

## *Analyse du métabolisme chez la levure*

### *Quels sucres est-elle capable d'utiliser pour obtenir son ATP ?*

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire. Comme bon nombre d'êtres vivants, la cellule utilise certaines molécules organiques de son environnement pour produire de l'ATP (adénosine triphosphate : molécule qui fournit, lors de son hydrolyse en ADP + phosphate inorganique, l'énergie nécessaire au métabolisme).

L'objectif de ce laboratoire est, dans un premier temps, de déterminer parmi plusieurs sucres quels sont ceux que la levure est capable d'exploiter pour produire son énergie.

#### Matériel :

9 g de Levure fraîche (ou sèche)	1 EthyloTest + 1 Détecteur CO <sub>2</sub>	Lactose
9 Erlenmeyers de 50 ml (à col large)	1 Bouchon percé	Lactase (cachet intolérance lactose)
9 Ballons de baudruche (± 26 cm)	1 Spatule	Maltose
Bain-marie ou résistance pour aquarium	Glucose	Saccharose
	Fructose	Amidon
Balance (précision 0,1 g)	Galactose	

#### Méthodes :

- Réglez le bain-marie sur une température comprise entre 28 et 32°C.
- Numérotez les erlenmeyers. Préparez les erlenmeyers en ajoutant 1 g des différents sucres (par facilité, pesez directement dans l'erlenmeyer avec la balance « mise à zéro ») et 20 à 30 ml d'eau (suffisamment pour que les erlenmeyers vainquent la Poussée d'Archimède et ne flottent pas dans le bain-marie).
- Ajoutez 1 g de levure fraîche à chaque erlenmeyer, et, si indiqué, une pointe de spatule d'enzyme. Travailler avec de la levure fraîche permet de mieux se rendre compte qu'il s'agit d'un être vivant. Mélangez suffisamment afin de dissoudre le sucre et disperser la levure.
- Fermez chaque erlenmeyer avec un ballon (préalablement gonflé quelques fois pour être rendu plus souple, ce qui facilitera son placement au niveau du col de l'erlenmeyer). Si besoin, pincez le ballon lors de son positionnement pour éviter qu'il ne soit trop rempli d'air.
- Déposez les erlenmeyers dans le bain-marie. Même si le bain-marie n'est pas indispensable, la chaleur va accélérer le métabolisme des levures et les activités enzymatiques ce qui permettra d'observer les résultats environ 1 heure après le lancement de l'expérience.

**Résultats :** Le symbole « + » signifie que le ballon s'est gonflé au bout d'une heure d'expérience

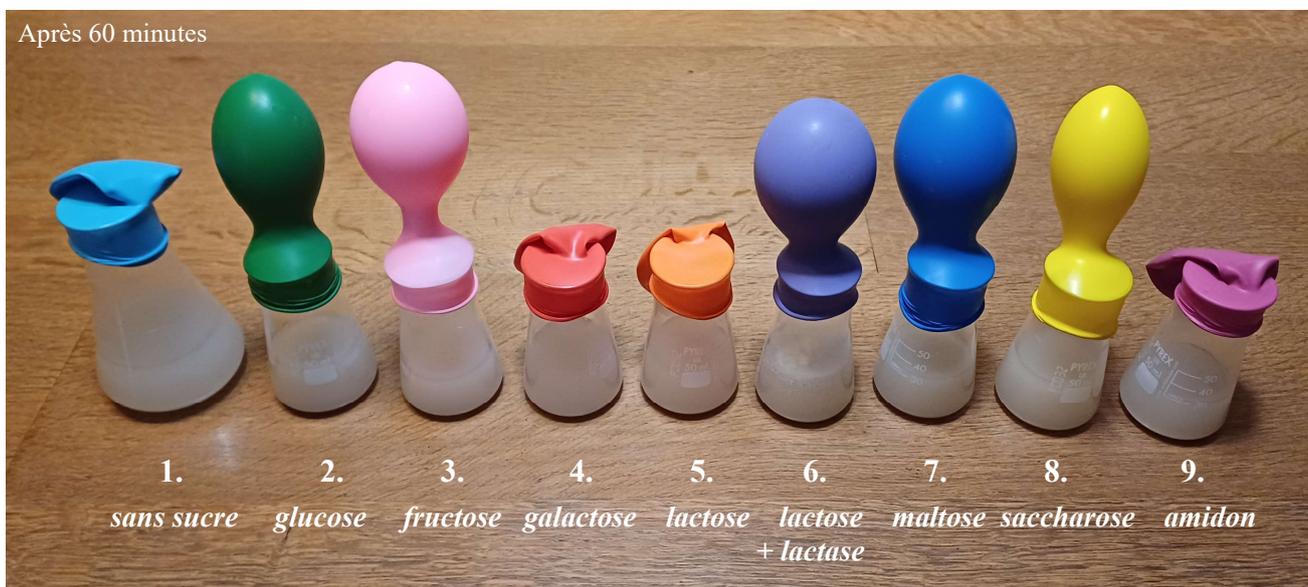
N°	Contenu	Sucre	Résultat
1	1 g Levure + 30 ml eau	/	-
2	1 g Levure + 1 g glucose + 30 ml eau	glucose	+
3	1 g Levure + 1 g fructose + 30 ml eau	fructose	+
4	1 g Levure + 1 g galactose + 30 ml eau	galactose	-
5	1 g Levure + 1 g lactose + 30 ml eau	lactose	-
6	1 g Levure + 1 g lactose + 30 ml eau + lactase	lactose devenu glucose + galactose	+
7	1 g Levure + 1 g maltose + 30 ml eau	maltose (= glucose + glucose)	+
8	1 g Levure + 1 g saccharose + 30 ml eau	saccharose (= glucose + fructose)	+
9	1 g Levure + 1 g amidon + 30 ml eau	Amidon (polymère de glucose)	-



