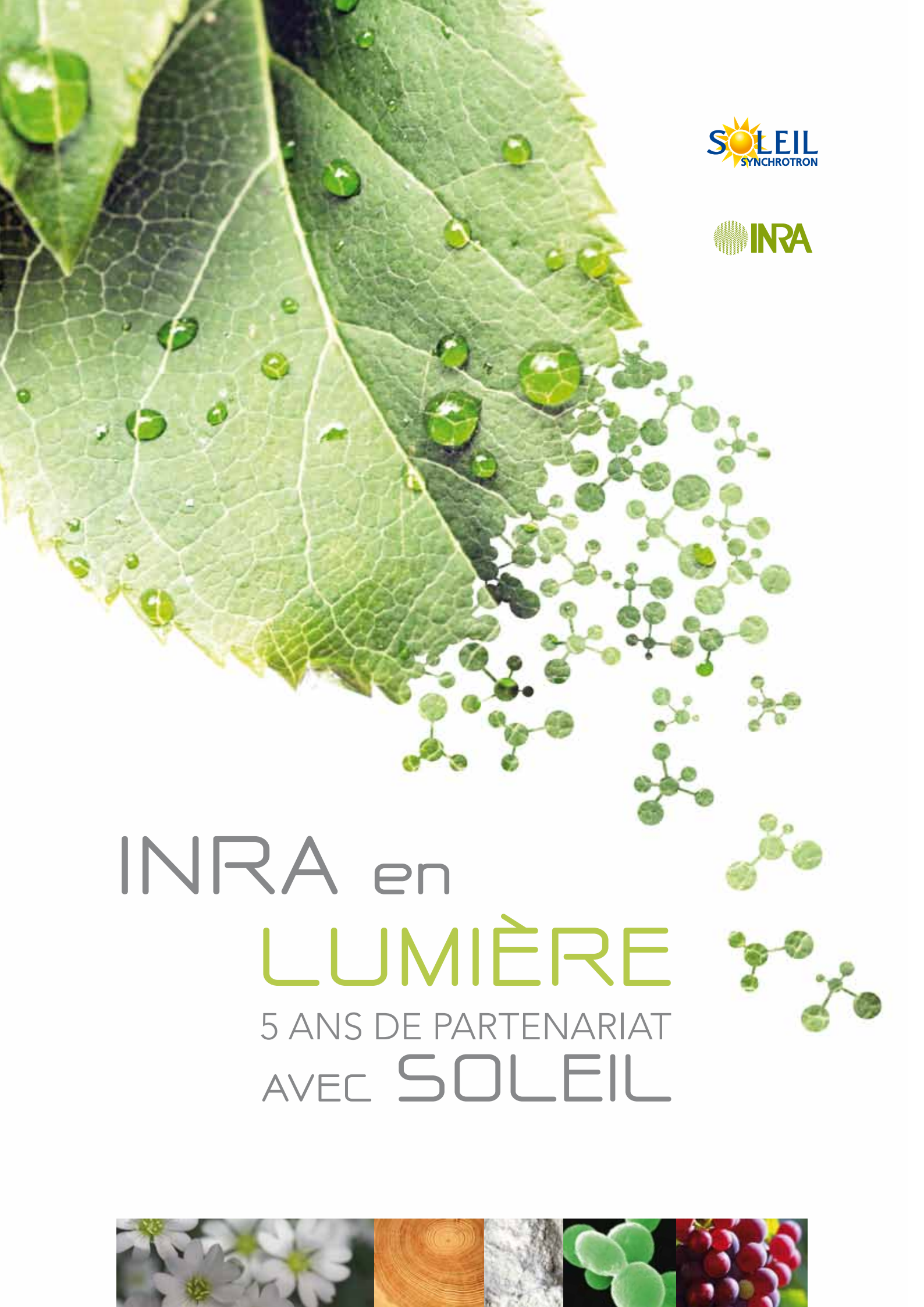




INRA en
LUMIÈRE
5 ANS DE PARTENARIAT
AVEC **SOLEIL**



SOMMAIRE

ÉDITO

SOLEIL	4
INRA	5

SYNCHROTON SOLEIL

Le synchrotron SOLEIL, un centre de recherches et un outil au service des scientifiques	6
Les modalités d'accès à SOLEIL	9

PANORAMA DES RECHERCHES

ENZYMES ET PROTÉINES

Étude structurale des prolamines isolées à partir de l'albumen de blé	12
D. Renard et al. - Ligne DISCO	
Étude structurale de la protéine salivaire humaine IB5 seule et en interaction avec un tanin	14
P. Sarni-Manchado et al. - Ligne DESIRS	
Relations structure-allergénicité dans les protéines de blé	16
J. Snégaroff et al. - Ligne DISCO	
Structures tridimensionnelles de protéines résolues sur la ligne de lumière PROXIMA-1	18
P. Briozzo et al. - Ligne PROXIMA1	
Cartographie UV à haute résolution et hydrolyse enzymatique de l'amidon	20
A. Buléon et al. - Ligne DISCO	
Structure – fonction des protéines phloémiennes PP2 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
D. Renard et al. - Ligne SWING	
Conformation en solution de protéines salivaires révélée par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	24
A. Vernhet et al. - Ligne SWING	
Structure des protéines stabilisatrices des réserves lipidiques de plantes oléagineuses	26
Y. Gohon et al. - Ligne DISCO	

MATIÈRES MOLLE & PHYSICO-CHIMIE

Structure de la micelle de caséine : une nouvelle proposition	28
A. Bouchoux et al. - Ligne SWING	
SAXS et synthèse enzymatique de polymères : détermination simultanée des conformations de transglucosidases et des polysaccharides produits	30
P. Roblin et al. - Ligne SWING	
Oxydation des tanins en solution et diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	32
C. Poncet-Legrand et al. - Ligne SWING	
Structures cristallines formées par les triglycérides du lait : identification par diffraction des rayons X en utilisant le rayonnement synchrotron	34
C. Lopez et al. - Ligne SWING	
Agrégation entre tanins condensés et le polysaccharide hyaluronane	36
F. Carn et al. - Ligne SWING	
Caractérisation des couches de protéines accumulées lors des opérations de filtration et diffusion de rayons X	38
G. Gesan-Guizou et al. - Ligne SWING	

PRODUITS ANIMAUX

Étude de la dénaturation thermique des composants musculaires par microspectroscopie infrarouge	40
T. Astruc et al. - Ligne SMIS	
Caractérisation de la composante protéique du foie gras en imagerie de fluorescence haute résolution	42
L. Théron et al. - Ligne DISCO	

PAROIS VÉGÉTALES ET FIBRES

Orientation sous contrainte des polysaccharides de la paroi du grain de blé : couplage sollicitation mécanique – microspectroscopie infrarouge	44
C. Barron et al. - Ligne SMIS	
Imagerie du fer dans la cellule végétale : découverte d'un nouveau pool de fer dans le nucléole	46
H. Roschztardtzt et al. - Ligne LUCIA	
Hétérogénéité chimique des parois de tige de blé et modifications par saccharification enzymatique	48
A. Habrant et al. - Ligne SMIS	
Apport de la microspectroscopie infrarouge et de l'imagerie de fluorescence haute résolution pour l'étude du grain de <i>Brachypodium</i>	50
F. Guillon et al. - Ligne SMIS	
Cartographie de la distribution des polymères dans les tiges de maïs par couplage d'images hyperspectrales dans le moyen infrarouge, en fluorescence UV et Raman	52
F. Allouche et al. - Lignes DISCO et SMIS	
Microanalyse à haute résolution du bois et dendrochronologie des arbres tropicaux	54
S. Ponton et al. - Ligne DIFFABS	

PETITES MOLÉCULES ET LIPIDES

Suivi de l'oxydation d'une émulsion lipidique par imagerie dynamique de fluorescence	56
M.-E. Cuvelier et al. - Ligne DISCO	
Corrélations entre la répartition des lipides et de FABP7 dans des cerveaux embryonnaires de rat	58
J. Aïoun et al. - Ligne SMIS	
Mesure des énergies d'ionisation du E-lycopène, de ses isomères Z et de ses produits d'oxydation par photoionisation à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse	60
M. Carail et al. - Ligne DISCO	

MICRO-ORGANISMES

Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> soumise au stress nano-argent : analyse haute résolution de la composition cellulaire par microspectroscopie infra-rouge	62
C. Saulou et al. - Ligne SMIS	
Vers la compréhension de la résistance à la congélation de bactéries lactiques grâce à la microspectroscopie infrarouge haute résolution	64
F. Fonseca et al. - Ligne SMIS	
Mise en évidence des modifications métaboliques induites par l'accumulation de lipides dans la levure <i>S. cerevisiae</i> par sFTIR sur cellules uniques	66
M. Froissard et al. - Ligne SMIS	

PROCÉDÉS

Imagerie dynamique de l'imprégnation en huile de produits frits étudiée en fluorescence UV	68
O. Vitrac et al. - Ligne DISCO	
Mécanismes moléculaires de diffusion de substances de type additifs dans les matrices plastiques étudiés par imagerie de fluorescence : application à la sécurité sanitaire des emballages	70
O. Vitrac et al. - Ligne DISCO	
Orientation macromoléculaire déterminée par microspectroscopie infrarouge dans les matériaux à mémoire de forme en amidon	72
A. Buléon et al. - Ligne SMIS	

DÉVELOPPEMENTS INSTRUMENTAUX POUR LES LIGNES DE LUMIÈRE

SMIS : Spectroscopie et Microscopie Infrarouge utilisant le rayonnement Synchrotron	74
F. Jamme et al. - Ligne SMIS	
La ligne de lumière DISCO, de sa conception à son exploitation	76
A. Giuliani et al. - Ligne DISCO	
Imagerie sur la ligne de lumière DISCO (Dichroism, Imaging and mass Spectrometry for Chemical and biOlogical systems)	78
F. Jamme et al. - Ligne DISCO	
Utilisation du rayonnement synchrotron pour l'activation d'ions en spectrométrie de masse tandem	80
A. Giuliani et al. - Ligne DESIRS	
La ligne de lumière SWING : Small and Wide angles X-rays scattering	82
J. Perez et al. - Ligne SWING	

PORTRAITS

84

INDEX

87

SOLEIL – INRA

un partenariat exemplaire

Ce document présente les premiers résultats du partenariat fort conclu il y a 5 ans entre l'INRA et SOLEIL. La variété des résultats obtenus est impressionnante, tant par l'étendue des thématiques abordées - de l'étude de la structure moléculaire de protéines et leurs interactions, en passant par le suivi de phénomènes de transport ou de résistance mécanique, jusqu'aux études sur cellules uniques – que par la diversité des méthodes employées.

En effet, une grande partie des possibilités d'analyses offertes par SOLEIL, de l'infrarouge aux rayons X, a été utilisée : biocristallographie des protéines, diffusion des rayons X aux petits angles et micro-analyse élémentaire par fluorescence ou absorption X, fluorescence UV et dichroïsme circulaire, cartographie UV haute résolution, spectrométrie et microspectrométrie infrarouge. L'opportunité de combiner les techniques expérimentales accessibles sur plusieurs lignes de lumière pour l'analyse d'un même échantillon est un atout qui permet d'aborder une des caractéristiques des échantillons INRA : leur complexité. Enfin, ce partenariat a conduit au développement d'environnements échantillons spécifiques à certaines thématiques de l'INRA. Les travaux menés à SOLEIL se sont donc révélés très fructueux pour approfondir la compréhension *in-situ*, sur plusieurs échelles structurales, des mécanismes biologiques et physico-chimiques qui sous-tendent l'organisation du vivant et ses transformations.

Ce dispositif est exemplaire à plus d'un titre. L'INRA nous a fait confiance et a inscrit SOLEIL dans la vision prospective de sa recherche et des développements technologiques et méthodologiques qui pourraient l'enrichir. En première ligne de cette action : Frédéric Jamme, Alexandre Giuliani et Pierre Roblin, les trois ingénieurs INRA qui travaillent au sein des équipes scientifiques de SOLEIL et facilitent l'accueil au synchrotron des collègues de leur institut. Avec Alain Buléon de l'INRA de Nantes, qui coordonne depuis le début ce partenariat fructueux, ils ont une mission également essentielle d'information et d'identification de nouvelles expériences auprès d'autres communautés scientifiques de l'INRA, moins familières des bénéfices que SOLEIL pourrait leur apporter. Cet effort conjoint pour faire connaître les possibilités offertes par les techniques synchrotron en regard des problématiques et des échantillons extrêmement divers et complexes que les scientifiques de l'INRA étudient, est très motivant. Il s'inscrit dans la volonté de SOLEIL d'ouvrir ce très grand instrument à un maximum de communautés et d'être toujours attentif aux sujets de recherche qui les mobilisent.

Grâce à cette collaboration permanente, nous savons de part et d'autre que les nouvelles lignes de lumière programmées à SOLEIL, en particulier en imagerie, pourront elles aussi répondre aux enjeux qui mobilisent les départements scientifiques de l'INRA, alimentation, écologie, microbiologie, santé, génétique...

Le partenariat INRA-SOLEIL est une grande fierté pour moi. Les relations humaines qui s'y sont nouées sont solides et chaleureuses, les échanges scientifiques qu'il permet nous enrichissent et nous rendent créatifs. Ce document en témoigne. Un grand merci à tous ceux qui ont imaginé ce partenariat, qui l'ont fait exister et à tous ceux qui, tant à SOLEIL qu'à l'INRA, le font vivre.

Jean Daillant
Directeur Général de SOLEIL

INRA – SOLEIL

une collaboration originale, riche de résultats et de nouvelles avancées



Aller sonder la matière depuis la liaison moléculaire jusqu'aux assemblages micro-métriques dans des structures très diverses, et cela avec un pas de temps pouvant descendre jusqu'à quelques millisecondes, est devenu une nécessité pour comprendre les mécanismes de structuration et d'évolution sous contraintes de la matière, qu'elle soit vivante ou élaborée par l'homme. C'est également un défi technique qui ne peut être relevé que grâce à l'utilisation du rayonnement synchrotron. C'est cette analyse qui a conduit, il y a cinq ans, l'INRA à mettre en place un partenariat tout à fait original principalement avec les équipes de trois lignes de lumière de SOLEIL : SMIS, SWING, DISCO.

Ce partenariat est structuré autour de trois dispositifs complémentaires :

- premièrement, en positionnant au sein de SOLEIL trois ingénieurs à plein temps qui participent au développement des lignes et à l'accueil des utilisateurs, dont les collègues de l'INRA, et qui optimisent ainsi la préparation des expériences puis le traitement des résultats ;
- deuxièmement, en mettant en place un conseil scientifique des utilisateurs INRA qui aide efficacement à l'élaboration des projets de demande de temps de faisceau en fonction des lignes de lumière ;
- troisièmement, en coordonnant le dispositif grâce à l'implication d'un scientifique compétent qui, en amont, sensibilise les équipes à ces nouvelles approches et évalue leurs besoins.

Après cinq années de fonctionnement effectif, ce recueil a l'ambition de démontrer aux travers des nombreux résultats obtenus la pertinence de ce dispositif. Ce succès est à mettre au crédit, pour l'INRA, de Paul Colonna alors chef du département CEPIA* et de Guy Riba alors Directeur Général Délégué et de l'engagement constant des dirigeants de SOLEIL, Denis Raoux (DG 2003-2007) et Roger Fourme (DS Sciences du vivant), suivis dans leur action ensuite par Michel Van Der Rest (DG 2007-2011) et Jean-Pierre Samama (Directeur Scientifique). Nous le devons aussi à la confiance que nous ont témoignée les responsables de ligne, Paul Dumas, Javier Perez et Matthieu Réfrégiers, à l'enthousiasme d'Alain Buléon, notre "chef d'orchestre" et bien sûr à la motivation et au travail quotidien de Frédéric Jamme, Alexandre Giuliani et Pierre Roblin, les ingénieurs INRA que nous tenons à remercier tous.

Nous souhaitons que cette aventure continue et s'amplifie avec le soutien du nouveau Directeur Général de SOLEIL Jean Daillant. Les défis à relever dans l'investigation des systèmes complexes sont nombreux et seront passionnants grâce aux possibilités que nous offrent les approches multi-échelles et multi-spectrales, les couplages de méthodes en temps réel et que nous offriront bientôt les accès à l'imagerie X ou à la micro/nanotomographie par exemple. Le champ des possibles est excessivement large d'un point de vue technique : à nous, donc, d'être imaginatifs pour poser et résoudre les bonnes questions.

Merci à tous les collègues qui ont contribué, par leurs travaux et leur engagement, au succès de cette entreprise et de ce partenariat.

Bonne continuation et faites des émules !

François Houllier
Directeur Général Délégué

Monique Axelos
Chef de département CEPIA

* CEPIA : Caractérisation et Élaboration des Produits issus de l'Agriculture.

LE SYNCHROTRON SOLEIL



Un centre de recherches et un outil au service des scientifiques

Être une source de lumière dont les caractéristiques, en termes de brillance et de longueurs d'onde, permettent de percer les secrets les plus intimes de la matière : telle est la mission d'un centre de rayonnement synchrotron tel que SOLEIL. Au service des scientifiques comme des industriels, cette installation de très haute technologie leur offre les moyens d'investigation désormais indispensables.

Qu'est-ce que SOLEIL ?

SOLEIL produit une lumière 10 000 fois plus brillante que la lumière solaire, émise de l'infrarouge lointain aux rayons X durs, dans le but d'explorer la matière. Cette lumière provient d'électrons de très haute énergie qui circulent dans un anneau de 354 mètres de périmètre, à une vitesse proche de celle de la lumière. Cet anneau est équipé de dispositifs magnétiques - aimants de courbure (appelés aussi "dipôles"), onduleurs et wigglers - qui forcent les électrons à suivre des trajectoires courbes ou ondulées. À chaque passage dans ces dispositifs magnétiques où leur trajectoire est déviée, les électrons perdent de l'énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique : le rayonnement synchrotron.

Ce rayonnement possède des caractéristiques uniques de polarisation, d'accordabilité sur une très large gamme d'énergies de photons, de brillance, ainsi qu'une structure temporelle. Ces propriétés uniques sont mises à profit par exemple pour étudier la matière ultra-diluée, suivre des processus à l'échelle de quelques centièmes de nanoseconde, ou obtenir des données à des échelles de taille de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. C'est dans les différentes lignes de lumière, construites tout autour de l'anneau (figure 1), qu'ont lieu les expériences utilisant le rayonnement synchrotron.

Des lignes de lumière sur mesure

Chaque ligne de lumière est un véritable laboratoire, conçu pour l'emploi d'une gamme de longueurs d'onde donnée (figure 2), et instrumenté pour préparer et analyser toute sorte d'échantillons de matière. Les photons émis viennent y frapper l'échantillon étudié et permettent, grâce à des techniques très spécifiques, d'étudier sa géométrie en surface ou en volume, ou bien ses propriétés chimiques, électroniques, magnétiques... Le programme expérimental prévoit la mise à disposition de 29 lignes de lumière. En 2012, 20 de ces 29 lignes sont ouvertes aux scientifiques, et accueillent déjà plus de 2 500 utilisateurs chaque année, selon un fonctionnement de 24h/24, 6 jours/7 et 250 jours/an.

Aux lignes de lumière de SOLEIL s'ajoutent des laboratoires supports de préparation des échantillons et d'instrumentation : chimie, biologie, surfaces, métrologie et étalonnage des optiques.

Une gamme d'équipements scientifiques de pointe

L'utilisation du rayonnement synchrotron concerne un très large ensemble d'activités tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée : physique, chimie, sciences des matériaux, électronique, sciences du vivant, médecine, sciences de la Terre et de l'atmosphère, environnement, agroalimentaire, cosmétique, pharmacie... Les recherches menées à SOLEIL sont d'une aussi grande diversité que les domaines qu'elles couvrent.

Complémentaire des autres dispositifs d'exploration de la matière, SOLEIL offre un panel de techniques spécifiques très large. Ces techniques peuvent être classées en quatre familles :

- diffraction/diffusion des rayons X : information structurale
- spectroscopies IR, UV et X : information chimique
- techniques d'analyses électronique et magnétique : photoémission, dichroïsme circulaire
- techniques d'imagerie et de radiographie/tomographie : morphologie



D'une surface de 16,5 ha, le site de SOLEIL est localisé sur la commune de Saint Aubin dans l'Essonne, sur le Plateau de Saclay. Le personnel de SOLEIL, soit près de 400 personnes, y accueille chaque année plus de 2 500 utilisateurs extérieurs qui bénéficient des compétences et des installations scientifiques de pointe mises à leur disposition.

Il est possible d'analyser, simultanément ou non, un même échantillon par plusieurs techniques complémentaires, une telle approche étant favorisée par la gamme spectrale disponible, qui s'étend de l'infrarouge lointain aux rayons X durs.

L'utilisation de la lumière synchrotron procure par ailleurs des avantages souvent décisifs pour l'analyse des échantillons car elle permet de gagner des ordres de grandeurs dans la qualité des mesures par rapport à l'utilisation des sources classiques de lumière.

Près de 400 personnes au service de la science

À SOLEIL, près de 400 personnes s'investissent quotidiennement pour garantir aux utilisateurs des lignes de lumière des conditions de recherche optimales. La première mission de SOLEIL est d'être un outil de service pour l'ensemble de la communauté scientifique et industrielle. Mais SOLEIL est aussi un laboratoire qui développe ses propres thématiques de recherche au sein d'équipes scientifiques de très haut niveau.

Concrètement, les équipes de SOLEIL :

- conçoivent et font évoluer les lignes de lumière pour qu'elles répondent en permanence au plus haut niveau d'exigence de leurs utilisateurs ;
- assurent l'excellence de l'accueil des utilisateurs extérieurs et l'adéquation entre leurs besoins et les possibilités offertes ;
- effectuent une recherche propre d'excellence, principalement obtenue en utilisant les installations de SOLEIL.

Qui finance SOLEIL ?

SOLEIL a vu le jour grâce au soutien de cinq partenaires. Deux parmi les plus grands organismes de recherche français – le CNRS et le CEA – sont les actionnaires de "la société civile Synchrotron SOLEIL", et en détiennent respectivement les parts à hauteur de 72 % et de 28 %. La Région Île-de-France et le Conseil général de l'Essonne ont fortement contribué financièrement à sa construction et assurent aujourd'hui un suivi rigoureux de son développement. Enfin, la Région Centre participe au développement de trois des 29 lignes de lumière de SOLEIL : DIFFABS, DISCO et SWING.

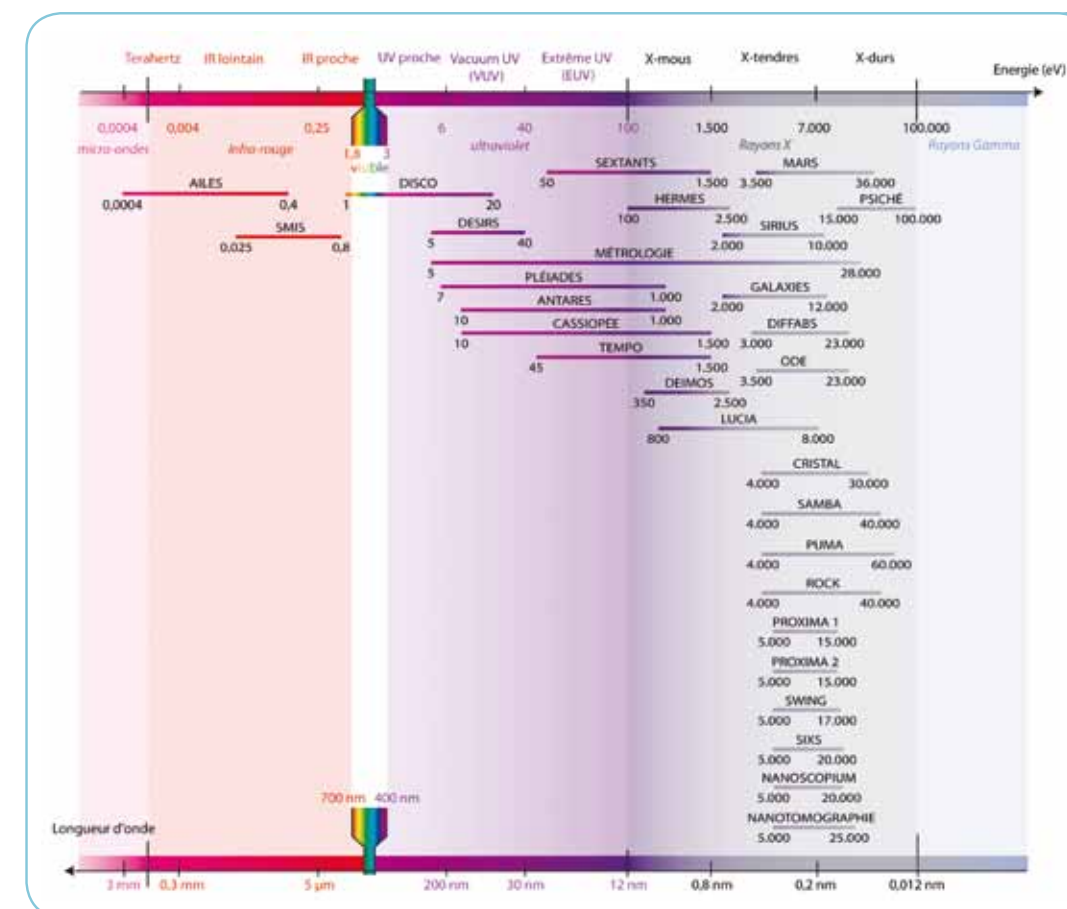


Figure 2

Classification des lignes de lumière de SOLEIL selon la gamme de longueurs d'onde/d'énergie qu'elles couvrent.

