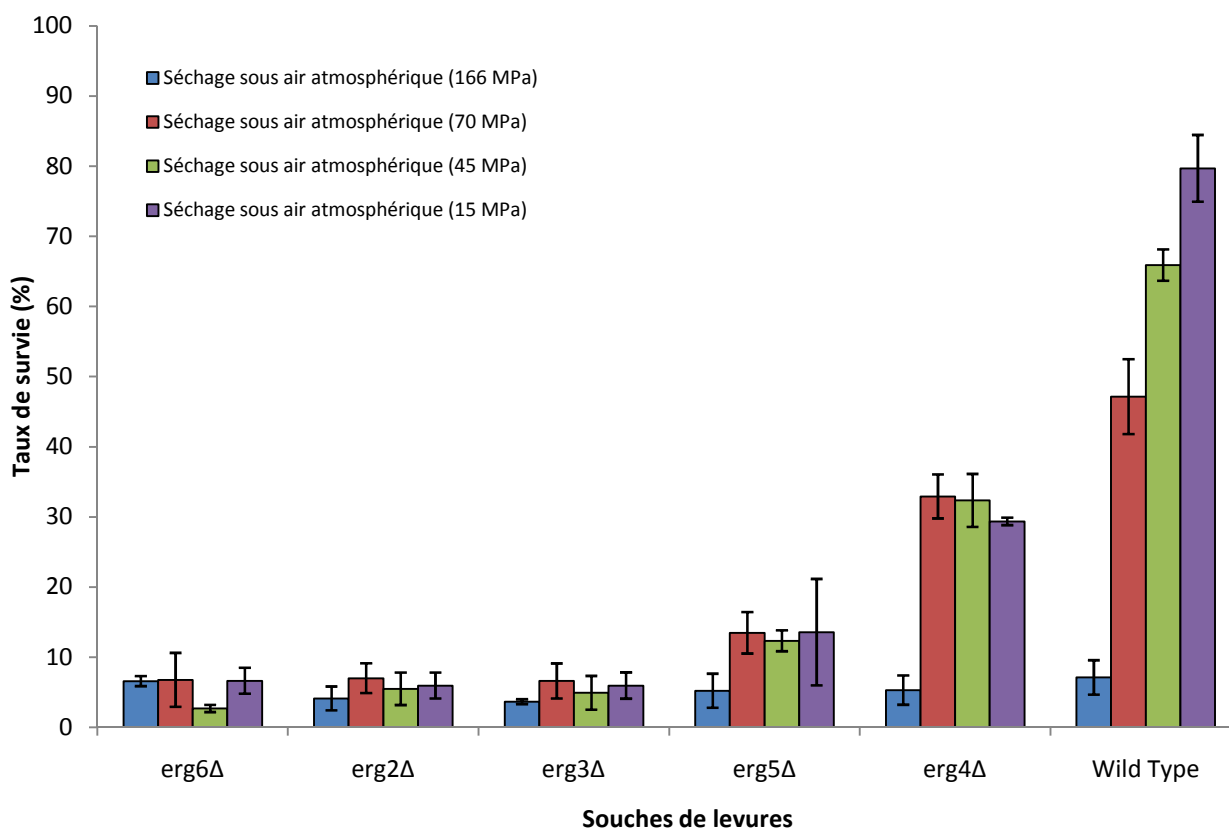


**Figure 55 : Survie des différentes souches de levures *S. cerevisiae* après des séchages gazeux de différentes amplitudes sous air atmosphérique. Les levures ont été déshydratées rapidement, maintenues 60 min dans l'état déshydraté puis réhydratées rapidement jusqu'à 1,4 MPa avant de mesurer les taux de survie par la méthode UFC. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes.**

Pour les déshydratations sévères jusqu'à 166 MPa, les viabilités mesurées pour les différentes souches ne sont pas significativement différentes et sont comprises entre 3,7% et 7,1%. En revanche, des différences entre les souches sont observables pour les déshydratations de plus faibles amplitudes. La souche sauvage est la souche de levure qui présente les plus forts taux de survie après les déshydratations réalisées jusqu'à 15, 45 et 70 MPa (80%, 67% et 47%, respectivement) tandis que les souches  $\Delta erg6$ ,  $\Delta erg2$  et  $\Delta erg3$  sont fortement affectées et présentent des viabilités proches de 6%, quelque soit l'amplitude du traitement réalisé. Enfin, les souches  $\Delta erg5$  et  $\Delta erg4$  présentent des viabilités intermédiaires avec une résistance plus importante de la souche  $\Delta erg4$  par rapport à la souche  $\Delta erg5$ . Ces résultats suggèrent donc que la nature des stérols membranaires influe sur la survie des levures à la déshydratation en milieu aérien et que l'évolution de la structure des stérols vers l'ergostérol permet d'augmenter la survie

des levures lors de ce type de traitement. En effet, la survie des différentes souches de levures est graduelle avec l'avancement dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

## 5.2. RESISTANCE DES MUTANTS $\Delta ERG$ LORS D'UN SECHAGE GAZEUX EN ABSENCE D'OXYGENE

Nous avons également réalisé un séchage aérien des différentes souches de levures dans une ambiance gazeuse ne contenant pas d'oxygène. Pour cela, les levures ont été déshydratées dans une enceinte hermétique chargée en azote. Dans cette manipulation, les levures ont été déshydratées à un niveau seulement. Le niveau choisi était de 45 MPa car il permet d'obtenir des viabilités qui diffèrent en fonction des souches de levures. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus lors du séchage sous air atmosphérique (Figure 56).

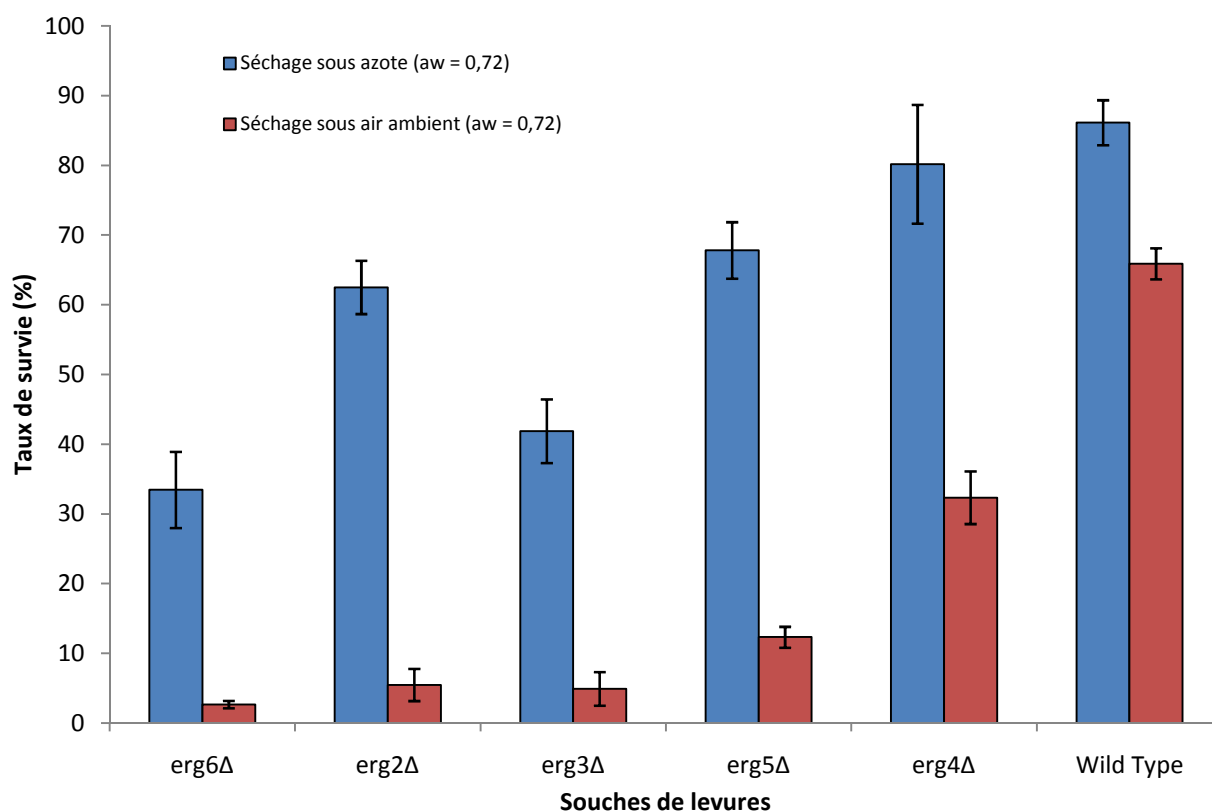


**Figure 56 :** *Survie des différentes souches de levures séchées à 45 MPa en présence ou en absence d'oxygène. Les mesures de viabilité ont été réalisées par UFC après maintien des levures dans l'état déshydraté pendant 60 min suivi d'une réhydratation rapide jusqu'à 1,4 MPa. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes.*

Le séchage jusqu'à 45 MPa réalisé sous azote en absence d'oxygène suivi d'un maintien d'une heure dans l'état déshydraté conduit à des taux de survie après réhydratation significativement supérieurs par rapport au séchage réalisé sous air atmosphérique quelque soit la

souche de levure étudiée. En effet, après le traitement sous azote, les souches sauvage et  $\Delta erg4$  présentent une viabilité proche de 80% contre 67% et 31%, respectivement, après le traitement dans l'ambiance gazeuse contenant de l'oxygène. Les souches  $\Delta erg5$  et  $\Delta erg2$  présentent une viabilité proche de 65% alors que les valeurs obtenues sous air atmosphérique étaient de 12% et 6%, respectivement. Enfin, les souches  $\Delta erg3$  et  $\Delta erg6$  passent respectivement d'une viabilité de 5% et 2% à 42% et 34%. Ces résultats suggèrent que l'oxygène présent dans l'air atmosphérique influe sur la viabilité des différentes souches de levures lors d'une déshydratation par séchage. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat consiste en une oxydation de la membrane plasmique lors d'un séchage en présence d'oxygène. L'explication de la résistance variable des différentes souches serait que la structure des stérols membranaires peut influencer l'oxydation de la membrane plasmique. Il est également intéressant de remarquer que la résistance des souches mutantes lors du séchage sous azote n'est pas croissante avec l'évolution de la structure du stérol membranaire comme cela avait été observé après le séchage sous air atmosphérique. Ces résultats indiquent que l'oxydation n'est pas le seul événement impliqué dans la sensibilité des souches mutantes lors du séchage sous air atmosphérique.

### 5.3. COMPARAISON DE L'EFFET D'UN SECHAGE GAZEUX EN ABSENCE D'OXYGENE ET D'UNE DESHYDRATATION OSMOTIQUE SUR LA VIABILITE CELLULAIRE

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la présence d'oxygène lors du séchage entraîne une diminution de la viabilité plus importante que lorsque ce même traitement est réalisé sous azote. Cependant, la perte de viabilité observée sur les différentes souches lors du séchage n'est pas seulement attribuable à la présence d'oxygène puisque certaines souches ont tout de même des taux de viabilité inférieurs à 50% lors du séchage en l'absence d'oxygène. Nous avons également observé dans le chapitre 2 que la nature des stérols membranaires conditionnait la réponse de la membrane plasmique ainsi que la survie lors de chocs hyperosmotiques réalisés avec du glycérol. Il est donc possible que ces différences de survie entre les souches lors du séchage sous azote soient liées à des réponses membranaires différentes lors la diminution de volume cellulaire induite par la déshydratation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la survie des souches de levures après une déshydratation par séchage aérien sous azote à 45 MPa ( $a_w=0,70$ ) et après un choc hyperosmotique réalisé avec du NaCl jusqu'à 40 MPa ( $a_w=0,75$ ) (Figure 57). Le NaCl a été choisi comme soluté dépresseur car il est présent

initialement dans le tampon dans lequel sont suspendues les levures avant le séchage en milieu gazeux et se concentre dans l'espace extracellulaire au cours du séchage. Le choc osmotique n'a cependant pu être réalisé à la même amplitude que le séchage car cette amplitude nécessite une saturation de la solution conduisant à la formation de cristaux de sels qui perturberaient la manipulation. Nous avons donc réalisé une solution concentrée de NaCl à la limite de la saturation à une pression osmotique de 40 MPa.

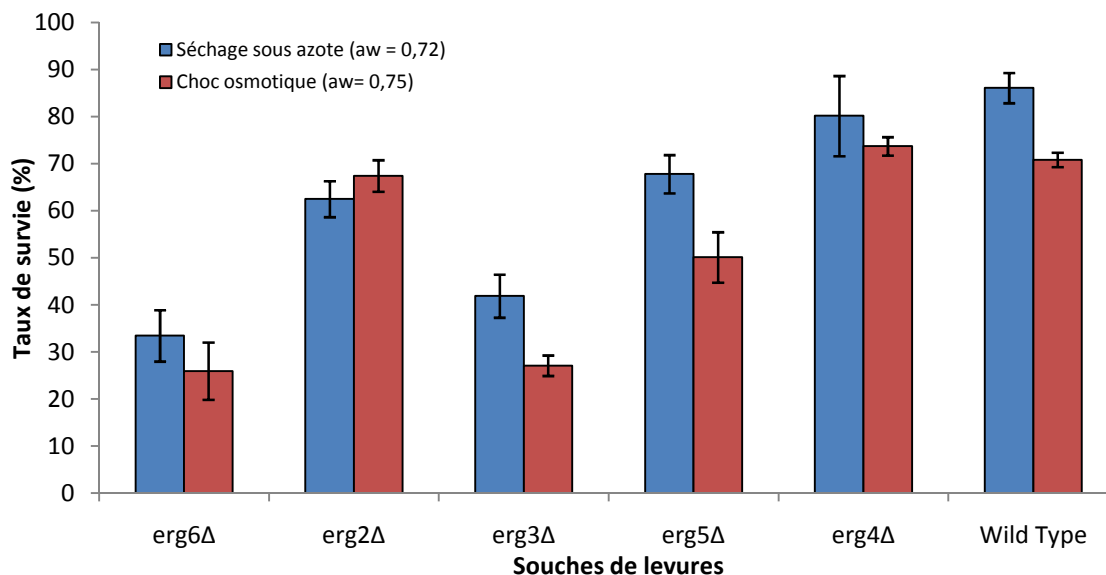


**Figure 57 : Comparaison de la survie des différentes souches de levures après un séchage rapide sous azote jusqu'à 45 MPa et après un choc hyperosmotique jusqu'à 40 MPa réalisé avec une solution de NaCl. Les mesures de viabilité ont été réalisées par UFC après maintien de 60 min dans l'état déshydraté suivi d'une réhydratation rapide jusqu'à 1,4 MPa. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes.**

Lorsque l'on compare les taux de survie après un séchage sous azote jusqu'à 45 MPa et après un choc hyperosmotique jusqu'à 40 MPa, les différentes souches de levures présentent des viabilités similaires après les deux traitements. Les viabilités sont cependant, pour la plupart des souches, légèrement supérieures (de manière non significative) pour le séchage sous azote. Ce résultat peut s'expliquer par la vitesse de déshydratation qui est plus rapide lors d'un choc hyperosmotique que lors du séchage, malgré que ce dernier soit réalisé rapidement. Ce résultat suggère néanmoins que les mécanismes impliqués dans la mort des souches sensibles lors du séchage sous azote correspondent principalement à des phénomènes mécaniques similaires à ceux induits lors de chocs hyperosmotiques. La variation des taux de viabilité entre les différentes souches confirment que la nature des stérols membranaires influe sur la réponse de la membrane lors la contraction volumique induite par la déshydratation et sur la survie de la levure. La résistance n'est cependant pas graduelle avec l'évolution de la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

#### 5.4. RESTAURATION DE LA RESISTANCE DES SOUCHES MUTANTES LORS D'UNE SUPPLEMENTATION EN ERGOSTEROL

Dans cette dernière partie, nous avons voulu vérifier que la supplémentation en ergostérol, par le biais de la culture anaérobie, de souches mutantes sensibles au séchage permettait de restaurer la résistance aux perturbations hydriques (séchage en présence d'oxygène et stress osmotique). Cette supplémentation a été réalisée sur les deux souches mutantes les plus éloignées de la souche sauvage concernant la voie de biosynthèse de l'ergostérol ( $\Delta\text{erg6}$  et  $\Delta\text{erg2}$ ). Nous avons également supplémenté la souche sauvage de levures avec du cholestérol, stérol accumulé par les cellules de mammifères, afin de comparer l'effet du cholestérol et de l'ergostérol sur la survie des levures aux perturbations hydriques. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 58.

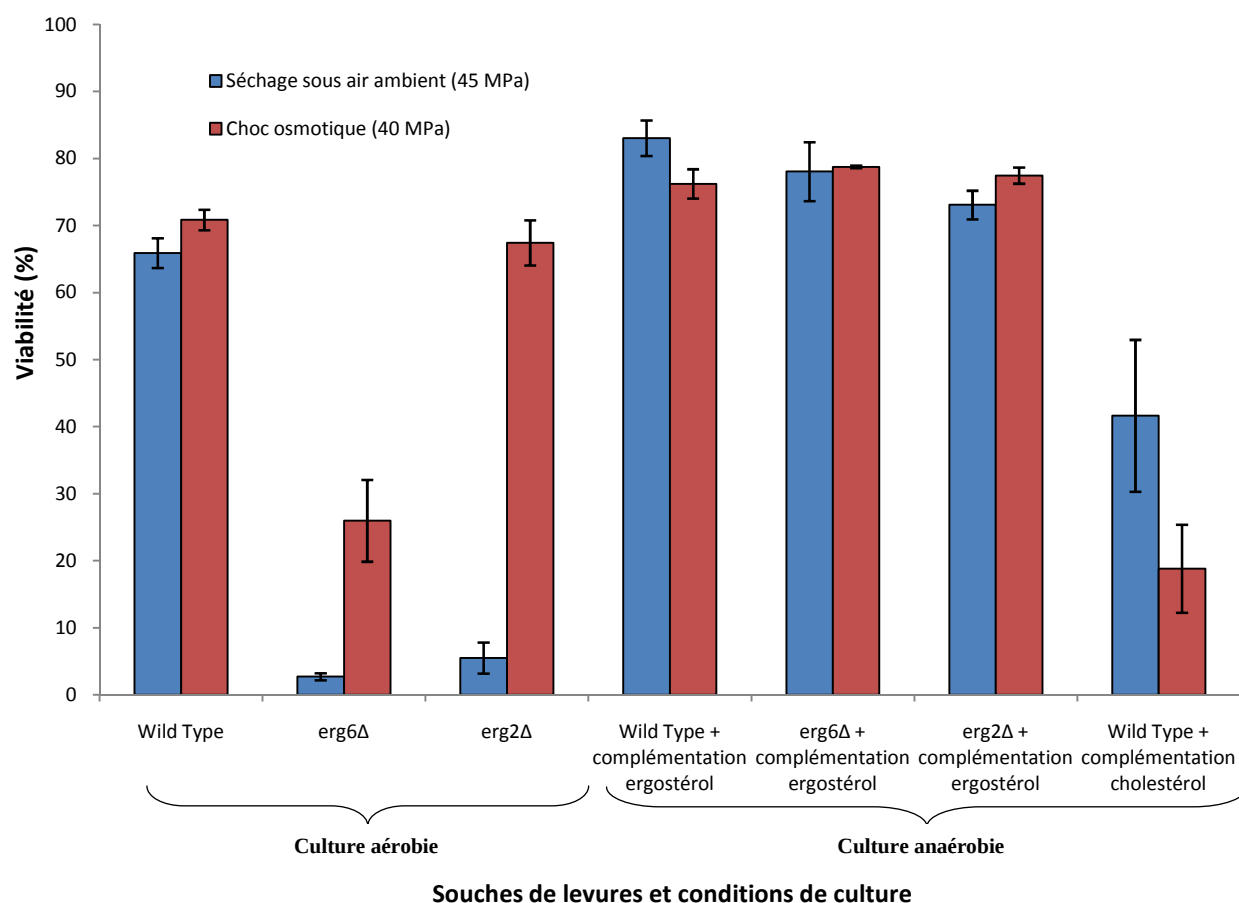


**Figure 58 : Effet de la supplémentation en stérols sur la survie des souches sauvage,  $\Delta\text{erg6}$  et  $\Delta\text{erg2}$  lors d'un séchage atmosphérique à 45 MPa et d'un choc osmotique à 40 MPa réalisé avec une solution de NaCl. Les mesures de viabilité ont été réalisées par UFC après maintien des levures 60 min dans l'état déshydraté suivi d'une réhydratation rapide jusqu'à 1,4 MPa. Les écarts types sont issus de trois manipulations indépendantes.**

Dans cette figure, les résultats obtenus après culture aérobie des souches sauvage,  $\Delta erg6$  et  $\Delta erg2$  ont été représentés pour rappel afin de mieux apprécier l'effet de la supplémentation en ergostérol sur ces levures. La supplémentation en ergostérol lors de la culture conduit à des taux de viabilité similaires ( $\approx 80\%$ ) pour les trois souches après un choc osmotique à 40 MPa et un séchage jusqu'à 45 MPa en présence d'oxygène. Ces taux sont proches, bien que légèrement supérieurs, à ceux obtenus chez la souche sauvage cultivée en aérobie après les mêmes traitements. Ces résultats montrent que l'ergostérol est un composant membranaire essentiel dans la résistance osmotique des levures mais aussi dans la résistance au séchage en présence d'oxygène. Concernant la souche sauvage complémentée avec du cholestérol, elle présente des viabilités de 41% et 19% après le séchage sous air ambiant jusqu'à 45 MPa et après un choc osmotique à 40 MPa, respectivement. Ces taux de survie sont très inférieurs à ceux obtenus lors de la complémentation avec l'ergostérol, suggérant que la structure de l'ergostérol semble plus adaptée que celle du cholestérol dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique lors d'une perturbation osmotique et d'un séchage.

## 5.5. DISCUSSION

Dans des manipulations précédentes, nous avons montré que la souche sauvage de levures présentait une résistance plus importante que la souche mutée  $\Delta erg6$  lors de chocs hyperosmotiques (Tableau 10). Cette différence de résistance a été attribuée à l'impact de la structure des stérols sur les propriétés mécaniques de la membrane et sur la réponse membranaire lors de perturbations hyperosmotiques brutales. Les manipulations réalisées dans ce quatrième chapitre sur un nombre plus important de mutants sur des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol montrent que la structure des stérols influence la survie à la déshydratation lors de perturbations osmotiques mais aussi lors de séchages en ambiance gazeuse. Cependant, les mécanismes associés à la mort des levures lors d'un stress hyperosmotique et d'un séchage sous air atmosphérique ne sont pas identiques car les sensibilités des différentes souches de levures sont différentes pour ces deux types de traitements. La survie des levures est plus faible lors du séchage sous air atmosphérique. En revanche, la réalisation d'un séchage sous azote (absence d'oxygène) permet d'obtenir un profil de survie des différentes souches proche de celui obtenu lors d'un choc hyperosmotique. L'ensemble de ces observations suggère que le séchage sous air atmosphérique conduit à la combinaison d'un stress mécanique membranaire, mis en évidence par le choc hyperosmotique et le séchage sous azote, et d'un

stress lié à la présence d'oxygène pouvant conduire à l'oxydation des lipides. Il est bien connu que l'oxydation des lipides membranaires conduit à des dommages importants de la membrane plasmique (Niki et al., 1991). Dans cette discussion, l'impact de la structure des stérols sur l'effet d'une contrainte membranaire mécanique et sur l'oxydation lipidique sera discuté. Enfin, un paragraphe est dédié à la présentation d'une nouvelle hypothèse concernant l'évolution des stérols vers l'ergostérol chez les Fungi.