Préparation des différentes solutions



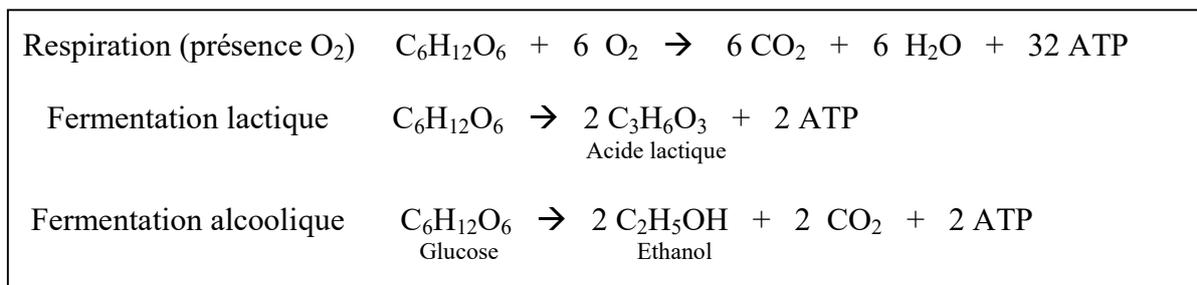
60 minutes au bain-marie 28-32°C



## Interprétation et discussion :

La comparaison des erlenmeyers 1 et 2 permet de constater que la levure a besoin de sucre (glucose) pour son activité.

Mais par quelle voie métabolique le glucose est-il utilisé en vue d'obtenir de l'ATP : la respiration cellulaire ou une fermentation ?



La respiration cellulaire ne produirait pas de gain net en volume gazeux (6 moles de dioxygène disparaissent au profit de 6 moles de dioxyde de carbone).

La fermentation lactique ne génère pas de gaz.

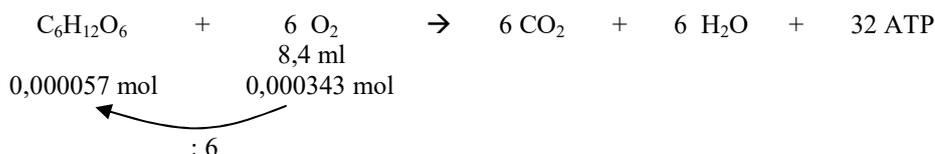
Les levures réalisent dès lors la fermentation alcoolique qui est à l'origine du gonflage des ballons.

Nb : s'il y a respiration cellulaire, la petite quantité d'oxygène présente initialement dans le récipient fermé par le ballon serait rapidement consommée.

En effet, quand les erlenmeyers contiennent 30 ml de solution sucrée, ils renferment 40 ml d'air.

Puisque l'air est formé de  $\pm 21\%$  O<sub>2</sub>, cela représente 8,4 ml d'O<sub>2</sub>.

Même si on travaille à plus de 25°C, on sait qu'en CSTP, 1 mole de gaz occupe un volume de 24,5 l.



Et étant donné que la masse moléculaire du glucose est de 180 g/mol, il y aurait, au maximum, une masse de 0,01 g qui pourrait être utilisée par la respiration cellulaire. Cela signifie que la grande majorité du sucre disponible ne serait métabolisée que par fermentation.

De toute façon, même en présence d'oxygène, il est établi que la levure privilégie la fermentation plutôt que la respiration (effet Crabtree) si la concentration en glucose est élevée.

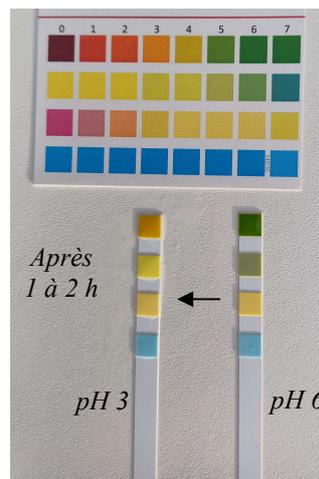
Certes, par fermentation, elle produit beaucoup moins d'ATP que via la respiration cellulaire, mais elle y trouve des avantages :

- La fermentation est beaucoup plus rapide que la respiration cellulaire, ce qui lui permet de répondre à des besoins immédiats en ATP et de maximiser la croissance à court terme ;

- Dans un environnement riche en glucose, la levure peut prendre l'avantage sur d'autres micro-organismes qui dépendent du glucose pour survivre. En métabolisant rapidement le glucose par fermentation, elle s'assure de consommer une grande quantité de cette ressource, ce qui laisse moins de glucose pour ses compétiteurs. De plus, la fermentation alcoolique produit de l'éthanol, un sous-produit toxique pour beaucoup d'autres organismes. L'accumulation d'une petite concentration en éthanol peut inhiber la croissance de micro-organismes concurrents tout en créant un environnement auquel la levure est relativement adaptée.

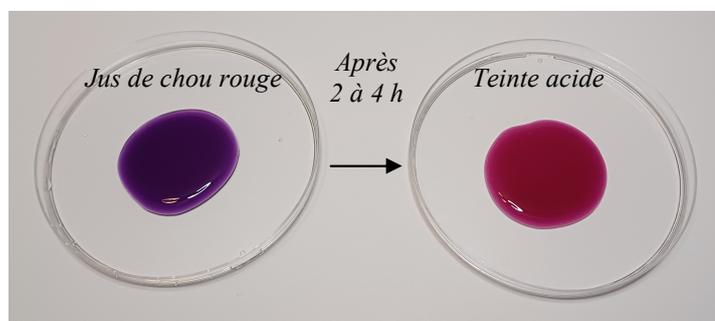
Deux constatations peuvent confirmer l'obtention des substances situées du côté des "produits" dans l'équation de la fermentation alcoolique :

- de petites bulles de gaz se forment dans la solution sucrée et un léger pétilllement est perceptible si on place l'oreille contre l'erlenmeyer ; le gaz présent dans le ballon trouble l'eau de chaux et, expulsé sur un détecteur à CO<sub>2</sub>, fait monter en flèche les teneurs mesurées ; de plus, ce gaz contribue à l'acidification du milieu (de pH 6 à pH 3 au bout d'une à deux heures) ;
- un éthylotest placé au niveau du col d'un erlenmeyer muni d'un bouchon percé détecte progressivement la présence d'alcool (les cristaux virent du jaune au vert).



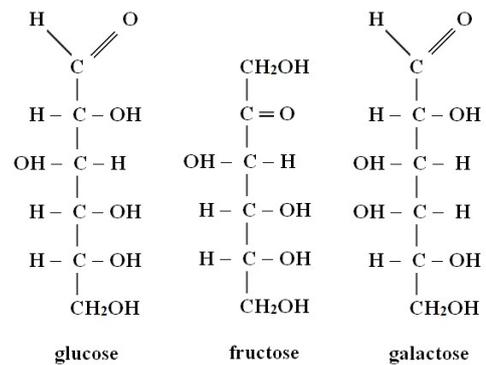
Mise en évidence des produits formés par la fermentation alcoolique : le CO<sub>2</sub> (qui contribue à l'acidification du milieu) et l'éthanol (détecté par éthylotest).