Les modalités d'accès à SOLEIL

Le synchrotron SOLEIL est un centre de recherche, et de services à la recherche, dédié à l'étude de la matière à travers ses interactions avec la lumière. SOLEIL assure deux missions : mener, d'une part, des projets de recherche scientifique d'excellence et soutenir, d'autre part, la recherche et l'innovation réalisées par les laboratoires de recherche publics, les entreprises, les hôpitaux, les musées...

SOLEIL propose à cet effet à ses utilisateurs externes quatre modalités d'accès complémentaires : un accès gratuit aux lignes de lumière après sélection par des Comités de Programmes, des prestations de services d'analyses, des partenariats de recherche et des accès rapides.

Les projets scientifiques sélectionnés par les Comités de Programmes

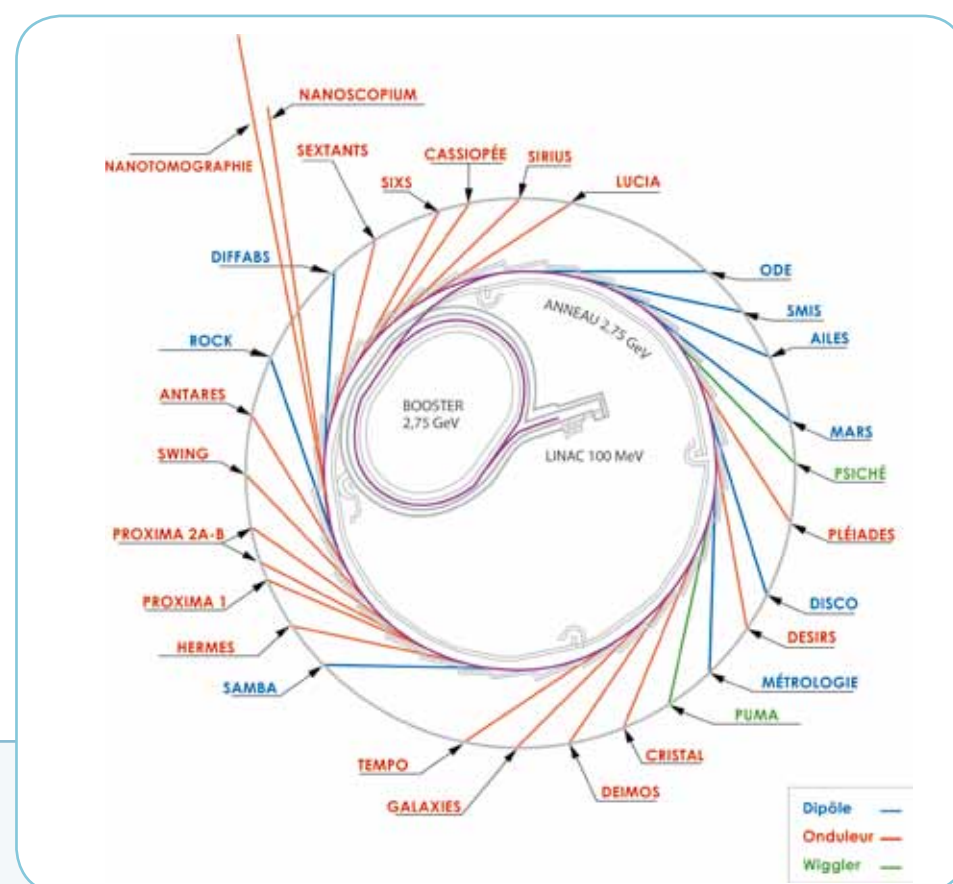
SOLEIL a mis en place un système d'évaluation par les pairs, "les Comités de Programmes", pour l'attribution du temps de faisceau, dans le cadre de deux appels à projets annuels (mi-février et mi-septembre). Les projets scientifiques soumis à SOLEIL sont évalués et classés dans un cadre compétitif par ces Comités de Programmes, sur la base de leur qualité scientifique et de la pertinence d'utilisation du rayonnement synchrotron. Le résultat de ces évaluations est soumis à la Direction Scientifique de SOLEIL pour validation.

Les Comités de Programmes couvrent les disciplines scientifiques suivantes :

1. Matière diluée
2. Propriétés électroniques et magnétiques de la matière - Surfaces et Interfaces
3. Propriétés de la matière et des matériaux : Structure, Organisation, Caractérisation, Élaboration
4. Chimie et physico-chimie - Réactivité *in situ* - Matière molle
5. Biologie - Santé
6. Matériaux anciens - Terre et Environnement

Figure 1

Disposition des 29 lignes de lumière de SOLEIL.



Dans ce cadre, deux types de projets sont proposés, de manière à couvrir les besoins et attentes des utilisateurs :

- Projets standards

Le temps de faisceau est alloué aux utilisateurs dans un créneau de 6 mois consécutif aux décisions des Comités de Programme.

- Block Allocation Group (BAG)

Les projets BAG concernent les expériences en cristallographie des protéines et en diffusion des rayons X aux petits angles dans le domaine de la biologie. Un BAG est porté par un scientifique qui coordonne et rassemble les demandes de plusieurs laboratoires. Le temps de faisceau demandé dans le projet BAG couvre une période d'un an.

Les principales caractéristiques de ce mode d'accès sont les suivantes :

- Mise à disposition d'une ou plusieurs lignes de lumière (3 au maximum), la collecte des données expérimentales étant réalisée directement par le demandeur, avec un accompagnement par l'équipe de ligne,

- Accès gratuit aux lignes de lumière pour les utilisateurs. Les frais de séjour et de voyage peuvent également être pris en charge par SOLEIL pour un maximum de trois personnes venant de laboratoires français, hors Région Ile de France. Des programmes de financement spécifiques existent pour les chercheurs travaillant dans un organisme/institut localisé dans un état membre ou associé à l'Union Européenne.

- Volume d'accès représentant 65 % du temps total de faisceau disponible pour les expériences.

- Délais d'accès aux lignes de lumière : après la communication des résultats aux utilisateurs (qui a lieu 3 mois après le dépôt des projets) et une période d'un mois et demi pour la planification et l'organisation de l'accueil des premiers projets, les expériences s'échelonnent sur une période de 6 mois.

- Taux de sélection actuel : en moyenne sur l'ensemble de lignes de lumière, 1 projet déposé sur 2 est accepté.

- Obligation de soumettre un compte-rendu d'expérience et de publier les résultats, avec mention de l'utilisation du synchrotron SOLEIL.

Les prestations facturées

Lorsque les études synchrotron nécessitent de la confidentialité les utilisateurs externes ont recours aux prestations payantes.

Les principales caractéristiques de ce mode d'accès sont les suivantes :

- Prestation "à la carte", en fonction des besoins spécifiques de l'utilisateur pour chacun de ses projets, allant de la simple mise à disposition d'une ligne de lumière jusqu'à la prestation complète (préparation des échantillons, collecte, analyse et interprétation des données expérimentales, rédaction du rapport d'analyse).

- Facturation sur la base du temps d'accès aux lignes de lumière et du temps passé par le personnel de SOLEIL pour effectuer la prestation.

- Accès continu (pendant les périodes de fonctionnement) et sans sélection préalable.

- Volume d'accès à hauteur de 10 % du temps total de faisceau disponible pour les expériences.

- Délai minimisé (de quelques jours à quelques semaines).

- Garantie du niveau de confidentialité demandé par l'utilisateur.

La recherche partenariale

Dans le cadre de l'activité de recherche scientifique et de développement instrumental menée directement par le personnel de SOLEIL, représentant 20 % du temps total de faisceau disponible pour les expériences, des actions de recherche partenariale sont menées avec des équipes externes, publiques et/ou privées. La règle du partage est appliquée dans un cadre contractuel : mise en commun de moyens (intellectuels, humains, techniques, financiers) par les différents partenaires, définition des règles de partage de la propriété et des modalités d'exploitation des résultats de la recherche.

Les accès rapides

Dans le cadre des accès rapides un nombre très limité de projets peuvent être acceptés pour des travaux urgents, à hauteur de 5 % maximum du temps total de faisceau disponible pour les expériences.



INRA en
LUMIÈRE
5 ANS DE PARTENARIAT
AVEC **SOLEIL**

Panorama
des recherches



Étude structurale des prolamines isolées à partir de l'albumen de blé

Chercheurs impliqués

D. Renard¹, Y. Popineau¹, A. Giuliani^{2,3}, P. Roblin^{2,3}, M-H. Morel⁴, C. Sanchez⁴

1. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France
2. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France
3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
4. UMR 1208 IATE, INRA CIRAD SupAgro UM2, Montpellier, France

Contact

Denis Renard, Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes
denis.renard@nantes.inra.fr

RÉSUMÉ

L'analyse structurale des protéines de réserve du blé, gliadines et gluténines dans l'eau et dans le mélange eau-propanol, a été conduite par dichroïsme circulaire sur la ligne de lumière DISCO. Les gliadines, majoritairement en hélices, et les gluténines, majoritairement désordonnées, ont une propension à former davantage d'hélices α en eau-propanol. De plus, la température n'affecte pas les structures secondaires des gluténines démontrant la grande flexibilité et stabilité de ces protéines après traitement thermique.

ABSTRACT

The structural analysis of wheat storage proteins, gliadins and glutenins, in water and water-propanol, was performed by synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) on the DISCO beamline. The gliadins, mainly in α -helices, and the glutenins, mainly disordered, have a propensity to form more α -helices in water-propanol. In addition, temperature does not affect the secondary structures of glutenins highlighting the great flexibility and stability of these proteins with temperature.

Les protéines de blé, gliadines et gluténines, sont des protéines abondamment présentes dans l'albumen de blé, tissu de réserve de la graine, et sont constituées de domaines répétés riches en proline et glutamine et de domaines non répétés.¹ La conformation des domaines non répétés est prédite comme étant globulaire tandis que la conformation des domaines répétés est prédite comme étant linéaire ou allongée (avec plus ou moins de flexibilité).² De par leur séquence, ces protéines ont la particularité d'être peu solubles après extraction en solvant aqueux³ alors qu'elles sont présentes au cours du développement de la graine dans un environnement physiologique aqueux.

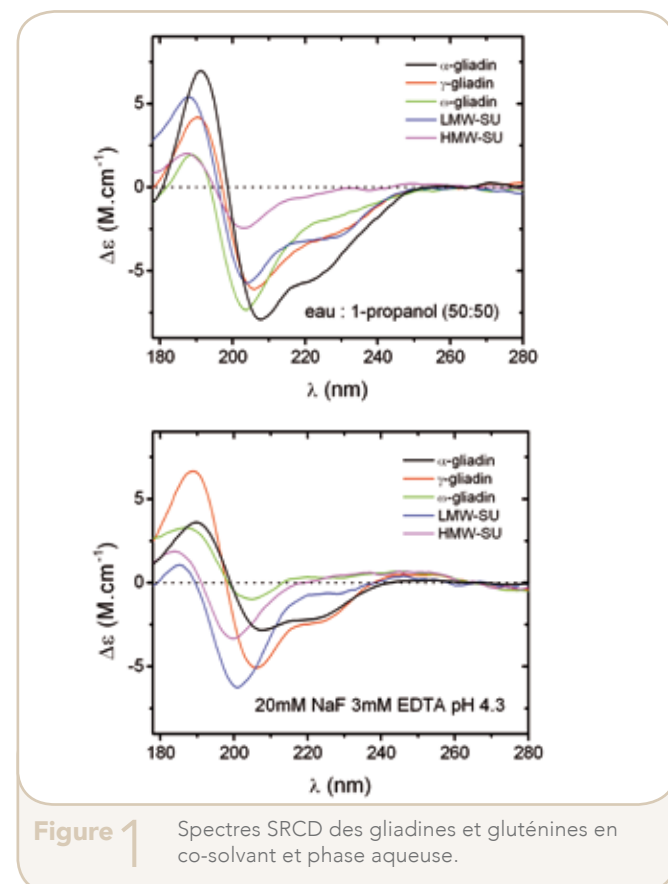


Figure 1 Spectres SRCD des gliadines et gluténines en co-solvant et phase aqueuse.

	Hélice α	Brin β	Coude	Désordonné	Total	NRMSD
α -gliadine						
eau:propanol (50:50)	0.364	0.053	0.178	0.405	1	0.169
20mM NaF 3mM EDTA pH 4.3	0.320	0.185	0.158	0.337	1	0.059
in silico SOPMA	0.32	0.02	0.06	0.60		
in silico SSPro	0.45	0.09	0.03	0.43		
γ -gliadine						
eau:propanol (50:50)	0.248	0.167	0.162	0.422	0.999	0.205
20mM NaF 3mM EDTA pH 4.3	0.316	0.105	0.151	0.428	1	0.121
in silico SOPMA	0.27	0.07	0.03	0.63		
in silico SSPro	0.35	0.08	0.03	0.54		
ω -gliadine						
eau:propanol (50:50)	0.238	0.118	0.178	0.465	0.999	0.123
20mM NaF 3mM EDTA pH 4.3	0.128	0.301	0.164	0.406	0.999	0.284
in silico SOPMA	0.04	0.01	0.01	0.94		
in silico SSPro	0.03	0.01	0.05	0.90		
LMW-SU (sous-unité gluténine de bas poids moléculaire)						
eau:propanol (50:50)	0.326	0.076	0.176	0.422	1	0.107
20mM NaF 3mM EDTA pH 4.3	0.161	0.204	0.183	0.453	1.001	0.087
20mM NaF pH 7.2	0.161	0.230	0.178	0.431	1	0.145
in silico SOPMA	0.17	0.08	0.03	0.74		
in silico SSPro	0.40	0.05	0.05	0.50		
HMW-SU (sous-unité gluténine de haut poids moléculaire)						
eau:propanol (50:50)	0.135	0.277	0.165	0.422	0.999	0.093
20mM NaF 3mM EDTA pH 4.3	0.093	0.253	0.163	0.492	1.001	0.416
20mM NaF pH 7.2	0.104	0.235	0.183	0.478	1	0.120
in silico SOPMA	0.11	0.06	0.08	0.75		
in silico SSPro	0.08	0.06	0.26	0.60		

Comme peu d'études structurales existent à ce jour sur ces protéines en milieu aqueux, nous avons choisi de comparer leurs structures secondaires par dichroïsme circulaire sur la ligne DISCO en co-solvant eau-propanol (maximum de solubilité) et en eau (minimum de solubilité). L'avantage du SRCD pour les protéines réside dans l'élargissement de la gamme spectrale ($\lambda < 190$ nm), par rapport aux équipements de laboratoire, autorisant une grande précision dans l'analyse quantitative des structures secondaires. Les prolamines de blé solubilisées en eau-propanol ont une propension à former davantage d'hélices α comparativement à leurs homologues solubilisées dans l'eau (Figure 1). De plus, il apparaît après analyse quantitative des spectres dichroïques que les α -gliadine, ω -gliadine et sous-unité gluténine de bas poids moléculaire (LMW-SU) sont fortement affectées par les conditions de solvant contrairement aux γ -gliadine et sous-unité gluténine de

CONCLUSION

Les résultats obtenus par SRCD ouvrent des perspectives intéressantes sur la détermination des structures tertiaires des prolamines de blé en fonction des conditions de solvant. En effet, il apparaît opportun désormais de comparer les résultats acquis sur les structures secondaires avec les conformations en solution de manière à préciser l'influence des changements de structures secondaires liés à la nature du solvant avec les états conformationnels en solution et en particulier la flexibilité des domaines répétés. Sur le plan biologique, ces données permettront d'apporter des arguments forts pour expliquer leur organisation et leur mobilité au sein des organites (réticulum endoplasmique, corpuscules protéiques⁴) présents dans les cellules de l'albumen de blé.

Tableau 1

Structures secondaires des prolamines de blé en eau-propanol, 20 mM NaF 3 mM EDTA pH 4.3 et 20 mM NaF pH 7.2 prédites à partir des spectres SRCD en utilisant l'algorithme Contin et la base de données SP175 sur le serveur Dichroweb (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html>). Les analyses *in silico* des structures secondaires à partir des séquences en acides aminés en utilisant SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) et SSPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>) sont données par comparaison.

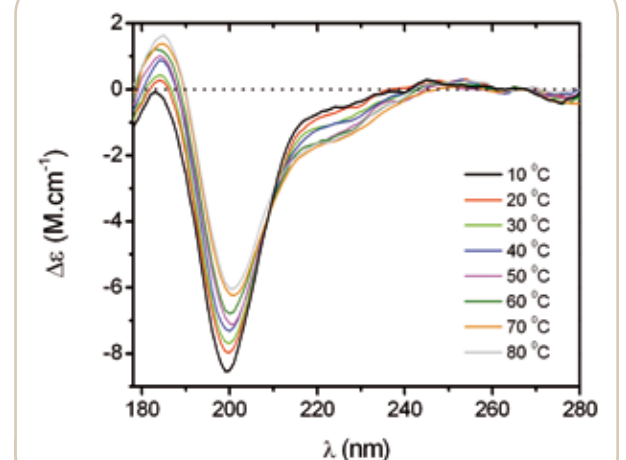


Figure 2 Spectres SRCD d'une sous-unité gluténine de haut poids moléculaire (HMW-SU) en 20 mM NaF pH 7.2 en fonction de la température.

Références

1. Shewry et al. (1985) *Plant Cell*, 7, 945-956.
2. D'Ovidio et al. (1995) *Cereal Chem.*, 72, 443-449.
3. Fu et al. (1996) *J. Cereal Sci.*, 24, 241-246.
4. Lousert et al. (2008) *J. Cereal Sci.*, 47, 445-456.

Étude structurale de la protéine salivaire humaine IB5 seule

et en interaction avec un tanin

Chercheurs impliqués

P. Sarni-Manchado¹, V. Cheynier², A. Giuliani^{3,4}, M. Réfrégiers³, L. Nahon³, F. Canon⁵

1. UAR 1008 CEPIA, Montpellier, France

2. UMR 1083 SPO, INRA Supagro UM1, Montpellier, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

4. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France

5. UMR 1324 CSGA, INRA AgroSup CNRS UB, Dijon, France

Contacts

Pascale Sarni (Département CEPIA) et Véronique Cheynier, Sciences pour l'œnologie, Montpellier, France

sarni@supagro.inra.fr

cheynier@supagro.inra.fr

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'ANR (07-BLAN-0279, PROTANIN) et du Ministère de la recherche (allocation doctorale de F. Canon).

RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode de fragmentation a été développée et appliquée à l'étude d'une protéine salivaire humaine et de ses interactions avec les tanins des végétaux. Cette méthode repose sur l'utilisation du rayonnement ultraviolet (UV) en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sur la ligne de lumière DESIRS.

ABSTRACT

A new method of fragmentation has been developed and applied to the study of a human salivary protein and of its interactions with plant tannins. This new method is based upon the use of ultraviolet radiation in tandem mass spectrometry (MS/MS) on the DESIRS beamline.

L'astringence est une caractéristique organoleptique importante des produits d'origine végétale, tels que le vin ou le thé, intervenant dans leur acceptabilité finale par le consommateur. Les tanins, métabolites secondaires des végétaux, sont à l'origine de cette sensation, qui reste encore mal caractérisée. Les protéines salivaires riches en proline (PRP) semblent jouer un rôle dans cette sensation. En effet, un régime riche en tanins peut induire la synthèse de ces dernières chez certains animaux. Ces protéines, appartenant à la famille des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP), sont capables de se lier aux tanins¹ avec une affinité supérieure aux autres protéines². Cette interaction permettrait de piéger les tanins et de protéger l'organisme de leurs effets anti-nutritionnels. Les nombreux clusters de proline présents au sein des PRP sont considérés comme des sites d'interaction privilégiés. Afin de tester cette hypothèse, la PRP salivaire humaine, IB5, seule et complexée à un tanin, le B2 3'O-gallate (B2 3'OG), a été étudiée à l'aide d'une nouvelle technique de spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est aujourd'hui un outil puissant pour l'étude des biomolécules en raison de sa rapidité, sa sensibilité, et de sa spécificité, mais aussi grâce aux informations structurales qu'elle est capable d'apporter. Ces informations peuvent être générées par des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) dans lesquelles une molécule ionisée cible est sélectionnée, puis activée et dissociée en fragments qui sont analysés dans une dernière étape. La technique classique d'activation des ions, appelée *collision induced dissociation* (CID) et implantée sur la grande majorité des spectromètres de masse commerciaux, fait intervenir des collisions avec un gaz. Néanmoins, cette méthode n'est pas applicable pour localiser des modifications post-traductionnelles labiles ou des interactions non covalentes sur la chaîne polypeptidique. Afin de localiser les sites d'interactions d'un ligand sur une protéine, il faut une méthode d'activation permettant

de fragmenter la chaîne polypeptidique tout en conservant les liaisons non covalentes et sans les déplacer. La technique que nous avons développée active la molécule cible à l'aide d'un rayonnement énergétique dans le domaine de l'ultraviolet sous vide (VUV)³.

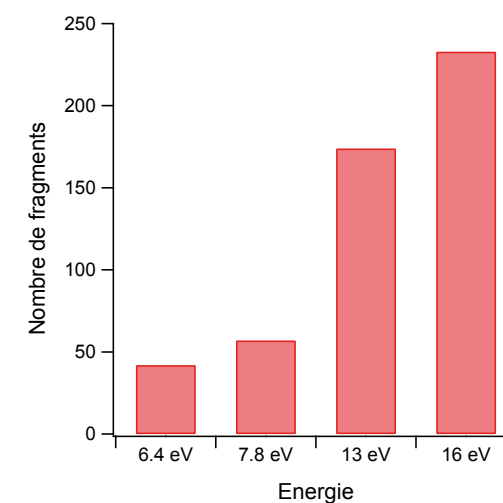


Figure 1 Nombre de fragments produits à partir de l'activation de la protéine IB5 sous l'état de charge de +7 en fonction de l'énergie des photons.



Figure 3 Séquence de la PRP IB5. Les barres vertes portant une étoile correspondent aux fragments qui ont été identifiés comme portant un B2 3'OG. Le rectangle rouge encadre la région identifiée comme étant le site d'interaction du B2 3'OG sur IB5.

CONCLUSION

Ces premiers résultats démontrent la potentialité du couplage de la spectrométrie de masse avec les lignes DISCO et DESIRS pour l'étude structurale des protéines et de leurs assemblages supramoléculaires. La technique est transposable à l'étude de nombreux autres objets biologiques tels que les sucres, les lipides, l'ADN et l'ARN... à l'échelle moléculaire et supramoléculaire. En effet, cette technique pourrait également générer des fragmentations spécifiques en fonction de la structure de l'objet étudié suivant qu'il soit replié ou complètement dénaturé et révéler ainsi la structure tertiaire ou quaternaire des protéines en plus de leur séquence primaire.

La pertinence d'une technique MS/MS est liée à la richesse d'informations qu'elle peut générer et donc au nombre de fragments produits ainsi qu'à la richesse des informations qu'ils portent. Afin d'étudier la pertinence de cette nouvelle technique, la protéine IB5, sous l'état de charge +7 (IB5⁺7), a été activée à différentes longueurs d'onde d'irradiation. La Figure 1 présente le nombre de fragments identifiés en fonction de l'énergie des photons. Elle montre une augmentation du nombre de fragments avec l'augmentation de l'énergie d'activation. Les énergies d'irradiation les plus basses, à 6,4 eV et 7,8 eV pouvant être obtenues à l'aide de lasers génèrent le moins de fragments, alors que les énergies les plus hautes sont les plus riches en informations et requièrent l'utilisation d'un synchrotron. Ainsi, grâce au rayonnement synchrotron, une couverture de séquence de près de 90 % a été obtenue alors qu'elle n'a été que de 58 % par CID.

La même méthodologie appliquée au complexe IB5•B2 3'OG a permis de fragmenter la chaîne peptidique d'IB5 et de générer plus d'une quarantaine de fragments ayant conservé l'interaction non-covalente avec le tanin. Une étape supplémentaire de MS/MS (MS³) mais cette fois par CID a permis de décrocher le tanin fixé et de confirmer l'identité des fragments. La figure 2 présente le spectre MS³ d'un fragment porteur d'un tanin. Sur cette figure, deux pics principaux sont présents. Ils correspondent à l'ion parent sélectionné et à un ion fragment ayant une masse inférieure, correspondant à la perte du tanin. L'identification de ces fragments a finalement permis de mettre en évidence que la séquence 'QPQAPPAGKPQG' comporte le site d'interaction privilégié de B2 3'OG sur IB5 (Figure 3). Au sein de cette séquence, les motifs répétés 'PP' et 'GKPQG' ont déjà été pressentis comme sites d'interaction des tanins sur les PRP.