#### 5.5.1. Effet de la structure des stérols sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique

La déshydratation engendre des contraintes importantes au niveau de la membrane plasmique des levures. Ces contraintes sont liées, d'une part, à la modification du rapport S/V cellulaire engendrée par la sortie d'eau causant la diminution du volume cytoplasmique. D'autre part, l'organisation structurale de la membrane plasmique est modifiée puisque la structure de la bicouche lipidique est lyotropique. La combinaison de ces contraintes est à l'origine de la perméabilisation de la membrane plasmique conduisant à la mort des levures lors de perturbations hydriques. Les taux de survie des mutants de la voie de biosynthèse de l'ergostérol obtenus lors de stress hyperosmotiques et lors de séchage en absence d'oxygène en comparaison avec ceux de la souche sauvage suggèrent que la nature des stérols affecte la réponse membranaire lors de la contraction mécanique induite par la déshydratation. Bien que la nature des stérols puisse affecter la transition de phase lipidique et que cet événement est connu pour fragiliser la membrane plasmique, ce phénomène ne permet pas d'expliquer les différents taux de survie des différentes souches lors de déshydratations jusqu'à 45 MPa. En effet, cette transition intervient à partir de 60 MPa chez la levure (Laroche et al., 2005). En revanche, la déshydratation des levures jusqu'à 45 MPa engendre une variation de volume cellulaire importante, à une valeur proche de 50% du volume physiologique mesuré à 1,4 MPa (Figure 31). En raison de la faible compressibilité de la membrane plasmique (Evans et al., 1976), l'augmentation du rapport S/V entraîne un stress de compression latéral aboutissant à la déformation de la membrane plasmique. Il a été montré, sur des vésicules modèles, que la structure des stérols présents dans une bicouche lipidique influe sur le degré et le sens de courbure de la bicouche (Bacia et al., 2005). Il est donc possible que la compression latérale membranaire induite lors de déshydratations conduise à des déformations de la membrane plasmique différentes selon la nature des stérols présents dans la membrane. Ces déformations

peuvent aboutir à une diminution de la surface membranaire comme cela a été observé sur la souche *Δerg6* après un choc à 30 MPa réalisé avec du glycérol (Figure 48). Cette perte de surface membranaire engendre une perméabilisation de la membrane au cours de l'augmentation du volume cellulaire se produisant lors de la réhydratation (Figure 44). Pendant la déshydratation, un autre mécanisme est susceptible d'expliquer l'influence de la nature des stérols sur la survie de la levure. Lors de la contraction volumique, la membrane plasmique tracte la paroi cellulaire lorsque le volume cellulaire diminue en dessous d'une valeur proche de 70% du volume physiologique. Lors de ce phénomène, la résistance à l'étirement de la membrane plasmique est mise à l'épreuve. Il a été montré que la nature des stérols membranaires influe sur la résistance à l'étirement de la membrane plasmique (Hossack and Rose, 1976). Ainsi, l'influence de la nature des stérols sur la résistance de la levure à la déshydratation pourrait être liée, au moins en partie, à l'impact de la structure de ces composés sur les propriétés physiques de la membrane plasmique.

#### 5.5.2. Effet de la structure des stérols sur l'oxydation des lipides membranaires

La comparaison des taux de survie des différentes souches de levures lors d'un séchage sous air atmosphérique et en absence d'oxygène montre que la présence d'oxygène lors de ce traitement augmente la perte de viabilité des levures (Figure 57). La survie plus élevée lors du séchage en absence d'oxygène suggère que la présence de ce composé pourrait être à l'origine d'une oxydation de certains composants cellulaires. Il a été montré que le séchage conduit à une augmentation des espèces réactives à l'oxygène au niveau intracellulaire et à des phénomènes de peroxydation lipidique (Garre et al., 2010). La cause de cette oxydation n'est cependant pas encore connue. Cette diminution de la survie lors d'un séchage en présence d'oxygène est d'autant plus importante que la structure des stérols membranaires est éloignée de la structure de l'ergostérol. Il est donc possible que les stérols membranaires puissent jouer un rôle dans la résistance à l'oxydation lipidique et que cette résistance soit dépendante de la structure des stérols. Une première hypothèse serait que les stérols agissent comme des antioxydants membranaires grâce à leur capacité à s'oxyder plus facilement que les phospholipides. Cette capacité à s'oxyder dépend de la présence d'un site oxydable sur la molécule. L'oxydation de l'ergostérol est réalisable par la présence des doubles liaisons présentes en position 5-6 et 7-8 de la molécule (Wiseman, 1993).

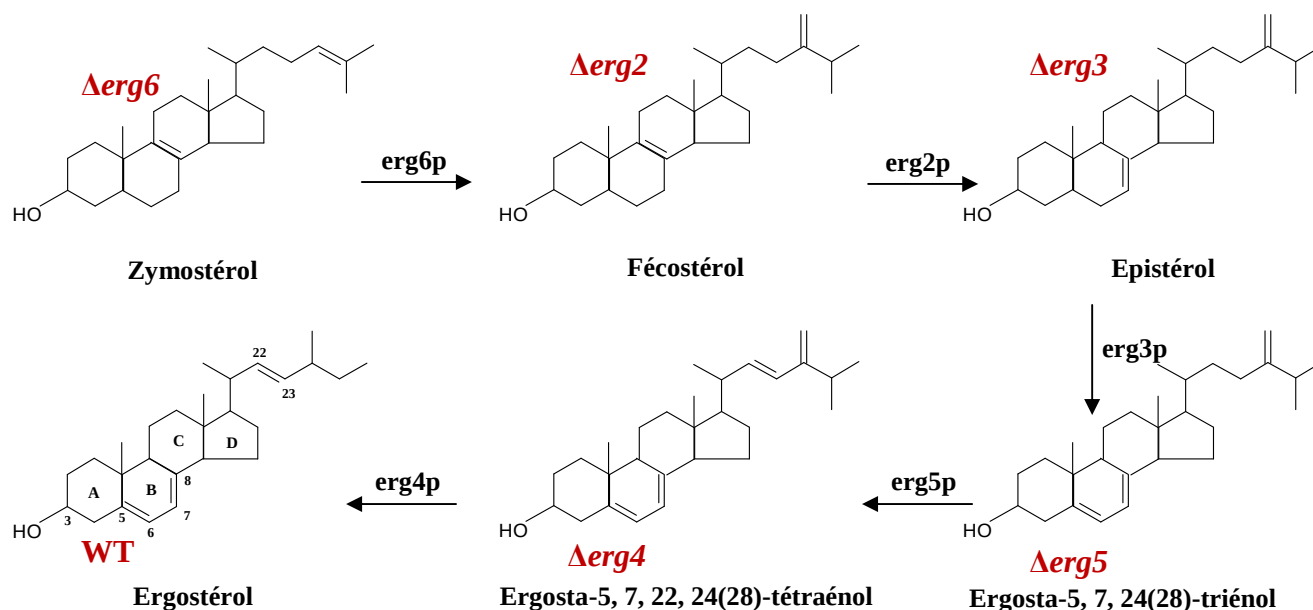


**Figure 59 : Etapes finales de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Structure des principaux stérols accumulés par les mutants  $\Delta erg$  et la souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Les structures des principaux stérols accumulés dans les différentes souches de levures sont présentées dans la Figure 59. Comme pour la souche sauvage accumulant majoritairement l'ergostérol, les souches  $\Delta erg4$  et  $\Delta erg5$  accumulent principalement des stérols possédant des sites d'oxydation. Cette observation pourrait expliquer la survie supérieure de ces mutants par rapport aux mutants  $\Delta erg6$ ,  $\Delta erg2$  et  $\Delta erg3$ , pour lesquels les stérols principalement accumulés ne possèdent pas ces sites. Le rôle protecteur des stérols contre l'oxydation des lipides membranaires est également influencé par le positionnement de ces stérols dans la bicouche lipidique. En effet, il a été montré que le cycle B des stérols contenant les doubles liaisons doit être ajusté de manière optimale avec les chaînes d'acide gras des phospholipides pour inhiber la peroxydation lipidique. Le positionnement du cycle B dépend fortement de la chaîne latérale des stérols (Wiseman, 1993). Ce phénomène pourrait expliquer la résistance croissante au séchage en présence d'oxygène des souches  $\Delta erg5$ ,  $\Delta erg4$  et WT, respectivement. Il a été montré que la rigidité de la membrane plasmique des différentes souches augmente avec leur avancement dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Kaur and Bachhawat, 1999; Abe and Hiraki, 2009). Ainsi, la souche sauvage accumulant l'ergostérol est la souche dont la membrane est la plus rigide. Cette rigidité peut être le reflet d'une cohésion forte entre le cycle B des stérols et les chaînes d'acides gras des phospholipides, expliquant le meilleur effet antioxydant de l'ergostérol. Un autre mécanisme est susceptible d'être à l'origine de l'influence de la nature des stérols sur l'oxydation lipidique. Une hypothèse avancée par Konrad Bloch serait que la nature des stérols

peut influencer sur les taux d'insaturations des acides gras des phospholipides et que l'ergostérol pourrait permettre l'accumulation d'une majorité d'acides gras saturés au niveau des phospholipides membranaires (Bloch, 1983). Ces acides gras sont moins sensibles aux phénomènes d'oxydation lipidique ce qui pourrait expliquer l'effet de la nature des stérols sur la résistance à l'oxydation lipidique. Des études complémentaires devront être réalisées afin de mieux comprendre l'effet de la structure des stérols sur l'oxydation des lipides.

### 5.5.3. Le passage du milieu liquide au milieu aérien : une force motrice possible pour l'évolution des stérols vers l'ergostérol chez les Fungi

L'ergostérol est issu d'une voie de biosynthèse complexe comportant un grand nombre d'étapes. Konrad Bloch, qui a reçu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1964 pour avoir élucidé la voie de biosynthèse du cholestérol, suggère que le cholestérol et l'ergostérol sont les résultats de la sélection naturelle pour aboutir à une fonctionnalité optimale de la membrane plasmique et que les intermédiaires présents dans leur voie de synthèse sont des précurseurs de ces molécules. Cette hypothèse, bien que largement admise, n'a cependant jamais pu être validée car la force motrice ayant guidé cette évolution est encore inconnue. Une autre question importante concerne la division de la voie de biosynthèse entre les Fungi et les mammifères. En effet, ces organismes présentent une voie initiale de biosynthèse commune jusqu'au lanostérol qui diverge ensuite vers l'ergostérol pour les Fungi et vers le cholestérol pour les mammifères (Galea and Brown, 2009). L'impact de ces deux types de stérols sur les propriétés structurales des membranes sont proches et le/les facteur(s) à l'origine de cette division est/sont à l'heure actuelle encore inconnu(s).

La synthèse des stérols implique la consommation d'oxygène. En effet, la synthèse d'une molécule de cholestérol, d'ergostérol et de phytostérol requiert 11, 12 et 11 molécules d'oxygène, respectivement (Summons et al., 2006), utilisées à la fin des voies de biosynthèse de ces stérols. L'apparition des premières cellules contenant des stéranes, précurseurs des stérols, coïncide avec l'apparition de l'oxygène sur la Terre, produit par les cyanobactéries il y a environ 2,5 milliards d'années (Kump, 2008). A cause de sa réactivité importante, l'oxygène a été très néfaste pour la survie des microorganismes anaérobies primitifs. Ainsi, l'augmentation de la concentration en oxygène sur Terre a stimulé l'évolution du métabolisme cellulaire afin de protéger les organismes des dégâts oxydatifs. Une hypothèse récente propose que les stérols membranaires permettent une protection contre l'oxydation cellulaire (Galea and Brown, 2009).

Deux mécanismes sont évoqués pour réaliser cette protection. Le premier serait lié au fait que les stérols membranaires pourraient diminuer la perméabilité de la membrane plasmique à l'oxygène et ainsi limiter l'entrée de ce composé au niveau intracellulaire. Ce premier mécanisme est appuyé par une étude de Widomska *et al.* qui montre que la perméabilité à l'oxygène de la membrane diminue lorsque l'on augmente la concentration en cholestérol (Widomska *et al.*, 2007). Le second mécanisme correspond à un possible effet antioxydant des stérols sur les acides gras membranaires. Des études réalisées sur des vésicules membranaires modèles ont montré que les stérols pouvaient réduire la peroxydation lipidique.

L'étude réalisée dans ce chapitre montre que l'évolution de la fin de la voie de biosynthèse de l'ergostérol permet à la levure *Saccharomyces cerevisiae* de survivre lors d'un passage d'un milieu liquide à un environnement gazeux suivi d'une réhydratation. Lors de ce traitement, les phénomènes oxydatifs deviennent importants car le retrait de l'eau de l'environnement cellulaire favorise l'oxydation. En effet, la concentration en oxygène dissous dans le milieu liquide est initialement faible et la diffusion de l'oxygène est lente. En revanche, lorsque l'eau est retirée autour des levures, les cellules sont directement exposées à l'oxygène atmosphérique. Dans leur milieu naturel (surface de fruits, sol...), les levures sont soumises à des fluctuations hydriques importantes de leur environnement qui dépendent essentiellement des variations climatiques. Ces perturbations ont pu être à l'origine de la pression de sélection ayant abouti à l'ergostérol chez la levure *S. cerevisiae* et plus généralement, chez les Fungi les plus évolués que sont les Ascomycètes et les Basidiomycètes. En effet, l'ergostérol est présent dans ces deux lignées de Fungi vivant sur le milieu terrestre tandis que les Fungi plus primitifs, tels que les Chytridiomycètes, vivant en milieu aquatique n'accumule pas ce stérol (Weete *et al.*, 2010). Ainsi, les résultats obtenus dans notre étude montrent, pour la première fois et sur des cellules *in vivo*, l'avantage de l'évolution de la voie de synthèse des stérols vers l'ergostérol pour les Fungi terrestres. Ces résultats permettent également d'appuyer la théorie de Bloch puisqu'une force motrice a pu être décelée pour expliquer la partie finale de la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

Les résultats de complémentation en ergostérol ou en cholestérol montrent que la résistance des levures, lors d'une déshydratation osmotique et d'un séchage aérien, est plus élevée lorsqu'elles accumulent l'ergostérol plutôt que le cholestérol. Ce résultat suggère que l'ergostérol est plus adapté que le cholestérol pour la survie des cellules lors de traitements hydriques, que ce soit sur le plan mécanique ou sur le plan de l'oxydation lipidique. Ce résultat pourrait être un premier élément de réponse à l'origine de la division de la voie de biosynthèse

des stérols à partir du lanostérol vers l'ergostérol chez les Fungi les plus évolués et vers le cholestérol chez les mammifères. En effet, ces Fungi sont unicellulaires ou passent au moins par des stades unicellulaires (spores de Basidiomycètes), subissant directement les fluctuations hydriques de l'environnement. En revanche, les mammifères sont des organismes pluricellulaires dont l'homéostasie hydrique est régulée, ne subissant ainsi pas de manière directe les modifications de l'environnement. Ces raisons pourraient expliquer que les Fungi accumulent un stérol plus coûteux à fabriquer d'un point de vue énergétique que les mammifères, afin de protéger leur membrane plasmique directement exposée aux perturbations hydriques et à l'oxygène atmosphérique.

**Les résultats présentés dans ce dernier chapitre montrent que l'évolution de la voie de biosynthèse de l'ergostérol permet d'augmenter la survie des levures à la déshydratation lors du passage d'un milieu liquide à un milieu aérien. La résistance des levures conférée par l'ergostérol semble liée l'influence de ce stérol sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique mais aussi à un possible rôle protecteur contre l'oxydation lipidique. Les cycles de déshydratation/réhydratation, subis par la levure dans son environnement naturel, ont pu être la force motrice à l'origine de l'évolution de la voie de synthèse des stérols vers l'ergostérol chez les levures, et plus généralement chez les Fungi les plus évolués.**

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette étude était d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à la déshydratation sévère. Cet objectif s'intègre dans un des axes du laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires qui concerne la stabilisation et la conservation de cellules d'intérêt. Bien que la levure soit admise comme anhydrobiote, de précédentes études menées au laboratoire ont montré que la survie de cette levure à des déshydratations de fortes amplitudes est dépendante de la cinétique de déshydratation. Ce microorganisme semblait donc particulièrement approprié pour comprendre les mécanismes conduisant à la mort ou à la survie des cellules lors de perturbations hydriques. La membrane plasmique, structure à l'interface entre le milieu intra et extracellulaire, était décrite dans la bibliographie comme une cible privilégiée des perturbations hydriques. Les travaux menés lors de cette étude ont donc été focalisés sur les modifications fonctionnelles et structurales de cet organe lors de la déshydratation et de la réhydratation. Une attention particulière a également été portée à l'influence des stérols membranaires sur la résistance des levures lors de perturbations hydriques.

Une partie de ce travail a été consacrée à la compréhension des effets de la cinétique d'un traitement hyperosmotique sur la réponse de la membrane plasmique. Le but était de comprendre le lien qui existe entre la vitesse de déshydratation et la survie des levures. En effet, bien qu'il ait été rapporté que les cinétiques progressives de déshydratation (rampes) permettent des taux de survie cellulaire supérieurs aux cinétiques rapides (chocs), les mécanismes impliqués n'étaient cependant pas connus. Nous nous sommes donc attachés à caractériser les modifications touchant la membrane plasmique lors de chocs ou de rampes hyperosmotiques.

#### Mécanismes à l'origine de la mort des levures lors de chocs hyperosmotiques sévères

Les mesures de perméabilité de la membrane plasmique ont révélé que l'étape de déshydratation ainsi que l'étape de réhydratation sont critiques pour l'intégrité de cette structure. Une première partie de la population de levures est perméabilisée lors de l'étape de déshydratation. Cet événement peut être lié aux contraintes importantes que subit la membrane plasmique lors de la contraction volumique brutale. En effet, pour les déshydratations de fortes amplitudes, la membrane plasmique tracte et compacte la paroi cellulaire à laquelle elle est attachée par de nombreux points d'ancrage. Ce phénomène est à l'origine d'un étirement de la membrane pouvant aboutir à sa rupture. Pendant le temps de maintien dans l'état déshydraté

après le choc hyperosmotique, les observations microscopiques ont révélé une internalisation de membrane conduisant à une diminution de la surface membranaire. Cette perte de surface semble être causée par la formation de nombreuses invaginations membranaires étroites en leur base qui favorisent les phénomènes de vésiculation. Lors de la reprise de volume induite par la réhydratation, la surface membranaire est insuffisante et les levures se perméabilisent. Les résultats obtenus dans cette étude confirment la forte implication de la membrane plasmique dans la mort cellulaire lors de déshydratations brutales. Ils confirment également une hypothèse posée par de précédents travaux réalisés au laboratoire GPMA qui suggérerait que des phénomènes de vésiculation membranaire induits par la déshydratation étaient impliqués dans la mort cellulaire lors de stress hydriques.

#### Mécanismes membranaires à l'origine de la survie des levures lors de rampes hyperosmotiques

Les rampes hyperosmotiques sont à l'origine de taux de survie des levures supérieurs à ceux obtenus lors de chocs. Ceci est lié à une préservation de l'intégrité de la membrane plasmique au cours du cycle déshydratation/réhydratation lors de perturbations hydriques progressives. Lors de déshydratations progressives, aucune internalisation de membrane plasmique n'est observée. Le maintien de la surface membranaire lors de la contraction volumique des levures est permis grâce à quelques grosses déformations particulières de la membrane évitant ainsi les phénomènes de fusion membranaire. Lors de la réhydratation, les levures peuvent ainsi retrouver leur volume initial sans se perméabiliser. L'origine de ces déformations particulières de la membrane plasmique semble être liée à une réorganisation latérale des composants membranaires pendant la contraction volumique. Une hypothèse pour expliquer la réorganisation latérale de la membrane pourrait être la transition de phase lipidique. Lorsque cette dernière se produit de manière progressive, elle pourrait permettre aux composants membranaires, notamment les stérols, situés initialement dans des microdomaines structurés en phase liquide ordonnée, de se disséminer dans l'ensemble de la membrane. Ce phénomène pourrait permettre de modifier les propriétés de la membrane plasmique telles que la résistance à l'étirement ainsi que les courbures locales. Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude montrent pour la première fois que la cinétique d'une perturbation environnementale gouverne les modifications structurales de la membrane plasmique. Ils permettent également de proposer une explication à la résistance plus élevée des cellules lors de perturbations hydriques progressives en comparaison à celle observée lors de perturbations brutales.

Une autre partie du travail de thèse a consisté à caractériser l'impact d'une modification de la structure chimique des stérols membranaires sur la réponse passive de la membrane plasmique ainsi que sur la survie des levures lors de déshydratations osmotiques. Ce travail a été complété par une étude visant à observer l'impact de la nature des stérols sur la résistance des levures lors d'une déshydratation par séchage. En plus des contraintes mécaniques qu'engendrent les déshydratations osmotiques, le séchage conduit à la mise en contact direct des cellules avec l'oxygène de l'air et est décrit pour induire une oxydation des lipides membranaires. Ces travaux sur les stérols ont permis de leur attribuer plusieurs rôles importants dans la résistance des levures à la déshydratation.

#### *Effet de la nature des stérols sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique*

L'étude de la résistance à des chocs hyperosmotiques du mutant  $\Delta erg6$ , accumulant majoritairement le zymostérol et le cholesta-5,7,24-trienol, a montré que cette souche est plus sensible que la souche sauvage qui accumule principalement l'ergostérol. Cette augmentation de sensibilité est liée aux modifications des propriétés mécaniques de la membrane plasmique conduisant à une réponse membranaire différente entre les deux souches. Les principales propriétés membranaires affectées par le changement de structure des stérols semblent être la résistance à l'étirement mais aussi les rayons de courbures locaux. Ces deux aspects sont cruciaux pour la survie des levures lors de la contraction volumique induite par la déshydratation.

#### *Effet de la nature des stérols sur la résistance à l'oxydation induite par le séchage*

Dans le cas de déshydratations réalisées par séchage, les résultats obtenus ont révélé que la nature de l'ambiance gazeuse est un facteur important pour la survie des levures. Le séchage sous air atmosphérique conduit à des taux de survie inférieurs à ceux obtenus lors de déshydratations osmotiques. En revanche, la réalisation d'un séchage dans une ambiance gazeuse privée d'oxygène (azote) permet de retrouver des taux de survie similaires à ceux obtenus lors de déshydratations osmotiques. Ces résultats confirment que le séchage sous air atmosphérique conduit à la combinaison d'un stress hydrique et d'un stress oxydant.