L'acidification du milieu par le CO<sub>2</sub> libéré est également visualisable en plaçant initialement les levures et le sucre dans du jus de chou rouge au lieu d'eau minérale. Le jus de chou rouge, qui se comporte comme un indicateur de pH, va progressivement adopter une teinte de plus en plus acide.



Cette forte acidification d'un milieu fermé se révélera d'ailleurs nuisible à l'activité des levures. Après quelques heures, elles se déposeront dans le fond des erlenmeyers et les ballons se dégonfleront progressivement.

Il ressort des expériences 3 et 4 que la levure peut rapidement réaliser la fermentation si elle est en présence de fructose, mais pas avec le galactose (pourtant tous deux monosaccharides isomères du glucose).



Le fructose du milieu est acheminé dans les cellules de levure par un transporteur. Une fois à l'intérieur, il est converti grâce à une enzyme (hexokinase) en fructose-6-phosphate qui poursuit les étapes de la glycolyse jusqu'à l'obtention de deux pyruvates.

L'enzyme hexokinase est déjà présente dans la cellule. En effet, elle intervient en début de glycolyse dans la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate.

Par conséquent, quand elle n'a pas de glucose, la levure peut rapidement utiliser le fructose disponible en utilisant une enzyme dont elle dispose déjà.

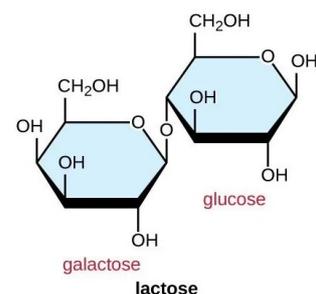
Aucune fermentation n'est observée avec le galactose. Pourtant, la levure peut métaboliser ce monosaccharide, mais le processus est plus complexe et moins efficace que pour le glucose ou le fructose. Le galactose doit être converti en une forme compatible capable d'entrer dans la glycolyse, ce qui nécessite une voie spécifique (voie de Leloir). Cette voie impose à la cellule d'activer plusieurs gènes afin de synthétiser les enzymes nécessaires à la transformation du galactose. Il faut au minimum une dizaine d'heures avant que la levure ne puisse commencer à métaboliser le galactose et encore, si les conditions sont optimales.

Or, les milieux ici formés à partir d'eau minérale et de sucres purs ne contiennent ni source d'azote, d'acides aminés, de phosphate, de certains minéraux essentiels et de vitamines. Ainsi, après quelques heures, les cellules entrent en stress cellulaire et ne remplissent plus leurs fonctions cellulaires. Cette absence d'activité de fermentation en présence de galactose se remarque au niveau du pH du milieu de culture qui ne s'acidifie pas au cours de l'expérience.

Ainsi, en raison des conditions expérimentales ici proposées, les levures n'auront pas été en mesure d'exploiter le galactose, même pas avec un temps de retard par rapport aux autres sucres métabolisables.

L'expérience 5 démontre que la levure ne sait pas métaboliser le lactose (disaccharide du lait).

Par contre, dans l'expérience 6, grâce à la présence de lactase (enzyme qui coupe le lactose en glucose et galactose), la levure obtient du glucose produit par l'action enzymatique.



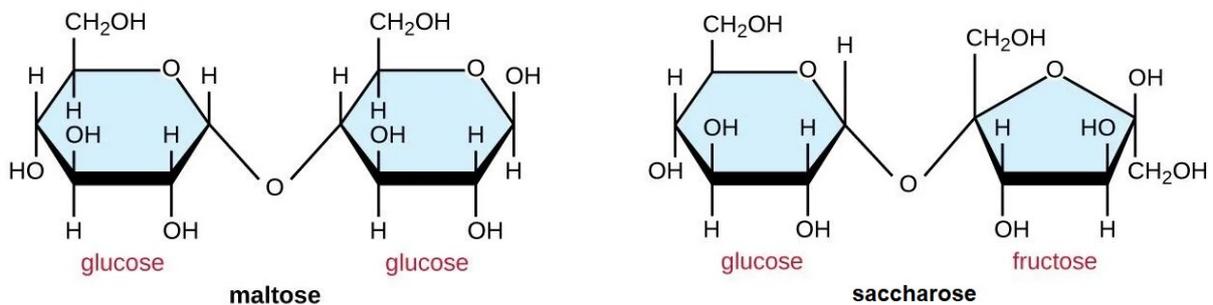
Quant au galactose également généré par l'action de la lactase, comme signalé précédemment, la levure n'est pas en mesure de l'exploiter directement, car elle doit d'abord activer plusieurs gènes spécifiques. De surcroît, quand le milieu est riche en glucose, l'induction génétique des gènes GAL est inhibée pour privilégier l'utilisation directe du glucose disponible.

Expériences similaires :

- 30 ml de lait + levure :  
pas de fermentation, car le lactose du lait n'est pas métabolisé ;
- 30 ml de lait + levure + lactase :  
fermentation, car l'enzyme lactase a coupé le lactose en glucose et galactose ;
- 30 ml lait sans lactose + levure :  
fermentation, car le lait sans lactose a été soumis industriellement à l'action de l'enzyme lactase. Ce lait sans lactose contient le glucose et le galactose provenant du lactose. La levure peut directement utiliser le glucose.



Les expériences 7 et 8 démontrent que les disaccharides maltose et saccharose peuvent être transformés par la levure (respectivement en deux glucoses et en un glucose + un fructose).



En l'absence de glucose, la levure va synthétiser un transporteur membranaire pour faire entrer en elle le maltose. La levure produit ensuite une maltase qui hydrolyse ce maltose. Les glucoses obtenus alimentent le processus de fermentation.

Le saccharose, quant à lui, n'est pas directement transporté dans la cellule. La levure produit une enzyme (invertase, saccharase) qui est sécrétée dans le milieu environnant où le saccharose est hydrolysé en ses deux monosaccharides constitutifs : glucose et fructose.