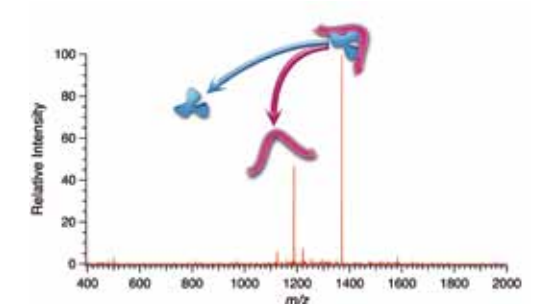


Figure 2 Spectre MS³ d'un fragment généré après irradiation VUV à 17 eV du complexe IB5•B2 3'OG.

Références

1. F. Canon, A. Giuliani, F. Paté, P. Sarni-Manchado (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 815-822
2. Hagerman et Butler (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 4494-4497.
3. A. R. Milosavljević, C. Nicolas, J.-F. Gil, F. Canon, M. Réfrégiers, L. Nahon, A. Giuliani, *J. Synchrotron. Rad.* 19,174-178

Relations structure-allergénicité dans les protéines de blé

Chercheurs impliqués

J. Snégaroff¹, Y. Gohon¹, H. Mameri², F. Wien³, P. Briozzo¹.

1. UMR 1318 IJPB, INRA AgroParisTech, Versailles, France

2. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France

3. Synchrotron Soleil, ligne DISCO, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Pierre Briozzo, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles
pierre.briozzo@versailles.inra.fr

RÉSUMÉ

Les gluténines sont des allergènes du blé. Nous avons comparé la réactivité avec les Immunoglobulines E (IgE) et le contenu en structures secondaires d'une gluténine recombinante, de ses deux moitiés N- et C- terminales, et du mélange de ces moitiés. Les deux moitiés interagissent dans la protéine entière et dans le mélange, ce qui induit une augmentation de la réactivité IgE et du nombre de feuillets β favorisant la présentation des épitopes.

ABSTRACT

The LMW glutenins are involved in various allergies to wheat. We compared the IgE-reactivities and secondary structure contents of whole recombinant glutenin, its repetitive N-terminal and non-repetitive C-terminal halves alone, and the mixed halves. The two halves interacted in whole protein or in mix : IgE-reactivity and β strand increased. This could favor epitopes presentation.

Les protéines de réserve du grain de blé sont impliquées dans les diverses allergies au blé. Ces protéines sont peu solubles et de structure peu connue. Pour mieux étudier les épitopes qui réagissent avec les IgE, nous avons utilisé sous forme recombinante deux gluténines, leurs moitiés N-terminale répétitive et C-terminale non répétitive¹. Nous avons étudié la réactivité de ces protéines ou fragments avec les immunoglobulines E (IgE) sériques de patients allergiques au blé.

Les protéines recombinantes exprimées dans *E. coli* ont été extraites et purifiées en utilisant leurs propriétés de solubilité, et déposées sur membrane de PVDF. Ces membranes sont incubées avec les sérums, puis avec un anticorps anti-IgE marqué enzymatiquement, et lavées. Les IgE sont détectées par chimioluminescence¹, et la ligne de lumière DISCO du Synchrotron SOLEIL a été utilisée pour analyser par dichroïsme circulaire (CD) les contenus en structures secondaires. Les données de CD issues du rayonnement synchrotron (SR) permettent d'obtenir un signal exploitable jusqu'à de très faibles longueurs d'onde : ceci améliore la précision dans l'analyse par rapport aux données de dichroïsme de laboratoire rapportées dans la littérature².

La protéine entière est nettement plus immunoréactive que ses moitiés (Figure 1), ce qui laisse penser que la protéine entière n'est pas la seule addition de ses moitiés. Parallèlement le SRCD montre que la protéine entière n'a pas les teneurs en structures secondaires qui correspondent à la moyenne de celles des moitiés, ce qui montre que les moitiés se modifient mutuellement quand elles sont incluses dans la même molécule (Figure 2). Le comportement du simple mélange des deux moitiés produites séparément est plus étonnant : la réactivité IgE est augmentée (Figure 1), et une évolution au cours du temps vers les structures secondaires présentes dans la protéine entière est observée (Figure 3).

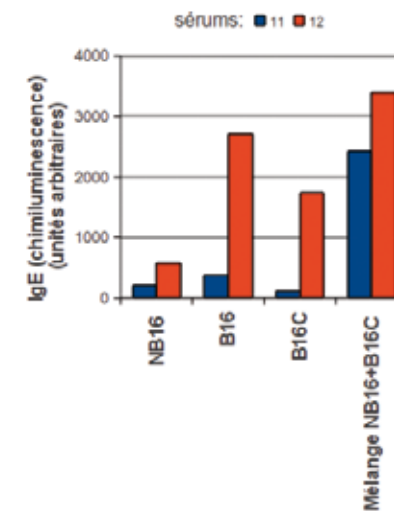


Figure 1 Exemple de réactivité d'une gluténine de blé recombinante avec les IgE de deux sérums de patients souffrant d'anaphylaxie au blé après effort.
B16 : gluténine entière.
NB16 : moitié N-terminale.
B16C : moitié C-terminale.

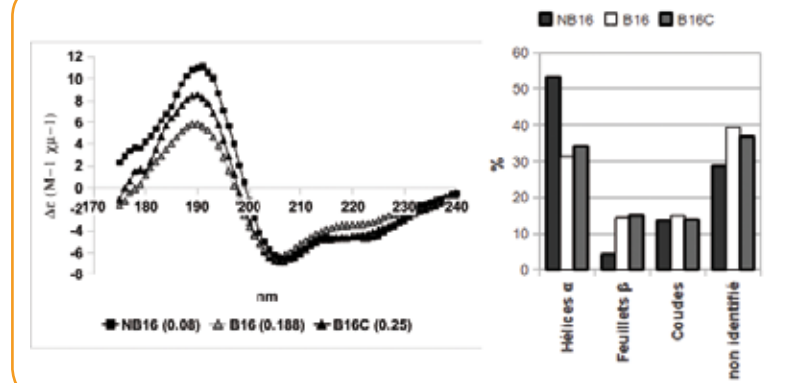


Figure 2 (a) Spectres de SRCD pour une gluténine et ses deux moitiés et (b) analyse en structure secondaire menée au moyen de l'algorithme ContinLL sur la plateforme en ligne Dichroweb.
(<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html>).

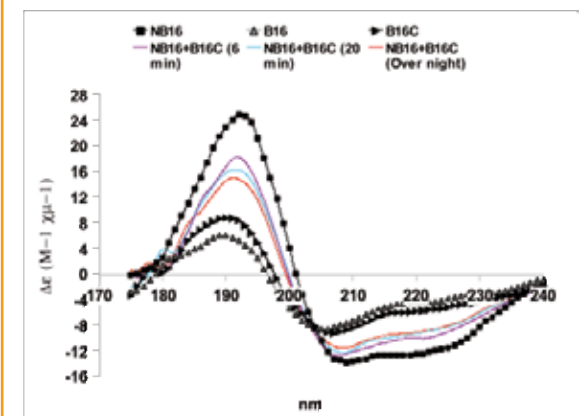


Figure 3 Évolution des spectres de SRCD du mélange des fragments de la gluténine en fonction du temps.

CONCLUSION

Il semblerait que les allergènes du blé qui ont été étudiés réagissent mieux avec les IgE *in vitro* quand la molécule est plus complexe, et que la structure secondaire soit un élément déterminant dans cette réaction, les feuillets β étant plus présents quand la réactivité avec les IgE est plus marquée. La relation entre l'immunoréactivité des protéines et la structure nécessite encore de nombreux essais pour être mieux comprise, et pour qu'on puisse envisager de prédire cette réaction.

D'autres travaux, en cours de publication, ont par ailleurs été menés pour comparer les contenus de structure secondaires des gliadines de blé et leur immunoréactivité *in vitro*, en liaison avec la réduction ou non de leurs ponts disulfure. L'omega5 gliadine, allergène majeur dans l'allergie du blé après effort, a montré en SR CD une thermostabilité remarquable. Elle peut être reliée à sa résistance aux processus technologiques qui conduisent à la fabrication des aliments à base de blé. Les structures d'allergènes solubles de blé, comme les protéines de transfert de lipides (LTP) et la serpine, ont également été étudiées sur la ligne DISCO.

Références

1. J. Snégaroff, G. Branlard, I. Bouchez-Mahiot, B. Laudet, M. Tylichova, T. Chardot, C. Pecquet, D. Choudat, N. Raison-Peyron, M. Vigan, S. Kerre, M. Lauriere (2007) *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9837-9845.
2. J. Lambourne, P. Tosi, J. Marsh, D. Bhandari, R. Green, R. Frazier, P. Shewry (2010) *J. Cereal Sci.*, 51, 96-104.

Structures tridimensionnelles de protéines résolues sur

la ligne de lumière PROXIMA-1

Chercheurs impliqués

P. Briozzo¹, D. Kopečný², A-M. Gilles³, B. Guimaraes⁴

1. UMR 1318 IJPB, INRA AgroParisTech, Versailles, France

2. Biochemistry, Palacky University, Olomouc, République tchèque

3. URA 2171 Génétique des génomes bactériens, Institut Pasteur CNRS, Paris, France

4. Synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Pierre Briozzo, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles
pierre.briozzo@versailles.inra.fr



Structure de la Glutathion S-nitroso réductase de tomate complexée à son cofacteur NAD

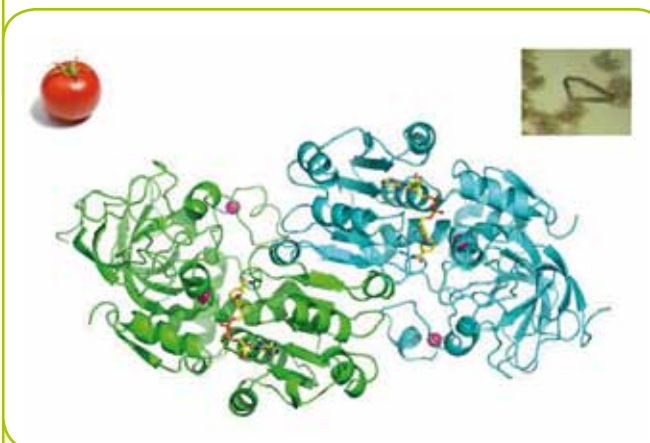


Figure 1 Structure résolue à 1,90 Å de résolution à l'aide de la ligne Proxima-1 du synchrotron Soleil. Le dimère biologique (vert/cyan) est représenté en rubans, le NAD en ball-and-sticks (jaune), les atomes de zinc catalytiques en magenta

Glutathion S-Nitroso Réductase (GSNOR) de tomate

La glutathion S-nitroso réductase (GSNOR) contribue à l'élimination du GSNO du cytosol, évitant la dégradation des protéines. Cette enzyme régule l'immunité aussi bien chez les animaux (elle est associée à l'asthme chez l'homme) que chez les plantes où elle module la résistance aux maladies et aux changements de température. Elle appartient à la famille des alcool-déshydrogénases 3 (ADH3). Plusieurs structures d'ADH3 sont publiées, mais aucune structure de GSNOR végétale. Grâce aux données de diffraction des rayons X enregistrées en 2010 puis 2011 sur la ligne de lumière PROXIMA-1, nous avons résolu les structures de l'enzyme de tomate : seule (résolution 2,15 Å), et complexée aux deux formes possibles de son cofacteur : NAD (1,90 Å : Figure 1) ou NADH₂ (2,10 Å). La GSNOR est capable de réduire le GSNO même en présence d'un rapport NAD/NADH₂ très élevé. Les structures résolues devraient permettre d'éclairer la forte affinité de l'enzyme pour la forme réduite de son cofacteur.

Protéine de liaison du fer YFeX d'*E. coli*

La capacité d'utilisation du fer héminique est un facteur déterminant du caractère infectieux des bactéries pathogènes. La protéine YFeX étudiée chez *E. coli* par nos collaborateurs de l'Institut Pasteur (Paris) semble effectuer *in vivo* la déferrochélation de l'hème sans rupture du cycle tétrapyrrolique, un mécanisme jamais décrit auparavant. Grâce aux enregistrements de données de diffraction des rayons X sur des cristaux de YFeX, effectués sur la ligne de lumière PROXIMA-1, nous avons pu résoudre la structure tridimensionnelle à haute résolution (1,75 Å) de cette protéine (Figure 2). Ceci permettra de mieux comprendre sa fonction biologique, soit d'extraction soit, plus simplement, de transport, du fer héminique.

Structure de la protéine de transport du fer YFeX d'*E. coli*



Figure 2 Structure résolue à 1,75 Å de résolution à l'aide de la ligne Proxima-1 du synchrotron Soleil (2011). Le dimère biologique (vert/cyan) est représenté en rubans, l'hème en ball-and-sticks (rouge).

RÉSUMÉ

Alors que les enzymes d'extraction du fer à partir de l'hème cassent le cycle tétrapyrrolique, la protéine YFeX semble agir par simple déferrochélation de l'hème². La résolution de la structure cristallographique d'YFeX donne un éclairage structural à cette fonction biologique originale.

ABSTRACT

As opposed to enzymes that extract iron from heme through the rupture of the tetrapyrrole skeleton, the cytoplasmic protein YFeX performs it through deferrochelation of the heme². The crystal structure of the protein complexed to heme give a structural basis to its particular function.

RÉSUMÉ

La GSNOR régule l'immunité aussi bien chez les plantes que chez les animaux¹. Les premières structures d'une GSNOR végétale, celle de tomate, devraient permettre de comprendre comment l'enzyme peut fonctionner en présence de très peu de NADH₂.

ABSTRACT

GSNOR regulates immunity in animals and plants¹. The first crystal structures of a plant GSNOR, that of tomato, should give insight on the molecular mechanism of the catalysis.

Références

1. C. Rusterucci, M. Carme Espunya, M. Diaz, M. Matthieu Chabannes, M. Carmen Martinez (2007) *Plant Physiol.*, 143, 1282–1292.
2. S. Létoffé, G Heuck, P. Delepelaire, N. Lange, C. Wandersman (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 11719–11724.

Cartographie UV à haute résolution et

hydrolyse enzymatique de l'amidon

Chercheurs impliqués

A. Buléon¹, P. Colonna¹, F. Jamme^{2,3}, M. Réfrégiers², G. Tawil¹

1. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Alain Buléon, Biopolymères Interactions Assemblages
Nantes

alain.buleon@nantes.inra.fr



RÉSUMÉ

La dégradation enzymatique de grains d'amidon de maïs par 2 amylases industrielles optimisées pour les biocarburants et les sirops de glucose à basse température a été suivie par fluorescence du tryptophane, sans ajout de sonde fluorescente, et imagerie dans le visible sur la ligne de lumière DISCO. Cela a permis, d'une part, de suivre les changements morphologiques grain par grain induits par l'hydrolyse et, d'autre part, de visualiser l'amylase en 3D à 283 nm de résolution.

ABSTRACT

Enzymatic breakdown of native maize starch by two amylases designed for the production of low temperature glucose syrup and bioethanol was monitored by mapping tryptophan fluorescence, without labeling, and light imaging on the DISCO beamline. It allowed to follow both the morphological changes of single starch granules and the 3D location of amylases at 283 nm resolution at different hydrolysis times.

L'amidon, principale substance de réserve des plantes, est biosynthétisé sous forme de grains dont la taille peut varier de 1 à 100 microns et la cristallinité de 15 à 45 %. Les amylases, enzymes majeures de l'hydrolyse de l'amidon, sont impliquées dans de nombreux processus naturels (fermentation, digestion) et industriels (panification, détergents, sirops de glucose, biocarburants...).¹ Contrairement à l'hydrolyse de substrats solubilisés comme l'amidon gélatinisé pour la production de sirop de glucose, les mécanismes d'hydrolyse de l'amidon granulaire sont mal connus et très dépendants de la structure du substrat qui limite la diffusion de l'enzyme et l'accessibilité des liaisons glycosidiques.² Récemment, deux enzymes particulièrement efficaces sur l'amidon granulaire ont été optimisées par la société Novozymes (DK) pour la production de sirop de glucose à basse température et de biocarburants à partir de *Anoxybacillus flavothermus* (AFA) et *Rhizomucor* (RA).^{3,4} Le nouveau microscope plein champ (Telemos) de la ligne DISCO⁵ utilisant le rayonnement synchrotron a été utilisé pour visualiser en lumière visible les changements morphologiques des grains d'amidon et la localisation de l'enzyme en fluorescence du tryptophane⁶.

La figure 1 montre le mode d'attaque des grains d'amidon par les deux enzymes, suivi grain par grain en microscopie dans le visible. L'hydrolyse par AFA débute par les couches externes du grain puis progresse vers le centre, ce qui conduit en visible à une diminution progressive de la taille du grain au cours de l'hydrolyse. RA, au contraire, hydrolyse d'abord le centre du grain, l'enzyme produisant rapidement des brèches qui s'étendent vers l'extérieur. Au stade final d'hydrolyse, une texture différente plutôt de type gel est observée (Figure 1). Elle pourrait correspondre à la forme recristallisée de fragments libérés par l'hydrolyse mise en évidence lors des études cinétiques.² C'est la première fois que l'hydrolyse enzymatique de grains d'amidon a pu être suivie grain par grain, les autres études concernant des populations de grains prélevées à différents temps d'hydrolyse.

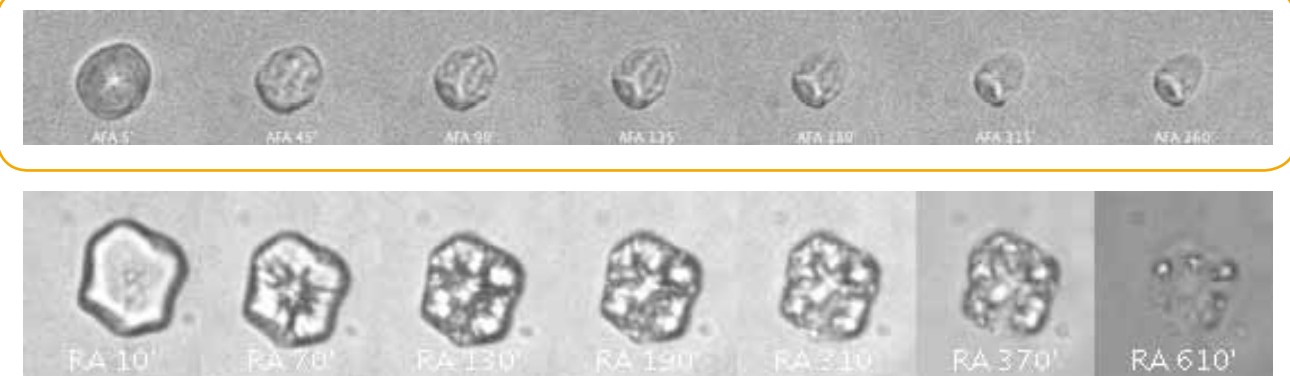


Figure 1 Images visibles de la dégradation de grain d'amidon de maïs par AFA (haut) et RA (bas).

Les figures 2 et 3 montrent la localisation en trois dimensions de l'AFA et de la RA dans un grain d'amidon à trois temps d'hydrolyse à partir de la fluorescence du tryptophane. Elles démontrent qu'il est possible de cartographier l'amylase dans le grain d'amidon sans ajout de sonde en utilisant seulement la fluorescence du tryptophane endogène à l'amylase. Les images de fluorescence démontrent clairement que l'AFA s'adsorbe préférentiellement sur les bords polyédriques du grain d'amidon au début de l'hydrolyse pour ensuite diffuser vers les zones plus internes, les cartes 3D ayant la même forme au cours de l'hydrolyse, avec une diminution de taille homothétique au cours de l'hydrolyse. Dans le cas de la RA, une pénétration dans le centre du grain au début de l'hydrolyse est nettement observée puis une dégradation du grain de l'intérieur vers l'extérieur, avec dans les derniers stades d'hydrolyse la présence de quelques nodules résistants formant une sorte de couronne, comme observé dans les images en visible. La superposition des images de visible et de fluorescence à un temps d'hydrolyse donné (Figures 2 et 3) démontre bien la complémentarité des deux méthodes d'imagerie, les zones les plus contrastées en visible n'apparaissant pas en fluorescence puisque non encore attaquées par les amylases. La résolution latérale est de 283 nm. C'est la première fois qu'une amylase est localisée à cette résolution, inaccessible avec les sondes fluorescentes et les lasers classiques.

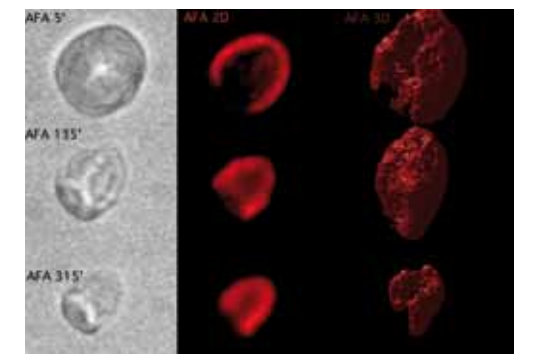


Figure 2 Hydrolyse de grain d'amidon de maïs par AFA à 5, 135 et 315 min : (gauche) Image en lumière visible, (centre) Fluorescence du tryptophane en 2D, (droite) cartes 3D de fluorescence montrant la localisation de l'enzyme dans le grain d'amidon.

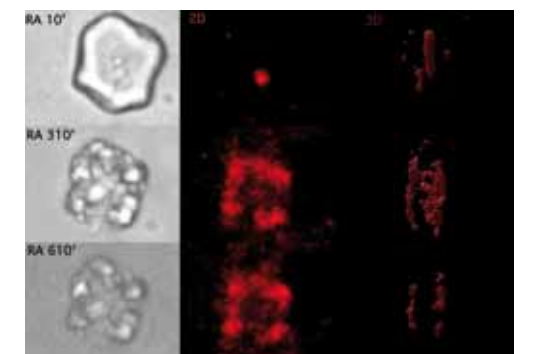


Figure 3 Hydrolyse de grain d'amidon de maïs par RA à 10, 310 et 610 min : (gauche) Image en lumière visible, (centre) Fluorescence du tryptophane en 2D, (droite) cartes 3D de fluorescence montrant la localisation de l'enzyme dans le grain d'amidon.

CONCLUSION

Ces premiers résultats démontrent la potentialité de la ligne DISCO pour l'imagerie de fluorescence 3D haute résolution et, plus généralement, l'imagerie des protéines par auto-fluorescence dans des milieux complexes. La technique est transposable à de nombreuses applications dans le domaine de l'imagerie biologique ou de l'enzymologie des systèmes complexes incluant la recherche sur les biocarburants.

Références

1. A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball (1998) *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85-112.
2. P. Colonna, A. Buléon, V. Leloup (1992) *J. Cereal Sci.*, 13, 1-13
3. G. Tawil, A. Viksø-Nielsen, A. Rolland-Sabaté, P. Colonna, A. Buléon (2012) *Carbohydr. Polym.*, 87, 46-52
4. G. Tawil, A. Viksø-Nielsen, A. Rolland-Sabaté, P. Colonna, A. Buléon (2011) *Biomacromolecules*, 12, 34-42
5. A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam, F. Wien, J.-L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chuber, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J.-L. Marlats, D. Zerbib, F. Polack, M. Réfrégiers (2009) *J. Synchrotron Rad.*, 16, 835-841

Structure – fonction des protéines phloémiennes PP2 chez *Arabidopsis thaliana*

Chercheurs impliqués

D. Renard¹, E. Perrin¹, V. Solé¹, P. Roblin^{2,3}, P. Briozzo³, S. Dinant⁴, J. Beneteau⁴, F. Vilaine⁴, C. Sanchez⁵

1. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France
2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
3. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France
4. UMR 1318 IJPB, INRA AgroParisTech, Versailles, France
5. UMR 1208 IATE, INRA CIRAD SupAgro UM2, Montpellier, France

Contact

Denis Renard, Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes
denis.renard@nantes.inra.fr

RÉSUMÉ

La structure de AtPP2-A1 et AtPP2-A2, deux protéines du phloème, le tissu conducteur de la sève élaborée chez les plantes supérieures, a été étudiée par diffusion des rayons X aux petits angles sur la ligne de lumière SWING. Cela a permis de mettre en évidence des états d'oligomérisation fortement dépendants des conditions physico-chimiques (pH, force ionique) et de la présence de ligand. La fonction de ces protéines reste néanmoins à ce jour inconnue à l'exception des propriétés lectines démontrées pour AtPP2-A1.

ABSTRACT

The structure of two phloem proteins, AtPP2-A1 and AtPP2-A2, specifically expressed in phloem, tissue conducting sap in higher plants, was studied by small angle X-ray scattering on the SWING beamline. This study allowed the identification of different state of oligomerization depending on the physico-chemical conditions (pH, ionic strength) and on the presence of ligand. The function of these proteins is still unknown except the lectin properties demonstrated for AtPP2-A1.

Les protéines PP2 sont des protéines abondamment présentes dans les éléments conducteurs du phloème, et nos observations microscopiques *in vivo* des cellules phloémiennes chez *Arabidopsis thaliana* montrent la présence de filaments protéiques dans lesquels les protéines PP2 sont associées.¹ La fonction biologique de ces filaments protéiques reste à ce jour inconnue. Nous avons parallèlement démontré que AtPP2-A1, exprimée par voie recombinante chez *E.coli*, présente une activité lectine caractérisée par sa fixation à trois types de sucres dont des oligomères de N-acétyl-glucosamine.² Enfin, nous avons démontré que PP2-A1 affecte la croissance des pucerons² et est impliquée dans la transmission des virus par les pucerons.³ En revanche, les données structurales sur ces protéines PP2 sont inexistantes et ne nous permettent pas d'établir les relations structure-fonction nécessaires à la compréhension de leur rôle biologique. Comme ces protéines sont inconnues sur le plan structural, nous avons utilisé la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) sur la ligne SWING pour déterminer leur conformation en solution.