Le séchage a été réalisé sur la souche sauvage de levures ainsi que sur cinq mutants ( $\Delta erg$ ) accumulant des stérols de structures différentes. Ces mutants accumulent différents précurseurs de l'ergostérol et sont considérés comme des « ancêtres » de la levure sauvage. La comparaison de la survie au séchage de ces différentes souches a révélé que la souche sauvage

présente une résistance plus forte que les mutants. La sensibilité des mutants est d'autant plus grande que l'on s'éloigne de la souche sauvage au niveau de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. La structure de l'ergostérol semble permettre une résistance optimale aux contraintes mécaniques induites par la déshydratation mais aussi à l'oxydation engendrée par le contact des cellules avec l'air. Ces résultats sont les premiers à relier l'augmentation de la résistance à une perturbation à l'évolution de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Ils nous permettent de proposer une nouvelle hypothèse concernant la force motrice ayant guidé l'évolution de la voie de synthèse de cette molécule chez les levures. Dans leur environnement naturel, les levures sont soumises à des fluctuations hydriques fréquentes (exemple: alternance de périodes de pluie et de sécheresse). Ainsi, ces perturbations hydriques ont pu diriger l'évolution des stérols dans le règne des Fungi aboutissant ainsi à l'ergostérol qui, en plus de satisfaire l'ensemble des fonctions physiologiques, permet à la levure de résister aux fluctuations hydriques de son environnement.

Pour conclure ce travail, l'observation et l'étude d'un microorganisme particulièrement adapté aux environnements instables sur le plan hydrique nous a permis de comprendre un certain nombre de mécanismes déterminant la survie cellulaire à des déshydratations sévères. Il a pu être montré que l'anhydrobiose de la levure est liée à des propriétés particulières de sa membrane plasmique. De par l'accumulation d'ergostérol, la composition chimique de la membrane plasmique des levures est particulièrement adaptée pour résister aux contraintes volumiques associées aux traitements hydriques et à l'oxydation pendant le séchage. Ces connaissances sont utiles à la transposition vers des applications industrielles, activité essentielle d'un laboratoire d'ingénierie des procédés, et permettent d'envisager l'optimisation de la survie de cellules au cours des procédés mis en œuvre pour leur préservation dans l'état déshydraté. D'une part, ces optimisations devront viser à réduire la diminution volumique et les phénomènes d'internalisation membranaire associés à la déshydratation puisque ceux-ci sont à l'origine des événements conduisant à la perte d'intégrité de la membrane plasmique. D'autre part, elles devront également chercher à contrer l'oxydation lipidique se produisant pendant le séchage des cellules. Une solution possible, étudiée dans cette thèse, est la réalisation de séchages sous azote permettant d'augmenter la survie des cellules. L'utilisation d'antioxydants pendant le séchage est également envisageable et fait actuellement l'objet de recherches au laboratoire GPMA.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, F., and Hiraki, T. (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 743-752.
- Adya, A.K., Canetta, E., and Walker, G.M. (2006) Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* **6**: 120-128.
- Aresta-Branco, F., Cordeiro, A.M., Marinho, H.S., Cyrne, L., Antunes, F., and de Almeida, R.F. (In press) Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, sphingolipid-enriched lipid rafts. *J Biol Chem*.
- Assani, A., Moundanga, S., Beney, L., and Gervais, P. (2009) Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration. *Ann Bot* **104**: 1389-1395.
- Bacia, K., Schwille, P., and Kurzchalia, T. (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3272-3277.
- Ball, P. (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev* **108**: 74-108.
- Barenholz, Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res* **41**: 1-5.
- Baumgart, T., Das, S., Webb, W.W., and Jenkins, J.T. (2005) Membrane Elasticity in Giant Vesicles with Fluid Phase Coexistence. *Biophys J* **89**: 1067-1080.
- Beker, M.J., and Rapoport, A.I. (1987) Conservation of yeasts by dehydration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **35**: 127-171.
- Beney, L., Linares, E., Ferret, E., and Gervais, P. (1998) Influence of the shape of phospholipid vesicles on the measurement of their size by photon correlation spectroscopy. *Eur Biophys J* **27**: 567-574.
- Beney, L., Martinez de Marañon, I., Marechal, P.A., and Gervais, P. (2000) Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* **55**: 275-279.

- Beney, L., Martinez de Maranon, I., Marechal, P.A., Moundanga, S., and Gervais, P. (2001) Osmotic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* is not related to a high water flow rate across the membrane. *Biochem Eng J* **9**: 205-210.
- Berner, J.L., and Gervais, P. (1993) A new visualization chamber to study the transient volumetric response of yeast cells submitted to osmotic shifts. *Biotechnol Bioeng* **43**: 165-170.
- Billi, D., and Potts, M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* **153**: 7-12.
- Bloch, K. (1994) Evolutionary Perfection of a Small Molecule. In *Blondes in Venetian Paintings, the Nine-Banded Armadillo, and Other Essays in Biochemistry* Yale University Press. New Haven, CT, pp. 14–36.
- Bloch, K.E. (1983) Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* **14**: 47-92.
- Bottema, C.D.K., McLean-Bowen, C.A., and Parks, L.W. (1983) Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **734**: 235-248.
- Brovchenko, I., Krukau, A., Oleinikova, A., and Mazur, A.K. (2007) Water clustering and percolation in low hydration DNA shells. *J Phys Chem B* **111**: 3258-3266.
- Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **17**: 181-242.
- Calcott, P.H., and Rose, A.H. (1982) Freeze-thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *Microbiology* **128**: 549-555.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., and Arakawa, T. (1990) Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J Dairy Sci* **73**: 3627-3636.
- Chirife, J., and Fontan, C.F. (1980) A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range. *J Food Sci* **45**: 1717-1719.
- Cress, A.E., and Gerner, E.W. (1980) Cholesterol levels inversely reflect the thermal sensitivity of mammalian cells in culture. *Nature* **283**: 677-679.

- 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., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M. (1989) Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 520-523.
- Cullis, P.R., Van Dijck, P.W.M., De Kruijff, B., and De Gier, J. (1978) Effects of cholesterol on the properties of equimolar mixtures of synthetic phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. A <sup>31</sup>P NMR and differential scanning calorimetry study. *Biochim Biophys Acta* **513**: 21-30.
- Czub, J., and Baginski, M. (2006) Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. *Biophys J* **90**: 2368-2382.
- D'Antuono, C., Fernandez-Tome, M.C., Sterin-Speziale, N., and Bernik, D.L. (2000) Lipid-protein interactions in rat renal subcellular membranes: a biophysical and biochemical study. *Arch Biochem Biophys* **382**: 39-47.
- de Maranon, I.M., Gervais, P., and Molin, P. (1997) Determination of cells' water membrane permeability: unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **56**: 62-70.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., and Thorpe, T.A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* **32**: 93-101.
- Edidin, M. (2003) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 414-418.
- Eisenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E., and Schneider, R. (2002) A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Mol Biol Cell* **13**: 4414-4428.
- Ellis, R.J., and Minton, A.P. (2003) Cell biology: join the crowd. *Nature* **425**: 27-28.
- Evans, E.A., Waugh, R., and Melnik, L. (1976) Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys J* **16**: 585-595.

- Fahsel, S., Pospiech, E.M., Zein, M., Hazlet, T.L., Gratton, E., and Winter, R. (2002) Modulation of concentration fluctuations in phase-separated lipid membranes by polypeptide insertion. *Biophys J* **83**: 334-344.
- Ferrando, M., and Spiess, W.E.L. (2001) Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions. *J Food Eng* **49**: 115-127.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509.
- Franca, M.B., Panek, A.D., and Eleutherio, E.C. (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**: 621-631.
- Fuller, W., Forsyth, T., and Mahendrasingam, A. (2004) Water-DNA interactions as studied by X-ray and neutron fibre diffraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 1237-1247.
- Galea, A.M., and Brown, A.J. (2009) Special relationship between sterols and oxygen: were sterols an adaptation to aerobic life? *Free Radic Biol Med* **47**: 880-889.
- Garcia-Manyes, S., Oncins, G., and Sanz, F. (2005) Effect of Temperature on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy. *Biophys J* **89**: 4261-4274.
- Garner, M.M., and Burg, M.B. (1994) Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *Am J Physiol* **266**: 877-892.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., and Matallana, E. (2010) Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int J Food Microbiol* **136**: 295-303.
- Gervais, P., and Marechal, P.A. (1994) Yeast Resistance to High Levels of Osmotic Pressure: Influence of Kinetics. *J Food Eng* **22**: 399-407.
- Gervais, P., and Beney, L. (2001) Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol* **47**: 831-839.
- Gervais, P., Marechal, P.A., and Molin, P. (1992) Effects of the Kinetics of Osmotic Pressure Variation on Yeast Viability. *Biotechnol Bioeng* **40**: 1435-1439.

- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (1994) High efficiency transformation with lithium acetate. In *Molecular genetics of yeast: a practical approach*, Oxford, UK: IRL Press, pp. 121–134.
- Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., and Tanner, W. (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* **26**: 1-8.
- Guyot, S., Ferret, E., and Gervais, P. (2005) Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnol Bioeng* **92**: 403-409.
- Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* **52**: 253-265.
- Hays, L.M., Crowe, J.H., Wolkers, W., and Rudenko, S. (2001) Factors Affecting Leakage of Trapped Solutes from Phospholipid Vesicles during Thermotropic Phase Transitions. *Cryobiology* **42**: 88-102.
- He, X., Fowler, A., and Toner, M. (2006) Water activity and mobility in solutions of glycerol and small molecular weight sugars: Implication for cryo-and lyopreservation. *J Appl Phys* **100**: 074702.
- Heese-Peck, A., Pichler, H., Zanolari, B., Watanabe, R., Daum, G., and Riezman, H. (2002) Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol Biol Cell* **13**: 2664-2680.
- Hossack, J.A., and Rose, H. (1976) Fragility of Plasma Membranes in *Saccharomyces cerevisiae* Enriched with Different Sterols. *J Bacteriol* **127**: 67-75.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **1**: 163-168.
- Jahnke, L., and Klein, H.P. (1983) Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **155**: 488-492.
- Jasnin, M., Moulin, M., Haertlein, M., Zaccai, G., and Tehei, M. (2008) Down to atomic-scale intracellular water dynamics. *EMBO Rep* **9**: 543-547.
- Kas, J., and Sackmann, E. (1991) Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys J* **60**: 825-844.

- Kaur, R., and Bachhawat, A.K. (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in erg mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **145** 809-818.
- Kedem, O., and Katchalsky, A. (1958) Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta* **27**: 229-246.
- Klipp, E., Nordlander, B., Kruger, R., Gennemark, P., and Hohmann, S. (2005) Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol* **23**: 975-982.
- Klose, C., Ejsing, C.S., Garcia-Saez, A.J., Kaiser, H.J., Sampaio, J.L., Surma, M.A. et al. Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *J Biol Chem* **285**: 30224-30232.
- Koch, A.L. (1988) Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric. *Microbiol Rev* **52**: 337-353.
- Kump, L.R. (2008) The rise of atmospheric oxygen. *Nature* **451**: 277-278.
- Laroche, C., Beney, L., Marechal, P.A., and Gervais, P. (2001) The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 249-254.
- Laroche, C., Simonin, H., Beney, L., and Gervais, P. (2005) Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures. *Biochim Biophys Acta* **1669**: 8-16.
- Leckband, D.E., Helm, C.A., and Israelachvili, J. (1993) Role of calcium in the adhesion and fusion of bilayers. *Biochemistry* **32**: 1127-1140.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., and Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3592-3597.
- Lesser, G.J., and Rose, G.D. (1990) Hydrophobicity of amino acid subgroups in proteins. *Proteins: Struct Funct Bioinf* **8**: 6-13.

- Lieverse, L.C., and van 't Riet, K. (1994) Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **51**: 71-89.
- Lipke, P.N., and Ovalle, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740.
- Lipowsky, R., and Sackmann, E. (1995) *Structure and dynamics of membranes*. Amsterdam: Elsevier.
- Lohner, K. (1996) Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chem Phys Lipids* **81**: 167-184.
- Lorenz, R.T., and Parks, L.W. (1991) Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **26**: 598-603.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14**: 1360-1371.
- Maeda, H., and Ishida, N. (1967) Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J Biochem* **62**: 276-278.
- Mager, W.H., and Siderius, M. (2002) Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* **2**: 251-257.
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., and Tanner, W. (2003) Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Mol Biol Cell* **14**: 4427-4436.
- Malinsky, J., Opekarova, M., and Tanner, W. (2010) The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* **27**: 473-478.
- Marechal, P.A., de Maranon, I.M., Molin, P., and Gervais, P. (1995) Yeast cell responses to water potential variations. *Int J Food Microbiol* **28**: 277-287.

- Martinez de Maranon, I., Marechal, P.A., and Gervais, P. (1996) Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 519-523.
- Martinez de Maranon, I., Chaudanson, N., Joly, N., and Gervais, P. (1999) Slow heat rate increases yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity. *Biotechnol Bioeng* **65**: 176-181.
- Matsumoto, B. (1993) *Cell biological applications of confocal microscopy*. San Diego: Academic Press.
- McKersie, B.D., and Stinson, R.H. (1980) Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiol* **66**: 316-320.
- McMurchie, E.J., and Raison, J.K. (1979) Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochim Biophys Acta* **554**: 364-374.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., and Baumeister, W. (2002) Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* **298**: 1209-1213.
- Meikle, A.J., Reed, R.H., and Gadd, G.M. (1988) Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **134**: 3049-3060.
- Mille, Y., Beney, L., and Gervais, P. (2002) Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochim Biophys Acta* **1567**: 41-48.
- Mille, Y., Beney, L., and Gervais, P. (2003) Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12. *Biotechnol Bioeng* **83**: 578-582.
- Mille, Y., Beney, L., and Gervais, P. (2005a) Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: Towards a survival prediction test. *Biotechnol Bioeng* **92**: 479-484.
- Mille, Y., Obert, J.P., Beney, L., and Gervais, P. (2004) New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnol Bioeng* **88**: 71-76.

- Mille, Y., Girard, J.P., Beney, L., and Gervais, P. (2005b) Air drying optimization of *Saccharomyces cerevisiae* through its water–glycerol dehydration properties. *J Appl Microbiol* **99**: 376-382.
- Morein, S., Andersson, A., Rilfors, L., and Lindblom, G. (1996) Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. *J Biol Chem* **271**: 6801-6809.
- Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E., and Clarke, K.J. (1986) Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **132**: 2023-2034.
- Mugnier, J., and Jung, G. (1985) Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Appl Environ Microbiol* **50**: 108-114.
- Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H., and Riezman, H. (1999) Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 3943-3957.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250.
- Munro, S. (2003) Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**: 377-388.
- Nevoigt, E., and Stahl, U. (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 231-241.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., and Sato, K. (1991) Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* **53**: 201S-205S.
- Norrish, R.S. (1966) An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *Int J Food Sci Tech* **1**: 25-39.
- Op den Kamp, J.A.F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* **48**: 47-71.
- Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G., and Gratton, E. (1994) Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophys J* **66**: 120-132.

- Patton, J.L., and Lester, R.L. (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol* **173**: 3101-3108.
- Pawley, J.B., and Masters, B.R. (2008) *Handbook of biological confocal microscopy*. New York: Springer.
- Pereira Ede, J., Panek, A.D., and Eleutherio, E.C. (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperon* **8**: 120-124.
- Persson, E., and Halle, B. (2008) Cell water dynamics on multiple time scales. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 6266-6271.
- Poirier, I., Marechal, P.A., and Gervais, P. (1997) Effects of the kinetics of water potential variation on bacteria viability. *J Appl Microbiol* **82**: 101-106.
- Poirier, I., Marechal, P.A., Evrard, C., and Gervais, P. (1998) *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 704-709.
- Pollack, G.H. (2001) Is the cell a gel--and why does it matter? *Jpn J Physiol* **51**: 649-660.
- Poolman, B., and Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.
- Potts, M. (2001) Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol* **9**: 553-559.
- Privalov, P.L., and Gill, S.J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem* **39**: 191-235.
- Ragoonanan, V., Malsam, J., Bond, D.R., and Aksan, A. (2008) Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 2283-2290.
- Rank, G.H., and Robertson, A.J. (1983) Protein and lipid composition of the yeast plasma membrane. In *Yeast genetics: fundamental and applied aspects*, Berlin: Springer-Verlag KG, pp. 225-241.
- Riezman, H. (1985) Endocytosis in yeast: Several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**: 1001-1009.

- Rodriguez-Vargas, S., Sanchez-Garcia, A., Martinez-Rivas, J.M., Prieto, J.A., and Randez-Gil, F. (2007) Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ Microbiol* **73**: 110-116.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., and Foerst, P. (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol* **105**: 1-13.
- Schaber, J., Adrover, M.A., Eriksson, E., Pelet, S., Petelenz-Kurdziel, E., Klein, D. et al. (2010) Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation. *Eur Biophys J* **39**: 1547-1556.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M. et al. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**: 741-754.
- Schwarz, H., and Koch, A.L. (1995) Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. *Microbiology* **141**: 3161-3170.
- Serrano, R. (1991) Transport across Yeast Vacuolar and Plasma Membranes. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*, New York: Cold Spring Harbor Monograph Archive, pp. 523-585.
- Shea, J.E., Onuchic, J.N., and Brooks, C.L. (2002) Probing the folding free energy landscape of the src-SH3 protein domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16064-16068.
- Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K.A., Kelders, M., and Mager, W.H. (2000) The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol* **36**: 1381-1390.
- Simonin, H., Beney, L., and Gervais, P. (2007) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1600-1610.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Slaninova, I., Sestak, S., Svoboda, A., and Farkas, V. (2000) Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **173**: 245-252.
- Sorin, E.J., Rhee, Y.M., and Pande, V.S. (2005) Does water play a structural role in the folding of small nucleic acids? *Biophys J* **88**: 2516-2524.
- Stadtman, E.R. (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* **40**: 1250-1258.
- Stradalova, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazikova, M., Rachel, R., Tanner, W., and Malinsky, J. (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci* **122**: 2887-2894.
- Summons, R.E., Bradley, A.S., Jahnke, L.L., and Waldbauer, J.R. (2006) Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 951-968.
- Swan, T.M., and Watson, K. (1999) Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Can J Microbiol* **45**: 472-479.
- Tanford, C. (1997) How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Sci* **6**: 1358-1366.
- Tibayrenc, P., Preziosi-Belloy, L., Roger, J.M., and Ghommidh, C. (2010) Assessing yeast viability from cell-size measurements? *J Biotechnol* **149**: 74-80.
- Tokumasu, F., Jin, A.J., Feigenson, G.W., and Dvorak, J.A. (2003) Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy* **97**: 217-227.
- Tomczak, M.M., Hinch, D.K., Crowe, J.H., Harding, M.M., and Haymet, A.D. (2003) The effect of hydrophobic analogues of the type I winter flounder antifreeze protein on lipid bilayers. *FEBS Lett* **551**: 13-19.

- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59**: 304-322.
- Van Meer, G. (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J* **24**: 3159-3165.
- Van Steveninck, J., and Ledebroer, A.M. (1974) Phase transitions in the yeast cell membrane the influence of temperature on the reconstitution of active dry yeast. *Biochim Biophys Acta* **352**: 64-70.
- Veatch, S.L., and Keller, S.L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J* **85**: 3074-3083.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779-792.
- Vindelov, J., and Arneborg, N. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast* **19**: 429-439.
- Watanabe, Y., Martini, J.E.J., and Ohmoto, H. (2000) Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature* **408**: 574-578.
- Weete, J.D., Abril, M., and Blackwell, M. (2010) Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PloS ONE* **5**: e10899.
- Wells, G.B., and Lester, R.L. (1983) The isolation and characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids. *J Biol Chem* **258**: 10200-10203.
- Widomska, J., Raguz, M., and Subczynski, W.K. (2007) Oxygen permeability of the lipid bilayer membrane made of calf lens lipids. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 2635-2645.
- Wiseman, H. (1993) Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* **326**: 285-288.

- Wiseman, H., Cannon, M., Arnstein, H.R.V., and Halliwell, B. (1993) Enhancement by tamoxifen of the membrane antioxidant action of the yeast membrane sterol ergosterol: relevance to the antiyeast and anticancer action of tamoxifen. *Biochim Biophys Acta* **1181**: 201-206.
- Wolfe, J., and Steponkus, P.L. (1981) The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts. *Biochim Biophys Acta* **643**: 663-668.
- Wolkers, W.F., van Kilsdonk, M.G., and Hoekstra, F.A. (1998) Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochim Biophys Acta* **1425**: 127-136.
- Wolkers, W.F., Tablin, F., and Crowe, J.H. (2002) From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**: 535-543.
- You, K.M., Rosenfield, C.L., and Knipple, D.C. (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1499-1503.
- Young, M.E., Karpova, T.S., Brugger, B., Moschenross, D.M., Wang, G.K., Schneiter, R. et al. (2002) The Sur7p Family Defines Novel Cortical Domains in *Saccharomyces cerevisiae*, Affects Sphingolipid Metabolism, and Is Involved in Sporulation. *Mol Cell Biol* **22**: 927-934.
- Zimmermann, U. (1978) Physics of turgor-and osmoregulation *Annu Rev Plant Physiol* **29**: 121-148.
- Zinser, E., Paltauf, F., and Daum, G. (1993) Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol* **175**: 2853-2858.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 2026-2034.

# ANNEXES



## Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration

Sebastien Dupont<sup>a,\*</sup>, Laurent Beney<sup>a,\*</sup>, Jean-Francois Ritt<sup>b</sup>, Jeannine Lherminier<sup>c</sup>, Patrick Gervais<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Centre de Recherche en Infectiologie, Division Microbiologie, Université de Laval, Boulevard Laurier, Québec, Canada G1V 4G2

<sup>c</sup> UMR Plante-Microbe-Environnement Université de Bourgogne/1083 INRA/5184 CNRS, INRA, BP 86510, 21065 DIJON Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 October 2009

Received in revised form 12 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 28 January 2010

#### Keywords:

Dehydration kinetic

Cell survival

Microdomain

Confocal microscopy

Electron microscopy

### ABSTRACT

In this study, we investigated the kinetic and the magnitude of dehydrations on yeast plasma membrane (PM) modifications because this parameter is crucial to cell survival. Functional (permeability) and structural (morphology, ultrastructure, and distribution of the protein Sur7-GFP contained in sterol-rich membrane microdomains) PM modifications were investigated by confocal and electron microscopy after progressive (non-lethal) and rapid (lethal) hyperosmotic perturbations. Rapid cell dehydration induced the formation of many PM invaginations followed by membrane internalization of low sterol content PM regions with time. Permeabilization of the plasma membrane occurred during the rehydration stage because of inadequacies in the membrane surface and led to cell death. Progressive dehydration conducted to the formation of some big PM pleats without membrane internalization. It also led to the modification of the distribution of the Sur7-GFP microdomains, suggesting that a lateral rearrangement of membrane components occurred. This event is a function of time and is involved in the particular deformations of the PM during a progressive perturbation. The maintenance of the repartition of the microdomains during rapid perturbations consolidates this assumption. These findings highlight that the perturbation kinetic influences the evolution of the PM organization and indicate the crucial role of PM lateral reorganization in cell survival to hydric perturbations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Liquid water is a requirement for life on Earth and is the main factor of interest for researchers looking for life on other planets. However, diverse organisms, including tardigrades, nematodes, yeasts, and higher and lower plants, can survive in a dehydrated environment for extended periods. The mechanisms by which cells survive extreme dehydration are important to biological research and for stabilizing cells for biotechnological applications. The long-term preservation of biological materials is currently based on severe dehydration of the cell environment (e.g., freezing, drying, and freeze-drying) [1–3]. Dehydration is nevertheless an abiotic stress that perturbs cells and threatens survival.