Puisque la levure métabolise en priorité le glucose, même si le milieu environnant contient du glucose et du fructose, la cellule va exprimer préférentiellement les transporteurs du glucose et laisser réprimés ceux spécifiques au fructose. Le fructose n'entre pas (ou faiblement) dans la cellule. La levure exploitera d'abord le glucose, puis progressivement le fructose au fur et à mesure de l'épuisement des ressources en glucose.

De façon générale, le glucose exerce un effet inhibiteur (répression catabolique) sur les gènes impliqués dans le métabolisme des autres sucres. Ces gènes sont inductibles et s'expriment à deux conditions : que cela soit utile (présence des sucres spécifiques dans le milieu) et, avant toute chose, qu'il n'y ait pas de glucose à disposition !

Expériences similaires :

- 30 ml de Coca + levure :  
fermentation, car le Coca renferme du saccharose ;

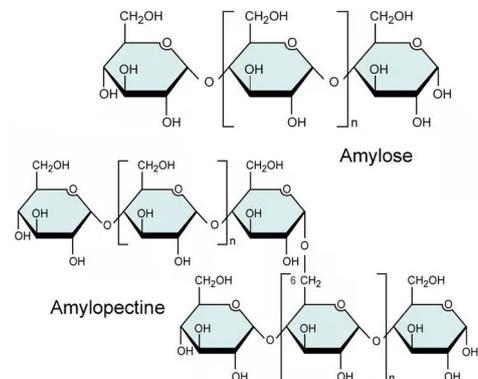
- 30 ml de Coca sans sucre + levure :  
pas de fermentation, car le Coca sans sucre renferme de l'aspartame. L'aspartame, bien qu'il ait un goût sucré pour l'humain, n'est pas un sucre. C'est un édulcorant artificiel formé de deux acides aminés. La levure ne sait pas l'exploiter.

Nb : Il est important que le Coca ne pétille plus (bouteille ouverte depuis 3 jours ou ajout de pierres poncees pour éliminer le gaz dissous) afin d'éviter tout risque de voir le ballon se gonfler par le dégazage du CO<sub>2</sub> dissous.



L'expérience 9 permet de constater que la levure ne sait pas hydrolyser l'amidon.

Ce polysaccharide est formé de longues chaînes de glucose (sous forme d'amylose et d'amylopectine). La molécule d'amidon est trop volumineuse que pour pouvoir entrer dans la cellule et la levure n'est pas non plus en mesure de synthétiser de l'amylase pour en effectuer une digestion extracellulaire.



Par contre, si l'amidon est scindé en maltoses par l'ajout d'une amylase, alors la levure peut faire rentrer en elle ces molécules de maltose et les couper en glucose servant de substrat à la fermentation alcoolique. Nb : la salive n'est pas une source suffisante d'amylase.

Pour faire de la bière, les levures, qui ne synthétisent pas l'amylase, sont incapables d'utiliser directement les réserves d'amidon présentes dans les grains. Par conséquent, les grains d'orge sont humidifiés ; ils se mettent à germer, ce qui pousse la graine à produire de l'amylase afin de dégrader les réserves d'amidon en vue de fournir de l'énergie à la jeune plantule. Puis, lors du tourailage, le malt est déshydraté par ventilation et chauffage. La germination s'arrête et les réserves de sucre ne sont pas utilisées par la plante. Mais les amylases sont préservées, car la température ne s'élève pas à plus de 85°C. Ces amylases vont poursuivre la dégradation de l'amidon en molécules de maltose que les levures pourront hydrolyser.

## Expériences supplémentaires :

- Il est possible de démontrer la spécificité des enzymes en effectuant le test :

1 g de Levure + 1 g d'amidon + 30 ml eau + lactase

La lactase, qui avait à chaque fois permis d'obtenir une fermentation quand elle était ajoutée à un milieu riche en lactose, n'aura aucun effet sur l'amidon.

- Il est possible de montrer la dénaturation des enzymes en effectuant le test :

1 g de Levure + 1 g de lactose + 30 ml eau + lactase ayant été portée à ébullition.

La lactase, qui avait à chaque fois permis d'obtenir une fermentation quand elle était ajoutée à un milieu riche en lactose, n'aura plus d'effet sur ce lactose si elle a été préalablement dénaturée avant d'être ajoutée à la solution sucrée.

## Mise en pratique:

Souvent, à l'école, deux heures d'affilée sont consacrées à l'option labo. Si chaque groupe d'élèves prépare un ou deux milieux de culture, il est envisageable que tous les erlenmeyers soient prêts en  $\pm 25$  minutes. Il reste suffisamment de temps pour que le  $\text{CO}_2$  libéré par la fermentation gonfle les ballons et que le résultat soit visible en fin de séance.

En attendant, l'une des expériences décrites ci-après et qui visent à analyser les facteurs qui influencent la fermentation peut être proposée ou interprétée.

Quand on dispose d'erlenmeyers (ou de petits flacons), d'un thermostat pour aquarium (ou d'un bain-marie), d'une balance, d'une spatule (ou une cuillère) et de ballons (réutilisables), cette expérience ne nécessite, pour sa mise en œuvre, que de quelques grammes de sucres et de levure : un coût dérisoire !

La manipulation est très aisée. Pas besoin de peser exactement 1 g ou de verser précisément 30 ml d'eau. Non, c'est une expérience qualitative qui est sûre de fonctionner et qui donne un résultat aisément observable (le ballon s'est redressé ou pas).

Il n'y a aucun danger. L'expérience peut même être réalisée à domicile par un public très jeune.

Le matériel se nettoie rapidement à l'évier avec de l'eau chaude.