La protéine AtPP2-A1 présente une faible similarité structurale avec les CBM (carbohydrate-binding module) dont le modèle, présenté Figure 1, prédit une grande région N-terminale flexible peu structurée tandis que l'autre moitié de la protéine est repliée en feuillets β anti-parallèles. Un domaine de fixation aux ARN est également identifié dans la région N-terminale. La fixation de AtPP2-A1 aux N-glycanes en régime dilué s'accompagne de la formation de dimère. Nous avons démontré en effet par SAXS une forte propension à l'oligomérisation de cette protéine dont le degré d'oligomérisation, déterminé à q tendant vers 0, augmente en présence du ligand (Figure 2). De plus, la superposition des intensités diffusées aux valeurs de $q > 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ démontre que la conformation globale et la structure interne de la protéine ne sont pas affectées par la présence du ligand. Par ailleurs, comme AtPP2-A2 est également sujette

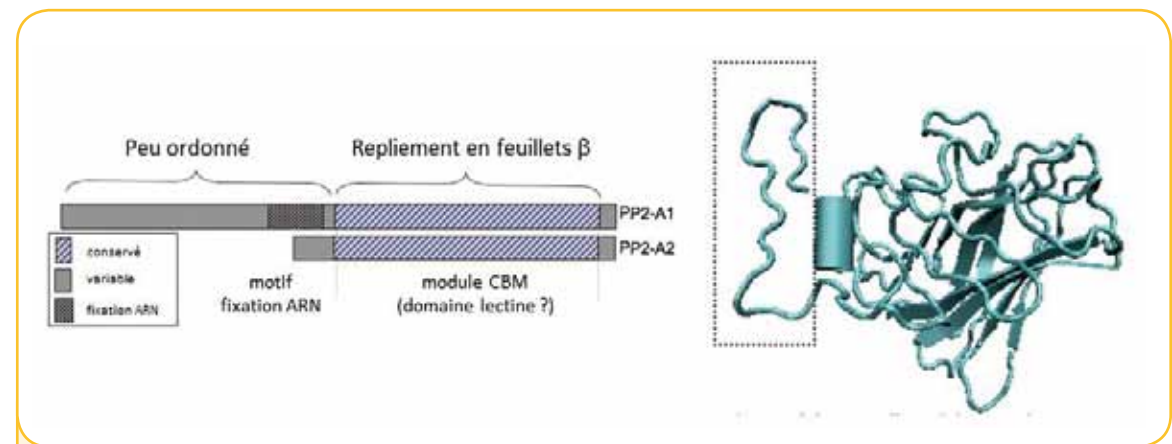


Figure 1 Organisation des protéines PP2 et modèle prédit pour la structure du monomère de PP2-A1.

à l'oligomérisation⁴ alors que son domaine N-terminal est beaucoup plus court, les interactions protéine – protéine, incluant les interactions PP2-PP2, impliqueraient le domaine structuré en feuillets β . Un calcul *ab initio* à partir des données de SAXS a permis de proposer un premier modèle 3D basse résolution très compact d'un oligomère de AtPP2-A1 (Figure 3). Néanmoins, des résultats récents acquis par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ont montré l'existence d'un équilibre oligomère – monomère en solution ce qui va nécessiter un couplage SAXS – SEC afin de valider le premier modèle *ab initio* acquis sur le mélange monomère - oligomère.

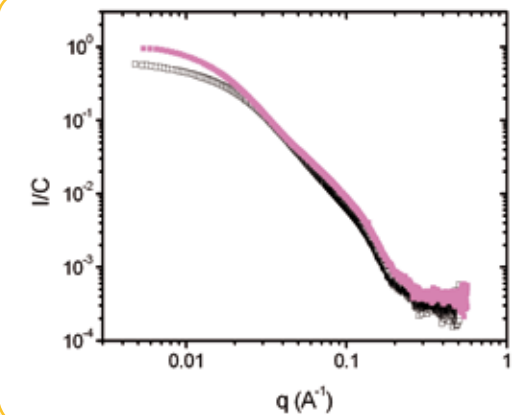


Figure 2 Intensités diffusées en fonction du vecteur d'onde q ($\text{\AA}^{-1}$) pour AtPP2-A1 en absence (symbole noir) et en présence (rose) de chitotriose (rapport molaire chitotriose: AtPP2-A1 = 6).

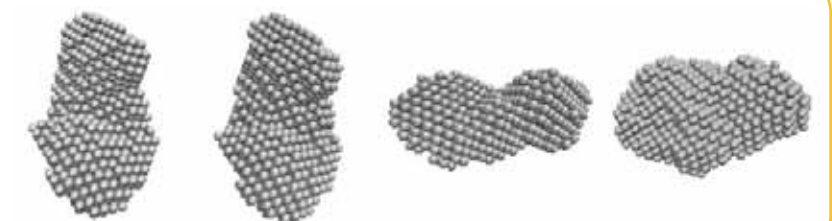


Figure 3 Modèle 3D basse résolution le plus probable d'un oligomère de AtPP2-A1.

CONCLUSION

Les résultats obtenus par SAXS ouvrent des perspectives intéressantes sur la détermination fine des structures des formes oligomériques de AtPP2-A1 et AtPP2-A2. En effet, à partir des nouveaux développements effectués sur la ligne SWING autorisant la détermination de structures dans des systèmes complexes à l'aide du couplage SAXS – SEC, nous pouvons envisager de préciser les modèles 3D basse résolution des formes monomérique et oligomérique. Sur le plan biologique, la propriété de lectine associée à la capacité auto-associative des PP2 pose la question de leur mobilité *in vivo* en fonction du stade de développement de la plante et/ou de l'environnement intracellulaire.

Références

1. B. Batailler, T. Lemaître, F. Vilaine, C. Sanchez, D. Renard, T. Cayla, J. Beneteau, S. Dinant (2012) *Plant Cell Environ.*, doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02487.x.
2. J. Beneteau, D. Renard, L. Marché, E. Douville, L. Lavenant, Y. Rahbé, D. Dupont, F. Vilaine, S. Dinant (2010) *Plant Physiol.*, 153, 1345-1361.
3. B. Bencharki, S. Boissinot, S. Revillon, V. Ziegler-Graff, M. Erdinger, L. Wiss, S. Dinant, D. Renard, M. Beuve, C. Lemaître-Guillier, V. Brault (2010) *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23, 799-810.

Conformation en solution de protéines salivaires

révélée par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

Chercheurs impliqués

A. Vernhet¹, B. Cabane², D. Durand³, J. Perez⁴

1. UMR 1083 SPO, INRA-Montpellier SupAgro-UM1, Montpellier, France

2. UMR 7636 PMMH, CNRS-ESPCI-UPMC, Paris, France

3. UMR 8619 IBBMC, CNRS-U. Paris Sud, Orsay, France

4. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Aude Vernhet, Sciences pour l'œnologie, Montpellier
aude.vernhet@supagro.inra.fr

Les protéines riches en proline (PRPs) représentent environ les deux tiers des protéines salivaires parotidiennes humaines. Elles sont généralement classées en protéines glycosylées, acides et basiques, et ont des fonctions différentes. Nous nous sommes intéressés à ces protéines dans le cadre de l'étude de leurs interactions avec les tanins. Ces interactions sont entre autres impliquées dans l'astringence, qui est une propriété organoleptique importante de nombreuses boissons à base de végétaux (vin rouge, thé, certains jus de fruits...). Des études antérieures montrent une très nette différence de comportement entre protéines glycosylées et protéines non glycosylées lorsqu'elles interagissent avec des tanins¹. Dans le premier cas, tanins et protéines forment des agrégats de taille finie (une dizaine de nm), stables. Au contraire, tanins et protéines non glycosylées précipitent très rapidement, même à faible concentration.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'interaction, il était nécessaire d'étudier la conformation des protéines en solution. Deux protéines salivaires humaines ont été exprimées par voie hétérologue et purifiées : IB-5, protéine non glycosylée de 7 kDa, et II-1, protéine glycosylée de 20 kDa. II-1 a été déglycosylée par voie enzymatique (II-1ng). Les PRPs appartiennent à la classe des protéines non structurées (pas de structure tertiaire stable). Il est par conséquent quasiment impossible de les cristalliser pour obtenir leur structure 3D à haute résolution par cristallographie (diffraction RX). La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) permet en revanche d'étudier leur conformation en solution. Les protéines non structurées peuvent adopter un très grand nombre de conformations. Les expériences de SAXS donnent accès à des paramètres géométriques moyens (rayon de giration, longueur de persistance et section de la chaîne polypeptidique), qui ont été déterminés pour chaque PRP et comparés à ceux d'autres protéines non structurées. Enfin, des algorithmes mathématiques ont été utilisés pour reconstruire des modèles compatibles avec les courbes expérimentales de diffusion.

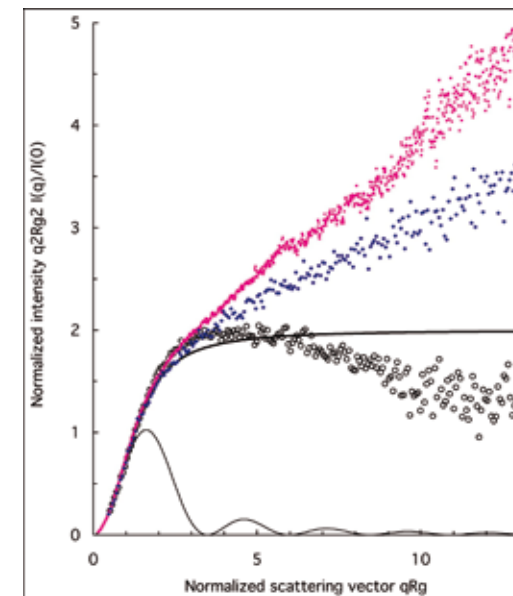


Figure 1

Représentation de Kratky des courbes de diffusion des protéines IB5 (rose), II-1 déglycosylée (bleu), II-1 (cercles noirs) dans un tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 5.5. La ligne continue la plus fine est une courbe de diffusion de sphères homogènes denses, la ligne plus épaisse représente la courbe de diffusion d'une chaîne de Debye.

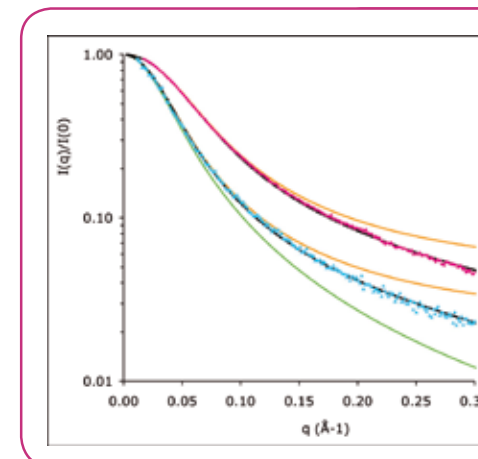


Figure 2

Courbes de diffusion des protéines IB5 (rose) et II-1 déglycosylée (turquoise). Courbes d'ajustement avec les modèles de Debye (vert), de Sharp-Bloomfield (orange) et de chaîne vermiculaire (noir).

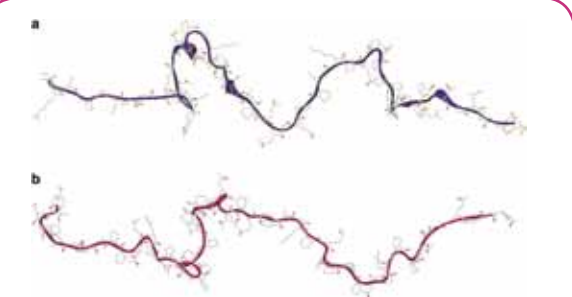


Figure 3

Deux exemples de conformations compatibles avec les données expérimentales, pour la protéine IB5, obtenues avec le programme BUNCH.

CONCLUSION

Les expériences menées sur SWING ont confirmé la conformation très étendue des protéines salivaires riches en proline. Elles ont permis de déterminer la conformation moyenne en solution des protéines glycosylées et non glycosylées². Les travaux se poursuivent pour identifier les caractéristiques structurales des agrégats formés par les interactions entre protéines salivaires et tanins.

Références

1. C. Pascal, C. Poncet-Legrand, B. Cabane, A. Vernhet (2008) *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6724-6732.
2. H. Boze, T. Marlin, D. Durand, J. Pérez, A. Vernhet, F. Canon, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, B. Cabane (2010) *Biophys. J.*, 99, 656-665.

RÉSUMÉ

La conformation en solution de protéines salivaires riches en proline (PRP) a été étudiée par SAXS. Cette technique a confirmé le caractère non structuré des PRP et a mis en évidence des différences structurales entre protéines glycosylées et non glycosylées.

ABSTRACT

The conformation of salivary proline rich proteins (PRPs) was determined by SAXS. This technique confirmed that PRPs are unstructured and highlighted conformation differences between glycosylated and non glycosylated proteins.

Structure des protéines stabilisatrices

des réserves lipidiques de plantes oléagineuses

Chercheurs impliqués

Y. Gohon¹, M. Froissard¹, T. Chardot¹, P. Briozzo¹, C. Tribet², F. Wien³, A. Giuliani^{3,4}

1. UMR 1318 IJPB, INRA AgroParisTech, Versailles, France

2. UMRS 8640, CNRS ENS, Paris, France

3. Synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette, France

4. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Yann Gohon & Pierre Briozzo, Institut Jean-Pierre Bourgin Versailles

yann.gohon@versailles.inra.fr

pierre.briozzo@versailles.inra.fr

RÉSUMÉ

Les oléosines et la caléosine sont des protéines qui stabilisent les oléosomes de graines et gênent l'extraction de l'huile. Par dichroïsme circulaire utilisant le rayonnement synchrotron (SRCD) sur la ligne de lumière DISCO, nous avons déterminé le contenu en structures secondaires de deux oléosines et de la caléosine en solution dans différents tensioactifs. Leur ancre centrale hydrophobe serait repliée en feuillets bêta.

ABSTRACT

Oleosins and caleosins are proteins that stabilize seed oleosomes and hamper oil extraction. Using synchrotron radiation circular dichroism on the DISCO beamline, we determined the secondary structure content of two oleosins and caleosin. It suggests that their central hydrophobic anchoring region folds as beta sheets.

L'extraction des huiles à partir des graines de plantes oléagineuses est un procédé coûteux en énergie (chauffage) et polluant (utilisation de solvants organiques comme l'hexane). Les lipides de réserve des graines sont stockés dans des corps lipidiques appelés oléosomes. À la surface de ces oléosomes se trouvent des protéines, majoritairement des oléosines et la caléosine, ainsi que d'autres protéines mineures. Ces protéines participent à la stabilisation des oléosomes et gênent l'extraction de l'huile. Le repliement et les fonctions de ces protéines sont peu connus. Leurs séquences contiennent une longue zone centrale entièrement hydrophobe de 50 (caléosine) à 70 (oléosines) acides aminés. Cette zone serait responsable de leurs interactions avec les corps lipidiques et de leur ancrage dans ces corps lipidiques et le cœur hydrophobe contenant les triglycérides.

Après avoir produit chez *Escherichia coli* et purifié les oléosines S3 et S5 ainsi que la caléosine d'*Arabidopsis thaliana*, différents tensioactifs ont été testés afin de maintenir ces protéines en solution aqueuse sans les dénaturer. Seuls les détergents anioniques comme le SDS (sodium dodecyl sulfate) et des polymères tensioactifs, les amphipols (APols), se sont révélés capables de maintenir plus de 60 % de ces protéines en solution après ultracentrifugation. Les amphipols, fournis dans le cadre d'une collaboration avec C. Tribet de l'ENS, sont des tensioactifs particuliers utilisés notamment pour maintenir les protéines membranaires sous forme native en solution aqueuse.

En collaboration avec les scientifiques de la ligne de lumière DISCO de SOLEIL (F. Wien, A. Giuliani) nous avons obtenu des spectres de SRCD de deux oléosines et de la caléosine maintenues en solution dans le SDS ou les APols. Ces données (Figure 1A) nous ont permis de proposer un modèle de repliement des oléosines et de la caléosines¹ en solution aqueuse (Figure 1B).

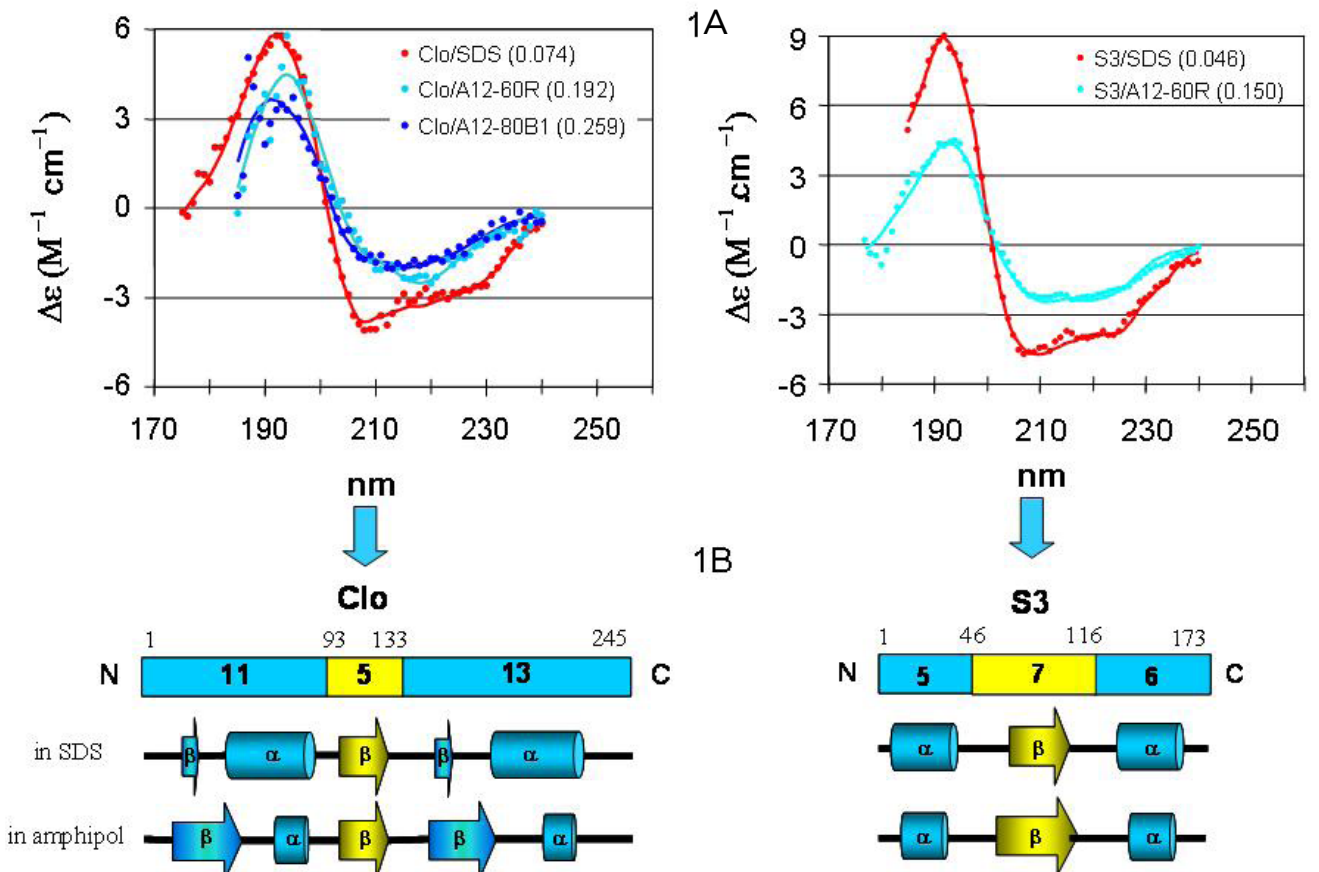


Figure 1 Spectres dichroïques et modèles des structures secondaires de deux protéines intégrales de l'oléosome, la caléosine et l'oléosine S3.

CONCLUSION

La partie centrale hydrophobe de ces protéines serait majoritairement en feuillets bêta. Les extrémités hydrophiles auraient quant à elles un contenu en structure secondaire changeant selon le tensioactif utilisé. Des résultats plus récents de SRCD ont également été obtenus sur des corps lipidiques de levure purifiés, contenant essentiellement l'oléosine S3 comme protéine intégrale. Ils indiquent la présence majoritaire de feuillets bêta dans cet environnement cellulaire plus proche de l'état physiologique.

Référence

1. Y. Gohon, J.-D. Vindigni, A. Pallier, F. Wien, H. Celia, A. Giuliani, C. Tribet, T. Chardot, P. Briozzo (2011) *BBA-Biomembranes*, 1808, 706-716.

Structure de la micelle de caséine : une nouvelle proposition

Chercheurs impliqués

A. Bouchoux¹, G. Gésan-Guizieu¹, J. Pérez², B. Cabane³

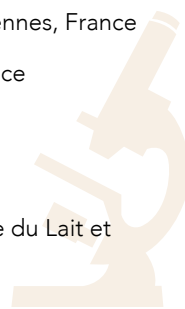
1. UMR 1253, INRA Agrocampus Ouest, Rennes, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. PMMH, ESPCI, Paris, France

Contact

Antoine Bouchoux, Science et Technologie du Lait et de l'œuf, Rennes
antoine.bouchoux@rennes.inra.fr



RÉSUMÉ

Nous avons suivi la déformation de la micelle de caséine, colloïde naturel bien connu, par diffusion de rayons X aux petits angles (ligne de lumière SWING) combinée à la technique de stress osmotique. Nous montrons ainsi que certaines parties de la micelle s'effondrent à la compression, tandis que d'autres y résistent. La micelle de caséine serait donc une sorte d'"éponge colloïdale" à la structure hiérarchique.

ABSTRACT

The deformation of a popular natural colloid - the milk casein micelle - was followed on the SWING beamline by combining the osmotic stress technique with small-angle X-ray scattering. The results indicate that some parts of the micelle collapse under compression, whereas other parts resist deformation. This suggests that the casein micelle is a spongelike material having a hierarchical structure.

À l'état natif, les protéines du lait sont majoritairement présentes sous forme de micelles de caséines, agrégats quasi-sphériques de ~100 nm de diamètre résultant de l'association de minéraux et des caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ (Fig. 1).

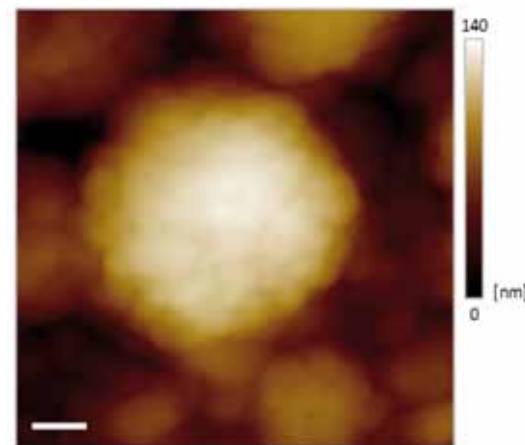


Figure 1 La micelle de caséine vue par microscopie à force atomique (AFM). La barre d'échelle fait 100 nm.

Cette "micelle" est sans doute l'objet colloïdal naturel que l'on rencontre le plus communément dans notre vie quotidienne. Cependant, elle suscite encore de nombreuses questions scientifiques tout à fait fondamentales. En particulier, la structure interne de la micelle de caséine, c.à.d. l'organisation des caséines et des minéraux en son sein, est une question qui subsiste et suscite encore des débats passionnés¹. Les techniques de diffusion aux petits angles sont des techniques de choix pour l'élucidation d'une telle structure, et voici une dizaine d'années que la micelle de caséine fait régulièrement l'objet d'études SAXS (diffusion de rayons X) et SANS (diffusion de neutrons). Cependant, les résultats obtenus ne concernent que la micelle dans son état natif et dilué, et peuvent être interprétés de diverses façons^{2,3}.

Un moyen d'apporter de nouvelles informations est de suivre, par ces mêmes techniques, les modifications structurales que subissent les micelles en réponse à une sollicitation physique et/ou chimique. C'est cette approche que nous avons adoptée dernièrement, en suivant par SAXS la réponse structurale de la micelle de caséine quand elle se déforme et se comprime sous l'effet d'un stress osmotique. La ligne SWING se prête particulièrement bien à ce type de manipulations, notamment en raison des plages de vecteur d'onde q explorées et des possibilités variées d'accommodation des échantillons (du liquide au gel).

Des dispersions modèles de micelles de caséines ont été concentrées par compression osmotique, technique s'appuyant sur l'équilibre osmotique entre une dispersion mère et un réservoir de pression osmotique connue⁴. Des échantillons de concentrations allant de 25 g/L (état liquide) à 400 g/L (état gel⁵) ont ainsi été préparés et disposés sur le trajet du faisceau de rayons X. Les spectres obtenus sont sur la Fig. 2, dans une représentation dite "de Kratky" qui permet de mettre en valeur les oscillations composant chaque courbe⁶. À chaque oscillation correspond une distance caractéristique $\sim 2\pi/q$ liée à un trait particulier de la micelle : contour de l'objet à petits q , distances internes à grands q .