The effects on cells induced by hydric perturbations are mainly a function of the severity of the treatment, and the magnitude of the perturbation determines the quantity of water that flows out of the cells. In the low-amplitude range of dehydration, most microorganisms adapt through active metabolic pathways. Osmoregulatory

pathways encompass active processes such as the high-osmolarity glycerol-signaling system through which cells monitor and adjust the internal osmotic pressure and control their shape, turgor, and relative water content [4], which allow cells to grow in concentrated media. The maximal osmotic pressure for osmoregulation varies according to microbial species and is about 15 MPa for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [5]. Long-term preservation strategies exceed this limit and typically involve osmotic pressures between 150 and 300 MPa corresponding to water activity ( $a_w$ ) of 0.34 and 0.15, respectively. In this range of extreme dehydration, active cell responses have never been detected and cell survival is challenged considerably by the physicochemical constraints induced by the low hydric status. The structures of macromolecules and macromolecular assemblies are altered in these conditions [6], and the decrease in the cytoplasmic space caused by water outflow increases the confinement of intracellular structures and promotes aggregation phenomena [7].

Among the vital structures affected by extreme dehydration, the plasma membrane is a major target because the phospholipid bilayer structure results largely from the interaction of the lipids with the cytoplasmic and extracellular fluids. Dehydration and consequential osmotic phenomena cause movement of large quantities of water across the membrane, decreasing cell volume. For example, during hyperosmotic shock, the volume of yeast *S. cerevisiae* can be reduced

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 39 66 65; fax: +33 3 80 39 68 98.  
E-mail address: [laurent.beney@u-bourgogne.fr](mailto:laurent.beney@u-bourgogne.fr) (L. Beney).

by 60% within a few milliseconds [8]. This event increases the cell surface-to-volume ratio (s/v), causing plasma membrane deformations such as ruffles, wrinkles, and surface roughness [9,10]. The fluidity and structural arrangement of membrane lipids also change; for example, their mobility decreases and the transition from the liquid lamellar to gel or hexagonal phases can occur under conditions of low water content [11–13]. These phenomena are often mentioned to explain plasma membrane permeabilization and cell death during hydric stresses [14–16].

Biological membranes have long been considered to be a fluid mixture of lipids organized in a homogenous bilayer. However, many studies reported that the plasma membrane of eukaryotic cells is highly compartmentalized laterally and that the membrane displays lipid microdomains enriched in sterols, sphingolipids, and specific raft proteins [17,18]. Lipid microdomains, so-called lipid rafts, are proposed to function in several processes including endocytosis and protein trafficking. The plasma membrane of the yeast *S. cerevisiae* comprises two different nonoverlapping lateral plasma membrane compartments. The first is occupied by the protein Pma1 and is called MCP (membrane compartment occupied by Pma1p) [19] or RMC P (raft-based membrane compartment P) [20]. The second contains the arginine transporter Can1 and is named MCC (membrane compartment occupied by Can1p) or RMC C (raft-based membrane compartment C). Grossmann et al. [21] have shown that 21 proteins cluster within or associate with the MCC ergosterol-rich membrane compartment. In physiological conditions, when fused to GFP, these proteins form a patch at the cell surface. The effect of severe perturbations on the plasma membrane lateral organization has never been investigated.

Several studies have shown that decreasing the rate of perturbation improves cell survival after extreme dehydration. Such kinetic effect was observed during dehydrations performed by drying [22] or hyperosmotic treatments [13,23] and suggest that the structural evolution of the membrane depends on the dehydration rate. The effects of the kinetics concern essentially the rate of osmotic water transfer and potentially the physical reorganization of cellular structures during dehydration. In the present study, we endeavored to clarify the impact of the magnitude and the kinetic of dehydration on plasma membrane reorganization and cell survival. We used yeast cells because they experience hydric fluctuations in their natural environment and are a convenient model to investigate the effect of hyperosmotic perturbations in eukaryotic organisms. Three dehydration conditions were chosen: 30 MPa ( $a_w = 0.8$ ), corresponding to a sublethal level but out of the osmoregulatory range, and 110 MPa ( $a_w = 0.45$ ) and 166 MPa ( $a_w = 0.3$ ), corresponding to severe dehydration close to the water status of dried cells. Dehydration was induced by progressively increasing the concentration of glycerol in the extracellular solution (slope) or within a few milliseconds (shock). This protocol allowed us to induce severe cell dehydration in a liquid medium, which is convenient for microscopic observations [24]. Functional and structural investigations of the plasma membrane are necessary to understand the mechanisms operating during dehydration perturbation. To this end, we used fluorescence microscopy (epifluorescence and confocal) to observe modifications of the yeast plasma membrane during dehydration [25]. These modifications included changes in plasma membrane permeability, Sur7-GFP (contained in MCC) repartition, and membrane delocalization. To better understand the effect of dehydration kinetic, we used transmission electron microscopy (TEM) in cases where the kinetics influenced the fluorescent staining and survival rates. Our results show that slow perturbations led to the lateral reorganization of the plasma membrane, which was associated with the preservation of plasma membrane integrity, whereas rapid perturbation did not allow this phenomenon. We conclude that time is required for membrane reorganization and that this event is crucial for cell survival in response to severe dehydration.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strain and culture conditions

*S. cerevisiae* strain BY 4742 (Euroscarf, Frankfurt, Germany) was used in this study. Cells were grown aerobically at 25 °C in 250 mL conical flasks containing 100 mL of Malt Wickerham modified medium (MW) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The MW medium contained 10 g glucose, 3 g pancreatic peptone, 3 g yeast extract, and 1.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in 1 L of water-glycerol, which had an osmotic pressure of 1.4 MPa. This osmotic pressure has been recommended for the optimal growth of *S. cerevisiae* [26]. A subculture (1 mL) was transferred into a conical flask containing MW medium, and cultures were placed on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) at 250 rpm for 24 h and allowed to grow to the early stationary phase. The final population was estimated at about  $10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

Plasmid amplification was carried out in the *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  host, grown at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicillin. The *S. cerevisiae* transformants were selected on Yeast Nitrogen Base case plates (0.67% Difco yeast nitrogen base without amino acids, 0.5%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1% glucose, 0.1% Difco Bacto Casamino acids, and 1.8% agar).

### 2.2. Yeast transformation

The strain BY4742 was transformed with the plasmid Ylp211-SUR7GFP after linearization by Eco52I. This plasmid was a generous gift from W. Tanner (University of Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Germany) and was first transferred into *E. coli* DH5 $\alpha$  and selected on Luria-Bertani plates supplemented with ampicillin (100  $\mu\text{g/mL}$ ). The *S. cerevisiae* strain transformation with the linearized Ylp211SUR7GFP plasmid was performed by the LiAc method [27].

### 2.3. Preparation of binary water-glycerol solutions of different osmotic pressures

The solute used in all experiments to perform hyperosmotic treatments was glycerol (Sigma-Aldrich).

The mass of solute to be added to 1000 g of distilled water to obtain the desired water activity ( $a_w$ ) was calculated using the Norrish equation [28]:

$$a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s}$$

where  $X_s$  is the molar fraction of the solute and  $K$  is the Norrish coefficient of the solute used to increase the osmotic pressure. For glycerol,  $K = 1.16$  [29]. Osmotic pressure ( $\pi$ ) is related to the water activity by the following equation:

$$\pi = \frac{-RT \ln a_w}{V_w}$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $T$  is the temperature (K) and  $V_w$  is the partial molar volume of water ( $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ). Table 1 presents the quantity of glycerol used to prepare the solutions of different osmotic pressures.

**Table 1**  
Preparation of binary water-glycerol solutions of different osmotic pressures.

| Osmotic pressure (MPa) | Water activity | Glycerol weight (g) for 1000 g of water |
|------------------------|----------------|-----------------------------------------|
| 1.4                    | 0.59           | 51                                      |
| 15                     | 0.5            | 513                                     |
| 30                     | 0.8            | 1063                                    |
| 110                    | 0.45           | 3986                                    |
| 166                    | 0.3            | 5654                                    |

The osmotic pressure of all solutions was checked with a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

#### 2.4. Osmotic treatments

Three levels of osmotic treatments were used: moderate (30 MPa), which is slightly higher than that allowing osmoregulation, and severes (110 and 166 MPa).

Samples (20 mL) of culture were centrifuged (5 min, 2200 ×g), washed twice in the binary water–glycerol mixture (1.4 MPa), and the pellets were resuspended in 10 mL of the same medium. For rapid perturbations (shock), 1 mL aliquots of this suspension were placed in microsample tubes, which were then centrifuged (10 min, 5100 ×g) and the supernatant was removed. Hyperosmotic shock was induced by quickly introducing 1 mL of a binary water–glycerol solution (final osmotic pressure of 30, 110, or 166 MPa) to the pellets. For the progressive perturbations (osmotic slope of 0.086 MPa s<sup>-1</sup>), the external osmotic pressure was increased linearly by slowly adding pure glycerol to an agitated conical flask containing the initial cell suspension at 1.4 MPa; the glycerol solution was injected by a syringe pump (KD Scientific, Boston, MA, USA). The cells were maintained for various maintenance periods under hyperosmotic conditions before rehydration. For rapid rehydration, the hyperosmotic solution was removed from the microsample tube after centrifugation (10 min, 5100 ×g) and 1 mL of the binary water–glycerol solution (1.4 MPa) was introduced suddenly to the cell pellet. Progressive rehydration was performed using successive dilutions in solutions with decreasing osmotic pressure to 1.4 MPa.

Cell suspensions, rehydration solutions, and shock solutions were kept in an air-conditioned room at 25 °C. The temperature of the solutions was checked using a thermocouple.

#### 2.5. Measurement of yeast viability

Yeast viability was estimated in triplicate by the CFU method. After osmotic treatment, fully rehydrated cells were diluted serially and the appropriate dilutions were plated in MW medium with 15 g L<sup>-1</sup> of agar. CFU were counted after incubation for 36 h at 25 °C. The initial cell suspension was used as the control.

#### 2.6. Fluorescence microscopy

Propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to assess plasma membrane integrity. This probe stains nucleic acids after permeabilization of the plasma membrane. PI was dissolved in distilled water (10 mg mL<sup>-1</sup>) to prepare the stock solution, and 200 µg of PI was used to stain 10<sup>8</sup> cells. PI was added to the cell suspension before, during, or 60 min after the dehydration shock and after rehydration (Fig. 8A). This protocol allowed us to estimate the changes in the membrane permeability during and after hydric perturbation. For staining during the hydric stress, the probe was added to the hyperosmotic solution before induction of the perturbation. A Nikon Eclipse TE 2000 E epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with spectral camera Nuance CRI was used to observe cells. Images were acquired with a ×40 (NA: 0.95) Plan Apo objective (Nikon) and collected with Nuance software (Nikon). Black and white images were captured to observe the total cell population. A monochromatic epifilter (540–580 nm and 600–660 nm excitation and emission wavelengths, respectively) was used to observe cells stained with PI.

N-(3-(triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM 4-64) (Invitrogen) is a membrane probe that is not fluorescent in an aqueous medium and which has been extensively used to observe endovesiculation phenomena [30–32]. In our study, FM 4-64 was used to observe the delocalization of membrane lipids and changes in cell morphology. The dye was dissolved in distilled water (1 mg mL<sup>-1</sup>) to prepare the

stock solution, and 10<sup>8</sup> cells were stained with 20 µg of FM 4-64. Before staining, yeast cells were placed in the 15 MPa water–glycerol solution to stop the natural endocytosis pathway, which could perturb the observations of membrane delocalization induced by hyperosmotic treatment. This low osmotic pressure had no impact on yeast viability. A Nikon Eclipse TE 2000 U microscope with multispectral confocal head D Eclipse C1 was used to observe the cells stained with FM 4-64. Excitation was performed at 488 nm with laser He/Ar and the emission signal was recovered between 550 and 700 nm. Images were acquired with a ×60 (NA: 0.95) Plan Apo objective and a ×100 (NA: 1.4) Plan Apo oil-immersion objective (Nikon), and collected with EZ-C1 software 3.50 (Nikon).

Sur7-GFP was visualized using the same confocal microscope. Images were acquired with a ×100 (NA: 1.4) Plan Apo oil-immersion objective (Nikon), and collected with EZ-C1 software 3.50 (Nikon). Excitation was performed at 488 nm, and the emission signal was measured between 500 and 550 nm.

#### 2.7. Electron microscopy

TEM was used to assess the yeast ultrastructure just after hyperosmotic slope and shock to 110 MPa. Concentrated yeast samples were fixed for 12 h at 4 °C with 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in PBS for control cells (1.4 MPa) and in water–glycerol solution for cells subjected to 110 MPa osmotic pressure. Treated cells were fixed just after the end of the osmotic treatment. After washing, cells were postfixed with 0.5% OsO<sub>4</sub>–0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 1 h at 4 °C. Cells were dehydrated progressively in 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% ethanol, 30 min for each step, impregnated with Epon, and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections (90 nm) were obtained using an Ultracut E ultramicrotome (Reichert, Depew, NY, USA) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Polysaccharides were detected histochemically by the periodic acid–thiocarbohydrazide (TCH)–silver proteinate (PATAg) method described by Thiery [33]. Observations were performed on a Hitachi 7500 transmission electron microscope (operating at 80 kV) equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Danvers, MA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Impact of hyperosmotic treatments on yeast viability

##### 3.1.1. Kinetic and magnitude of hyperosmotic treatments influence the yeast survival

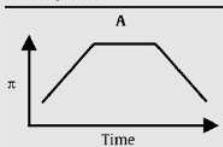
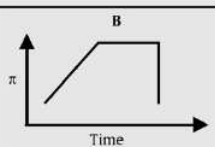
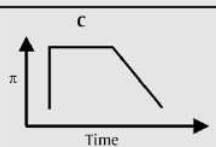
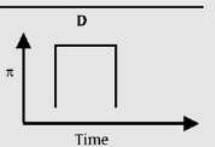
Cells were treated with the hyperosmotic conditions at 30, 110, or 166 MPa for 60 min and then rehydrated to 1.4 MPa. The dehydration and rehydration steps were achieved progressively or quickly according to 4 possible combinations (Table 2). For 30 MPa, the rates of dehydration and rehydration had almost no effect on yeast viability, which remained higher than 80%. For severe dehydrations, the survival rate depended on the kinetics of dehydration and rehydration. At 110 and 166 MPa, the best viabilities were observed after progressive dehydrations followed by progressive rehydrations (86.9% and 78.7%, respectively) and the weakest were observed when the two steps were performed quickly (12.5% and 0.3%, respectively). Intermediate viabilities were obtained after slope/shock and shock/slope cycles: 41.7% and 67.7%, respectively, for the treatments to 110 MPa, and 19.2% and 42.6%, respectively, for the treatments to 166 MPa. These results showed that the magnitude of the dehydration treatment influenced the cell viability. For severe perturbations (110 and 166 MPa), survival rates are strongly related to the perturbation kinetic of the dehydration and rehydration steps.

##### 3.1.2. First minutes after a severe hydric shock are crucial for cell survival

The effect of maintenance periods in hyperosmotic conditions on cell viability was estimated by rapid rehydration at different times

**Table 2**

Impact of changes in the kinetics of dehydration and rehydration on yeast viability for treatments to 30, 110, and 166 MPa with a maintenance period of 60 min in hyperosmotic conditions.

| Amplitude | Kinetic profiles                                                                  |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|           |  |  |  |  |
| 30 MPa    | 86.0% (3.6)                                                                       | 86.2% (3.9)                                                                       | 88.2% (8.4)                                                                        | 83.5% (2.5)                                                                         |
| 110 MPa   | 86.9% (11.6)                                                                      | 67.7% (4.7)                                                                       | 41.7% (12.7)                                                                       | 12.5% (9.1)                                                                         |
| 166 MPa   | 78.7% (3.6)                                                                       | 42.6% (3.6)                                                                       | 19.2% (1.1)                                                                        | 0.3% (0.2)                                                                          |

$\pi$  corresponds to the osmotic pressure of the extracellular medium. (A) Slow dehydration and slow rehydration, (B) slow dehydration and rapid rehydration, (C) rapid dehydration and slow rehydration, and (D) rapid dehydration and rapid rehydration. Survival rate was measured using the CFU method after rehydration to 1.4 MPa. The SDs were calculated from three experiments.

after the hyperosmotic shock: 1, 15, and 60 min for 30 MPa, and 1, 2, 15, and 60 min for 166 MPa (Fig. 1). For 30 MPa shock, cell viability did not evolve significantly according to maintenance periods and remained close to 85%. This result indicates that the decrease of the survival rate occurs during the first minute after the shock and that the viability is not affected by the maintenance time. After osmotic shock at 166 MPa, cell viability decreased markedly with increasing maintenance time in hyperosmotic conditions. The viability was 48.9% when cells were rehydrated 1 min after the shock and declined to 38.7%, 3.6% and 0.3% for rehydration at 2, 15 and 60 min, respectively. These results suggest that events occurring during the first minutes after severe hyperosmotic shock influence the cell survival during the rehydration.

### 3.2. Plasma membrane internalization depends on the amplitude and the kinetic of hyperosmotic treatments

#### 3.2.1. Arrest of endocytosis at 15 MPa

Endocytosis refers to the formation of vesicles in the cytosol from the plasma membrane. It is a rapid process that allows the internalization of extracellular fluids, particles, and plasma membrane proteins by invagination of the plasma membrane [32]. The yeast plasma membrane was stained by FM 4-64 and visualized using confocal microscopy to observe the membrane delocalization (Fig. 2). Initially, the probe was observed only in the plasma membrane. With

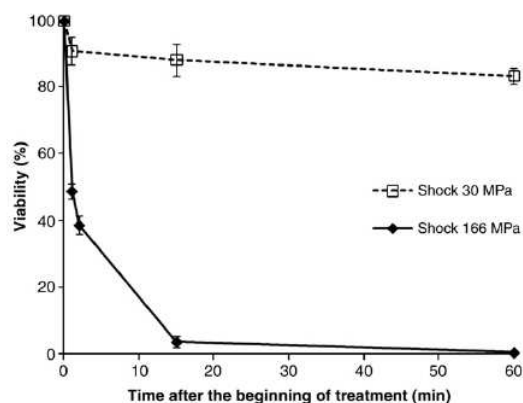


**Fig. 1.** Evolution of the viability of yeast cells during different maintenance periods after hyperosmotic shock to 30 MPa and 166 MPa. Viability was measured by the CFU method after rapid rehydration to 1.4 MPa. The cells were rehydrated for 1, 15, or 60 min after the shock to 30 MPa and for 1, 3, 15, or 60 min after the shock to 166 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeat experiments.

time and in iso-osmotic conditions corresponding to the osmotic pressure of the culture medium (1.4 MPa), the plasma membrane was internalized and reached intracellular compartments such as vacuoles after 60 min (Fig. 2C). The kinetic of the probe internalization is consistent with observations previously reported [34]. As endocytosis is an energy-dependent phenomenon [35], yeast placed in a 1.4 MPa water/glycerol solution possessed sufficient energetic resources. In our study, FM 4-64 staining was used to assess plasma membrane delocalization during hydric perturbations. It was necessary to arrest this phenomenon because it could disturb observations during progressive dehydration which required 30 min to reach 166 MPa. So we seek for non-lethal conditions which stopped this phenomenon. For that, we placed the cells at 15 MPa which corresponds to the limit level of yeast osmoregulation [5]. At this amplitude, staining by the FM 4-64 remained in the plasma membrane over time (Fig. 2D, E, and F).

#### 3.2.2. Induction of plasma membrane internalization by severe hyperosmotic shock

Yeasts were observed at 1, 10, and 60 min after hyperosmotic treatments. The images obtained after hyperosmotic perturbations are presented in Figs. 3 and 4.

After shock or slope to 30 MPa, the staining by FM 4-64 appeared only in the plasma membrane, and the pattern was similar to that of cells before treatment (Figs. 3 and 4). Shocks to 110 and 166 MPa led to progressive plasma membrane internalization which occurred during the maintenance period in hyperosmotic conditions. Small spots of probe were visible close to the plasma membrane 10 min after the beginning of the treatment (Fig. 3F and I). The probe was internalized deeper in the cell with time and reached intracellular compartments such as vacuoles after 60 min (Fig. 3G and J). However, membrane internalization did not affect all the cells after the shock to 110 MPa contrary to the one to 166 MPa. Indeed, a minor part of cells (~20%) did not present intracellular FM 4-64 staining after 60 min time exposure (Fig. 3G). So, these results show that the shock to 30 MPa did not induce plasma membrane delocalization, whereas shocks to 110 and 166 MPa caused plasma membrane internalization. Progressive dehydrations to 110 and 166 MPa were characterized by a peripheral staining which did not evolve over time (Fig. 4). The plasma membrane was not internalized during the 60 min following the perturbations but presented a peculiar aspect. Spots of probe were observed in the plasma membrane at the end of the progressive dehydration; these spots may correspond to large wrinkles of membrane or vesicles that stayed close to the plasma membrane.

These original results showed that hyperosmotic shock to 110 and 166 MPa induced membrane internalization during the maintenance period in hyperosmotic conditions. For these high-osmotic pressure

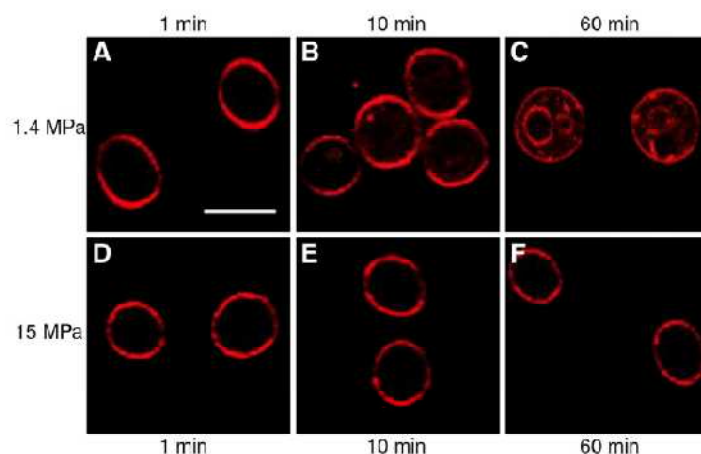


**Fig. 2.** Effect of an increase in osmotic pressure to 15 MPa on plasma membrane endocytosis. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeast *Saccharomyces cerevisiae* showing evolution over the time of FM 4-64 staining in iso-osmotic conditions (A, B, and C) and after 15 MPa hyperosmotic treatment (D, E, and F) at 25 °C. Observations were performed 1, 10, and 60 min after the staining with the probe. Bar scale = 5  $\mu$ m.

levels, the kinetic of dehydration influenced the morphological evolution of the plasma membrane.