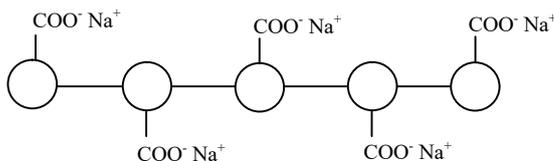
**Matériel :**

1 g de Levure fraîche	1 Passoire à thé	1 Pipette en plastique
4 Tubes à fermentation	1 Spatule	Alginate de sodium
4 Ballons de baudruche	4 Erlenmeyers de 50 ml	Chlorure de calcium . 6 H <sub>2</sub> O ou Lactate de calcium
Balance (précision 0,1 g)	4 Berlins de 50 ml	Glucose

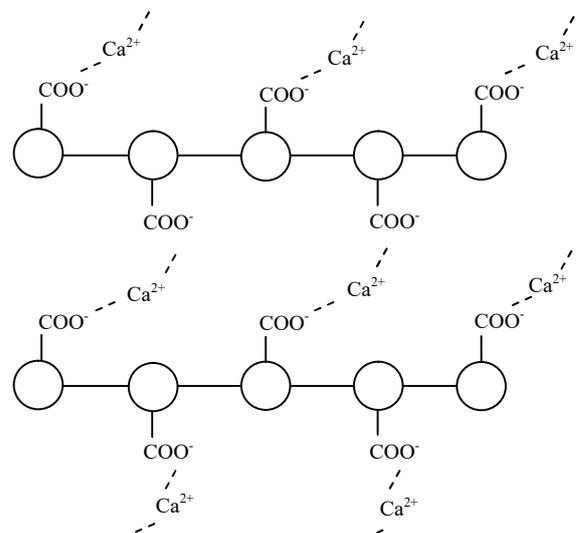
**Méthodes :**

- Préparez 40 ml de solution de chlorure de calcium (ou de lactate de calcium) 1,5 % (donc pesez ± 0,6 g).
- Préparez 20 ml de solution d'alginate de sodium 2 % (donc ± 0,4 g dans de l'eau minérale !). Ecraser la poudre contre le bord du berlin à l'aide de la spatule permet une dissolution plus rapide.
- Placez 1 g de levure fraîche dans 5 ml d'eau. Mélangez.
- A l'aide de la pipette, ajoutez à la solution de levure 12 ml de la solution d'alginate. Mélangez.
- Avec cette même pipette, faites tomber goutte à goutte la solution « levure + alginate » dans le berlin de chlorure de calcium. Les billes d'alginate renfermant la levure se forment. Attendez 1 minute pour que leur coque d'alginate de calcium se consolide.

L'alginate de sodium est un polysaccharide composé de deux monomères, l'acide mannuronique (M) et l'acide guluronique (G), qui se lient en blocs MM, GG, MG et/GM au sein de la longue chaîne qu'ils constituent. Chaque monomère possède un groupement carboxylate (-COO<sup>-</sup>) auquel est lié un ion sodium (Na<sup>+</sup>).



Quand l'alginate de sodium est placé dans une solution riche en ions Ca<sup>2+</sup>, les ions calcium prennent la place des ions sodium. Etant donné que le calcium a la valence II, il peut relier entre eux deux groupements carboxylate, créant ainsi des ponts entre différentes chaînes d'alginate.



C'est un phénomène de réticulation qui aboutit à la formation d'un polymère sous forme de gel. Cet alginate de calcium forme la "peau" souple de la bille.

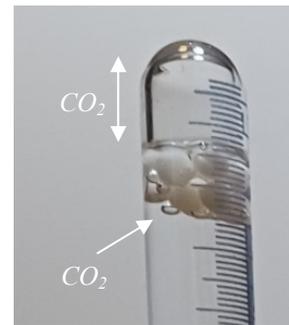
Il ne faut pas utiliser du CaCl<sub>2</sub> anhydre, mais du CaCl<sub>2</sub> hydraté. La présence d'eau aide à la dissociation des ions Ca<sup>2+</sup>.

Il faut utiliser de l'eau minérale (et non de l'eau distillée), car la présence d'ions favorise la gélification de l'alginate.

- Récupérez les billes d'alginate à l'aide de la passoire à thé. Rincez les billes à l'eau du robinet pour éliminer le calcium qui serait responsable de la gélification progressive du cœur de la bille.
- Dans les 4 erlenmeyers, préparez  $\pm$  25 ml de solutions de glucose de concentration croissante (par exemple : 0,5 %, 1 %, 2 % et 4 %). Préparer les solutions dans cet ordre évite de devoir systématiquement rincer la spatule utilisée pour procéder à la dissolution du sucre.
- Insérez un même nombre de billes ( $\pm$  15) dans chacun des tubes de fermentation. Remplissez ensuite chaque tube avec une solution de glucose. Lorsque la solution s'écoule doucement, elle entraîne avec elle les billes dans la partie graduée du dispositif. Laissez la boule dépourvue de solution, car elle est susceptible de se remplir d'eau sucrée au fur et à mesure que du gaz sera produit dans la partie graduée.
- Fermez les tubes avec un petit ballon. En effet, il est important que celui serre suffisamment l'ouverture du tube de fermentation pour y garantir une bonne étanchéité, tout en permettant de récolter une partie du gaz créé ou poussé par le déplacement d'eau sucrée.

En effet, si certaines billes sont allées dans la boule du dispositif, le gaz qui y sera libéré lors de la fermentation gonflera le ballon. Vu la faible quantité de levures présentes, un petit ballon permet de mieux détecter la production de gaz.

- Il est possible que les billes se déplacent durant l'expérience. En effet, dès qu'elles émettent du  $\text{CO}_2$ , elles se chargent de petites bulles à leur surface. Celles qui seraient restées dans la boule auront tendance à remonter dans le tube. On peut d'ailleurs, après quelques minutes, légèrement incliner le tube pour forcer les billes à y aller et ainsi mieux mesurer le  $\text{CO}_2$  libéré qui s'accumule au niveau des graduations (au lieu de gonfler le petit ballon).



**Résultats :** *Après 4 heures à température ambiante, mais l'expérience peut se prolonger !*



# Comment évolue l'intensité de la fermentation en fonction du milieu ?

## Influence de la concentration en éthanol

### Matériel :

1 g de Levure fraîche	1 Passoire à thé	1 Pipette en plastique
4 Tubes à fermentation	1 Spatule	Alginate de sodium
4 Ballons de baudruche	4 Erlenmeyers de 50 ml	Chlorure de calcium . 6 H <sub>2</sub> O ou Lactate de calcium
Balance (précision 0,1 g)	4 Berlins de 50 ml	Glucose et Eau de vie

### Méthodes

Idem  
expérience  
précédente

- Préparez 40 ml de solution de chlorure de calcium (ou de lactate de calcium) 1,5 % (donc pesez ± 0,6 g). Ne pas utiliser du CaCl<sub>2</sub> anhydre !
- Préparez 20 ml de solution d'alginate de sodium 2 % (donc pesez ± 0,4 g). Utilisez de l'eau minérale.
- Placez 1 g de levure fraîche dans 5 ml d'eau. Mélangez.
- A l'aide de la pipette, ajoutez à la solution de levure 12 ml de la solution d'alginate. Mélangez.
- Avec cette même pipette, faites tomber goutte à goutte la solution « levure + alginate » dans le berlin de chlorure de calcium. Les billes d'alginate renfermant la levure se forment. Attendez 1 minute pour que leur coque se consolide.
- Récupérez les billes d'alginate à l'aide de la passoire à thé. Rincez les billes à l'eau du robinet.