Aux faibles concentrations ($C \leq 150$ g/L), les micelles sont encore éloignées les unes des autres et ne sont pas déformées. Comme attendu, le signal n'est alors que peu affecté par la concentration. À partir de $C > 150$ g/L, les micelles sont peu à peu forcées à entrer en contact. Elles se déforment et se compriment jusqu'à perdre la moitié de leur volume initial à $C = 400$ g/L.

La signature SAXS d'une telle déformation est alors tout à fait particulière puisque les positions des oscillations caractéristiques de distances internes de la micelle sont inchangées. Ce type

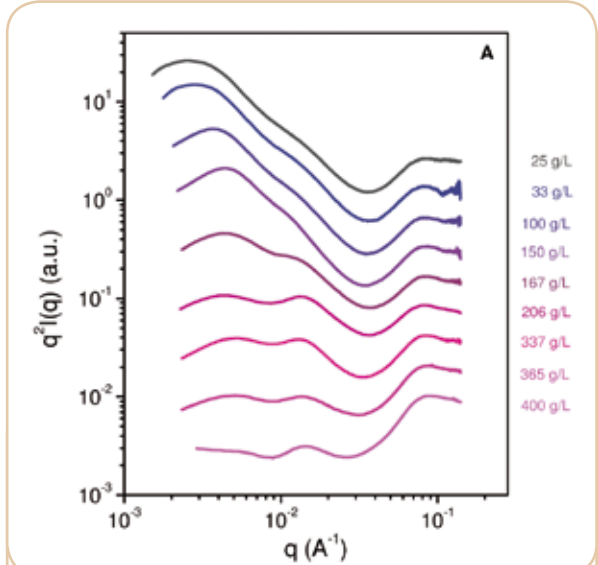


Figure 2 Spectres SAXS de la micelle à différentes concentrations en caséine. Ces spectres montrent trois "oscillations", ou distances caractéristiques, qui correspondent aux trois niveaux de structuration interne de la micelle de caséine.

de déformation non-affine suggère que la micelle de caséine est faite d'un matériau hétérogène lui-même constitué de régions denses, qui résistent à la compression, et de régions "molles" ou vides, qui se contractent voire s'effondrent quand la micelle est comprimée (= modèle éponge, voir Fig. 3).

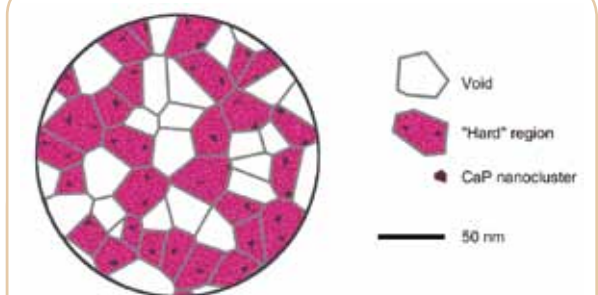


Figure 3 Proposition de structure interne en accord avec les résultats obtenus sur la ligne SWING. La micelle de caséine serait une "éponge" à trois niveaux de structure.

CONCLUSION

Cette proposition d'une micelle de caséine structurée en "éponge" contraste avec les modèles déjà développés et constitue une avancée importante du point de vue fondamental. À terme, et du point de vue applicatif, mieux connaître la structure interne de la micelle de caséine permettra d'avancer sur des nombreux points ayant trait à la manipulation et à l'utilisation de cet objet biologique dans différents domaines : maîtrise des procédés de transformation, encapsulation et libération contrôlée de composés ciblés, etc.

Références

1. D.G. Dalgleish (2011) *Soft Matter*, 7, 2265-2272.
2. C. Holt, C.G. de Kruif, R. Tuinier, P.A. Timmins (2003) *Colloids Surf. A*, 213-275.
3. A. Shukla, T. Narayanan, D. Zanchi (2010) *Soft Matter*, 5, 2884-2888.
4. A. Bouchoux, P.-E. Cayemite, J. Jardin, G. Gésan-Guizieu, B. Cabane (2009) *Biophys. J.*, 96, 693-706.
5. A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gésan-Guizieu, M.-H. Famelart, J.-L. Doublier, B. Cabane (2009) *J. Chem. Phys.*, 131, 165106.
6. A. Bouchoux, G. Gésan-Guizieu, J. Pérez, B. Cabane (2010) *Biophys. J.*, 99, 3754-3762.
7. M. Ouanezar, F. Guyomarc'h, A. Bouchoux (2012) *Langmuir*, 28, 4915-4919.

SAXS et synthèse enzymatique de polymères

détermination simultanée des conformations de transglucosidases et des polysaccharides produits

Chercheurs impliqués

P. Roblin^{1,2}, D. Guieysse³, J. Perez¹, F. Guerin³, M. Axelos⁴, A. Buleon⁴, G. Veronese³

1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
2. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France
3. UMR INSA/INRA/CNRS ISBP, Toulouse, France
4. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France

Contact

Gabrielle Veronese, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse
gabrielle.veronese@insa-toulouse.fr



RÉSUMÉ

La structure de deux amylosaccharases au cours de la synthèse d'amylose a été déterminée par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) sur la ligne de lumière SWING, simultanément avec les premiers stades d'enchevêtrement du polymère produit. La structure des enzymes en cours de synthèse correspond à leur structure cristallographique. Les chaînes d'amylose produites forment tout d'abord des zones de jonction en forme de doubles hélices isolées puis des empilements de 4 doubles hélices de structure identique à celle des zones cristallines de l'amidon.

ABSTRACT

The structure in solution of 2 amylosucrases was determined by SAXS on SWING beamline during amylose synthesis, together with the first stages of entanglement of the polymer produced. The enzyme structures during catalysis were found to be identical to the crystallographic structures. Amylose was shown to first entangle as single double helices, which then associate marked into arrays of 4 double helices that are very similar to the packing observed in crystalline starch.

Les amylosaccharases bactériennes sont de bons outils pour mimer *in vitro* la synthèse de l'amylose, l'un des deux constituants majeurs de l'amidon. Ces enzymes sont les seules capables de synthétiser ce polymère sans précurseur à partir du saccharose. L'amylosaccharase recombinante de *Neisseria polysacchara* (ASNP) a été très étudiée pour la synthèse d'amylose à 30 °C et la modification d'amylo-polysaccharides. La réaction démarre par l'hydrolyse du saccharose. Le glucose relargué est ensuite utilisé comme accepteur pour produire par transferts successifs des maltooligosaccharides et des chaînes d'amylose qui précipitent lorsque leur concentration et leur taille critique sont atteintes¹. L'amylosaccharase de *Deinococcus geothermalis* (ASDG) est une enzyme thermostable dont la température optimale est de 50 °C. Elle catalyse le même type de réaction qu'ASNP. Les structures cristallographiques des deux enzymes sont connues^{2,3} et, si les repliements sont très similaires, ASDG se distingue par une structure quaternaire homodimérique, probablement en rapport avec sa thermostabilité. Ce travail décrit les résultats obtenus par SAXS sur la conformation en solution de ces deux enzymes pendant la synthèse et les premiers stades d'enchevêtrement du polymère.

La Figure 1 montre la parfaite superposition des données de SAXS obtenues pour ASNP en absence et en présence de substrat. La conformation en solution de ASNP ne varie donc pas lorsque l'enzyme est en conditions de synthèse de polymère. Le même résultat a été obtenu avec ASDG. De plus, les courbes obtenues avec les deux enzymes sont en parfait accord avec les courbes de SAXS théoriques calculées à partir des structures cristallographiques.

Après soustraction des contributions de l'enzyme, du saccharose et des oligosaccharides produits, il est possible d'extraire les courbes SAXS du polymère à différents temps de synthèse (Figure 2). L'intensité du signal augmente régulièrement jusqu'à 8 h de synthèse. Le rapport des intensités du signal du polymère entre 2,7 h et 8 h est du même ordre de grandeur (103) que le rapport des concentrations massiques du polymère produit

aux mêmes temps de synthèse. Au-delà de 8 h les courbes changent de forme (Figure 2) et l'intensité aux plus petits angles augmente fortement avec l'aggrégation du polymère. Après 2,7 h de synthèse, les courbes de diffusion mesurées peuvent être modélisées à partir d'objets cylindriques de 1,03 nm de diamètre et 13 nm de long, qui correspondent à 6-7 tours de double hélice (Figure 3) semblable à celles qui constituent les structures cristallines dans l'amidon. De 2,7 à 8 h, le diamètre moyen des objets observés passe de 1,03 à 2,67 nm, tandis que la longueur reste constante. La structure la plus probable correspond alors à un empilement de quatre double hélices (Figure 3). Le modèle structural permettant le meilleur ajustement de la courbe de diffusion implique un décalage d'un demi-pas entre deux doubles hélices voisines,

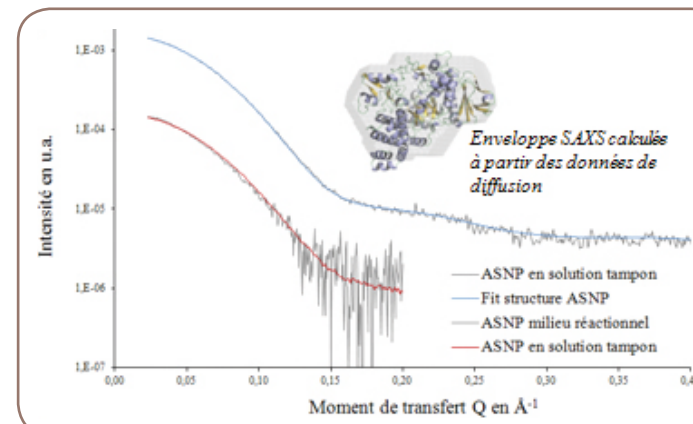


Figure 1 Superposition des courbes SAXS expérimentales de ASNP en solution seule, en présence de son substrat, et calculée à partir de la structure cristallographique.

CONCLUSION

Ces résultats montrent que la structure des deux amylosaccharases ASNP et ASDG en conditions de synthèse d'amylose est identique à leur structure cristallographique. Cette analyse par SAXS de la conformation d'enzymes en activité est unique. En effet, la conformation en solution d'enzymes est généralement étudiée à partir de mutants inactifs, ou en présence d'analogues de substrats pour lesquelles elles sont inactives. Par ailleurs, cette étude a permis de montrer que les premiers stades d'enchevêtrement de l'amylose en cours de synthèse correspondent à des éléments de structure présents dans les zones cristallines de l'amidon. L'analyse simultanée de la conformation d'enzymes et des polymères en cours de synthèse ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de biosynthèse des polymères.

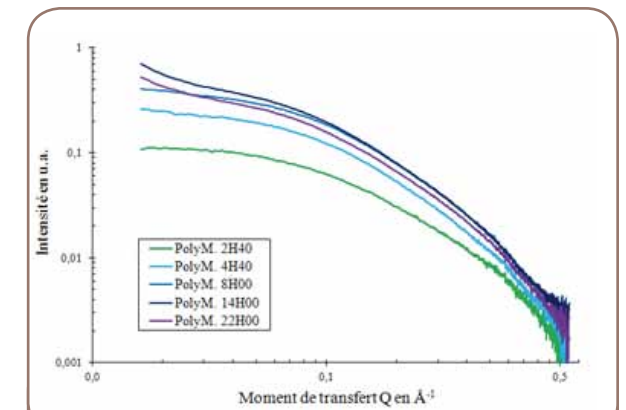


Figure 2 Analyse de la cinétique de polymérisation de l'amylose par ASNP.

comme observé dans les structures cristallines d'amidon⁴. Au-delà de 8 h, l'intensité diffusée aux petits angles augmente de manière importante traduisant une aggrégation des empilements d'hélices. La diminution d'intensité observée à 22 h correspond à la précipitation du polymère. Dans le cas de ASDG, la cinétique de polymérisation est plus lente et, pour une concentration finale d'amylose produite identique, la taille moyenne des objets est beaucoup plus petite et l'amylose ne s'auto-associe pas sous la forme de structures spécifiques. Ces résultats sont probablement liés à la haute température de synthèse utilisée, à laquelle l'amylose est beaucoup plus soluble qu'à 30 °C. Dans ces conditions, le polymère produit correspondrait à un mélange de pelotes statistiques, de cylindres mal structurés et de particules de type "worm like".

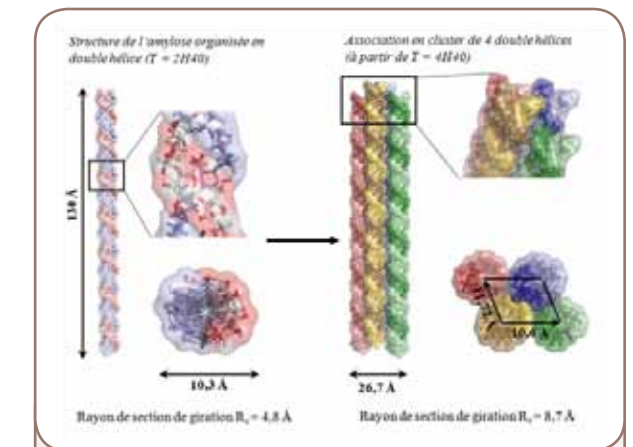


Figure 3 Modèle d'empilement de doubles hélices utilisé pour ajuster les courbes SAXS de l'amylose en cours de synthèse.

Références

1. G. Potocki-Veronese, J.-L. Putaux, D. Dupeyre, C. Albenne, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, A. Buléon (2005) *Biomacromolecules*, 6, 1000-1001.
2. L. K. Skov, O. Mirza, A. Henriksen, G. P. De Montalk, M. Remaud-Simeon, P. Sarcabal, R. M. Willemot, P. Monsan, M. Gajhede (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 25273-25278.
3. F. Guérin, S. Barbe, S. Pizzut-Serin, G. Potocki-Veronese, D. Guieysse, V. Guillet, J. Perez, P. Monsan, L. Mourey, M. Remaud-Simeon, I. André, S. Tranier (2012) *J. Biol. Chem.* In press.
4. A. Buléon, G. Veronese, J.-L. Putaux (2007) *Australian J. Chem.*, 60, 706-718.

Oxydation des tanins en solution et diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

Chercheurs impliqués

C. Poncet-Legrand¹, A. Vernhet¹, B. Cabane², J. Pérez³

1. UMR 1083 SPO, INRA-Montpellier SupAgro-UM1, Montpellier, France

2. UMR 7636 PMMH, CNRS-ESPCI-UPMC, Paris, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Céline Poncet-Legrand, Sciences Pour l'Oenologie Montpellier
poncetc@supagro.inra.fr

Les flavonoïdes (anthocyanes et tanins condensés) sont les composés phénoliques majoritaires de nombreux produits alimentaires élaborés à base de végétaux. Ils jouent un rôle déterminant dans la qualité organoleptique de ces produits (couleur, goût...), ainsi que dans leurs propriétés nutritionnelles et les effets santé attribués à leur consommation. Leurs propriétés sont liées à leur réactivité chimique (nucléophilie, oxydabilité) et/ou à leur tendance à interagir entre eux ou avec d'autres (bio) polymères. Pour un système donné, ces interactions physico-chimiques dépendent des caractéristiques structurales des flavonoïdes. Or ces derniers, et notamment les tanins condensés (oligomères et des polymères de flavanols, Figure 1), présentent dès l'origine une grande diversité structurale. Du fait de leur réactivité, cette diversité s'accroît après extraction et au long des itinéraires technologiques suivis pour l'élaboration des produits.

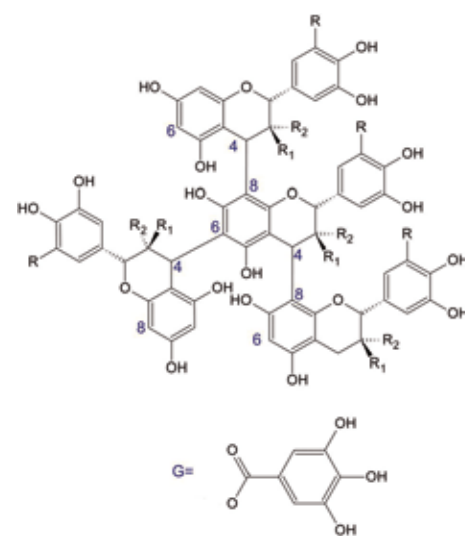


Figure 1 Structure des tanins condensés, constitués dans le cas du raisin d'unités catéchine ($R=H$, $R_1=H$, $R_2=OH$), épicatechine ($R=H$, $R_1=OH$, $R_2=H$), épicatechine gallate ($R=H$, $R_1=G$, $R_2=H$) ou épigallocatechine ($R=OH$, $R_1=OH$, $R_2=H$). Ces unités sont reliées entre elles par les carbones C4-C8 (majoritaire) ou C4-C6.

Les réactions d'oxydation qu'ils subissent peuvent entraîner des changements structuraux importants (Figure 2). Elles sont à l'origine de nouvelles liaisons, qui peuvent se former soit au sein d'une même macromolécule (réaction intramoléculaire ne modifiant pas le degré de polymérisation, DP) soit entre deux macromolécules (réaction intermoléculaire entraînant une augmentation du DP). Ces changements structuraux modifient probablement les propriétés physico-chimiques des tanins (solubilité, capacité à interagir avec d'autres macromolécules). Ils doivent être caractérisés pour identifier les relations existant entre la structure des tanins (natifs et dérivés) et les propriétés qui leur sont attribuées.

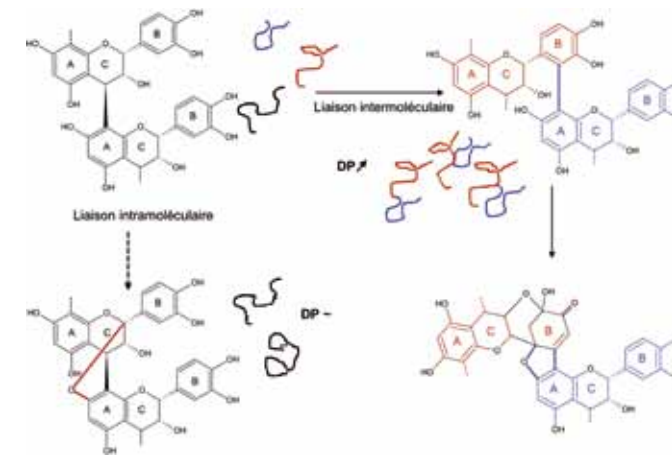


Figure 2 Exemples de structures chimiques de tanins après oxydation. La formation de nouvelles liaisons peut se faire sur la même macromolécule (phénomène intramoléculaire, le DP ne varie pas), ou entre deux macromolécules (intermoléculaire, le DP augmente).

Figure 3 Courbes de SAXS de deux fractions de tanins natifs (DP : 9 et 40). Après une semaine d'oxydation, le DP moyen est multiplié par 1,4 pour la première fraction. Il est multiplié par 3 après 2 semaines pour la seconde fraction. Les courbes de diffusion nous permettent également de déterminer l'évolution des conformations en solution des tanins : polymères linéaires semi-flexibles pour les tanins natifs, polymères en étoile à un peu moins de trois branches pour les polymères oxydés (dans le cas ici du DP 40).

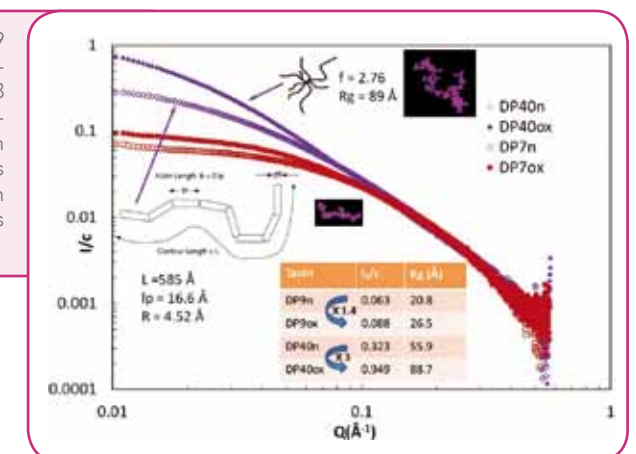
CONCLUSION

Ces premiers résultats montrent l'intérêt du SAXS pour l'étude de la conformation de tanins natifs et oxydés. À terme, nous envisageons une étude plus systématique de l'influence de la matrice alimentaire (pH, force ionique), de la composition chimique initiale des tanins, de l'avancement de la réaction d'oxydation et de la température sur la formation des produits d'oxydation finaux.

Cette caractérisation est un défi dans le cas des tanins. Les méthodes usuelles d'analyse des polyphénols monomères et oligomères (HPLC, RMN, spectrométrie de masse) s'appliquent difficilement aux polymères de plus haut DP. Ces derniers sont habituellement analysés après réaction de dépolymérisation, les techniques classiques d'analyse des polymères (SEC/MALLS par exemple) étant mal adaptées : les tanins s'adsorbent sur les supports de chromatographie et/ou sont trop petits pour être étudiés par diffusion de lumière. Avec les tanins natifs, ces réactions de dépolymérisation donnent accès au DP moyen en nombre et à la nature des unités constitutives. Ces réactions sont incomplètes dans le cas des structures dérivées et cette information n'est plus accessible. Le SAXS, qui donne accès au DP moyen des objets, s'est avéré un outil précieux pour identifier l'impact de réactions d'autoxydation sur l'évolution du DP des tanins. Cette technique donne en outre des informations sur l'évolution de leur conformation après oxydation.

Les travaux réalisés au synchrotron SOLEIL (ligne de lumière SWING) nous ont notamment permis de montrer que :

- (i) si l'oxydation a lieu en milieu concentré, le DP moyen des tanins augmente ;
- (ii) selon le DP initial des tanins, les structures linéaires peuvent se brancher (Figure 3') ;
- (iii) il est possible de favoriser les réactions intramoléculaires en travaillant par exemple en milieu très dilué² ;
- (iv) les tanins solubles dans l'eau et les tanins insolubles ont des masses et des conformations différentes.



Références

1. C. Poncet-Legrand, B. Cabane, A.-B. Bautista-Ortin, S. Carrillo, H. Fulcrand, J. Pérez, A. Vernhet (2010), *Biomacromolecules*, 11, 2376-2386
2. A. Vernhet, S. Dubascoux, B. Cabane, H. Fulcrand, E. Dubreucq, C. Poncet-Legrand (2011), *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 1559-1569

Structures cristallines formées par les triglycérides du lait

identification par diffraction des rayons X en utilisant le rayonnement synchrotron

Chercheurs impliqués

C. Lopez¹, C. Bourgaux², J. Perez³

1. UMR 1253 INRA Agrocampus Ouest, Rennes, France

2. UMR 8612 CNRS Université Paris XI, Châtenay-Malabry, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Christelle Lopez, Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, Rennes
christelle.lopez@rennes.inra.fr

RÉSUMÉ

Les propriétés de cristallisation des triglycérides du lait ont été étudiées en fonction de leur composition en acides gras et de leur dispersion dans des gouttelettes d'émulsion de différentes tailles. Les expérimentations ont été réalisées avec le couplage de la microcalorimétrie différentielle et de la diffraction des rayons X en utilisant le rayonnement synchrotron sur la ligne de lumière SWING de SOLEIL.

ABSTRACT

The crystallization properties of milk triglycerides have been studied as a function of their fatty acid composition and dispersion in emulsion droplets of various sizes. The experiments have been conducted using the coupling of differential scanning calorimetry and time-resolved synchrotron X-ray diffraction on the SWING beamline of SOLEIL.

Le lait et les produits laitiers sont importants en nutrition humaine. Cependant, la matière grasse laitière est majoritairement composée de triglycérides (98 % des lipides laitiers) contenant environ 70 % d'acides gras saturés supposés être impliqués dans les maladies cardio-vasculaires. Pour suivre les recommandations nutritionnelles et les besoins des consommateurs, la matière grasse laitière pourrait être enrichie en acides gras insaturés (AGI) en modifiant l'alimentation des animaux. Les propriétés rhéologiques et fonctionnelles de la matière grasse laitière dépendent de sa composition en acides gras et de son organisation dans les produits laitiers. Un enrichissement en AGI pourrait altérer les propriétés physiques de la matière grasse laitière, particulièrement ses propriétés de cristallisation, et avoir des conséquences sur la texture des produits laitiers.

Les objectifs du projet étaient :

- de caractériser les structures cristallines formées par une matière grasse enrichie en AGI et de les comparer à une matière grasse laitière de composition classique en acides gras,
- de déterminer l'effet de la taille des gouttelettes d'émulsion sur les propriétés de cristallisation des triglycérides du lait.

Une matière grasse enrichie en AGI (50,7 % des acides gras totaux) et une matière grasse de composition classique en acides gras (AGI = 29,3 %) ont été utilisées pour fabriquer des émulsions avec trois tailles de gouttelettes différentes. Les six émulsions ont été stockées pendant au moins 48 heures à 4°C pour simuler le stockage des produits laitiers au réfrigérateur. Les structures cristallines formées par les triglycérides ont été identifiées à 4°C puis en fonction de la température au cours d'un chauffage à 2°C/min jusqu'à 60°C. Les expérimentations ont été réalisées en utilisant le couplage de la microcalorimétrie différentielle (MCD)¹ et de la diffraction des rayons X (DRX) sur la ligne SWING du Synchrotron SOLEIL (Figure 1).