### 3.3. Dehydration kinetic influences plasma membrane deformations

TEM was used to characterize ultrastructural changes in cases where the dehydration kinetic influenced the survival rate and the fluorescent staining by FM 4-64 (Table 2 and Figs. 3 and 4). As it was not possible to fix the cells at 166 MPa because of the high viscosity of the solutions, observations were performed on samples dehydrated to 110 MPa (Fig. 5). Cell fixation was performed just after the treatments

(slope or shock) to observe membrane modifications which occurred after the perturbations. Fixation of cells was performed with chemical fixation. This protocol can sometimes alter the structure of the plasma membrane with artificially tilted and profound invaginations, evoked by Stradalova et al. [36], caused by the osmotic effects of chemical fixatives [37]. These artifacts were not observed on the control cells and allowed reasonable comparative observations between the samples after slope and shock dehydrations.

Control cells presented an almost smooth plasma membrane with about ten curved membrane areas per cell median microscopic section that corresponded to invaginations of ~50 nm deep (Fig. 5A

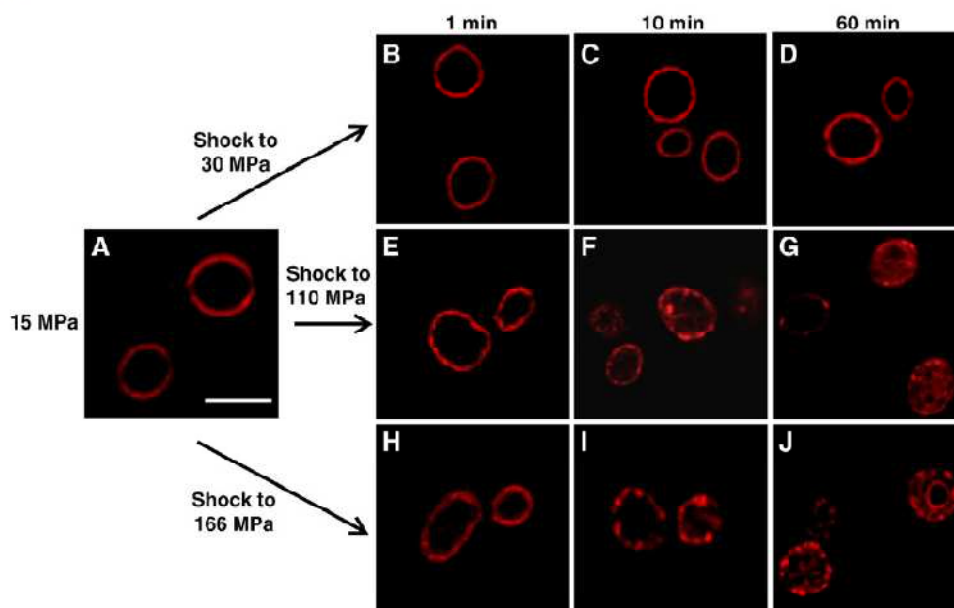


**Fig. 3.** Impact of hyperosmotic shocks on plasma membrane internalization. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* stained with the styryl dye FM 4-64 after hyperosmotic shocks to 30, 110, and 166 MPa carried out with glycerol. (A) Control cells in 15 MPa water/glycerol solution; (B), (C), and (D) correspond to cells after 30 MPa hyperosmotic shock; (E), (F), and (G) after hyperosmotic shock to 110 MPa and (H), (I), and (J) after hyperosmotic shock to 166 MPa. Cells were observed 1, 10, and 60 min after the shocks. Bar scale = 5  $\mu$ m.

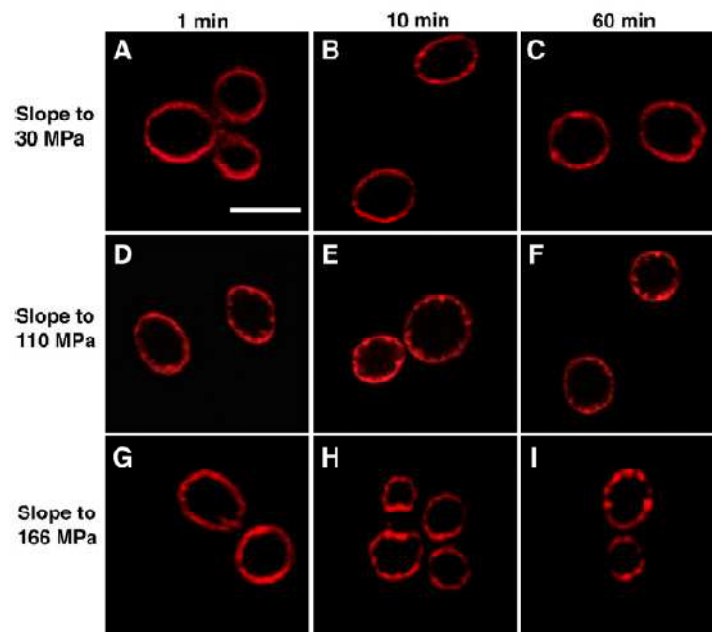


**Fig. 4.** Impact of hyperosmotic slopes on plasma membrane internalization. Representative confocal laser scanning microscopy images of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* stained with FM 4-64 after hyperosmotic slopes of 30, 110, and 166 MPa carried out with glycerol. Progressive dehydrations were performed with a rate of  $0.086 \text{ MPa s}^{-1}$ . (A), (B) and (C) correspond to cells after slope to 30 MPa; (D), (E), and (F) after slope to 110 MPa and (G), (H), and (I) after slope to 166 MPa. Cells were observed 1, 10, and 60 min after the end of the slopes. Bar scale =  $5 \mu\text{m}$ .

and B). Observations of superficial sections revealed that these invaginations presented a furrow-like aspect with a length of  $\sim 300 \text{ nm}$  (data not shown). This type of invaginations has already been described and localized within MCC patches [36]. After the shock to 110 MPa, cells showed an undulated plasma membrane with deeper invaginations than in control cells. These invaginations were narrower at the base than at the tip and extended about  $150 \text{ nm}$  into the cytosol (Fig. 5D). After the slope condition to 110 MPa, membrane deformation was different: the invaginations were fewer but were longer ( $\sim 400\text{--}500 \text{ nm}$ ) than in the case of the shock dehydration (Fig. 5E). They often appeared curl back toward, and in some cases even to fuse, with themselves or the cell surface (Fig. 5F).

In contrast to the observations after dehydration in vegetal cells [38], the cell wall remained in contact with the plasma membrane after the dehydration treatment, and the classical plasmolysis event was not observed. This can be explained by the many anchorage sites between the cell wall and plasma membrane in yeast and by the greater elasticity of the wall of yeast cells than in vegetal cells [39].

#### 3.4. Progressive dehydration leads to lateral redistribution of Sur7-GFP

Effect of treatments to 166 MPa (progressive or rapid) on lateral distribution of Sur7-GFP was studied. In control cells, Sur7 proteins fused to GFP were not distributed homogeneously in the plasma membrane but were concentrated in discrete patches (Fig. 6A), as described previously [19,40]. Analysis of the fluorescence intensity profiles of the median optical sections gave an estimated mean number of patches at the median section of the control cells of 11 with a size of about  $550 \text{ nm}$  (Table 3). This number of patches is in agreement with previous observations [19]. MCC size of  $300 \text{ nm}$  which is smaller than the size estimated in the present study has been reported [20]. This difference could result from the blur introduced by micro-

scopic imaging and from the threshold used to estimate the domain size. After hyperosmotic shock to 166 MPa, the repartition of Sur7-GFP domains remained in distinct patches (Fig. 6B). The distance between the fluorescence intensity peaks on the membrane perimeter was smaller than that in control cells, indicating that the Sur7-GFP patches were positioned closer to each other. The size of the domains was also slightly decreased. Progressive dehydration to 166 MPa changed the distribution of the Sur7 proteins, and the plasma membrane did not exhibit small fluorescent patches, but larger fluorescent domains (Fig. 6C) with a mean size of about  $1.1 \mu\text{m}$  (Table 3). The number of domains decreased from 11 in median cell sections of control cells and cells subjected to rapid dehydration (shock) to 6 distinct domains after progressive dehydration (slope). Progressive dehydration caused a redistribution of Sur7p from the patches, suggesting that lateral membrane reorganization occurred during this treatment. These results indicate that the dehydration kinetic influences the evolution of the repartition of Sur7p.

Effect of rehydration on Sur7p distribution was assessed by observation of cells after dehydration to 166 MPa followed by rehydration. Yeasts were treated according to a dehydration–rehydration cycle leading to low survival rate (shock–shock) or to a cycle conducting to high survival rate (slope–slope). After the shock–shock cycle, Sur7-GFP was localized in the cell cytosol and was not observed in the plasma membrane (Fig. 7A) and did not evolve with time (Fig. 7B). As Sur7p is a membrane protein, this aberrant localization could be explained by lysis of the cells during the shock rehydration. Just after the rehydration step of the slope–slope cycle, fluorescence of Sur7-GFP was observed in large and diffuse domains of the plasma membrane (Fig. 7C). Sur7-GFP regained the initial small patch distribution 90 min later (Fig. 7D) suggesting that MCC domain re-formation required time. These results show an influence of the rehydration kinetic on the structural evolution of the plasma membrane.

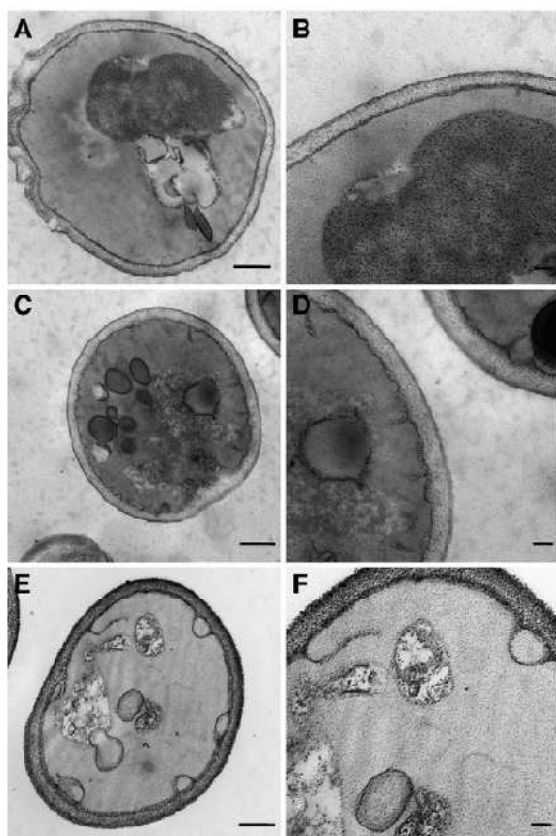


**Fig. 5.** Ultrastructure of yeast in the first moments after hyperosmotic treatments. TEM micrographs of representative yeast sections. Control cells (A and B), cells after shock to 110 MPa (C and D) and after slope to 110 MPa (E and F) were treated with Thiery reaction. Cells were fixed just after the hyperosmotic treatments. (A), (C), and (E): bar scale = 500 nm. (B), (D), and (F): bar scale = 100 nm.

### 3.5. Plasma membrane integrity is challenged both by dehydration and rehydration

The permeability of the plasma membrane of the yeast cell population was estimated with PI staining. The cells were labeled during, or 60 min after dehydration, and after rehydration in the high-osmotic pressure (166 MPa) condition in the slope and shock experiments (Fig. 8A). Dehydration led to permeabilization of some of the cells, and the proportion of cells affected was higher for shock (45.6%) than for slope (12.9%). The staining pattern was similar for staining performed during the perturbations and for staining performed 60 min after the maintenance period at 166 MPa. This result indicates that permeabilization occurred in the first minute of the treatments and persisted over the time. Shock rehydration, performed after 60 min maintenance, caused additional permeabilization of cells: proportion of permeabilized cells after rapid rehydration reached 86.4% and 55.2% for the dehydration achieved according to a shock or a slope, respectively (Fig. 8). These results suggest that the kinetics of dehydration and rehydration influence the membrane integrity of the plasma membrane. Thus, the two steps of the dehydration–rehydration cycle are critical for maintaining plasma membrane integrity.

## 4. Discussion

We have extended the findings of a previous study [16] on the impact of hyperosmotic stress on the plasma membrane by characterizing the structural and functional plasma membrane modifications following osmotic perturbations. We focused on the effects of the kinetic and the amplitude of hyperosmotic treatments on these alterations to understand the influence of these parameters on yeast survival. Several pieces of evidence are presented, which allow us to propose a scenario describing the events implied in survival and death of cells during hydric perturbations (Fig. 9).

### 4.1. Preservation of cell integrity and high survival rate after moderated dehydration (15 and 30 MPa)

Hyperosmotic treatment to 30 MPa led to a high survival rate of yeast (Table 2), and progressive and rapid dehydration to this level conducted to the same viability. This suggests that survival after mild dehydration is not dependent on the kinetics of dehydration and rehydration. Cell viability was not affected by the duration of the maintenance at 30 MPa before rehydration (Fig. 1). Thus, this osmotic level, slightly higher than the one allowing osmoregulation [5], corresponds to a condition where the cell growth is stopped but where the viability remains high. This suggests that the plasma membrane integrity is preserved over the time in this condition. Fluorescent staining by FM 4-64 showed a smooth and regular aspect of the yeast plasma membrane after the perturbation to 30 MPa (Figs. 3 and 4), similar to that in the control cells (Fig. 3A), which did not change with exposure time. Preservation of membrane integrity could be related to the maintenance of lipid order in the liquid phase. Indeed, the lipid phase transition from the liquid-crystalline to gel phase, which can destabilize the plasma membrane, has been reported to occur above 60 MPa in glycerol solutions for *S. cerevisiae* [12].

Experiments performed at 15 and 30 MPa showed that mild dehydrations, to levels higher than the ones allowing yeast osmoregulation [5], conducted to the arrest of plasma membrane endocytosis mechanism (Figs. 2 and 3). This active mechanism is time, temperature and energy dependent [35]. In our study, endocytosis was observed even if the yeasts were placed in water–glycerol at 1.4 MPa (Fig. 2). This suggests that an energetic insufficiency cannot be the cause of the observed arrest of endocytosis. Arrest of endocytosis is most probably related to the consequences of the decrease of hydric potential on macromolecular structure assemblies. For example, hyperosmotic treatments are known to cause depolymerization of the yeast cytoskeleton [41,42] which is required for plasma membrane endocytosis [43,44].

### 4.2. Severe hyperosmotic shocks (110 and 166 MPa) lead to cell death

Yeast viability was strongly affected by rapid and severe dehydrations (Table 2). Leaking of cellular content induced by plasma membrane permeabilization is often reported to explain cell death during hydric perturbation [11,14]. Membrane continuity is essential for maintaining many vital cellular functions that rely on membrane-bound proteins and electrochemical potentials, such as ATP synthesis. The results of the membrane permeability experiments (Fig. 8B) and those on viability (Table 2) confirm this hypothesis because the proportion of permeabilized cells was similar to that of dead cells. Staining by PI at different moments of dehydration–rehydration cycles allowed us to specify the critical phases for plasma membrane integrity (Fig. 8) and to draw the probable scenario explaining cell death during hydric treatments. This scenario is composed of two phases presented in Fig. 9A.

First, a part of cells are irreversibly permeabilized during the rapid volume variation phase caused by the osmotic shock (Fig. 8B).

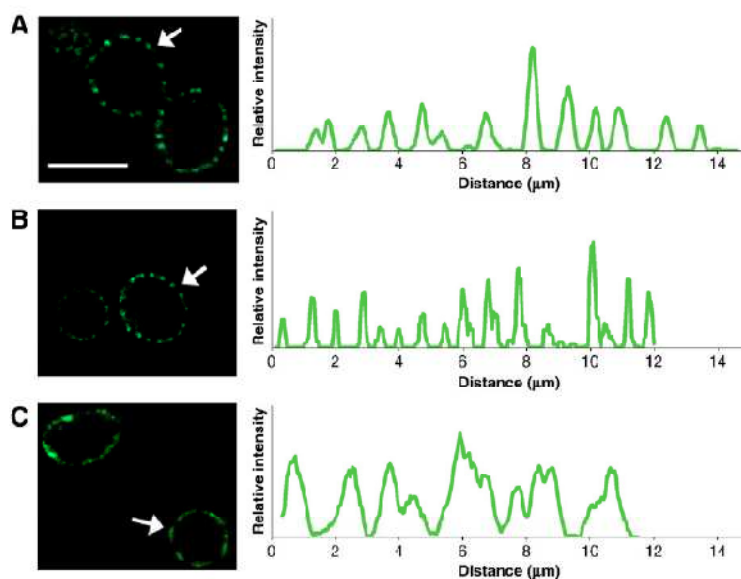


**Fig. 6.** Impact of dehydration kinetics to 166 MPa on Sur7-GFP domain repartition in the plasma membrane. (A) Control cells, (B) cells after rapid dehydration to 166 MPa, and (C) cells after progressive dehydration to 166 MPa. On the left of the figure, median optical sections through the cells are shown. On the right, representative fluorescence intensity profiles (diagrams) measured along the perimeter of the cells are shown. Each profile corresponds to the cell indicated by an arrow. A mean filter was applied on the plotted curves to reduce the noise present in the raw data, and the curves were normalized to the same maximum value. Bar scale = 5  $\mu\text{m}$ .

Membrane permeabilization could be related to the phase transitions of lipids emerging around 60 MPa [12]. Such phenomenon is induced by the removal of water from polar head groups during dehydration [11] and affects the resistance of membranes to shear forces [45]. Moreover, rapid volume contraction may be critical because plasma membrane regions with too high curvature could experience the loss of the continuity of the lipid bilayer.

Rehydration step after maintenance period in hyperosmotic conditions is also critical for cell integrity. Maintenance period of 60 min followed by rapid rehydration conducted to an increase of the proportion of permeabilized cells (Fig. 8B). Higher survival rates were observed when the exposure times were brief (<15 min) (Fig. 1) suggesting that membrane integrity was preserved during rehydration for the short maintenance period in hyperosmotic conditions. Thus, permeabilization occurring during the rehydration phase is linked to events arising in the first minutes after the shock dehydration. During this period, progressive plasma membrane internalization was observed (Fig. 5). This phenomenon leads to reduction of the plasma membrane surface, which becomes insufficient during the rehydration step and leads to cell lysis when the cell volume increases (Fig. 9A). Plasma membrane rupture explains the abnormal intracellular location of Sur7-CFP observed after rapid rehydration (Fig. 7).

The relation between membrane internalization and cell death is supported by the higher survival rate after 110 MPa than 166 MPa which could be related to the absence or the insufficiency of membrane internalization for some cells at 110 MPa (Fig. 3G). Thus, plasma membrane internalization induced by hyperosmotic shock seems to be a key event in the induction of the cell death during the dehydration–rehydration cycle.

**Table 3**  
Impact of different dehydration kinetics to 166 MPa on the number and size of plasma membrane domain containing Sur7-GFP.

|                 | Mean number (SD) of domains by cell section | Mean size of domain ( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| Control 1.4 MPa | 11.0 (0.6)                                  | 0.56 (0.05)                           |
| Shock 166 MPa   | 11.0 (1.6)                                  | 0.49 (0.015)                          |
| Slope 166 MPa   | 6.3 (0.8)                                   | 1.13 (0.24)                           |

The mean number of domains was estimated by observation of median optical sections through the cells. The SDs were calculated from the observation of 20 cells for each treatment.

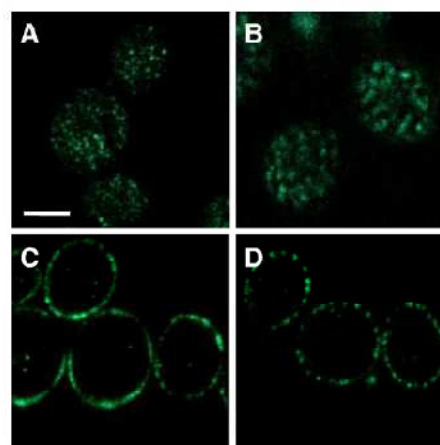


**Fig. 7.** Evolution of the repartition of Sur7-GFP after rehydration. (A) and (B) correspond to cells after shock to 166 MPa, kept during 60 min in hyperosmotic conditions followed by shock rehydration to 1.4 MPa. (C) and (D) correspond to cells after slope dehydration to 166 MPa, kept 60 min in hyperosmotic conditions followed by progressive rehydration to 1.4 MPa. Cells were observed just after rehydration (A and C) or 90 min after rehydration (B and D). Bar scale = 2  $\mu\text{m}$ .

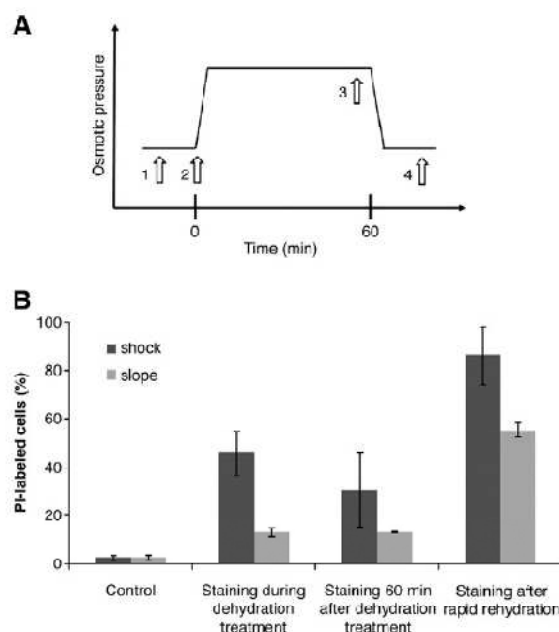


**Fig. 8.** Estimation of the integrity of yeast during dehydration-rehydration. (A) Protocol for cell staining with PI in order to investigate the evolution of membrane permeability during treatments. The arrows represent the timing of cell staining: 0 min corresponds to the beginning of the hyperosmotic treatment, PI was introduced (1) before, (2) during, (3) 60 min after the dehydration treatment, and (4) after the rehydration step. Rapid dehydration (shock) and progressive dehydration (slope) were performed. (B) The proportion of permeabilized cells (positively stained with PI) during and 60 min after 166 MPa dehydration treatment, and after rapid rehydration to 1.4 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeat experiments. At least 300 cells were observed for each experiment.