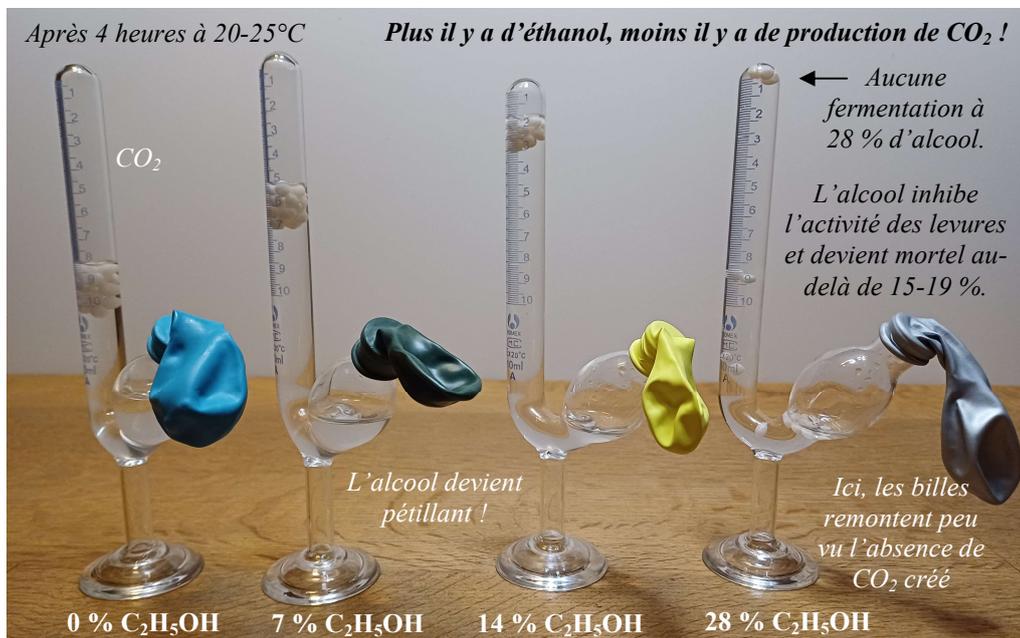


- Préparez 4 solutions d'alcool. L'eau de vie à disposition titrait à 28 %.

Solution 0 % alcool	Solution 7 % alcool	Solution 14 % alcool	Solution 28 % alcool
0 ml eau de vie 28 % + 24 ml eau	6 ml eau de vie 28 % + 18 ml eau	12 ml eau de vie 28 % + 12 ml eau	24 ml eau de vie 28 % + 0 ml eau

- Ajoutez 1 g de glucose à chaque solution. La teneur en sucre est ainsi la même partout (la boisson alcoolisée n'ajoute pas de molécule de sucre).
- Insérez un même nombre de billes (± 15) dans chacun des tubes de fermentation et remplissez chaque tube avec une des solutions. Fermez les tubes avec un petit ballon.

### Résultats : Après 4 heures à 20-25°C Plus il y a d'éthanol, moins il y a de production de CO<sub>2</sub> !



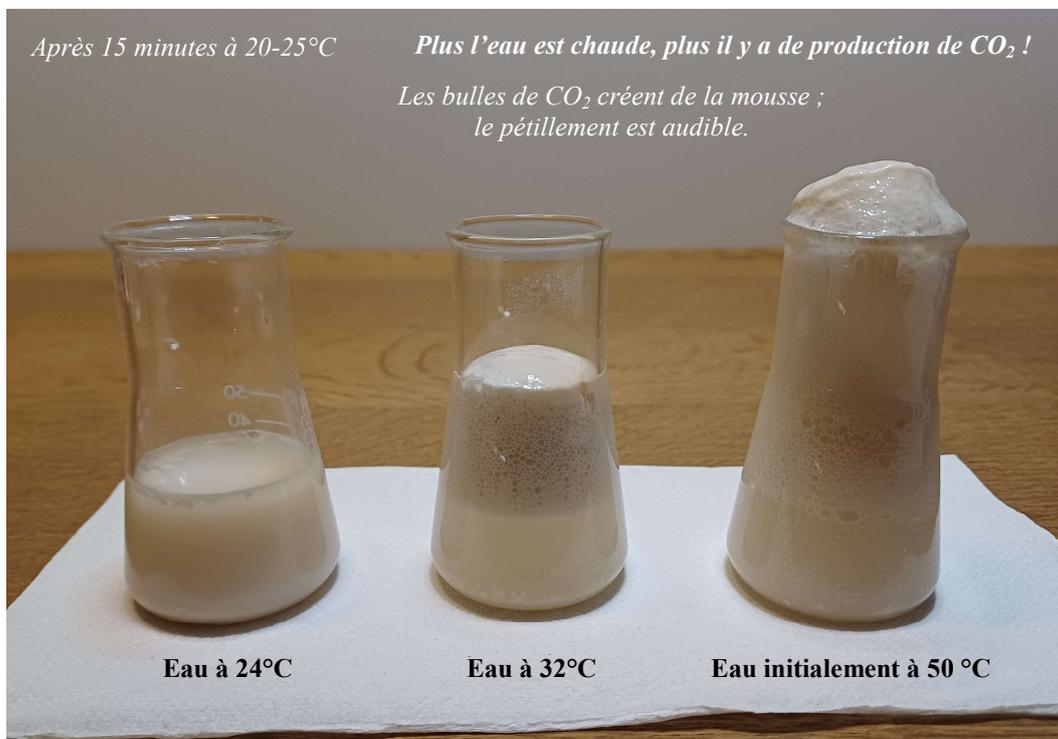
**Matériel :**

3 g de Levure sèche	3 Erlenmeyers de 50 ml	Eau à $\pm 50^{\circ}\text{C}$
3 g de Glucose	Eau minérale à $\pm 24^{\circ}\text{C}$	Bouilloire électrique
Balance (précision 0,1 g)	Eau à $\pm 32^{\circ}\text{C}$	(thermomètre 0 – $100^{\circ}\text{C}$ )