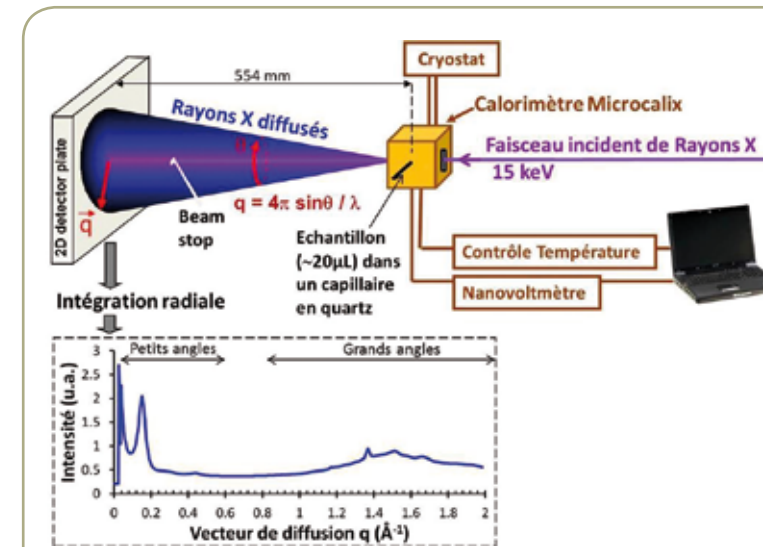


Figure 1

Schéma du montage expérimental réalisé sur la ligne SWING du Synchrotron SOLEIL : couplage de la diffraction des rayons X aux petits et aux grands angles et de la microcalorimétrie différentielle (calorimètre Microcalix ; Ollivon et al., 2006).

Nous avons montré³ :

- que la phase solide formée par les triglycérides du lait correspond à la coexistence de plusieurs structures cristallines, qui ont été caractérisées (Figure 2) ;
- que l'enrichissement en AGI de la matière grasse laitière modifie son comportement de cristallisation : absence de structure 3L dans la matière grasse enrichie en AGI ; forme polymorphique β majoritaire (Figure 2) ;
- que la taille des gouttelettes d'émulsion affecte les structures cristallines formées par les triglycérides.

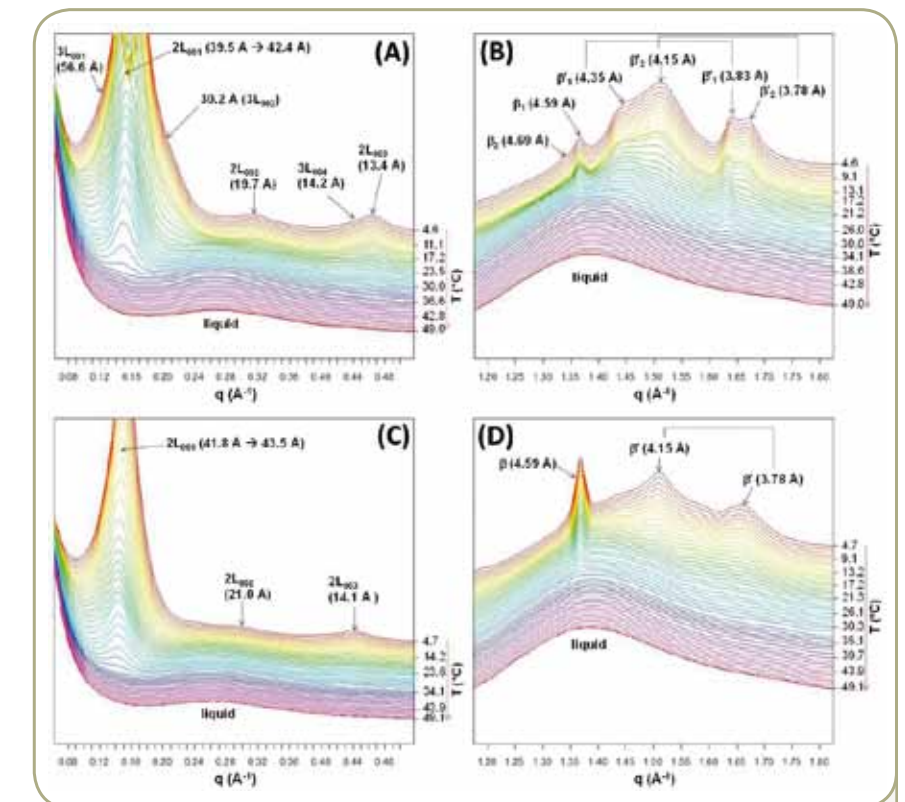


Figure 2

Diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés aux petits angles (A, C) et aux grands angles (B, D) en fonction de la température au cours d'un chauffage à 2°C/min des triglycérides de composition classique (A, B) et des triglycérides enrichis en acides gras insaturés (C, D), dispersés dans des gouttelettes d'émulsion de 180 nm. Les différentes structures cristallines identifiées sont indiquées sur la figure.

CONCLUSION

La DRX utilisant le rayonnement synchrotron sur SWING a permis d'identifier les structures cristallines formées par les triglycérides du lait dans des gouttelettes d'émulsion de taille nanométrique, avec un faible taux de matière cristallisée lié à l'enrichissement en AGI. Le couplage avec la MCD a permis de relier les propriétés structurales des triglycérides à leurs propriétés thermiques enregistrées simultanément. Ces travaux sont importants pour la recherche académique, particulièrement la biophysique des lipides appliquée à la cristallisation des triglycérides, et pour la recherche finalisée de par leurs applications dans l'industrie laitière.

Références

- M. Ollivon, G. Keller, C. Bourgaux, D. Kalin, P. Villeneuve, P. Lesieur (2006), *J. Therm. Anal. Cal.*, 85, 219-224.
- C. Lopez, C. Bourgaux, P. Lesieur, M. Ollivon (2007), *Lait*, 87, 459-480.
- S. Bugeat, V. Briard-Bion, J. Pérez, P. Pradel, B. Martin, S. Lesieur, C. Bourgaux, M. Ollivon, C. Lopez (2011), *Food Res. Int.*, 44, 1314-1330.

Agrégation entre tanins condensés

et le polysaccharide hyaluronane

Chercheurs impliqués

F. Carn¹, S. Guyot², A. Baron², J. Perez³, E. Buhler¹ et D. Zanchi⁴

1. UMR 7057, CNRS Université Paris Diderot-Paris 7, Paris, France

2. UR 117 URC-BFL, INRA, Le Rheu, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

4. UMR CNRS-ENS-UPMC, Paris, France

Contact

Drazen Zanchi, Chimie Biophysique ENS Paris, France et Sylvain Guyot, INRA Unité de Recherches Cidricoles Le Rheu, France
zanchi@ens.fr
sylvain.guyot@rennes.inra.fr

RÉSUMÉ

Les interactions entre tanins condensés et un polysaccharide de type hyaluronane (HA) ont été étudiées par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, ligne de lumière SWING). Des complexes stables et de tailles finies sont formés en suspension colloïdale. Dans ce travail, nous montrons comment la taille et la densité de ces agrégats dépend du degré de polymérisation des tanins.

ABSTRACT

Interactions of condensed tannins with a hyaluronan polysaccharide (HA) were studied by small angle X-ray scattering (SAXS, SWING beamline). Stable complexes were formed in colloidal suspension. In this work we show how the size and density of the aggregates depend on the degree of polymerization of tannins.

Vis-à-vis des plantes, les tanins ont un rôle protecteur contre les agents microbiens et les insectes. Cela est notamment en relation avec leur capacité à se complexer avec les biopolymères tels que les protéines et polysaccharides¹. En nutrition, les polyphénols, et parmi eux les tanins, ont également un rôle important. Ainsi, le métabolisme lipidique et la fermentation colique sont différemment affectés selon que le régime alimentaire contient des tanins seuls ou en mélange avec des polysaccharides². En technologie des boissons à base de fruit (jus, cidres, vins) par des mécanismes impliquant protéines et polysaccharides, les tanins affectent l'amertume, l'astringence et la stabilité colloïdale³. En outre, les tanins sont sélectivement partitionnés au cours du procédé du fait de leur capacité à s'associer aux polysaccharides pariétaux des fruits⁴.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la formation de complexes tanin-polysaccharide, nous avons utilisé la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et la diffusion de la lumière pour explorer les aspects structuraux de cette association en considérant comme solutions modèles une série de tanins condensés oligomères et polymères (procyanidines) de degrés de polymérisation (DP) variables et un hyaluronane HA (Soliance, 50 kDa), polysaccharide bien connu et largement présent dans les tissus épithéliaux humain et animaux⁵. (Figure 1)

Nous avons étudié HA (à 3 g/L) en mélange avec le tanin de DP2 (petit tanin) à des concentrations variant de 0,25 à 5 g/L (Figure 2). À toutes les concentrations, le rayon de giration est de 20 nm soit deux fois plus que celui du polysaccharide seul, ce qui témoigne de l'existence de complexes tanins-polysaccharides contenant quelques ($N < 5$) macromolécules de HA.

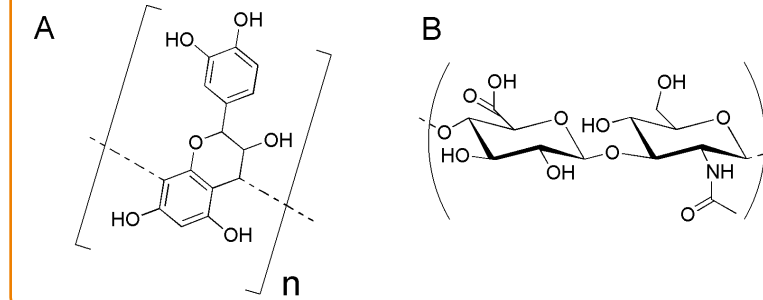


Figure 1 Structure simplifiée d'un tanin condensé (A) et d'un hyaluronane (B).

Concernant l'effet du DP (2, 4, 10 ou 35), l'intensité aux petits vecteurs d'onde (Figure 3) augmente de façon monotone avec le DP ce qui correspond à une augmentation de l'agrégation, suggérant que les tanins plus longs pourraient établir plus facilement des pontages entre molécules de polysaccharide.

CONCLUSION

Ce travail a permis de mieux comprendre le mécanisme de formation de complexes colloïdaux stables entre tanins et polysaccharides. Ceux-ci peuvent être divisés en deux populations : (i) les oligo-agrégats ($N < 5$) et (ii) de plus grands objets buissonneux dont la taille est très supérieure à la taille d'une molécule de HA.

La taille et la structure des agrégats sont notamment déterminées par la taille des tanins et ces agrégats sont formés même à des teneurs faibles en tanins (moins de 0,016 g de tanins par gramme de polysaccharides). Au sein des agrégats, les deux espèces gardent leur conformation native. De ce fait, les complexes ont une très faible compacité puisque la densité du microgel tanin-polysaccharides est jusqu'à sept fois plus faible que celle du polysaccharide seul.

Nos résultats pour le système tanin-HA sont à mettre en relation, par exemple, avec une meilleure compréhension du rôle des agrégats colloïdaux entre tanins et polysaccharides dans la stabilisation des boissons à base de fruits et la réduction de l'astringence. Ils pourraient également interférer sur la biodisponibilité des polyphénols dans l'alimentation. L'étude d'autres types de polysaccharides et l'impact de l'oxydation des tanins sur l'agrégation sont dans les perspectives de ce travail.

Enfin, nous avons fait varier la concentration des tanins de DP moyen 35 en présence du polysaccharide à 3 g/L (données non montrées). L'intensité de diffusion extrapolée à vecteur d'onde nul augmente d'un facteur 20 comparée à celle du polysaccharide, indiquant que les polysaccharides sont agrégés en amas contenant jusqu'à une vingtaine de chaînes HA. Par l'analyse des spectres nous trouvons que la taille de ces agrégats est au moins d'une centaine de nanomètres et que leur dimension fractale est autour de 2,4. Ces résultats, en accord avec des expériences d'ultracentrifugation, permettent de conclure que les longs tanins forment avec HA des agrégats de très basse densité de type microgel.

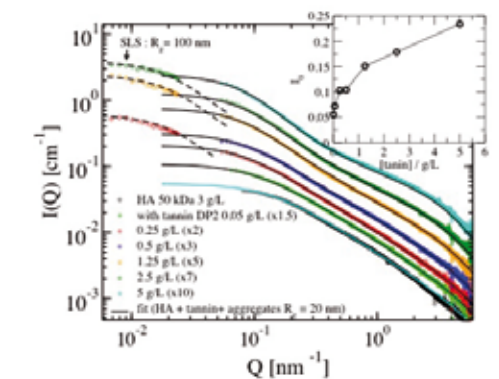


Figure 2 Profils SAXS du HA (50 kDa) en présence du tanin de DP2 à différentes concentrations.

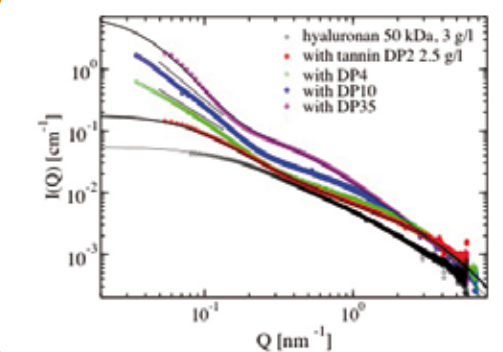


Figure 3 Effet du degré de polymérisation des tanins sur les profils SAXS du système tanin-polysaccharide.

Références

- Scalbert, A. (1991) *Phytochemistry*, 30, 3875-3883
- O. Aprikian, V. Duclos, S. Guyot, C. Besson, C. Manach, A. Bernalier, C. Morand, C. Rémésy, C. Demigné (2003) *J. Nutr.* 133, 1860-1865.
- C. Poncet-Legrand, T. Doco, P. Williams, A. Vernhet (2007) *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 87-91.
- C. Le Bourvellec, J.-M. Le Quere, C. M. G. C. Renard (2007) *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7896-7904.
- C. Esquenet, E. Buhler (2002) *Macromolecules*. 35, 3708-3716.
- D. Zanchi, P.V. Konarev, C. Tribet, A. Baron, D.I. Svergun, S. Guyot (2009) *J. Chem. Phys.* 130, 245103.

Caractérisation des couches de protéines accumulées

lors des opérations de filtration et diffusion de rayons X

Chercheurs impliqués

G. Gesan-Guiziou¹, F. Pignon², C. David², A. Bouchoux¹, J. Pérez³

1. UMR 1253 STLO, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France

2. UMR 5520 Laboratoire de Rhéologie, UJF Grenoble INPG CNRS, Grenoble, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Geneviève Gesan-Guiziou, Science et Technologie du Lait et de l'œuf, Rennes
genevieve.gesan-guiziou@rennes.inra.fr

RÉSUMÉ

L'établissement de couches concentrées de protéines à la surface des membranes en cours de filtration a été suivi par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) sur la ligne de lumière SWING. Cela a permis d'une part d'accéder aux profils de concentration et à leur réversibilité au cours du temps avec une résolution de 50 μm , et d'autre part de suivre les modifications structurales des protéines dans ces couches.

ABSTRACT

The formation of concentrated layers of proteins at the membrane surface during filtration was followed using small angle X-ray scattering on the SWING beamline. It allowed to follow both the concentration profiles (and their reversibility) in the course of time with a resolution of 50 μm and the structural modifications of the proteins in the concentrated layers.

Les opérations de filtration sont des outils incontournables en particulier en industrie laitière. Elles sont utilisées aussi bien au sein de la chaîne de production (épuration, concentration, fractionnement) que pour le traitement des fluides techniques et des effluents. Aujourd'hui encore, les mécanismes impliqués dans la structuration des couches déposées inéluctablement à la surface des membranes restent mal connus, ce qui conduit à l'impossibilité de prédire les performances d'une opération de filtration. Cet état de fait est essentiellement attribué à l'absence de techniques d'observations non-invasives des phénomènes à l'interface membranaire. Une analyse locale *in situ* des couches concentrées de micelles de caséines (principale protéine du lait, majoritairement déposée à la surface des membranes¹) a été réalisée, grâce à l'utilisation de microcellules de filtration adaptables sur la ligne de lumière², par diffusion de rayons X aux petits angles, qui permet de sonder des échelles de longueurs de quelques nanomètres aux échelles micrométriques. Cette analyse locale *in situ* a ainsi pu être confrontée à l'analyse des performances de la filtration au cours du temps et aux caractérisations *ex situ* des micelles en milieu concentré.

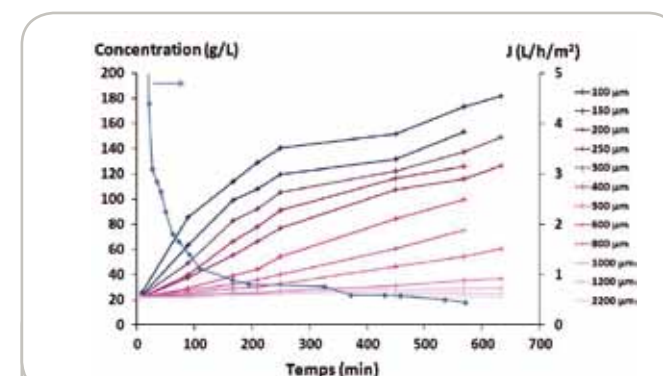


Figure 1 Profil de concentration au cours de la filtration frontale de micelles de caséine (1.2 10⁵ Pa ; 23°C).

Au cours de la filtration, la forte décroissance du flux est associée à une augmentation de la concentration en micelles à la surface de la membrane (Figure 1). L'analyse de ce profil et des courbes de diffusion permet de définir trois régimes.

Pour des concentrations $C < 116$ g/L, les micelles se comportent comme des sphères dures. Le changement de l'intensité $I(q)$ des micelles avec la concentration est notable aux faibles vecteurs de diffusion, q , avec un épaulement qui se déplace vers les courtes distances, traduisant un rapprochement entre micelles (Figure 2). La structure interne de la micelle n'est alors pas modifiée et les interactions répulsives entre micelles augmentent, conduisant à une augmentation du coefficient de diffusion collective des micelles. L'augmentation forte puis moins rapide de la concentration à la surface de la membrane (Figure 1) est la conséquence de cette

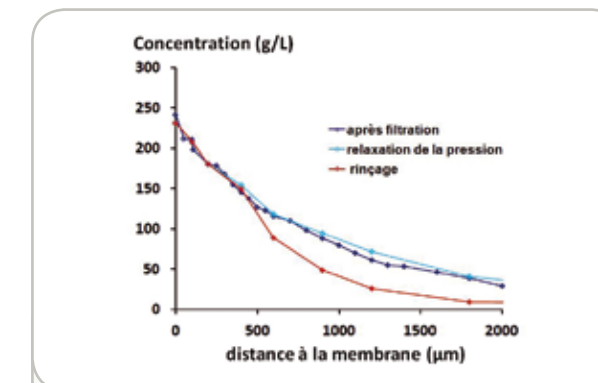


Figure 3 Profils de concentration des micelles après filtration (187 h), relaxation (arrêt de pression) et rinçage au solvant.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent les potentialités de la ligne SWING dans l'analyse locale *in situ* de couches concentrées à la surface de membrane de filtration. Grâce à la diffusion de rayons X et au développement de cellules de filtration adaptées, il est en effet possible d'accéder aux évolutions temporelles et spatiales (50 μm) de la structure des micelles concentrées près de la membrane. Cette analyse, combinée à la caractérisation *ex situ* des entités concentrées, apporte des informations essentielles sur la compréhension des mécanismes mis en jeu en filtration. Elle sera utilisée en particulier pour comprendre le rôle des modifications physico-chimiques sur la structure des couches et les performances de filtration. Ces développements constituent une base indispensable au développement de théories et modèles mécanistiques de transfert de matière en filtration, et à la proposition d'outils d'aide à la conduite des installations industrielles.

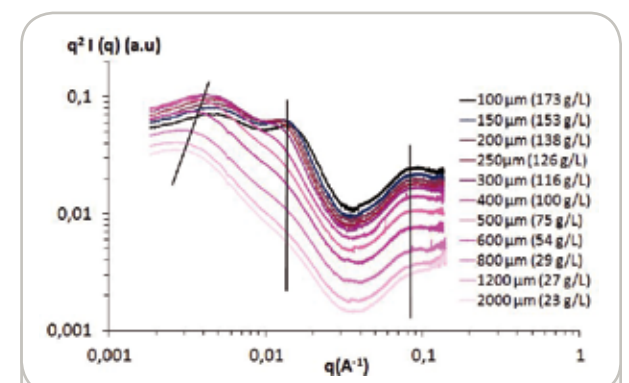


Figure 2 Spectres SAXS de la micelle à différentes distances de la membrane et concentrations. Cette représentation dite de "Kratky" permet de faire ressortir les distances caractéristiques. Les spectres montrent trois distances caractéristiques qui correspondent à la structure globale de la micelle et à deux niveaux de structure interne (zones denses, nanoclusters)⁵.

augmentation des interactions entre micelles en milieu de plus en plus contraint. Dans cette plage de concentration, les couches accumulées sont réversibles (Figure 3), en accord avec les études *ex-situ* réalisées sur les micelles en milieu concentré^{3,4}.

Pour des concentrations ≥ 116 g/L les micelles sont au contact les unes avec les autres. Une oscillation intermédiaire s'amplifie alors que sa position ne change pas, indiquant que la micelle est un matériau hétérogène qui se déforme : des zones denses résistent à la compression, alors que des zones "molles" ou vides se contractent⁵ (Figure 2).

Enfin, à partir de 140 g/L les micelles se déforment de plus en plus et forment un gel irréversible (Figure 3).

Cette étude permet, pour la première fois, de déterminer d'une part le profil de concentration d'une espèce à une distance de 100 μm de la membrane avec une résolution de 50 μm , et d'autre part de déterminer en cours de filtration les concentrations de transition liquide/gel.

Références

1. A.J.E. Jimenez-Lopez, N. Leconte, O. Dehainault, C. Geneste, L. Fromont, G. Gesan-Guiziou (2008) *Sep. Purif. Technol.*, 61, 33-43.
2. C. David, F. Pignon, T. Narayanan, M. Sztucki, G. Gesan-Guiziou, A. Magnin (2008) *Langmuir*, 24, 4523-4529.
3. A. Bouchoux, P.E. Cayemite, J. Jardin, G. Gesan-Guiziou, B. Cabane (2009) *Biophysical J.*, 96, 693-706.
4. A. Bouchoux, B. Debbou, G. Gesan-Guiziou, M.H. Famelart, J.L. Doublier, B. Cabane (2009) *J. Chem. Phys.*, 131, 165106-1 - 165106-11.
5. A. Bouchoux, G. Gesan-Guiziou, J. Pérez, B. Cabane (2010) *Biophysical J.*, 99, 3754-3762.

Étude de la dénaturation thermique des composants musculaires

par microspectroscopie infrarouge

Chercheurs impliqués

T. Astruc¹, F. Peyrin¹, A. Vénien¹, R. Labas¹, M. Abrantes, P. Dumas², F. Jamme^{2,3}

1. UR 370 QuaPA, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France

2. ligne SMIS, Synchrotron SOLEIL, Gif sur Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Thierry Astruc, Qualité des Produits Animaux, Theix
thierry.astruc@clermont.inra.fr



RÉSUMÉ

La dénaturation thermique *in situ* de composants musculaires a été suivie par microspectroscopie FT-IR sur la ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL. Cette méthode nous a permis de caractériser l'évolution de la structure secondaire des protéines de la matrice extracellulaire et des protéines myofibrillaires de cellules musculaires identifiées sur leur type.

ABSTRACT

The *in situ* thermal denaturation of muscle components was followed by FT-IR microspectroscopy on the SMIS beamline of the SOLEIL synchrotron. This method allowed us to characterize the evolution of the secondary structure of the proteins of the extracellular matrix and of muscle cells myofibrillar proteins identified on their type.

La viande est le résultat de la transformation du muscle après l'abattage des animaux de boucherie. Or, le muscle est essentiellement composé de fibres musculaires de différents types (I ; IIa ; IIx et/ou IIb et leurs hybrides), basés sur leur vitesse de contraction et sur la nature de leur métabolisme énergétique, et dans une moindre mesure de tissu conjonctif. Ce tissu conjonctif se présente sous forme d'enveloppes à différents niveaux d'échelles. L'épimysium, le périmysium et l'endomysium enveloppent respectivement le muscle, les faisceaux de fibres musculaires et les fibres musculaires. Il est essentiellement composé de collagène (90 %), d'élastine, de protéoglycanes et d'autres molécules de la matrice extracellulaire.

La viande est généralement consommée après cuisson. Or ce procédé modifie sensiblement la texture et le pouvoir de rétention d'eau des viandes avec une importante variabilité dépendant à la fois des caractéristiques du muscle (composition, structure) et des procédés de cuisson (couple temps/température). Le tissu conjonctif est considéré comme responsable de la dureté des viandes car il est très résistant et peu sensible aux attaques des enzymes protéolytiques. Le collagène qui le compose a la particularité de se contracter au chauffage et est soupçonné "d'essorer" les fibres musculaires de leur contenu aqueux favorisant les pertes de jus à la cuisson. Les fibres musculaires se contractent au chauffage ce qui, d'une part, augmente leur résistance mécanique et, d'autre part, expulse l'eau dans les espaces extracellulaires qui est ensuite évacuée dans les jus de cuisson.