The cause of membrane internalization after severe hyperosmotic shock may be related to the rapid volume contraction of the cells. Due to the low lateral compressibility of the membrane [46], the cell  $s/v$  ratio increase conducted to the deformation of the plasma membrane [9,10]. After severe hyperosmotic shocks, the dissipation of membrane surface excess could be achieved by undulation and furrow-like invaginations of the plasma membrane. Furrow-like invaginations, localized at the MCC domains containing Sur7p [36], were also observed in our study in isotonic conditions (Fig. 5B) but they were shallower than after hyperosmotic shocks (Fig. 5D). A possible mechanism is the extension of membrane invaginations, existing in isotonic conditions, to dissipate the excess of membrane surface. This assumption is supported by the observation of the closeness of the Sur7-GFP patches after the shock dehydration (Table 3). Observation of Sur7-GFP localized in sterol-rich MCC microdomains revealed that these proteins were not internalized (Fig. 6B). Consequently, the phenomenon of membrane internalization could consist in a first initial step of furrow-like invagination extension by low sterol content membrane region. Membrane fusion is the second step necessary for membrane internalization. This event could be explained by the closeness between two portions of plasma membrane (Fig. 5D), protein aggregation [47] and the structural instability of lipids in hyperosmotic conditions which promote membrane fusion and vesicle formation [48,49].

#### 4.3. Progressive dehydrations and cell survival to severe treatments (110 and 166 MPa)

As already reported [13,22,23], progressive dehydrations allow higher survival rates than ones obtained after rapid treatments

(Table 2). High cell survival rates are related to the preservation of plasma membrane integrity during the two steps of dehydration-rehydration cycle (Fig. 8). Preservation of membrane continuity may result from the particular evolution of membrane structure during progressive perturbations which consists in the formation of big pleats. Accordingly, membrane surface excess, caused by cell volume contraction, is dissipated in some fewer and larger pleats than in the case of shock dehydration (Fig. 5). Such deformations do not bring closer portions of plasma membrane which could explain the absence of membrane internalization over time after progressive treatments (Fig. 4).

The formation of these large invaginations which curled back toward the cell surface (Fig. 5E and F) could be related to the rate of increase of the  $s/v$  ratio. Indeed, such invaginations are sometimes observed when the chemical fixation of samples for electron microscopy causes slight osmotic dehydration. Similar formations are also observed on yeast mutants presenting an imbalance between exocytosis and endocytosis which is not compensated by a parallel increase in overall growth [50]. In this last case, the increase of the  $s/v$  ratio also occurs progressively. Formation of such invaginations could depend on the time required for the lateral reorganization of the plasma membrane. This hypothesis is comforted by the observation of the modification of Sur7-GFP repartition after the progressive dehydration (Fig. 6). Delocalization of proteins located in MCC domains after perturbation has been already reported: plasma membrane depolarization induces reversible dispersion of the  $H^+$ -symporters, localized in MCC domains in physiological conditions [19]. However, to our knowledge, the delocalization of Sur7p has never been observed. Sur7p is described as a very stable protein due to its association with large immobile protein assemblies at the cell cortex [51]. Observation of its redistribution could be linked to the severity of the perturbation used in the present study. Indeed, modification of Sur7p lateral distribution, after progressive dehydration to 166 MPa, could be related to thorough membrane reorganization caused by the disordered to ordered phase transition which occurs in this elevated range of osmotic pressures [12]. Such phenomenon is known to promote progressive phase separation in the membrane plane [52] and could influence the lateral distribution of proteins in the membrane due to their partition equilibrium between phases [53].

After progressive dehydration, invaginations formed during the perturbation could be reincorporated into the plasma membrane during rehydration, avoiding permeabilization for some of the cells during the increase in cell volume (Table 2). The survival rate of yeasts was even higher when rehydration was performed progressively, as already reported on bacteria [54]. Hypothetical events that may allow a high survival rate during severe dehydration followed by rehydration are presented in Fig. 9B. Progressive rehydration probably causes slow and optimal unfolding of membrane pleats which allows the maintenance of membrane integrity. This explains the beneficial effect on yeast survival of rehydration in the slope condition after dehydration to 166 MPa (Table 2). Therefore, after dehydration to high-osmotic pressures, the rehydration step should be considered as a second perturbation. After rehydration, the MCC domains visualized by Sur7-GFP did not immediately appear as small domains but recovered their patch distribution over time (Fig. 7). The time period after rehydration, allowing Sur7-GFP patch recovery, could correspond to the requisite time for the recovery of the cell metabolism after hydric perturbations which could be involved in rich Sur7p domain re-formation. However, this mechanism is not really understood and should be investigated further.

#### 5. Conclusion

The present study focused on yeast plasma membrane modifications and their dynamics during hyperosmotic perturbations. We found that the modifications varied according to the osmotic level and

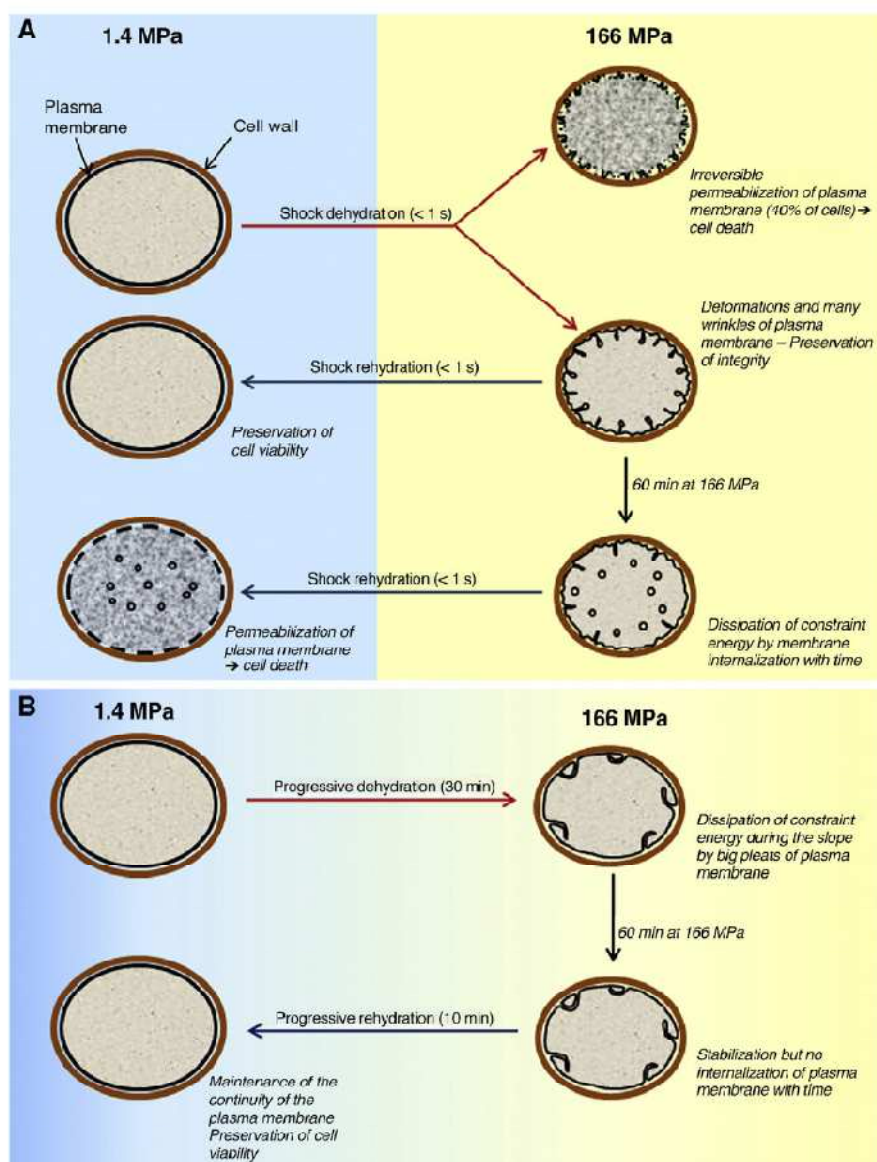


**Fig. 9.** Schematic representations of the hypothetical sequence of events occurring during high-amplitude dehydration of yeast in the shock (A) or slope (B) conditions followed by rehydration. The first scheme (A) highlights the different mechanisms leading to cell death during the rapid dehydration and rehydration stages. Scheme B explains how the yeasts maintain their integrity during progressive dehydration followed by progressive rehydration.

the kinetic of treatment and could explain the survival and the death of cells during hydric perturbations. The study of plasma membrane behavior during drastic hydric perturbations showed that cell death is strongly related to loss of membrane integrity. A determinant mechanism causing the loss of membrane integrity during dehydration–rehydration cycle is a plasma membrane internalization which occurs after hyperosmotic shocks. We have shown for the first time that the morphologic response of the plasma membrane is related to the kinetic of dehydration, suggesting that this cellular structure is sensitive to the rate of environmental perturbation. By visualizing the dynamics of the membrane microdomains during environmental

perturbation, we have shown that lateral membrane reorganization can occur during hydric disturbance and that this organization is time dependent. This suggests that the plasticity of the plasma membrane is a key property in the resistance of cells to environmental stresses. Such knowledge may lead to improvement of cell resistance during hydric stress and to optimization of preservation methods based on dehydration (drying, freezing, and freeze-drying). Indeed, the both steps of the dehydration–rehydration cycle need to be considered as critical for membrane integrity and cell survival. Future studies will focus on the mechanisms of plasma membrane lateral reorganization during drastic environmental perturbation and the potential effects of

lipid structural transitions and changes in functionality of active proteins on the membrane microdomain distribution.

### Acknowledgements

We are grateful to W. Tanner and G. Grossmann (University of Regensburg, Cell Biology and Plant Physiology, Regensburg, Germany) for providing the plasmid Ylp211SUR7GFP. We thank the personnel of the Plateau Technique "Imagerie Spectroscopique" IFR 92 (University of Burgundy, Dijon, France) for the technical support during the confocal microscopy manipulations. The authors wish to thank the INRA/University of Burgundy microscopy center of Dijon for the assistance during electron microscopy manipulations. This work was supported by the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy.

### References

- [1] K.L. Scott, J. Lecak, J.P. Acker, Biopreservation of red blood cells: past, present, and future, *Transfus. Med. Rev.* 19 (2005) 127–142.
- [2] X.C. Meng, C. Stanton, G.F. Fitzgerald, C. Day, R.P. Ross, Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures, *Food Chem.* 106 (2008) 1406–1416.
- [3] C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey, Preservation of micro-organisms by drying: a review, *J. Microbiol. Methods* 65 (2006) 183–193.
- [4] E. Klipp, B. Nordlander, R. Kruger, P. Gennemark, S. Hohmann, Integrative model of the response of yeast to osmotic shock, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 975–982.
- [5] P.A. Marechal, J.M. de Maranon, P. Molin, P. Gervais, Yeast cell responses to water potential variations, *Int. J. Food Microbiol.* 28 (1995) 277–287.
- [6] S.J. Prestrelski, N. Tedeschi, T. Arakawa, J.F. Carpenter, Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers, *Biophys. J.* 65 (1993) 661–671.
- [7] B. van den Berg, R.J. Ellis, C.M. Dobson, Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation, *EMBO J.* 18 (1999) 6927–6933.
- [8] P. Gervais, L. Beney, Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell. Mol. Biol.* 47 (2001) 831–839.
- [9] A.K. Adya, E. Canetta, G.M. Walker, Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 120–128.
- [10] F. Guilak, G.R. Erickson, H.P. Ting-Beall, The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes, *Biophys. J.* 82 (2002) 720–727.
- [11] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Membrane phase transitions are responsible for inhibitory damage in dry pollen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 520–523.
- [12] C. Laroche, L. Beney, P.A. Marechal, P. Gervais, The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 249–254.
- [13] V. Ragonanaran, J. Malsam, D.R. Bond, A. Aksan, Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 2283–2290.
- [14] M.J. Beker, A.I. Rapoport, Conservation of yeasts by dehydration, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 35 (1987) 127–171.
- [15] A.I. Rapoport, G.M. Khroustalyeva, E.N. Kukina, Anhydrobiosis in yeast: activation effect, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (1997) 9–13.
- [16] H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1600–1610.
- [17] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [18] F.R. Maxfield, Plasma membrane microdomains, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 483–487.
- [19] G. Grossmann, M. Opekarova, J. Malinsky, I. Weig-Meckl, W. Tanner, Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast, *EMBO J.* 26 (2007) 1–8.
- [20] K. Malinska, J. Malinsky, M. Opekarova, W. Tanner, Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 4427–4436.
- [21] G. Grossmann, J. Malinsky, W. Stahl-Schmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W.B. Frommer, M. Opekarova, W. Tanner, Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast, *J. Cell Biol.* 183 (2008) 1075–1088.
- [22] P. Mary, D. Ochir, R. Tailliez, Rates of drying and survival of *Rhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 207–211.
- [23] L. Beney, I. Martinez de Maranon, P.A. Marechal, P. Gervais, Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Food Microbiol.* 55 (2000) 275–279.
- [24] Y. Mille, J.P. Obert, L. Beney, P. Gervais, New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 71–76.
- [25] C. Schlee, M. Miedl, K.A. Leiper, G.G. Stewart, The potential of confocal imaging for measuring physiological changes in Brewer's yeast, *J. Inst. Brew.* 112 (2006) 134–147.
- [26] J.C. Anand, A.D. Brown, Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol, *J. Gen. Microbiol.* 52 (1968) 205–212.
- [27] H. Ito, Y. Fukada, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* (1983) 163–168.
- [28] R.S. Nerrish, An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups, *Int. J. Food Sci. Technol.* 1 (1966) 25–39.
- [29] J. Chirife, C.F. Fontan, A study of the water activity lowering behavior of polyethylene glycols in the intermediate moisture range, *J. Food Sci.* 45 (1980) 1717–1719.
- [30] Y. Gachet, J.S. Hyams, Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarized cell growth and cytokinesis, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4231–4242.
- [31] T. Meckel, A.C. Hurst, G. Thiel, H. Homann, Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K<sup>+</sup>-channel KAT1, *Plant J.* 39 (2004) 182–193.
- [32] T.A. Vida, S.D. Emr, A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast, *J. Cell Biol.* 128 (1995) 779–792.
- [33] J.P. Thiery, Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique, *J. Microsc.* 6 (1967) 987–1018.
- [34] D. Otsuga, B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, J.M. Shaw, The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 333–349.
- [35] H. Riezman, Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis, *Cell* 40 (1985) 1001–1009.
- [36] V. Stradalova, W. Stahl-Schmidt, G. Grossmann, M. Blazikova, R. Rachel, W. Tanner, J. Malinsky, Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2887–2894.
- [37] Q. Bone, E.J. Denton, The osmotic effects of electron microscope fixatives, *J. Cell Biol.* 46 (1971) 571–581.
- [38] M. Ferriando, W.E.L. Spiess, Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions, *J. Food Eng.* 45 (2001) 115–127.
- [39] G.J. Morris, L. Winters, G.E. Coulson, K.J. Clarke, Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 2023–2034.
- [40] M.E. Yung, T.S. Karpova, B. Brugger, D.M. Moschenross, G.K. Wang, R. Schneider, F.T. Wieland, J.A. Cooper, The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 927–934.
- [41] A.M. Robertson, L.M. Hagan, Stress-regulated kinase pathways in the recovery of tip growth and microtubule dynamics following osmotic stress in *S. pombe*, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 4055–4068.
- [42] I. Staninova, S. Sestak, A. Svoboda, V. Farkas, Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Microbiol.* 173 (2001) 249–252.
- [43] K.R. Ayscough, J. Stryker, N. Fokala, M. Sanders, P. Crews, D.G. Drubin, High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 399–416.
- [44] D. Pryne, A. Bretscher, Polarization of cell growth in yeast, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4) (2000) 571–585.
- [45] S. Garcia-Manes, G. Oncins, F. Sanz, Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy, *Biophys. J.* 89 (2005) 4261–4274.
- [46] E.A. Evans, R. Waugh, L. Melnik, Elastic area compressibility modulus of red cell membrane, *Biophys. J.* 16 (1976) 585–595.
- [47] K. Goyal, L.J. Walton, A. Tunnicliffe, LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress, *Biochem. J.* 388 (2005) 151–157.
- [48] J. Liu, M. Kaksonen, D.C. Drubin, G. Oster, Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 10277–10282.
- [49] A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, B. Coud, Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules, *EMBO J.* 24 (2005) 1537–1545.
- [50] B. Singer-Kruger, Y. Nemoto, L. Daniell, S. Ferro-Novick, P. De Camilli, Synaptotagmin family members are implicated in endocytic membrane traffic in yeast, *J. Cell Sci.* 111 (1998) 3347–3356.
- [51] T.C. Walther, J.H. Brickner, P.S. Aguilera, S. Bernales, C. Pantoja, P. Walter, Eosomes mark static sites of endocytosis, *Nature* 439 (2006) 998–1003.
- [52] K. Jorgensen, O.G. Mouritsen, Phase-separation dynamics and lateral organization of 2-component lipid membranes, *Biophys. J.* 69 (1995) 942–954.
- [53] I. Baumgart, A.L. Hammond, P. Sengupta, S.J. Hess, D.A. Hciowka, B.A. Baird, W.W. Webb, Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 3165–3170.
- [54] Y. Mille, L. Beney, P. Gervais, Magnitude and kinetics of rehydration influence the viability of dehydrated *E. coli* K-12, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 578–582.

## ARTICLE IN PRESS

BBAMEM-80433; No. of pages: 9; 4C:

Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamem](http://www.elsevier.com/locate/bbamem)

## Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration

Sebastien Dupont <sup>a,\*</sup>, Laurent Beney <sup>a,\*</sup>, Thierry Ferreira <sup>b</sup>, Patrick Gervais <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Université de Poitiers, UMR-CNRS 6187, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, 1, rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 July 2010

Received in revised form 25 October 2010

Accepted 9 November 2010

Available online xxxx

#### Keywords:

Dehydration

Osmotic stress

Cell survival

Plasma membrane

Ergosterol

Sterol evolution

### ABSTRACT

The plasma membrane (PM) is a main site of injury during osmotic perturbation. Sterols, major lipids of the PM structure in eukaryotes, are thought to play a role in ensuring the stability of the lipid bilayer during physicochemical perturbations. Here, we investigated the relationship between the nature of PM sterols and resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic treatment. We compared the responses to osmotic dehydration (viability, sterol quantification, ultrastructure, cell volume, and membrane permeability) in the wild-type (WT) strain and the ergosterol mutant *erg6Δ* strain. Our main results suggest that the nature of membrane sterols governs the mechanical behavior of the PM during hyperosmotic perturbation. The mutant strain, which accumulates ergosterol precursors, was more sensitive to osmotic fluctuations than the WT, which accumulates ergosterol. The hypersensitivity of *erg6Δ* was linked to modifications of the membrane properties, such as stretching resistance and deformation, which led to PM permeabilization during the volume variation during the dehydration–rehydration cycles. Anaerobic growth of *erg6Δ* strain with ergosterol supplementation restored resistance to osmotic treatment. These results suggest a relationship between hydric stress resistance and the nature of PM sterols. We discuss this relationship in the context of the evolution of the ergosterol biosynthetic pathway.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Understanding the mechanisms responsible for the ability of microorganisms to survive environmental perturbations is a major issue in microbial ecology and biotechnology. Because of its interfacial position between the extracellular medium and the cytosol, the plasma membrane (PM) is a primary target for damage caused by environmental stress. Changing the environmental conditions affects the organization and the dynamic of membrane components, reflected in changes in PM fluidity and the phase transition of membrane phospholipids. Such structural changes in the PM are observed during temperature and hydrostatic pressure shifts [1,2]. In addition to these changes, hyperosmotic perturbation can decrease cell volume, which increases in the cell surface-to-volume ratio (s/v) [3]. Hyperosmotic perturbation causes PM deformations such as ruffles, wrinkles, and surface roughness [4,5]. When associated with lipid structural modifications, such deformations cause internalization of the PM [6]. All of these modifications can lead to permeabilization of the PM and to cell death during severe dehydration–rehydration cycles [7–10].

One parameter that conditions the cell to tolerate and survive environmental perturbations is the lipid composition of the PM; that is,

the nature of polar phospholipids influences the resistance of microorganisms to stresses such as ethanol, freezing, salt, and cold treatments [11–13]. Changes in the fatty acid unsaturation levels can alter the cell sensitivity by changing the physical properties of the PM such as membrane fluidity. PM properties are also susceptible to the quantity and the nature of sterols. Sterols are one of the most abundant membrane constituents and are found in a wide range of species. In mammalian cells, the major sterol present in the PM is cholesterol, whereas ergosterol and phytosterol predominate in fungi and plant cells, respectively. Through their interactions with phospholipids and sphingolipids, sterols confer important properties on the PM, and they play an essential role in the stability of membranes by affecting rigidity, fluidity, and permeability [14–16]. Sterols are proposed to maintain the lateral heterogeneity of the protein and lipid distribution in the PM because of their putative role in inducing microdomains, so-called lipid rafts [17]. The nature of sterols influences the properties of membrane models such as the tensile properties [18], phase separation, and the curvature of the liquid-ordered phase in membranes [19]. Although much is known about the effects of the nature of sterols on lipid bilayer properties, few studies have investigated the impact of sterol composition on the in vivo response of the cell PM to environmental perturbations and its possible implications for cell resistance to such perturbation.

The aim of this study was to investigate the relationship between the nature of PM sterols and the membrane response to hyperosmotic

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 80396666; fax: +33 3 80772385.  
E-mail address: [laurent.beney@u-bourgogne.fr](mailto:laurent.beney@u-bourgogne.fr) (L. Beney).