**Méthodes :**

- Dans chaque erlenmeyer, placez 1 g de levure sèche et 1 g de glucose.
- Remplissez chaque erlenmeyer de 30 ml d'eau minérale :
  - 1<sup>er</sup> erlenmeyer : eau à température ambiante ;
  - 2<sup>e</sup> erlenmeyer : eau à  $\pm 32^{\circ}\text{C}$  (la résistance pour aquarium permet de très rapidement chauffer un gobelet d'eau et d'en mesurer la température) ;
  - 3<sup>e</sup> erlenmeyer : eau à  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  (eau portée à ébullition puis un peu refroidie par ajout d'eau froide).
- Mélangez avec la spatule ou par mouvements circulaires de l'erlenmeyer.
- Attendez 15 minutes, puis observez. Ce n'est pas grave si l'eau refroidit durant l'expérience.

**Résultats :**



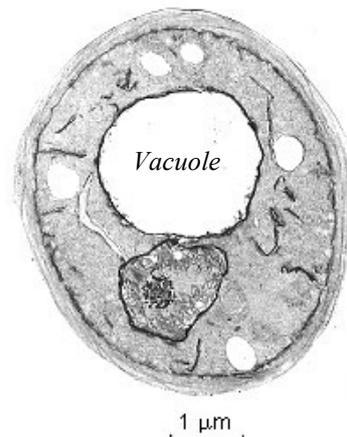
En dessous de  $15^{\circ}\text{C}$ , la fermentation est stoppée ; si la température de l'eau est trop chaude (par exemple proche de  $100^{\circ}\text{C}$ , les cellules sont tuées).

## Quel est le pH de la vacuole des cellules de levure ?

La vacuole est un compartiment majeur de la cellule de levure.

Elle offre un environnement acide propice à la dégradation et au recyclage des macromolécules, la gestion des déchets cellulaires et au stockage d'ions. L'acidité permet d'activer les enzymes spécifiques (hydrolases acides) qui nécessitent un pH bas pour être fonctionnelles.

Le pH de la vacuole, généralement compris entre 4,5 et 6, est maintenu par des pompes à protons qui utilisent de l'ATP pour transporter des protons à l'intérieur de la vacuole.



<https://nfabien-svt.fr/courslycee/tsspe/theme3/ref07.htm>

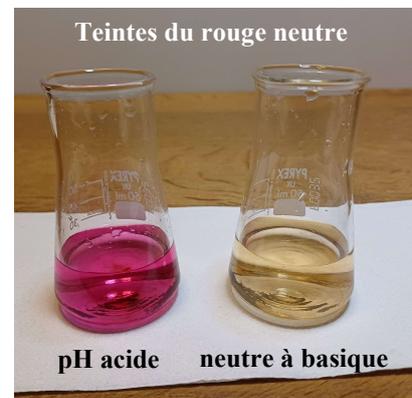
### Matériel :

2 g de Levure fraîche	1 Spatule	Bandelettes mesure pH
Balance (précision 0,1 g)	1 Pipette en plastique	Rouge neutre 0,1 %
6 Erlenmeyers de 50 ml	Vinaigre	

### Méthodes et résultats :

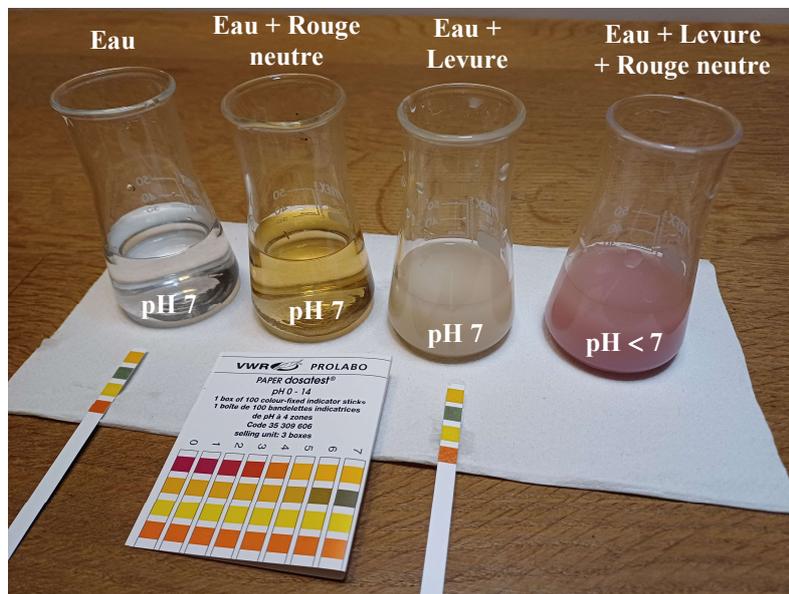
- Préparez la solution de rouge neutre 0,1 % (donc placez 0,1 g dans 100 ml).
- Dans un erlenmeyer, versez  $\pm$  50 ml d'eau minérale et ajoutez des gouttes de rouge neutre jusqu'à ce que la coloration jaune pâle soit bien marquée.
- Versez la moitié de cette solution dans un second erlenmeyer.
- Dans un de ces deux erlenmeyers, ajoutez quelques gouttes de vinaigre. La solution devient rose-mauve.

Le rouge neutre est un indicateur coloré qui est rose-mauve quand le pH est acide, alors qu'il est jaune pâle quand le pH est neutre à basique.



- Préparez 4 erlenmeyers pour l'expérience. Dans 2 d'entre eux, versez 30 ml d'eau minérale.
- Mesurez le pH de l'eau du 1<sup>er</sup> erlenmeyer avec une bandelette indicatrice de pH. Vous obtenez un pH proche de la neutralité (par exemple, pH 7 pour l'eau Cristaline, comme indiqué sur la bouteille).
- Mesurez le pH de l'eau du 2<sup>e</sup> erlenmeyer par ajout de quelques gouttes de rouge neutre. La coloration jaune révèle un pH neutre. Remarquez que l'ajout de rouge neutre n'affecte pas le pH de la solution. Vous pouvez, à l'aide d'une bandelette à pH, confirmer que le pH du 2<sup>e</sup> erlenmeyer est resté neutre après l'ajout de rouge neutre.