De nombreuses études ont été conduites pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes et mieux maîtriser les qualités sensorielles et technologiques des produits carnés^{1,2}. Des analyses biochimiques sur des extraits de protéines musculaires ont montré une dénaturation dépendante du type cellulaire. Cependant, l'environnement avait été profondément modifié par les techniques d'extraction. La microspectroscopie FT-IR

qui permet de caractériser la structure secondaire des protéines *in situ* est une méthode adaptée à nos objectifs scientifiques³. De plus, le très bon rapport signal/bruit du rayonnement synchrotron et la haute résolution spatiale permise par l'ouverture de (10 x 10) μm^2 du faisceau infrarouge de la ligne SMIS nous permettent de réaliser ces mesures à l'échelle subcellulaire. L'évolution des spectres ainsi obtenus reflète la dénaturation des protéines en fonction de la température.

Le couplage de colorations histologiques garantit l'identification des composés étudiés en FT-IR. Le collagène, la laminine, l'élastine et les différents types de fibres musculaires ont été identifiés par immunohistofluorescence (Figure 1). Les acquisitions en microspectroscopie ont été réalisées rigoureusement sur les mêmes composants et les mêmes cellules de coupes sérieées chauffées de 20 à 80 °C.

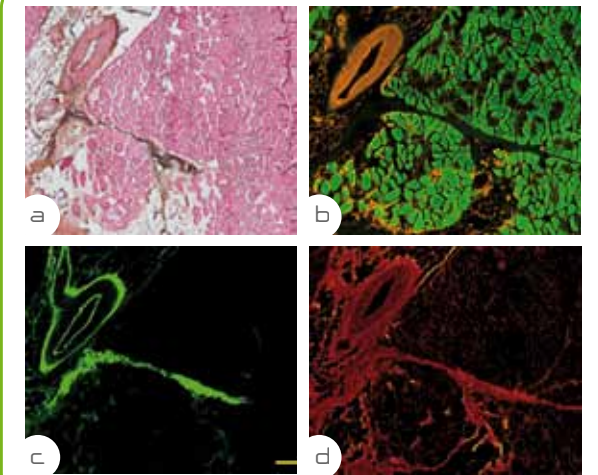


Figure 1 Identification des composants et types de fibres musculaires en microscopie à fond clair après coloration HES a) et en épifluorescence après immunomarquage b) des fibres de type II en vert et de la laminine en orange ; c) de l'élastine ; d) du collagène.

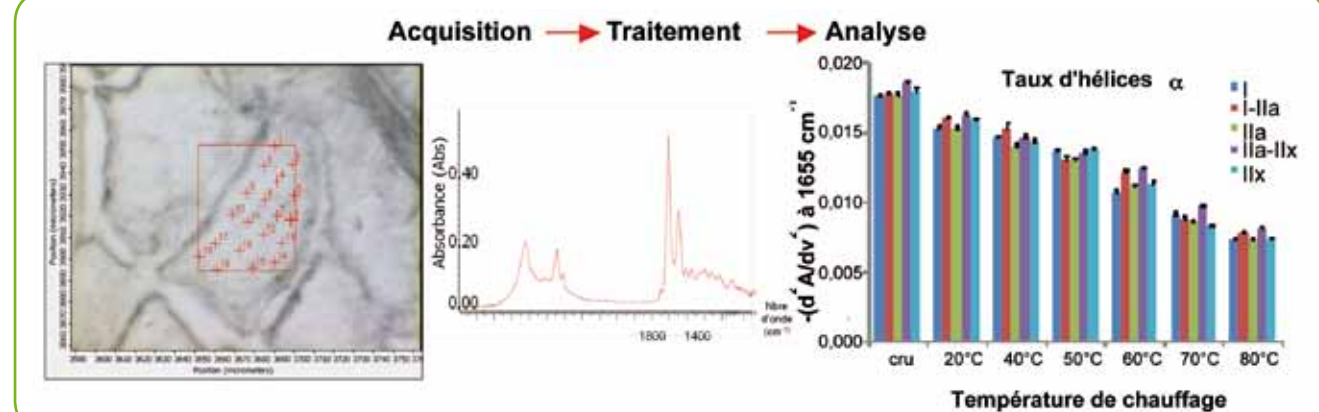


Figure 2 Impact du chauffage sur la dénaturation des protéines myofibrillaires en fonction des différents types de fibre (I, I-IIa, IIa, IIa-IIx, IIx).

CONCLUSION

La microspectroscopie FT-IR couplée au rayonnement synchrotron est parfaitement adaptée à l'étude des protéines musculaires qui sont parfois situées dans des zones restreintes comme les espaces extracellulaires ou entre les faisceaux de fibres musculaires. La caractérisation *in situ* prend en compte les interactions moléculaires contrairement aux études réalisées sur des extraits biochimiques. Cette approche est parfaitement transposable à l'étude d'autres traitements technologiques mais aussi à la caractérisation des lipides ou encore des phénomènes d'oxydations suspectés d'affecter la conservation des produits et leurs qualités nutritionnelles.

Références

1. R. Hamm (1977) eds T. Hoyem and O.Kvale, Applied Science, London
2. E.Tornberg (2005) Meat Sci., 70, 493-508
3. Böcker U, Ofstad R, Bertram HC, Andersen HJ, Kohler A (2006) J. Agric. Food Chem. 54 6733-6740
4. T. Astruc, F. Peyrin, A. Vénien, R. Labas, M. Abrantes, P. Dumas, F. Jamme (2012). Food Chem. Sous presse.

Caractérisation de la composante protéique du foie gras

en imagerie de fluorescence haute résolution

Chercheurs impliqués

L. Théron¹, A. Vénien¹, F. Peyrin¹, R. Labas¹, F. Jamme^{2,3}, M. Réfrégiers², T. Astruc¹

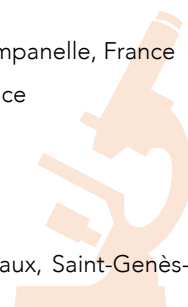
1. UR 370 QuaPA, INRA, Saint-Genès-Champagnelle, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif sur Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Annie Vénien, Qualité des Produits Animaux, Saint-Genès-Champagnelle, France
annie.venien@clermont.inra.fr



Le foie gras est un produit traditionnel à forte valeur ajoutée, 70 % de la production mondiale est française. Sa forte teneur en lipides lui confère des qualités organoleptiques appréciées. Or, toutes choses égales par ailleurs, la fonte lipidique des foies gras de canard à la cuisson, varie de 50 à 98 %. De plus, la réglementation interdit l'appellation foie gras si le taux de lipide exsudé dépasse 30 % du produit fini. Cette variabilité entraîne d'importantes pertes économiques pour la filière. Les études scientifiques engagées pour essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents à ce phénomène de fonte à la cuisson laissent entendre que la composante lipidique ne serait pas en cause¹. Les classes de lipides ou les degrés d'insaturation des acides gras varient peu en fonction du niveau de fonte. En revanche, la caractérisation de la composante protéique permet d'établir un lien avec celui-ci.

Les analyses structurales montrent des déformations importantes des hépatocytes, gorgés de lipides et dont les organites cellulaires sont rejetés contre la membrane plasmique. La résistance de la matrice extracellulaire qui enveloppe et consolide les hépatocytes, pourrait contribuer au phénomène de fonte. Une densification plus importante de la matrice protéique après cuisson est observée lorsque la fonte est élevée. Ces changements morphologiques et structuraux pourraient correspondre à un tissu plus fragile et donc plus sensible à la fonte lipidique².

La microspectroscopie de fluorescence présente divers avantages qui ont été exploités dans cette étude. La préparation de l'échantillon étant identique à celle utilisée pour l'histologie il est possible de coupler les deux méthodes. La microspectroscopie de fluorescence permet d'identifier la composante protéique du tissu, ce qui n'est pas toujours aisée en histologie sur des tissus aussi riches en lipides. Enfin il est possible de caractériser le collagène qui est un composant essentiel de la matrice extracellulaire.

Des foies gras de canard de qualités technologiques très différentes ont été caractérisés en microspectroscopie de fluorescence haute résolution sur la ligne de lumière DISCO. La matrice protéique est parfaitement mise en évidence et les données spectrales discriminent l'effet du chauffage. En revanche, les données ne permettent pas de discriminer les produits de qualités différentes.

ABSTRACT

Duck fatty livers varying on their technological qualities were characterized by high-resolution fluorescence microspectroscopy on the DISCO beamline. The protein matrix is perfectly highlighted and spectral data discriminate the effect of heating. However, the data do not discriminate between products of different qualities.

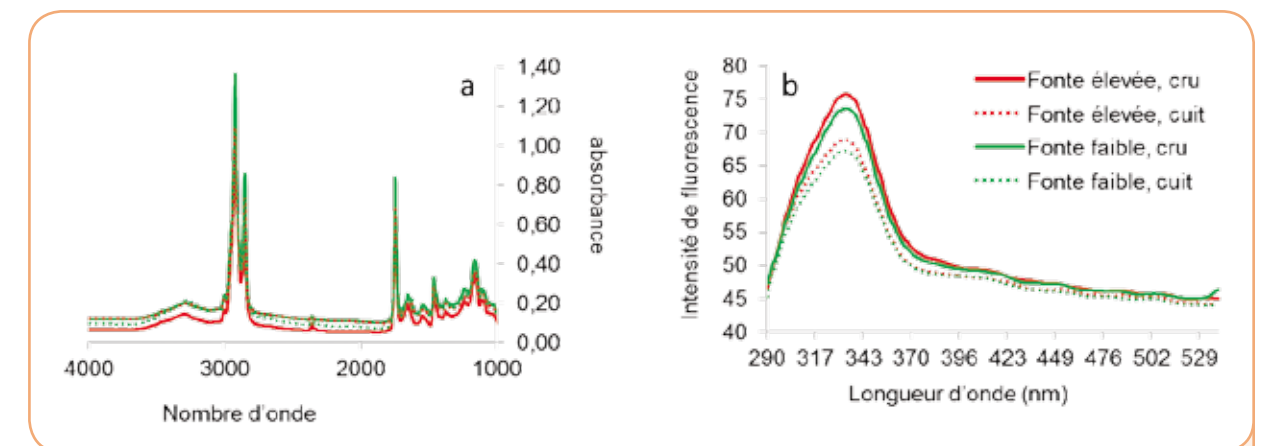


Figure 1 Spectres moyens obtenus en microspectroscopie FTIR (a) et de fluorescence (b) sur des foies gras cuits ou non, présentant des niveaux de fonte opposés.

160 canards engraisés ont été abattus et éviscérés. Les foies ont été prélevés et des échantillons ont été cryofixés. Après transformation dans des conditions identiques et détermination du rendement de cuisson, 24 individus présentant des niveaux de fonte variables ont été sélectionnés pour les études d'imagerie, 4 foies gras ayant des poids identiques mais des rendements de cuisson opposés ont été retenus pour les études en synchrotron. Des coupes à congélation de 10 µm d'épaisseur ont été déposées sur fenêtres BaF2 pour analyses en micro-spectroscopie FTIR (ligne de lumière SMIS source interne) et sur lames de verre pour colorations histologiques et pour analyses en micro-spectroscopie de fluorescence. Ces dernières ont été réalisées sur la ligne de lumière DISCO. Après excitation en lumière monochromatique, les spectres provenant de chaque pixel excité ont été enregistrés. L'intégration des données nous a permis d'obtenir des cartes de 50 x 50 µm avec un pas de 4 µm.

Les trois méthodes : histologie, microspectroscopies FTIR et de fluorescence discriminent parfaitement les foies gras crus des cuits respectivement aux échelles tissulaires, supramoléculaires et moléculaires. En revanche, aucune des deux méthodes de

microspectroscopie ne détecte de différence significative en fonction du niveau de fonte (Figure 1). Les analyses de micro-spectroscopie FTIR confirment que la nature des lipides est indépendante du niveau de fonte. La microspectroscopie de fluorescence permet de parfaitement discriminer spectralement et visuellement les protéines des gouttelettes lipidiques avec une résolution de 1 µm sur une coupe n'ayant subi aucun traitement chimique (Figure 2). Il semble donc que les taux des acides aminés histidine et tryptophane ainsi que les propriétés du collagène soient peu variables quel que soit le niveau de fonte.

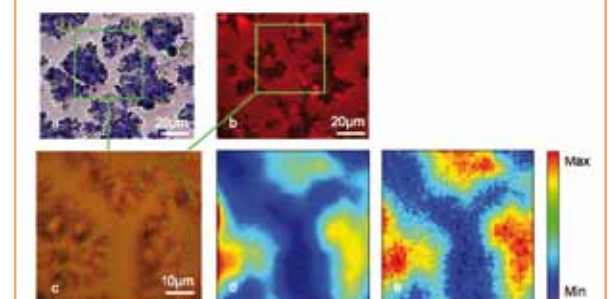


Figure 2 Images optiques du même échantillon (a) après coloration au bleu de toluidine observé en fond clair, (b) au Nile red observé en épifluorescence filtre CY3, (c) sans coloration ; reconstitution des images spectrales (d) du tryptophane 290 - 375 nm et (e) du collagène 375 - 440 nm

CONCLUSION

Cette approche est complètement inédite sur le foie gras, et les données spectrales méritent un traitement et une analyse mathématique plus poussée. Les résultats d'imageries morphologique et spectrale ont permis de faire progresser l'état des connaissances et de dégager des pistes pour comprendre les mécanismes impliqués dans le phénomène de fonte des foies gras. Néanmoins, des investigations supplémentaires sont indispensables pour affiner nos conclusions.

Références

1. C. Cerruti, L. Théron, D. Touboul, T. Astruc, A. Brunelle (2011) Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP) Avignon, France.
2. L. Théron, T. Astruc, M. Bouillier-Oudot, C. Molette, A. Vénien, F. Peyrin, Z. G. Vitezica, X. Fernandez (2011) *Meat Sci.*, 89 (4), 377 – 383.

Orientation sous contrainte des polysaccharides de la paroi du grain de blé :

couplage sollicitation mécanique – microspectroscopie infrarouge

Chercheurs impliqués

C. Barron¹, A. Sadoudi¹, F. Mabilie¹, M. Martelli¹,
F. Jamme^{2,3}, S. Lefrançois², P. Dumas²

1. UMR 1208 IATE, INRA, CIRAD, Supagro, UMII, Montpellier, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Cécile Barron, Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes, Montpellier
cecile.barron@supagro.inra.fr



RÉSUMÉ

Le couplage entre sollicitation mécanique et microspectroscopie infrarouge (IR) a pu être réalisé grâce au développement d'un dispositif expérimental original qui s'insère de façon adéquate entre les objectifs de focalisation du microscope IR de la ligne de lumière SMIS. L'intensité du signal synchrotron, sa polarisation naturelle, nous ont permis d'analyser, à l'échelle de la cellule, l'orientation des polymères de la paroi végétale.

ABSTRACT

An original experimental device was developed and adapted to couple mechanical test and infrared spectroscopy on SMIS beamline. Cell wall polymer orientation was shown in the wheat grain aleurone layer at cell scale thanks to brightness and natural polarization of synchrotron beam.

Les aliments céréaliers sont la base de l'alimentation humaine en Europe. Ils sont pour l'essentiel fabriqués à partir de blé et plus spécifiquement de farine blanche, dont ont été éliminés les tissus les plus périphériques du grain. Ces tissus présentent toutefois un potentiel nutritionnel important à travers la présence de minéraux, micronutriments et fibres. Extraire ces constituants sans détruire leur matrice est un des enjeux du fractionnement par voie sèche des produits de mouture.

Les tissus périphériques du grain de blé peuvent être comparés à des matériaux multicouches, constitués majoritairement de parois végétales. Ils sont en effet constitués de plusieurs assises tissulaires différant par leur organisation cellulaire mais aussi par leur composition. Les propriétés mécaniques (cohésion et adhésion) sont des propriétés clef pour expliquer leur aptitude au fractionnement. Compte tenu de leur structure, la paroi végétale apparaît être un niveau d'organisation essentiel pour comprendre ces propriétés. En effet, en tant que frontière cellulaire, elle constitue un réseau continu à l'origine des propriétés mécaniques des produits. D'un point de vue moléculaire, l'organisation des polymères pariétaux influencerait directement sur ces propriétés (extensibilité, rigidité), notamment par la création de pontages entre les polysaccharides (arabinoxylanes) via des composés phénoliques. Si cet effet a été évalué à l'échelle tissulaire, l'analyse de l'orientation des macromolécules sous contrainte, à l'échelle pariétale, permettrait de mettre en évidence un lien plus direct entre réticulation et propriété mécanique.

Afin de simplifier le système, cette étude a été menée sur un des tissus périphériques du grain de blé, la couche à aleurone, qui représente 50 % en masse de ces tissus, peut être isolée manuellement et pour laquelle de nombreuses données (biochimiques, spectroscopiques, mécaniques) ont pu être acquises.

Ce tissu se présente sous la forme d'une couche monocellulaire organisée en nid d'abeille. Les dimensions cellulaires sont de l'ordre de 40 μm , incompatible avec l'analyse IR en transmission, au contraire des parois végétales qui présentent une épaisseur de 4 μm environ. Une méthode de préparation originale a été développée afin d'isoler localement une paroi de la couche à aleurone au sein d'une éprouvette, en utilisant de façon complémentaire l'ablation froide par laser (pour ouvrir les cellules) et la sonication pour éliminer le contenu cellulaire. Par ailleurs une microplatine mécanique a été adaptée pour être placée entre l'objectif et le condenseur du microscope de la ligne SMIS, grâce à une nouvelle platine de déplacement XYZ dédiée et développée spécifiquement (Figure 1). Ce dispositif expérimental original permet la réalisation de tests de traction/compression à vitesse de déplacement imposée (de 0.04 $\mu\text{m.s}^{-1}$ à 25 $\mu\text{m.s}^{-1}$) sur des échantillons biologiques de petite taille (entrefer 3 mm, déplacement total : 10 mm).

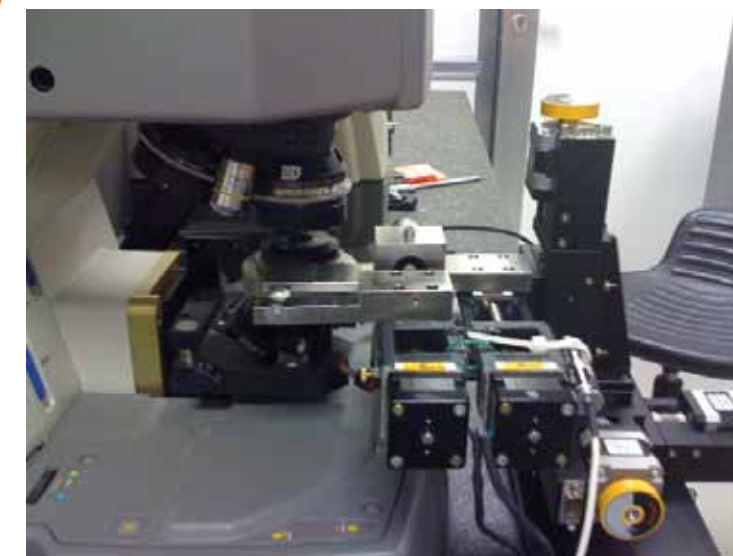


Figure 1 Installation expérimentale sur le microscope de la ligne SMIS

CONCLUSION

L'orientation des polymères pariétaux de la couche à aleurone a été mise en évidence à l'échelle cellulaire grâce au couplage entre sollicitation mécanique et spectroscopie IR sur la ligne SMIS. Une microplatine mécanique a été ainsi adaptée pour être placée entre l'objectif et le condenseur du microscope de la ligne SMIS, grâce à une nouvelle platine XYZ dédiée et développée spécifiquement.

L'intensité du signal synchrotron ainsi que sa polarisation naturelle, nous ont permis d'analyser, à l'échelle de la cellule, l'orientation des polymères de la paroi végétale. Deux types de tests ont ainsi pu être menés : (i) tests de traction avec arrêt et acquisition du spectre à déformation fixée (Figure 2), (ii) tests de traction avec acquisition des spectres, couplée en continu tout au long de la déformation de l'échantillon (Figure 3).

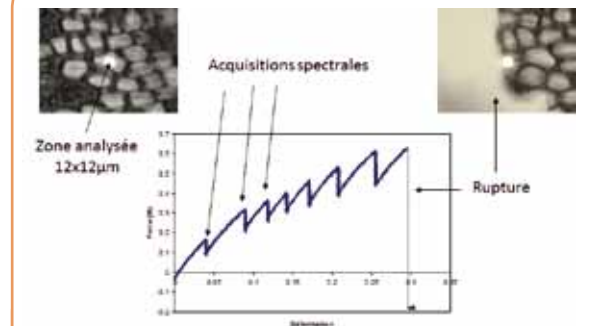


Figure 2 Test de traction arrêt/reprise sur une éprouvette de couche à aleurone ablatée et soniquée. Courbe force/déformation et observation microscopique de la zone d'analyse.

En effet, grâce à la brillance du rayonnement synchrotron, il a été possible d'acquérir des spectres sur une zone de 12x12 μm présentant un bon rapport signal/bruit, selon un temps d'acquisition (quelques secondes) compatible avec la réalisation du test mécanique. Une orientation préalable des polysaccharides pariétaux a été mise en évidence. Par ailleurs, des modifications spectrales ont été observées dans la zone de l'empreinte digitale des polysaccharides lorsque la paroi est mise sous contrainte lors d'un test à la rupture (Figure 3).

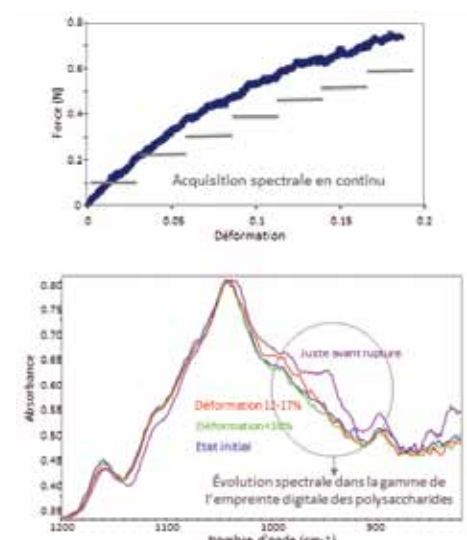


Figure 3 Test de traction sur une éprouvette de couche à aleurone ablatée et soniquée. Courbe force/déformation et spectres IR acquis pour différentes phases de déformation.

Imagerie du fer dans la cellule végétale :

découverte d'un nouveau pool de fer dans le nucléole

Chercheurs impliqués

H. Roschztardt¹, L. Grillet¹, M.P. Isaure², G. Conejero¹, R. Ortega³, N. Trcera⁴, C. Curie¹, S. Mari¹

1. UMR 5004, BPMP, Montpellier, France

2. UMR 5254, IPREM, Pau, France

3. UMR 5797, CENBG, Bordeaux, France

4. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Stephane Mari, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier
mari@supagro.inra.fr



Le fer (Fe) est un élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes. Il intervient comme cofacteur dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction et de transfert d'électrons, notamment au cours de la respiration et de la photosynthèse. Ces réactions ont lieu dans des compartiments intracellulaires (chloroplastes, mitochondries...) vers lesquels le fer doit être correctement distribué. La dualité du fer, indispensable mais également toxique en conditions d'excès, impose aux cellules un maintien strict de l'homéostasie, qui se traduit notamment par un contrôle de la répartition du fer entre les différents compartiments intracellulaires. L'étude de la localisation du fer au sein des cellules et des mécanismes qui la contrôlent représente actuellement un enjeu majeur pour la compréhension du rôle de ce métal.

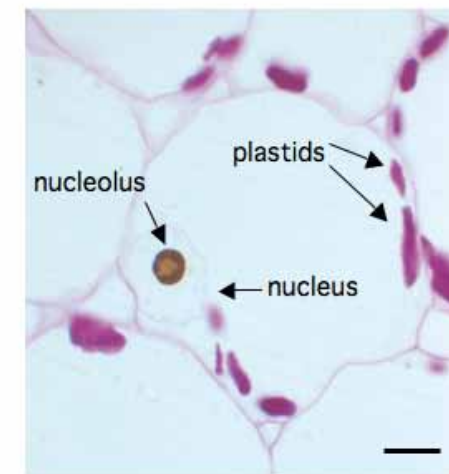
Les approches d'imagerie du fer ont longtemps été limitées chez les plantes, à cause du faible niveau de sensibilité et de résolution spatiale des techniques disponibles. L'imagerie du fer dans les cellules végétales a été grandement facilitée par l'établissement d'une technique de détection histochimique très sensible et résolutive dans notre équipe¹ et également grâce à l'accès à la ligne de lumière LUCIA, qui a les caractéristiques requises (énergie, taille de faisceau) pour réaliser ce type d'approche. L'étude systématique par histochimie de la localisation du fer dans les cellules des différents organes de la plante a permis de détecter, en plus des sites attendus, la présence de quantités importantes de fer dans les noyaux des cellules (Figure 1A). Cette observation n'avait jamais été décrite chez les plantes et elle est d'autant plus surprenante que, chez l'humain, l'accumulation de fer dans le noyau est systématiquement associée à l'apparition de maladies neurodégénératives.