## ARTICLE IN PRESS

2

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

perturbation and to estimate the effects on cell survival. Hyperosmotic stress was chosen because the structure of the PM is strongly challenged during this perturbation (lipid phase transitions and membrane deformations caused by cell volume decrease) [6,20]. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) was used as a model because it is exposed to hydric fluctuations in its natural environment (e.g., on plant surfaces, in soil) and can survive extreme dehydration. In addition, several mutant strains with alterations in the ergosterol biosynthetic pathway (*ergΔ*) are available, and these mutants accumulate different sterols in their PM [21]. It seems plausible that the sterol biosynthetic pathway parallels sterol evolution [22,23] and that these mutants are evolutionary precursors of the wild-type (WT) strain. We compared the responses to osmotic dehydration (viability, ultrastructure, cell volume, and permeability) in WT *S. cerevisiae* and the ergosterol mutant *erg6Δ*. The *erg6* gene encoding the sterol C-24 methyltransferase, which catalyzes the first of the five final steps of the ergosterol biosynthetic pathway, is nonessential. The corresponding mutant strain accumulates mainly zymosterol and cholesta-5,7,24-trienol instead of ergosterol, the major sterol species found in the WT strain [24,25] (Fig. 1). Our results show that the *erg6Δ* strain is more sensitive to hyperosmotic perturbation than is the WT strain. This greater sensitivity is related to differences in PM behavior between the *erg6Δ* and the WT strains during the dehydration–rehydration cycles. Our data suggest that the nature of PM sterols influences the kind of deformation and the stretching resistance of the PM during cell volume variations caused by hyperosmotic treatment. The PM of the *erg6Δ* strain undergoes permeabilization during dehydration under severe osmotic conditions and during the rehydration stage under mild hyperosmotic conditions. This result shows that the sterol nature affects the mechanical properties of the PM and that sterols play a role in cell adaptation to hydric fluctuations in the environment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains and culture conditions

The *S. cerevisiae* strain BY4742 WT (*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) and the *erg6Δ* mutant (*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 YMR008c::kanMX4*) (EUROSCARF, Frankfurt, Germany) were used in this study. Cells were grown aerobically at 25 °C in 250 mL conical flasks containing 100 mL of Malt Wickerham (MW) modified medium. The MW medium

contained 10 g glucose, 3 g pancreatic peptone, 3 g yeast extract, and 1.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in 1 L of water–glycerol, which had an osmotic pressure of 1.4 MPa. This osmotic pressure level has been recommended for the optimal growth of *S. cerevisiae* and does not correspond to an osmotic stress condition for yeasts [26]. For aerobic growth, a subculture (1 mL) was transferred into a conical flask containing MW medium, and the cultures were placed on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) at 250 rpm for 24 h and allowed to grow to the early stationary phase. The final population was nearly  $10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The medium used for anaerobic growth was supplemented with 2% (v/v) Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) and 250  $\mu\text{M}$  ergosterol and was degassed of oxygen by nitrogen bubbling for 12 h before inoculation with 1 mL of subculture. The culture was performed in an anaerobic chamber for 24 h at 25 °C.

### 2.2. Preparation of binary water–glycerol solutions of different osmotic pressures

The solute used in all experiments to perform hyperosmotic treatments was glycerol (Sigma-Aldrich). This solute was chosen because it allows to reach very high osmotic pressures and is accumulated in yeast at high concentrations during dehydration [27].

The mass of solute to be added to 1000 g of distilled water to obtain the desired water activity ( $a_w$ ) was calculated using the Norrish equation [28]:

$$a_w = (1 - X_s)e^{-KX_s^2},$$

where  $X_s$  is the molar fraction of the solute and  $K$  is the Norrish coefficient of the solute used to increase the osmotic pressure. For glycerol,  $K = 1.16$ . Osmotic pressure ( $\pi$ ) is related to the water activity by the following equation:

$$\pi = -\frac{RT \ln a_w}{V_w},$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $T$  is the temperature (K), and  $V_w$  is the partial molar volume of water ( $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ ). Table 1 presents the quantity of glycerol used to prepare the solutions of different osmotic pressures.

The osmotic pressure of all solutions was checked with a dew-point osmometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

### 2.3. Osmotic treatments

Two levels of osmotic treatment were used: moderate (30 MPa), which is slightly higher than that allowing osmoregulation, and severe (166 MPa).

Samples (20 mL) of culture were centrifuged (5 min,  $2200\times g$ ), washed twice in the binary water–glycerol mixture (1.4 MPa), and the pellets were resuspended in 10 mL of the same medium. One-milliliter aliquots of this suspension were placed in microsample

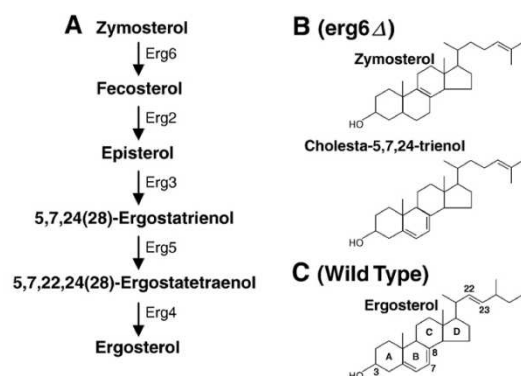


**Fig. 1.** Ergosterol biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) The five final steps in ergosterol biosynthesis. (B) Structure of the main sterols accumulated in the *erg6Δ* mutant. (C) Structure of ergosterol, the major sterol accumulated in the WT strain.

**Table 1**  
Preparation of binary water–glycerol solutions of different osmotic pressures.

| Osmotic pressure (MPa) | Water activity | Glycerol weight (g) for 1000 g of water |
|------------------------|----------------|-----------------------------------------|
| 1.4                    | 0.99           | 51                                      |
| 7                      | 0.95           | 255                                     |
| 15                     | 0.9            | 513                                     |
| 22                     | 0.85           | 781                                     |
| 30                     | 0.8            | 1063                                    |
| 70                     | 0.6            | 2440                                    |
| 110                    | 0.45           | 3986                                    |
| 166                    | 0.3            | 6654                                    |

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, Biochim. Biophys. Acta (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

3

tubes; the tubes were then centrifuged (10 min, 5100×g), and the supernatant was removed. Hyperosmotic shock was induced by quickly introducing 1 mL of a binary water–glycerol solution (final osmotic pressure of 30, or 166 MPa) into the pellets. The cells were maintained for 1 h under hyperosmotic condition before rehydration. Rapid rehydration was performed by removing the hyperosmotic solution from the microsample tube after centrifugation (10 min, 5100×g) and by quickly introducing 1 mL of the binary water–glycerol solution (1.4 MPa) into the cell pellet. Cell suspensions, rehydration solutions, and shock solutions were kept in an air-conditioned room at 25 °C. The temperature of the solutions was checked using a thermocouple.

#### 2.4. Measurement of yeast viability

Yeast viability was estimated in triplicate using the colony forming unit (CFU) method. After osmotic treatment, fully rehydrated cells were diluted serially and the appropriate dilutions were plated in MW medium with 15 g L<sup>-1</sup> of agar. CFUs were counted after incubation for 36 h at 25 °C. The initial cell suspension was used as the control.

#### 2.5. Cell volume analysis

Cell volume variations were measured after dehydration to different osmotic pressures (7, 14, 22.5, and 30 MPa) and after dehydration to 30 MPa followed by rehydration to 14, 7, and 1.4 MPa. These variations were estimated on images acquired with a Nikon Eclipse TE 2000 E microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with spectral camera Nuance CRI. In the present study, yeasts grew in presence of glycerol (1.4 MPa) and contained intracellular glycerol. In these conditions, yeast volume variation induced by hyperosmotic shock with the water–glycerol solutions occurred in less than 1 s and resulted mainly from water outflow from the cell [3]. This water outflow leads to the equilibration in the osmotic pressures and glycerol concentrations between the intracellular and extracellular spaces. The level of volume contraction after treatments remained constant (provided the cells were not permeabilized) for at least 1 h after the osmotic shock [10]. Images of treated cells were taken 5 min after the hyperosmotic perturbation. Cells were analyzed individually using the software ImageJ 1.42q to determine their projected areas and volumes.

#### 2.6. Assessment of plasma membrane permeability

Propidium iodide (PI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to assess PM integrity. This probe stains nucleic acids after permeabilization of the PM. PI was dissolved in distilled water (10 mg mL<sup>-1</sup>) to prepare the stock solution, and 200 µg of PI was used to stain 10<sup>8</sup> cells. PI was added to the treated cells at different times in the dehydration–rehydration cycle. Aliquots of the cell suspension were stained before the treatment (control cells), after the dehydration treatment (estimation of cells permeabilized by the dehydration step), and after rehydration (estimation of the cells permeabilized by the whole dehydration–rehydration cycle). This protocol allowed us to estimate the changes in the membrane permeability caused by each stage of the dehydration–rehydration cycle. The proportion of permeabilized cells was estimated by flow cytometry for osmotic pressures lower than 30 MPa using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). For each sample, 10,000 events were collected. Above this osmotic pressure level, it was not possible to use the flow cytometer because of the high viscosity of the cell suspensions, and the proportion of permeabilized cells was assessed by fluorescence microscopy. A Nikon Eclipse TE 2000 E epifluorescence microscope with Nuance spectral camera (CRI) was used to observe the cells. Images were acquired with a ×40 (NA: 0.95) Plan Apo objective (Nikon) and collected with Nuance software (Nikon). Black and white images were captured to observe

the total cell population (at least 300 cells). A monochromatic epifilter (540– to 580-nm excitation and 600– to 660-nm emission wavelengths) was used to observe cells stained with PI.

#### 2.7. Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was used to assess the yeast ultrastructure just after shock to 30 MPa. Concentrated yeast samples were fixed for 12 h at 4 °C with 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in water–glycerol solution at osmotic pressure of 30 MPa. The treated cells were fixed just after the end of the osmotic treatment. After washing, cells were postfixed with 0.5% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 1 h at 4 °C. Cells were dehydrated progressively in 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% ethanol, 30 min for each step, impregnated with Epon, and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections (90 nm) were obtained using an Ultracut E ultramicrotome (Reichert, Depew, NY, USA) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Observations were performed on a Hitachi 7500 transmission electron microscope (operating at 80 kV) equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Danvers, MA, USA).

#### 2.8. Membrane sterol identification and quantification

Lipid extracts were obtained from ≈5.10<sup>8</sup> shock-frozen yeast cells grown as indicated. Cells were harvested and washed with distilled water, and the volume was adjusted to 1 mL with cold water. Cells were then broken by vigorous shaking with a Mini-BeadBeater™ (Biospec Products, Bartlesville, OK) for 1 min at 5000 rpm in the presence of 500 µL of glass beads (diameter 0.3–0.4 mm; Sigma). Cellular lipids were extracted using chloroform–methanol (2:1, v/v) as described by Folch et al. [29]. The final organic phase was evaporated, and sterols were dissolved in 100 µL of hexane. The different sterol species were then separated by gas chromatography using a 25 m×0.32 mm AT-1 capillary column (Alltech, Deerfield, IL) and identified by their retention times relative to cholesterol, which was used as a standard. The results are expressed as nmol of sterol/10<sup>9</sup> cells.

### 3. Results

#### 3.1. The *erg6Δ* mutant strain is more sensitive to hyperosmotic shocks than is WT

To compare the sensitivity to osmotic dehydration of the WT and *erg6Δ* strains, yeasts were treated with osmotic shocks at 30 and 166 MPa, maintained under hyperosmotic conditions for 60 min, and rehydrated to 1.4 MPa (Table 2). For the mild treatment (30 MPa corresponding to a water activity of 0.8), the viability of the WT strain remained high (about 80%), whereas it was much lower in the *erg6Δ* strain (3%). The survival of the WT strain agrees with previously published values showing that exposure to shock at 30 MPa, which is slightly higher than that allowing osmoregulation (15 MPa) [30], weakly affects yeast viability [10]. The difference in sensitivity to osmotic shock between the two strains was also observed in response to shock at 166 MPa (corresponding to a water activity of 0.3), at which yeast survival was 0.3% and 0.01% for the WT and the *erg6Δ* strains, respectively. Despite the low viability of the two strains at this dehydration level, *erg6Δ* was more sensitive than the WT to this osmotic shock. This result suggests that mutating a protein involved in the ergosterol synthesis can directly affect the resistance of yeast to hyperosmotic perturbations. In further experiments, we endeavored to understand the cause of the high sensitivity of the *erg6Δ* yeast strain to hyperosmotic treatments at 30 and 166 MPa.

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, Biochim. Biophys. Acta (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

4

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

**Table 2**  
Influence of hyperosmotic shocks to 30 and 166 MPa on viability and permeability of WT and *erg6Δ* strains.

|         |                                                                  | Wild type     | <i>Erg6Δ</i>     |
|---------|------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|
| 1.4 MPa | Viability <sup>a</sup>                                           | 100%          | 100%             |
|         | Proportion of permeabilized cells <sup>b</sup>                   | 1.51% (1.34)  | 1.25% (0.78)     |
| 30 MPa  | Viability <sup>a</sup>                                           | 83.50% (2.5)  | 3.3% (1.6)***    |
|         | Proportion of permeabilized cells after dehydration <sup>b</sup> | 1.50% (0.46)  | 7.00% (0.86)**   |
|         | Proportion of permeabilized cells after rehydration <sup>b</sup> | 5.73% (0.74)  | 89.33% (7.06)*** |
| 166 MPa | Viability <sup>a</sup>                                           | 0.35% (0.18)  | 0.011% (0.003)   |
|         | Proportion of permeabilized cells after dehydration <sup>b</sup> | 32.9% (14.61) | 91.01% (3.69)*** |
|         | Proportion of permeabilized cells after rehydration <sup>b</sup> | 87.19% (9.81) | 95.15% (3.43)    |

Data are represented with standard deviations between brackets.

Asterisks denote statistical significance with respect to wild-type strain (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

<sup>a</sup> Viabilities were measured with CFU method after rehydration to 1.4 MPa.

<sup>b</sup> Proportion of permeabilized cells were estimated by PI staining.

### 3.2. High sensitivity of the *erg6Δ* strain to hyperosmotic shocks is linked to PM permeabilization

Leaking of cellular content induced by loss of PM integrity is thought to explain cell death during hydric perturbations [8,31]. To understand the cause of the sensitivity of the *erg6Δ* mutant strain to hyperosmotic stress, we used PI staining to examine PM permeability. The WT and *erg6Δ* strains were studied before and after dehydration shock to 30 and 166 MPa and after shock to 30 and 166 MPa followed by a maintenance period of 60 min and by rehydration to 1.4 MPa (Table 2).

#### 3.2.1. The rehydration step is critical for *erg6Δ* PM integrity during mild treatment (30 MPa)

Without osmotic perturbation, the percentage of permeabilized cells was very low, about 1% for the two strains. This percentage did not change after dehydration to 30 MPa in the WT strain and increased slightly to 7% in the *erg6Δ* strain (Table 2). Rehydration to 1.4 MPa markedly increased the percentage of permeabilized cells to 90% in the mutant strain, whereas this percentage remained low (6%) in the WT strain. This result suggests that permeabilization of the PM of the *erg6Δ* strain occurred during rehydration and that this caused the high sensitivity of the mutant to hyperosmotic stress.

To estimate more accurately the mechanism responsible for the loss of membrane integrity of *erg6Δ* during rehydration, we characterized the changes in membrane permeability after rehydration to different osmotic pressures between 1.4 and 22.5 MPa after hyperosmotic shock to 30 MPa (Fig. 2). In the WT strain, rehydration from 30 MPa to this range of osmotic pressures did not affect the PM.

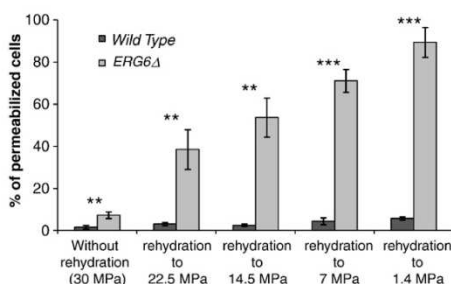


**Fig. 2.** Evolution of the plasma membrane integrity as a function of the rehydration level after dehydration at 30 MPa. WT and *erg6Δ* strains were treated with hyperosmotic shock to 30 MPa and then stained with PI after rehydration to different osmotic pressures: 1.4, 7, 14.5, and 22.5 MPa. The percentage of permeabilized cells was measured by flow cytometry. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments. Asterisks denote statistical significance with respect to the WT strain (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

In the *erg6Δ* strain, the percentage of permeabilized cells was about 40% after rehydration to 22.5 MPa and increased with the amplitude of rehydration to reach 90% after rehydration to 1.4 MPa. This result shows that the permeabilization of the PM during rehydration depends on the level of rehydration and that the loss of membrane integrity already occurs for low magnitude rehydration.

#### 3.2.2. The dehydration step affects PM integrity during high-amplitude treatment (166 MPa)

PI staining was performed after dehydration to 166 MPa and after rehydration to assess the effect of each stage of the dehydration–rehydration cycle on PM integrity in both strains (Table 2). After the dehydration step to 166 MPa, the percentage of permeabilized cells was 33% and 91% in the WT and *erg6Δ* strains, respectively. After rehydration, this percentage remained high in both strains: 87% and 95%, respectively. The percentage of permeabilized cells after rehydration correlated with the low survival rate observed after treatment to 166 MPa (Table 2). These results suggest that the mechanisms responsible for PM permeabilization differ between the two strains. The PM of *erg6Δ* is altered strongly by the dehydration stage, whereas the two steps of the dehydration–rehydration cycle are involved in the loss of PM integrity in the WT strain, as reported previously [6].

#### 3.3. Variations in yeast volume lead to plasma membrane stress

Hyperosmotic perturbation causes movement of large quantities of water across the PM, decreasing cell volume [3,10,32]. Yeast membrane permeabilization might be related to changes in the cell surface-to-volume ratio ( $s/v$ ) during the dehydration–rehydration cycle. Cell volume was measured in the WT and *erg6Δ* strains by optical microscopy. This method allows observation of the yeast surface delimited by the cell wall. The volume was then calculated by assimilating the yeast volume to a sphere.

Yeast volume was measured after hyperosmotic shocks from 1.4 MPa to osmotic pressure levels between 30 and 166 MPa in both strains (Fig. 3). The study of cell volume as a function of osmotic shock amplitudes showed that WT cells shrank under hyperosmotic conditions. With increasing osmotic pressure to 70 MPa, cell volume, delimited by the cell wall, asymptotically reached a minimal value (50% of initial volume). Although glycerol is a permeant solute, the cell volume decrease is mainly related to the water outflow because yeasts contain a small quantity of glycerol when they are cultivated with this solute as in our study (1.4 MPa). Moreover, glycerol permeates cell membrane at a lower rate than water. Thus, the rapid water outflow of the cells allows the equilibration of the osmotic pressures and glycerol concentrations between the intracellular and the extracellular spaces [3]. The volume decrease in the cytoplasm causes the PM to pull on the cell wall, which contracts the wall. In contrast to vegetal cells in which plasmolysis is observed [33], the cell

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, Biochim. Biophys. Acta (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

5

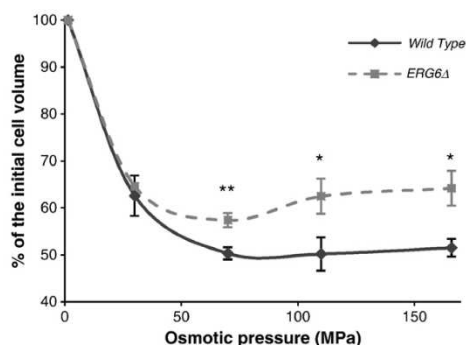


Fig. 3. Change in yeast volume as a function of the osmotic pressure during hyperosmotic shock. The volume was estimated by microscopic image analyzing after shock to 30, 70, 110, and 166 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments. Asterisks denote statistical significance with respect to the WT strain (\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001).

wall of yeast remains in contact with the PM during dehydration because it has many attachment sites to the PM and displays great elasticity [32]. Beyond 70 MPa, yeast volume did not change significantly and remained at a value close to 50% of the initial volume. This volume plateau occurs during the increase in the osmotic pressure of the extracellular medium [10,30] and is related to the reach of the non-osmotic volume corresponding to the volume occupied by the intracellular structures and the cell wall. The analysis of the cell volume after increasing osmotic pressure revealed similar responses in *erg6Δ* and WT cells to mild osmotic shock ( $\leq 30$  MPa). This result indicates that the sterol nature does not affect significantly the osmotic properties of the PM in conditions of mild osmotic shock. By contrast, *erg6Δ* cells and WT cells responded differently at pressures higher than 30 MPa. In *erg6Δ* cells, the volume decreased to a minimum value of 57.4% at 70 MPa but then increased at higher osmotic levels and reached 64.2% after treatment to 166 MPa. Thus, for a range of osmotic pressures between 70 and 166 MPa, the final volume was greater in the mutant strain than in the WT strain (Fig. 3). This increase in the cell volume of the *erg6Δ* strain at high osmotic pressure occurred in parallel with extensive permeabilization ( $\approx 90\%$ ) of the PM for these treatments (Table 2). This result indicates that cell volume increased when the PM was permeabilized. In this case, the pulling effect of the shrunken cytoplasm on the cell wall is abolished and the cell wall, an elastic structure in yeast [32], relaxes to its equilibrium dimensions (70–80% of the initial volume). The value for

the volume of the relaxed state of the yeast wall agrees with that reported in a previous study showing that the volume of permeabilized yeast cells by non-osmotic treatments equilibrates at around 74% of the physiological volume [34]. Thus, dehydration at osmotic pressure higher than 30 MPa causes the PM to pull on the cell wall and the high tensile strength in the PM; in the mutant strain, this could cause rupture of the PM and subsequent permeabilization of the yeast because of its greater sensitivity to stretching.

To understand further the mechanisms responsible for PM permeabilization during a mild dehydration–rehydration cycle (30 MPa) in the mutant strain, we compared yeast volume between the *erg6Δ* and WT strains after dehydration of the cells to 30 MPa (Fig. 4A) and after dehydration of the cells to 30 MPa followed by rehydration to different osmotic pressures (Fig. 4B). At increasing osmotic pressure during dehydration (from 7 MPa to 30 MPa), the cell volume was similar in the two strains. Hyperosmotic treatment caused an exponential decrease in cell volume: the change in volume was greater at amplitudes to 14.5 MPa, and the yeast volume reached 68% of the initial volume at 1.4 MPa. Under higher osmotic pressure, the volume decreased slightly to 65% at 30 MPa. After dehydration to 30 MPa followed by rehydration to different osmotic pressures, the volumes differed between the two strains. In the WT strain, cell volume after rehydration related closely to the cell volume measured during dehydration (Fig. 4A and B). Thus, volume changes induced by dehydration to 30 MPa were reversible, and the cell volume was recovered after rehydration to 1.4 MPa. This observation is consistent with the idea that the PM integrity is maintained in the WT strain (Fig. 2). In the *erg6Δ* strain, rehydration from 30 MPa to various osmotic pressures between 22.5 and 7 MPa increased cell volume slightly more than the values observed in the WT strain, although the differences were not significant. However, the causes of the volume increase during the rehydration to these intermediate osmotic pressures differed between the two strains. The *erg6Δ* strain showed an increasing percentage of permeabilized cells from 39% after rehydration to 22.5 MPa to 71% to 7 MPa, whereas this percentage remained at a low value ( $\approx 5\%$ ) in the WT strain, suggesting that the integrity of this strain was preserved during the rehydration (Fig. 2). Thus, in the WT strain, the volume increase was related to water inflow mediated by an osmosis phenomenon. Permeabilization of the PM of *erg6Δ* cells did not allow osmosis, and the volume increase during rehydration in this strain was probably linked to the PM rupture and to the subsequent cell wall relaxation to its equilibrium dimension. A possible hypothesis to explain the PM permeabilization during the rehydration steps between 22.5 and 1.4 MPa in the mutant strain (Fig. 2) is that the lack of membrane surface led to the membrane rupture during cell swelling induced by water inflow. We reported previously that PM permeabilization occurs during rehydration of

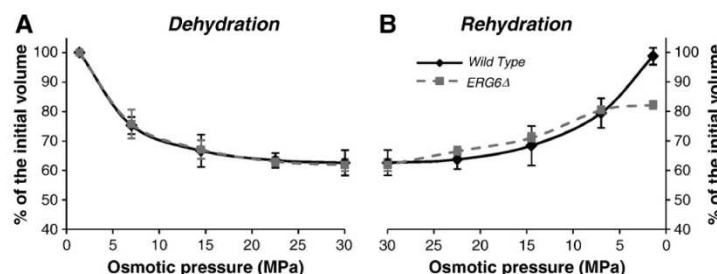


Fig. 4. Comparison of cell volumes between WT and *erg6Δ* during dehydration to 30 MPa followed by rehydration to 1.4 MPa. The volume was estimated by microscopic image analyzing. For the cell volume profile during dehydration (A), yeast cells were observed after hyperosmotic treatments to 7, 14.5, 22.5, and 30 MPa. For the profile during rehydration (B), yeast cells were observed after rehydration to 1.4, 7, 14.5, and 22.5 MPa in cells first dehydrated to 30 MPa. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments.