- Dans un nouvel erlenmeyer, dispersez 2 g de levure dans 40 ml d'eau. Répartissez 20 ml de cette solution dans les erlenmeyers n°3 et 4.
- Déterminez le pH des solutions contenant les levures : à l'aide d'une bandelette indicatrice de pH dans l'erlenmeyer n°3 et par ajout de quelques gouttes de rouge neutre dans l'erlenmeyer n°4.



Le pH de l'eau ne varie pas quand les levures viennent d'y être immergées (erlenmeyer n°3). Ce pH est proche de 7 (neutralité).

Par contre, dans l'erlenmeyer n°4, le rouge neutre indique directement un pH acide ! Puisqu'il ne peut s'agir de l'eau dans laquelle les levures viennent d'être plongées (milieu extracellulaire ; cf. erlenmeyer n°3), c'est que le colorant met en évidence un environnement acide à l'intérieur des cellules ! C'est une propriété particulière du rouge neutre (cf. ci-dessous).

### Discussion :

Le rouge neutre est une molécule non ionisée à pH physiologique. Il franchit passivement, par diffusion, la membrane plasmique des cellules et entre ensuite dans des compartiments où le pH est acide (la vacuole des cellules végétales et des levures ; les lysosomes des cellules animales).

Une fois à l'intérieur de ces organites, le rouge neutre est rendu protoné par l'acidité. Devenu chargé positivement, il se retrouve piégé à l'intérieur de ces compartiments, car les molécules ionisées ne diffusent pas librement à travers les membranes. Le rouge neutre s'accumule dès lors dans la vacuole des cellules de levure et colore cet organite en rouge.

Pour cette raison, couplée à sa non-toxicité, le rouge neutre est utilisé pour évaluer la viabilité des cellules et la cytotoxicité des médicaments. En effet, son accumulation dans les compartiments acides dépend de l'intégrité de la membrane et du maintien du gradient de pH grâce au fonctionnement des pompes membranaires.

Les cellules en bonne santé ont des organites acides colorés en rouge. Par contre, chez les cellules mortes, endommagées ou au métabolisme altéré, la membrane devient perméable et le pH acide n'est plus maintenu dans les organites. Il n'y a pas de coloration rouge vive.

## Où se procurer le matériel ?



Chauffage (thermostat) d'aquarium de 50W.

Fait office de thermomètre et permet de régler la température de l'eau jusqu'à 34°C (idéal comme bain-marie à 30°C durant 1h).

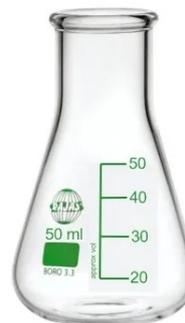
Sur internet (Amazon) : 18 euros.

Nb : Il est aussi possible d'obtenir un environnement plus chaud pour les levures en faisant bouillir de l'eau puis en y ajoutant de l'eau froide.

L'avantage du chauffage d'aquarium (ou du bain-marie) est d'obtenir facilement une température idéale et de la maintenir durant l'expérience.

Les erlenmeyers de 50 ml sont intéressants, car ils ont une belle base pour reposer dans le bain-marie et sont gradués, ce qui permet d'ajouter environ 30 ml d'eau en se référant aux graduations. Avec un col large (34 mm), le CO<sub>2</sub> rentre facilement dans le ballon.

On en trouve chez les fournisseurs scolaires (± 5 euros/unité) ou sur internet. Néanmoins, l'expérience peut être effectuée à moindre coût avec des mini-bouteilles en plastique ou des petits verres.



La levure peut être achetée en grande surface (Colruyt).

Avec un cube de 42 g de levure fraîche, il y en a bien assez !



Les ballons de diverses couleurs (et taille 26 cm) ont été achetés chez Action.



Le glucose est disponible en pharmacie. Les autres monosaccharides (fructose et galactose) se trouvent sur internet (Amazon) à des prix très intéressants.

Le lactose est présent dans le lait ou en poudre (2 euros pour 100 g chez les fournisseurs scolaires, ou aussi sur internet).

Le maltose, le saccharose et l'amidon (4 euros pour 100 g) se trouvent chez les fournisseurs scolaires.

Néanmoins, pour le saccharose, on peut prendre du sucre de table et, pour l'amidon, de la Maïzena.



L'enzyme lactase a été achetée en pharmacie.

L'enzyme amylase, initialement prévue pour hydrolyser l'amidon, coûte assez cher et a été expédiée depuis le Royaume-Uni (pays hors UE) avec des frais de douane exorbitants ! Pour cette raison, elle n'a pas été utilisée dans les expériences ici illustrées.



Les bandelettes pour mesurer le pH ont été achetées sur internet (Amazon).



Un éthylotest s'achète en pharmacie (éventuellement en ligne) pour 4 euros.



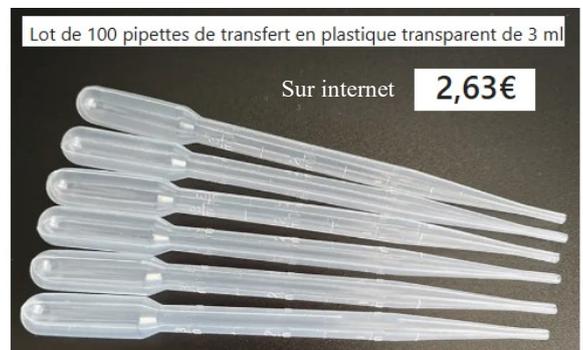
Un détecteur de CO<sub>2</sub> peut s'acheter facilement sur internet (Amazon). Ceux utilisés dans les écoles durant la période Covid peuvent être récupérés.



L'alginate de sodium et le lactate de calcium qui permettent de créer les billes ont été commandés sur internet (Amazon).



Les tubes à fermentation ont été commandés sur internet (Aliexpress) : 15,49 € / pièce



Le rouge neutre a été acheté chez un fournisseur scolaire (10 g pour 10 euros).

Bonnes expériences !

Lionel Jonlet  
lioneljonlet@hotmail.com