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, Biochim. Biophys. Acta (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

6

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

WT yeast after a shock to 166 MPa [6]. This event is caused by a decrease in the PM surface induced by membrane internalization after perturbation.

#### 3.4. Plasma membrane deformation after hyperosmotic shock to 30 MPa depends on the nature of membrane sterols

TEM was used to characterize the ultrastructural changes induced by hyperosmotic shock to 30 MPa in the two strains. The cells were fixed just after the treatment using a chemical fixation protocol. This protocol is sometimes prone to artifacts because of the osmotic effect of the fixatives. These artifacts, reported previously [35], can be observed at physiological osmotic pressure. In the present experiment, the osmotic pressure of the shock treatment (30 MPa) was greater than that induced by chemical fixation, and the osmotic effect of the fixatives is probably negligible compared with the effects of dehydration.

After shock to 30 MPa, both the WT and the *erg6Δ* strains showed PM deformation (Fig. 5A–D). In the WT strain, the PM showed narrow and deep (400–500 nm) invaginations, which appeared to curl backward (Fig. 5B). This kind of deformations was also reported in a study of the effects of progressive osmotic dehydration to 166 MPa [6]. In the *erg6Δ* strain, the PM showed a more undulated aspect than did the WT, and small vesicles were observed between the PM and the cell wall (Fig. 5D). The formation of vesicles outside the cytoplasm

has been reported for gram-negative bacteria under hyperosmotic conditions [36]. These vesicles might have formed at the origin of the reduction in PM surface after hyperosmotic shock in the mutant strain and could explain the permeabilization of the mutant PM during the swelling induced by rehydration.

#### 3.5. Exogenous ergosterol restores the resistance of the *erg6Δ* strain to hyperosmotic shock to 30 MPa

The most probable hypothesis to explain the hypersensitivity of the *erg6Δ* to hyperosmotic perturbations is the modification of the PM properties caused by the change in PM sterols. However, an alternative explanation is that downstream effects are induced by the *erg6Δ* mutation, such as remodeling in the transcription, translation, or cytoskeleton organization. These effects might also induce changes in membrane properties. To test the first hypothesis, we investigated whether exogenous addition of ergosterol to the *erg6Δ* strain could restore normal sensitivity to hyperosmotic perturbation at 30 MPa (Fig. 6). Addition of ergosterol during cell growth under aerobic conditions did not change the survival in response to this perturbation in either strain; the viability of the WT and *erg6Δ* strains remained unchanged at about 80% and 3%, respectively. Under aerobic growth conditions, yeast cells synthesize sterols and do not incorporate significant amounts of exogenous sterols, a phenomenon known as “aerobic sterol exclusion” [37]. In contrast, growing yeast cells without

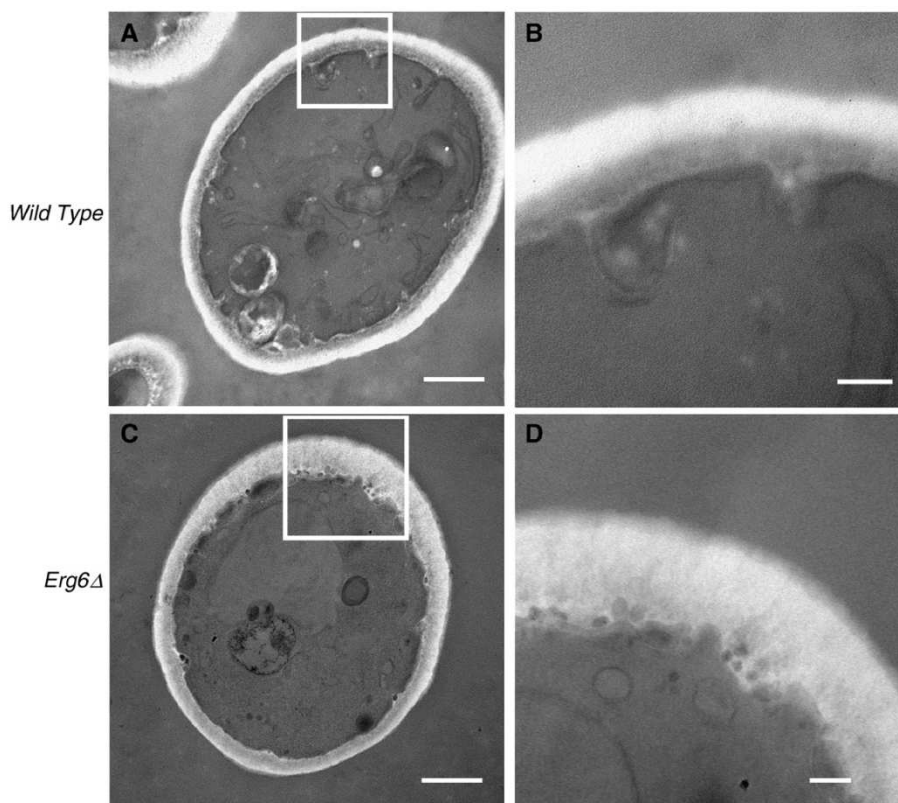


**Fig. 5.** Ultrastructure of WT and *erg6Δ* yeasts after hyperosmotic shock to 30 MPa. TEM micrographs of representative yeast sections. Cells after shock to 30 MPa for WT (A and B) and *erg6Δ* (C and D). Micrographs were taken of cells fixed in 2% paraformaldehyde–3% glutaraldehyde, treated with metaperiodate, postfixed in reduced osmium, and embedded in Epon. Cells were fixed just after the hyperosmotic shock to 30 MPa. (A and C) Scale bar = 500 nm. (B and D) Scale bar = 100 nm.

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, Biochim. Biophys. Acta (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

7

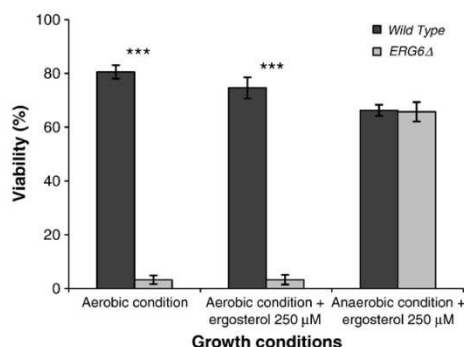


**Fig. 6.** Effects of exogenous ergosterol addition during anaerobic culture on yeast survival after hyperosmotic shock. WT and *erg6Δ* strains were cultivated in aerobic and anaerobic conditions with a supplementation of ergosterol (250 μM). The cells were exposed to hyperosmotic shock to 30 MPa, and the viability was estimated by the CFU method. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments. Asterisks denote statistical significance with respect to the WT strain (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

oxygen allowed exogenous ergosterol to be incorporated into the PM in both strains because yeasts become auxotrophic for sterols under anaerobic conditions. Anaerobic growth with ergosterol supplementation to the culture medium (250 μM) significantly increased the yeast survival rates after hyperosmotic shock at 30 MPa. This rate reached 66% in both the WT and the *erg6Δ* strains.

### 3.6. PM ergosterol is a key factor in yeast resistance to hyperosmotic perturbation

The sterol composition of the two strains was analyzed as a function of the growth conditions (aerobic or anaerobic) to confirm whether the observed effects on yeast resistance to dehydration correlated with the nature of sterols in the PM (Fig. 7). Under the aerobic growth condition, the WT strain accumulated mainly ergosterol and some of its precursors (squalene, lanosterol, zymosterol, and ergosta-5,7), whereas

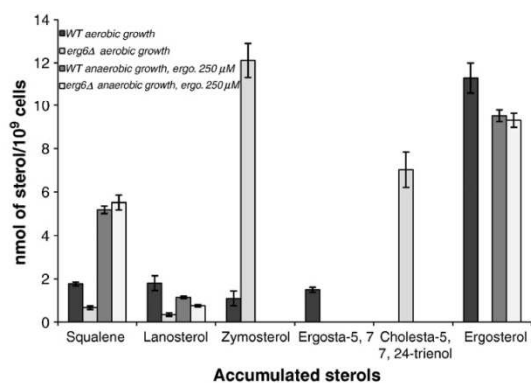


**Fig. 7.** Effects of growth condition on the sterol composition of the WT and *erg6Δ* strains. Both strains were grown under aerobic or anaerobic conditions with ergosterol supplementation (250 μM). After lipid extraction, the amount of sterols was measured by gas chromatography using cholesterol as a standard, as described in the Materials and methods. Sterols are arranged along the x-axis according to their order of appearance in the biosynthetic pathway of ergosterol, except for cholesta-5,7,24-trienol. This compound has a structure close to that of ergosterol and is a by-product that accumulates in the *erg6Δ* strain. Error bars correspond to the SD calculated from three repeated experiments.

the *erg6Δ* strain accumulated mainly zymosterol and cholesta-5,7,24-trienol, as described previously [25]. In contrast, under the anaerobic growth condition with ergosterol supplementation, the sterol profiles of the two strains were similar: both strains accumulated mainly ergosterol at a level close to that observed for the WT strain grown under the aerobic condition. Squalene accumulation under anaerobic condition is not surprising because squalene epoxidation, the next step after squalene in the ergosterol biosynthetic pathway, requires oxygen [38]. Taken together, these results suggest that resistance to dehydration is related to the presence of ergosterol in the PM. The growth conditions that allowed ergosterol accumulation in the PM (anaerobic growth for *erg6Δ*, aerobic and anaerobic growth for WT) increased yeast resistance to dehydration. These data suggest that the ability of yeast to survive dehydration is linked directly to the nature of membrane sterols.

## 4. Discussion

This study focused on the relationship between the sterol nature of the PM and the response to hyperosmotic perturbation. We compared membrane behavior during the dehydration–rehydration cycle between the WT strain, which accumulates ergosterol in the PM, and the *erg6Δ* mutant, which accumulates zymosterol and cholesta-5,7,24-trienol (Fig. 7). The main finding was that the nature of PM sterols influences the mechanical properties of the PM. These changes in properties led to different osmotic behavior of the PM and explained the greater sensitivity in the *erg6Δ* mutant to hyperosmotic perturbations than in the WT strain.

Hyperosmotic perturbation induced an outflow of a large quantity of water, which decreased the cell volume (Figs. 3 and 4). Because of the low lateral compressibility of the membrane [39], the increase in the cell  $s/v$  ratio causes compressive lateral stress and deformation of the PM. TEM observation of WT and *erg6Δ* strains after hyperosmotic shock at 30 MPa showed that the type of membrane deformation depends on the sterol composition of the PM (Fig. 5). The link between membrane sterols and the type of membrane deformation observed could be related to the influence of the nature of sterols on the physical properties of the lipid bilayer. To our knowledge, the effects of zymosterol and cholesta-5,7,24-trienol on model membrane properties have not been studied, but it is known that modifications of physical membrane properties can be related directly to the structure of the sterol molecule, including its planar structure, size, and properties of its small polar 3-OH group [40]. In particular, the double bond between C-7 and C-8 in the B ring is known to be involved in the packing and the overall rigidity of the PM. Cholesta-5,7,24-trienol, like ergosterol but unlike zymosterol, displays a C-7,8 double bond (Fig. 1). This induces greater membrane fluidity in the mutant than in the WT strain [14,41]. These differences between strains in packing and fluidity of the PM could account for the differences in membrane deformation during osmotic cell volume contraction.

Changes in PM properties were related to the difference in sensitivity to hyperosmotic perturbation in the two yeast strains. The greater sensitivity of the *erg6Δ* strain is linked to the loss of PM integrity that occurs during two steps of the dehydration–rehydration cycle (Table 2). The dehydration stage causes permeabilization of the PM, which was observed during the high hyperosmotic condition (166 MPa). After this perturbation, >91% of the mutant cells were permeabilized, whereas only 33% of WT yeast cells lost their integrity (Table 2). This suggests that the sterol composition of the yeast PM, which is affected by the *erg6* mutation, influences the membrane behavior and yeast survival during dehydration caused by severe osmotic pressure. Measurement of cell volume during osmotic conditions between 30 and 166 MPa (Fig. 3) showed that the PM pulled the cell wall and endured stretching stress during severe dehydration. The influence of sterol structure on the stretching resistance of the

## ARTICLE IN PRESS

8

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

membrane [42] may explain the greater fragility of the membrane in the *erg6Δ* mutant than in the WT during the dehydration step.

Lipid phase transition could also be involved in the extensive permeabilization of the mutant strain during severe dehydration. Lipid phase transition destabilizes the PM and increases the permeability of the membrane under osmotic stress [43,44]. In yeast, lipid phase transition from the disordered to ordered phase occurs >60 MPa in a glycerol solution [44]. Numerous studies have observed a modulation of the lipid phase transition by membrane sterols [45,46]. Thus, the nature of membrane sterols might influence this event and may explain the hypersensitivity of the mutant *erg6Δ* strain. The rehydration step was critical for mutant cell integrity in the mild osmotic condition at 30 MPa (Table 2). The dehydration step did not affect the PM integrity in either strain during osmotic shock to 30 MPa (Table 2). In contrast, rehydration from this osmotic pressure to 1.4 MPa caused extensive permeabilization of the PM in the mutant strain (89%), whereas the PM of the WT strain remained unpermeabilized (6%) (Fig. 2). Thus, the nature of PM sterol also influences the PM behavior and cell survival after exposure to moderate levels of osmotic pressure. After shock to 30 MPa, membrane permeabilization of the *erg6Δ* strain increased with the level of rehydration (Fig. 2) and with cell volume swelling (Fig. 4). A possible explanation is that the lack of membrane surface leads to the lysis of the PM during the increase in cell volume caused by rehydration. This phenomenon has been observed in WT yeast in the case of severe hyperosmotic shock, in which the decrease in the PM surface is caused by membrane internalization [6] and leads to the loss of membrane integrity during rehydration. This event was also observed during osmotic perturbation in protoplasts [47]. In the present study, a decrease in the membrane surface seemed to be related to the formation of extracellular vesicles between the cell wall and the PM, which were observed by TEM after dehydration to 30 MPa only in the mutant strain (Fig. 5). All these events indicate that the nature of the sterol molecules in the membrane influences the physical behavior of the PM during hydric perturbations and is clearly involved in cell survival during this type of environmental stress. This conclusion is reinforced by the observation that *erg6Δ* resistance to dehydration was restored when cells were cultivated under conditions that allowed ergosterol accumulation (Figs. 6 and 7).

In their ecological niche, such as the plant surface and soil, yeasts are subjected to hydric fluctuations in the environment and can encounter high solute concentrations. This study shows that a nonlethal (in the classic genetic sense) ergosterol mutant, which accumulates ergosterol precursors, is more sensitive to hyperosmotic perturbations than is the WT strain. It is surmised that membrane sterols have been selected over a very long time by Darwinian evolution for their ability to optimize certain physical properties of the membranes. As argued by Konrad Bloch, the temporal sequence of the sterol biosynthetic pathway can be taken to represent the evolutionary sequence of sterols [22]. In this view, the *erg6Δ* yeast strain is an evolutionary precursor of the WT strain. These results may provide some response elements on the nature of the driving force that led to the evolution of the ergosterol biosynthetic pathway in members of the fungi kingdom, which encounter hydric fluctuations in their natural environment.

#### Acknowledgments

We thank the personnel of the Plateau Technique "Imagerie Spectroscopique" IFR 92 (University of Burgundy, Dijon, France) for technical support during the optical microscopy manipulations. We also thank the INRA/University of Burgundy microscopy center of Dijon for assistance during the electron microscopy manipulations. This work was supported by the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy.

#### References

- [1] L. Beney, P. Gervais, Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001) 34–42.
- [2] T.J. Denich, L.A. Beaudette, H. Lee, J.T. Trevors, Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes, *J. Microbiol. Meth.* 52 (2003) 149–182.
- [3] P. Gervais, L. Beney, Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell. Mol. Biol.* 47 (2001) 831–839.
- [4] A.K. Adya, E. Canetta, G.M. Walker, Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 120–128.
- [5] F. Guilak, G.R. Erickson, H.P. Ting-Beall, The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes, *Biophys. J.* 82 (2002) 720–727.
- [6] S. Dupont, L. Beney, J.F. Ritt, J. Lherminier, P. Gervais, Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 975–985.
- [7] A.I. Rapoport, G.M. Khrustaleva, G. Chamanis, M.E. Beker, Yeast anhydrobiosis: permeability of the plasma membrane, *Microbiology* 64 (1995) 229–232.
- [8] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86 (1989) 520–523.
- [9] V. Ragoonanan, J. Malsam, D.R. Bond, A. Aksan, Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 2283–2290.
- [10] H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1600–1610.
- [11] K.M. You, C.L. Rosenfield, D.C. Knipple, Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1499–1503.
- [12] S. Rodriguez-Vargas, A. Sanchez-Garcia, J.M. Martinez-Rivas, J.A. Prieto, F. Randez-Gil, Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 110–116.
- [13] P.H. Calcott, A.H. Rose, Freeze-thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition, *Microbiology* 128 (1982) 549–555.
- [14] F. Abe, T. Hiraki, Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 743–752.
- [15] V. Folmer, N. Pedrosa, A.C. Matias, S.C. Lopes, F. Antunes, I. Cyrne, H.S. Marinho, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1141–1147.
- [16] T. Rög, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, Ordering effects of cholesterol and its analogues, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 97–121.
- [17] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [18] Y.W. Hsueh, M.T. Chen, P.J. Patty, C. Code, J. Cheng, B.J. Frisken, M. Zuckermann, J. Thewalt, Ergosterol in POPC membranes: physical properties and comparison with structurally similar sterols, *Biophys. J.* 92 (2007) 1606–1615.
- [19] K. Bacia, P. Schwill, T. Kurzchalia, Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102 (2005) 3272–3277.
- [20] C. Laroche, H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures, *Biochim. Biophys. Acta* 1669 (2005) 8–16.
- [21] D.H.R. Barton, J.E.T. Corrie, D.A. Widdowson, M. Bard, R.A. Woods, Biosynthesis of terpenes and steroids. Part IX. The sterols of some mutant yeasts and their relationship to the biosynthesis of ergosterol, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* (1974) 1326–1333, 1974.
- [22] K. Bloch, in: Y.U. Press (Ed.), *Blondes in Venetian Paintings, the Nine-Banded Armadillo, and Other Essays in Biochemistry*, New Haven, CT, 1994, pp. 14–36.
- [23] J.D. Weete, M. Abrial, M. Blackwell, Phylogenetic distribution of fungal sterols, *PLoS ONE* 5 (2010) e10899.
- [24] E. Zinser, F. Paltauf, G. Daum, Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 2853–2858.
- [25] A.L. Munn, A. Heese-Peck, B.J. Stevenson, H. Pichler, H. Riezman, Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 3943–3957.
- [26] J.C. Anand, A.D. Brown, Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol, *J. Gen. Microbiol.* 52 (1968) 205–212.
- [27] C. San Jose, R. Alonso Monge, R. Perez-Diaz, J. Pla, C. Nombela, The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5850–5852.
- [28] R.S. Norrish, An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups, *Int. J. Food Sci. Tech.* 1 (1966) 25–39.
- [29] J. Folch, M. Lees, G.H. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [30] P.A. Marechal, I.M. de Maranon, P. Molin, P. Gervais, Yeast cell responses to water potential variations, *Int. J. Food Microbiol.* 28 (1995) 277–287.
- [31] M.J. Beker, A.I. Rapoport, Conservation of yeasts by dehydration, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 35 (1987) 127–171.

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, *Biochim. Biophys. Acta* (2010), doi:10.1016/j.bbame.2010.11.012

## ARTICLE IN PRESS

S. Dupont et al. / Biochimica et Biophysica Acta xxx (2010) xxx–xxx

9

- [32] G.J. Morris, L. Winters, G.E. Coulson, K.J. Clarke, Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 2023–2034.
- [33] M. Ferrando, W.E.L. Spiess, Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions, *J. Food Eng.* 49 (2001) 115–127.
- [34] I. Martinez de Maranon, N. Chaudanson, N. Joly, P. Gervais, Slow heat rate increases yeast thermotolerance by maintaining plasma membrane integrity, *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999) 176–181.
- [35] V. Stradalova, W. Stahlschmidt, G. Grossmann, M. Blazikova, R. Rachel, W. Tanner, J. Malinsky, Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2887–2894.
- [36] A.L. Koch, The biophysics of the gram-negative periplasmic space, *Crit. Rev. Microbiol.* 24 (1998) 23–59.
- [37] R.T. Lorenz, L.W. Parks, Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lipids* 26 (1991) 598–603.
- [38] L. Jahnke, H.P. Klein, Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 155 (1983) 488–492.
- [39] E.A. Evans, R. Waugh, L. Melnik, Elastic area compressibility modulus of red cell membrane, *Biophys. J.* 16 (1976) 585–595.
- [40] X. Xu, E. London, The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation, *Biochemistry* 39 (2000) 843–849.
- [41] R. Kaur, A.K. Bachhawat, The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology* 145 (1999) 809–818.
- [42] J.A. Hossack, A.H. Rose, Fragility of plasma membranes in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols, *J. Bacteriol.* 127 (1976) 67–75.
- [43] M. Yamazaki, S. Ohnishi, T. Ito, Osmoelastic coupling in biological structures: decrease in membrane fluidity and osmophobic association of phospholipid vesicles in response to osmotic stress, *Biochemistry* 28 (1989) 3710–3715.
- [44] C. Laroche, L. Beney, P.A. Marechal, P. Gervais, The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 249–254.
- [45] Y. Barenholz, Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts", *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 1–5.
- [46] J. Czub, M. Baginski, Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol, *Biophys. J.* 90 (2006) 2368–2382.
- [47] J. Wolfe, M.F. Dowgert, P.L. Steponkus, Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions, *J. Membr. Biol.* 93 (1986) 63–74.

Please cite this article as: S. Dupont, et al., Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration, *Biochim. Biophys. Acta* (2010), doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.012