L'analyse par microfluorescence aux rayons X d'échantillons cryofixés a permis de réaliser les premières cartographies du fer à l'échelle subcellulaire chez les

plantes, sur la ligne LUCIA. Il a ainsi été possible de confirmer la présence de fer dans une structure correspondant au noyau (Figure 1B). Quantitativement, nous avons pu montrer que le pool de fer nucléaire est le plus concentré de la cellule. Nous avons également pu montrer que la distribution dans le noyau n'était pas homogène et que le fer était concentré dans un sous-compartiment, correspondant au nucléole². Cette observation pose de manière plus précise la question du rôle des atomes de fer dans cette structure, dont la fonction principale est la synthèse d'ARN ribosomiaux. Pour mieux appréhender le rôle du fer dans le nucléole, nous avons pu initier une analyse de la

spéciation du fer *in situ*, par microspectroscopie d'absorption de rayons X (μ XANES et μ EXAFS). Cette approche, visant à identifier l'environnement atomique du fer présent dans le nucléole pour en déduire sa fonction, est également réalisée sur la ligne LUCIA. Enfin, des résultats préliminaires ont permis d'avoir accès à la ligne SMIS pour analyser les noyaux par spectroscopie infrarouge. Ces analyses, réalisées sur les mêmes échantillons que ceux analysés sur LUCIA, devraient permettre de mieux caractériser l'environnement organique (protéines, acides nucléiques...) au voisinage des atomes de fer et donc d'apporter des informations complémentaires.

(A) Histochemistry (Perls/DAB + Schiff)



(B) XRF imaging (merge of Fe and K)

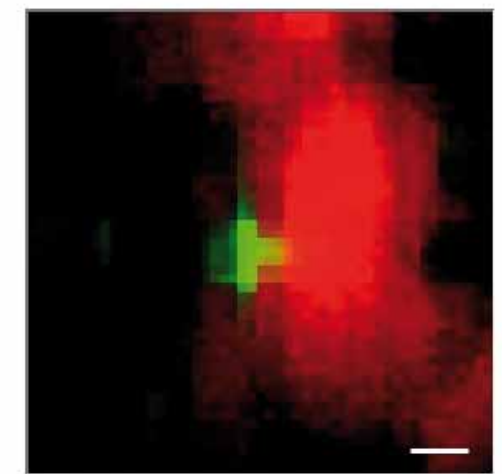


Figure 1

Imagerie du fer dans des cellulaires d'embryon de pois. (A) coloration histochimique du fer avec le Perls/DAB (coloration brune) et contre coloration des polysaccharides (paroi et grains d'amidon des plastes) avec le réactif de Schiff (coloration rose), (B) cartographie élémentaire (μ XRF) de cryocoupe d'embryon de pois (Énergie= 7200eV, taille de faisceau = 2,5 μ m x 3,5 μ m). Le fer apparaît en vert et le potassium en rouge. Sur la base de la taille et de la disposition des 2 éléments, la structure riche en fer correspond au noyau alors que l'accumulation de potassium sert à visualiser la vacuole (barre = 10 μ m).

Références

1. H. Roschztardt, G. Conejero, C. Curie, S. Mari (2009), *Plant Physiol.* 151, 1329-1338
2. H. Roschztardt, L. Grillet, M.-P. Isaure, G. Conejero, R. Ortega, C. Curie, S. Mari (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 27863-27866

RÉSUMÉ

Ce travail a porté sur l'étude de la localisation du fer, micro-élément essentiel, dans les cellules végétales, en utilisant des approches d'histochimie et d'imagerie élémentaire par fluorescence aux rayons X de la ligne de lumière LUCIA. Ces techniques ont permis de révéler la présence inattendue de fortes concentrations de fer dans le nucléole, mettant à jour un nouveau rôle du fer dans la cellule.

ABSTRACT

The study was focused on the localization of iron, an essential micronutrient, in plant cells, using histochemistry and elemental imaging approaches by X-ray fluorescence on the LUCIA beamline. These techniques have allowed the discovery of an important pool of iron in the nucleolus, revealing a new and unexpected role of this metal in plant cells.

Hétérogénéité chimique des parois de tige de blé et modifications par saccharification enzymatique

Chercheurs impliqués

A. Habrant¹, B. Chabbert¹, F. Jamme^{2,3}, P. Dumas²

1. UMR 614 FARE, INRA, Université de Reims, Reims, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Brigitte Chabbert, Fractionnement des Agroressources et Environnement, Reims, France
chabbert@reims.inra.fr

RÉSUMÉ

La saccharification enzymatique des parois lignocellulosiques de blé a été étudiée au niveau cellulaire en microspectroscopie infrarouge sur la ligne de lumière SMIS. Le degré de modifications chimiques liées à l'action de cellulases commerciales varie selon le type cellulaire et le stade de maturation.

ABSTRACT

Enzymatic saccharification of wheat lignocellulosic cell walls was studied by microspectroscopy using SMIS beamline. The extent of chemical changes related to the action of commercial cellulases varies according to the cell type and maturation.

La biomasse lignocellulosique constitue une source potentielle de sucres fermentescibles pour la production de biocarburant de deuxième génération. Cependant la saccharification directe des lignocelluloses par les cellulases est peu efficace et nécessite des prétraitements physicochimiques facilitant l'accès des enzymes au substrat^{1,2}. En effet les parois lignocellulosiques résultent de l'association coordonnée de polymères (cellulose, hémicelluloses, lignines)³ pour former un réseau particulièrement résistant à la dégradation biologique. Les parois lignifiées varient selon l'espèce végétale, les types cellulaires ou le stade de maturation, cette hétérogénéité peut diversement affecter l'efficacité des enzymes^{4,5}.

Le microscope de la ligne SMIS utilisant le rayonnement synchrotron a été utilisé pour évaluer, en microspectroscopie infrarouge, les degrés de modifications chimiques induites par l'action des enzymes en fonction du type de parois de tige de blé (sclérenchyme, parenchyme, vaisseaux, fibres et trachéides, Figure 1).

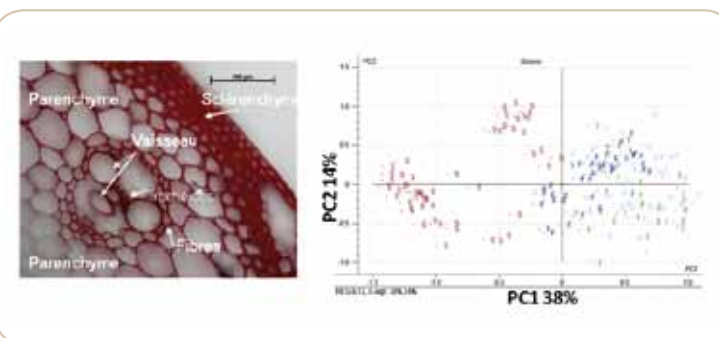


Figure 1 Anatomie tissulaire de la tige de blé et analyse en composante principale des spectres infrarouge des parois des différents types cellulaires.

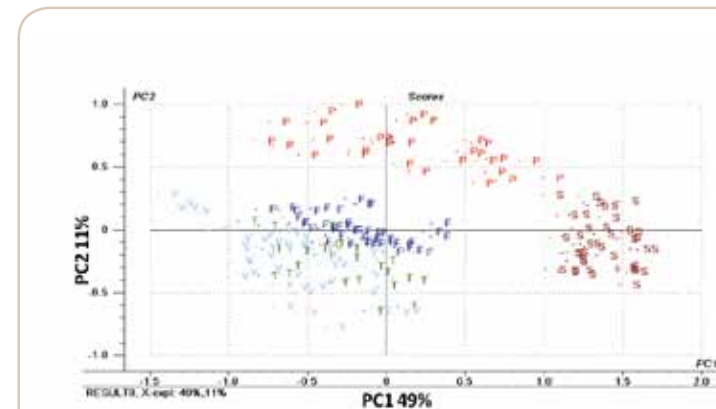


Figure 2 Analyse en composante principale des spectres infrarouge des parois de tige de blé après action de cellulases.

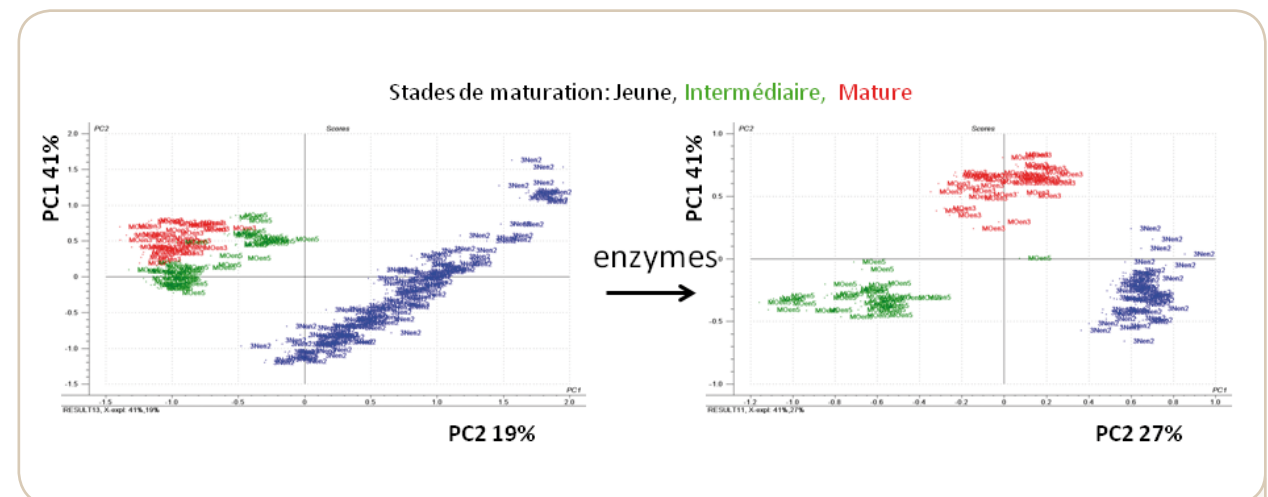


Figure 3 Effet de la maturation sur les parois de sclérenchyme : analyse en composante principale des spectres infrarouge avant et après hydrolyse enzymatique.

CONCLUSION

Ces résultats montrent que la ligne SMIS permet une analyse chimique à l'échelle de la paroi (2-3 μ m), et l'analyse statistique de l'hétérogénéité des parois dans les tissus lignocellulosiques en lien avec le stade de développement et la saccharification enzymatique. Cette approche peut être appliquée à plusieurs thématiques de recherche portant sur la qualité des lignocelluloses pour des usages non alimentaires ou des aspects environnementaux.

Références

1. Akin, (2007) *Applied Biochem Biotechnol*, 137, 3-15.
2. M.E. Himmel, S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. M. Brady, T. D. Foust (2007) *Science*, 315, 804-807.
3. N. Terashima, K. Fukushima, L.-F. He, K. Takabe, (1993), *Forage cell wall structure and digestibility*, pp 247-270
4. J. Beaugrand, G. Paes, D. Reis, M. Tahahashi, P. Debeire, M. O' Donohue, B. Chabbert, (2005) *Planta*, 222, 246-257
5. I. Bertrand, B. Chabbert, B. Kurek, S. Recous (2006) *Plant and Soil*, 281, 291-307.

Apport de la microspectroscopie infrarouge et de l'imagerie de fluorescence haute résolution pour l'étude du grain de *Brachypodium*

Chercheurs impliqués

F. Guillon¹, P. Robert¹, F. Jamme^{2,3}, B. Bouchet¹, P. Dumas²

1. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Fabienne Guillon, Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes, France
fabienne.guillon@nantes.inra.fr



RÉSUMÉ

La microspectroscopie infrarouge couplée à une source synchrotron (ligne de lumière SMIS, SOLEIL) a permis la caractérisation des parois des tissus de l'albumen du grain de *B. distachyon* grâce à sa résolution et sensibilité. L'imagerie de fluorescence haute résolution (ligne de lumière DISCO, SOLEIL) a montré la présence de protéines dans les grandes "vacuoles" des cellules de l'albumen de réserve alors que l'immunocytochimie avait révélé la présence de globulines dans les petites vésicules.

ABSTRACT

Infrared microspectroscopy was used to investigate cell wall composition of *B. distachyon* endosperm. The synchrotron source (SMIS beamline, SOLEIL) allows setting up a confocal configuration at an aperture size consistent with cell wall dimensions. Deep ultraviolet (DISCO beamline, SOLEIL) fluorescence imaging allowed the imaging of proteins in large vacuoles of storage endosperm cells. Using immuno-cytochemistry, we identified globulins in small vesicles.

Le blé tendre est une céréale majeure de l'alimentation humaine. Le grain est majoritairement constitué d'amidon et de protéines. Les parois cellulaires qui ne représentent que 3-4 % de l'albumen (farine blanche) ont un fort impact sur la transformation et la qualité des produits céréaliers. Bien que de nombreuses ressources génomiques soient disponibles pour le blé, sa polyploidie est un frein pour les approches de génomique fonctionnelle et l'étude de l'expression des gènes. Récemment, *Brachypodium distachyon* a été proposé comme espèce modèle pour les monocotylédones. *B. distachyon* combine beaucoup d'avantages pratiques et génétiques : petite taille, auto-compatibilité, temps de génération court, petit génome entièrement séquencé, transformation facile.

Notre objectif est de valider *B. distachyon* comme modèle pour l'étude des mécanismes de biosynthèse et d'assemblage des biopolymères dans les grains de blé. Cette étude est ciblée sur l'analyse du grain mature. Nous avons exploité les ressources disponibles au Synchrotron SOLEIL sur les lignes de lumière SMIS et DISCO, pour caractériser la composition des parois des tissus composant l'albumen et étudier la distribution des protéines de réserve.

Le grain sec de *B. distachyon* pèse 10 fois moins que le grain de blé. Une observation en microscopie photonique de coupes transversales de grains révèle la présence de parois épaisses dans l'albumen. Les protéines représentent 15-21 % de la masse sèche du grain. Les protéines de réserve majeures sont de type glutélines comme pour le riz. Les techniques d'immunocytochimie utilisant les anticorps disponibles au laboratoire montrent que des protéines de réserve de type globuline sont localisées dans de petites vésicules. Nous avons mis à profit la possibilité d'exciter dans l'UV lointain (DISCO, 275 nm) pour imager les protéines via leurs acides aminés aromatiques¹.

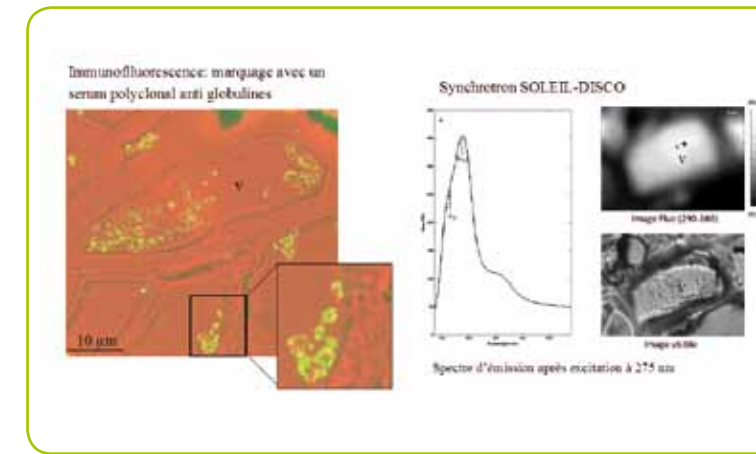


Figure 1 Localisation des protéines de réserve. (v, vacuole)

Nous avons révélé la présence de protéines dans les grandes vacuoles (Figure 1). La nature exacte de ces protéines reste à élucider. Les polysaccharides représentent 60 % de la masse sèche du grain. Au sein de ces polysaccharides, la teneur en amidon atteint 6-10 % alors que les polysaccharides pariétaux constituent environ 50-54 % de la masse sèche du grain. La microspectroscopie infrarouge est une technique puissante pour étudier *in situ*

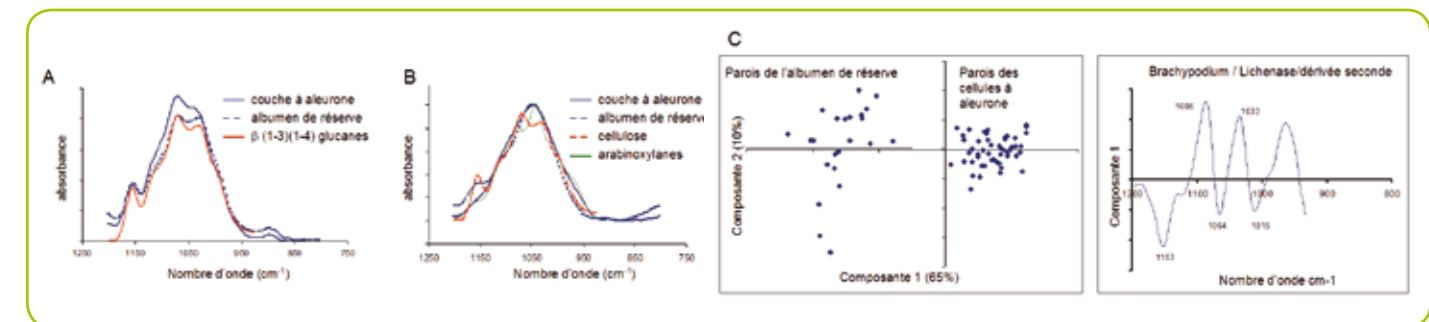


Figure 2 Analyse des parois de l'albumen par micro-spectroscopie infrarouge.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent le potentiel et la complémentarité des lignes de lumière SMIS et DISCO pour établir une cartographie de la distribution des polymères à une résolution qui peut atteindre celle de la cellule. Les techniques développées à SOLEIL peuvent s'appliquer pour l'étude de changements de composition à l'échelle de la cellule ou du tissu survenant lors du développement de l'organe ou induits par un traitement chimique, enzymatique, ou lors de mutation d'un gène impliqué dans la biosynthèse des polymères d'intérêt.

Références

1. F. Jamme, S. Villette, A. Giuliani, V. Rouam, F. Wien, B. Lagarde, M. Refrégiers (2010) *Microsc. Microanal.*, 16, 507-514.
2. F. Jamme, P. Robert, B. Bouchet, L. Saulnier, P. Dumas, F. Guillon (2008) *Appl. Spectr.*, 62, 895-900.
3. L. Saulnier, P. Robert, M. Grintchenko, F. Jamme, B. Bouchet, F. Guillon (2009) *J. Cereal Sci.*, 50, 312-317.
4. P. Robert, F. Jamme, C. Barron, B. Bouchet, L. Saulnier, P. Dumas, F. Guillon (2011) *Planta*, 233, 393-406.
5. F. Guillon, B. Bouchet, F. Jamme, P. Robert, B. Quémener, C. Barron, C. Larre, P. Dumas, L. Saulnier (2011) *J. Exp. Bot.*, 62 (3), 1001-1015.
6. F. Guillon, C. Larré, F. Petipas, A. Berger, J. Moussawi, H. Rogniaux, A. Santoni, L. Saulnier, F. Jamme, M. Miquel, L. Lepiniec, B. Dubreucq (2012) *J. Exp. Bot.*, 63(2) : 739-755.

Cartographie de la distribution des polymères dans les tiges de maïs

par couplage d'images hyperspectrales dans le moyen infrarouge, en fluorescence UV et Raman

Chercheurs impliqués

F. Allouche¹, C. Barron², M.F. Devaux¹, F. Guillon¹, M. Hanafi³, F. Jamme^{4,5}, P. Robert¹

1. UMR 1208 BIA, INRA, Nantes, France

2. UMR1208 IATE, INRA CIRAD SUPAGRO UM2, Montpellier, France

3. USC 1124 Sensométrie et Chimiométrie, INRA ONIRIS, Nantes, France

4. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

5. UAR 1008, CEPIA INRA, Nantes, France

Contact

Marie-Françoise Devaux, Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes
marie-francoise.devaux@nantes.inra.fr

RÉSUMÉ

L'hétérogénéité de distribution des polymères dans les parois cellulaires de tiges de maïs est étudiée par cartographie conjointe dans le moyen infrarouge (ligne SMIS), en fluorescence (ligne DISCO) et en Raman (source interne). L'analyse multibloc par co-inertie multiple révèle des différences pour les trois types cellulaires étudiés : phloème, xylème et sclérenchyme.

ABSTRACT

The spatial distribution of polymers in maize stem cell walls is investigated by computing joint cartographies from Mid-Infrared (SMIS beamline), fluorescence (DISCO beamline) and Raman (internal source) hyperspectral images. Multiblock analysis using multiple co-inertia decomposition reveals differences between the three cell types studied: sclerenchyma, xylem and phloem.

Les parois cellulaires des tiges de végétaux ligno-cellulosiques sont constituées en majorité de polysaccharides pouvant être dégradés - saccharifiés - sous la forme de monomères utilisables pour la production de biocarburants de deuxième génération¹. Dans la paroi, les microfibrilles de cellulose forment un réseau inclus dans une matrice d'hémicellulose.

Les lignines et les acides hydroxycinnamiques incrustés dans cet ensemble peuvent rendre la paroi très résistante à la dégradation. Pour comprendre les facteurs limitant la saccharification, il est nécessaire de prendre en compte non seulement la quantité globale de polymères dégradables mais aussi leur accessibilité et leur hétérogénéité au sein de la plante.

La microspectroscopie est une méthode puissante pour analyser *in situ* la variabilité de composition des parois en fonction des types cellulaires. Les gammes du moyen infrarouge et du Raman sont adaptées à l'analyse des polysaccharides et des lignines avec des sensibilités différentes². Les principaux acides hydroxycinnamiques sont potentiellement identifiables par leur signature en fluorescence UV.³ Nous proposons ici d'utiliser de manière conjointe les trois microspectroscopies pour cartographier la composition des parois de tiges de maïs étudiées à la fois comme plante modèle et d'application.

L'épaisseur des parois cellulaires étant de l'ordre de quelques micromètres, la meilleure résolution spatiale est recherchée. En Raman et en fluorescence, les appareils classiques permettent d'atteindre une résolution de 1 µm. Dans le moyen-infrarouge, la source synchrotron de la ligne SMIS permet d'obtenir une résolution de 5 µm par pixel. La ligne de lumière DISCO de SOLEIL a été retenue pour analyser les échantillons à 280 nm, longueur d'onde adaptée pour l'étude des acides hydroxycinnamiques.

Des images hyperspectrales ont été acquises pour une même région d'un faisceau vasculaire contenant trois types cellulaires : sclérenchyme, phloème et xylème (Figure 1).

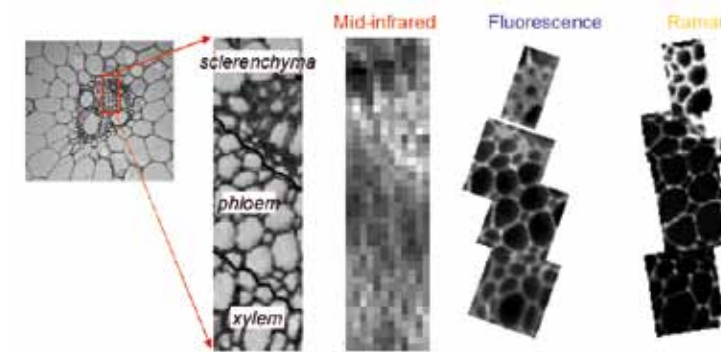
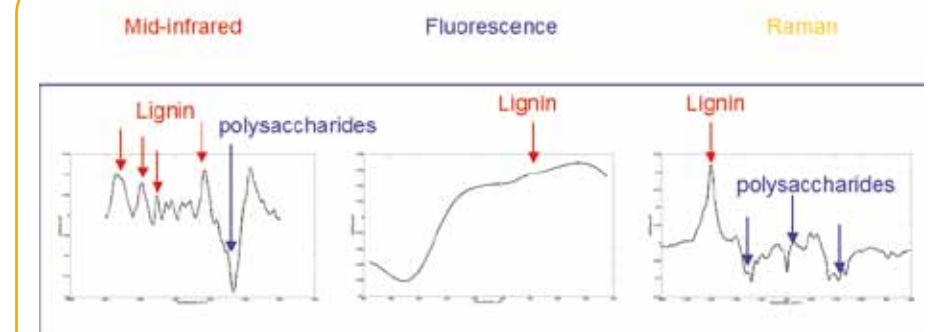


Figure 1 Acquisition et appariement des images hyperspectrales. La somme des intensités spectrales après pré-traitement est représentée pour chaque spectroscopie.

Les spectres infrarouge et Raman ont été étudiés entre 1800 et 800 cm⁻¹ et les spectres de fluorescence entre 375 et 540 nm. La figure 1 illustre l'appariement des données. Chaque pixel infrarouge est apparié à un ensemble de 5 x 5 pixels Raman ou fluorescence. Classiquement, la cartographie chimique est obtenue pour une technique spectroscopique en intégrant une bande ou par analyse multivariée. Nous proposons ici une analyse conjointe des trois microspectroscopies par analyse multibloc : l'analyse de co-inertie multiple⁴. Les profils spectraux sont calculés en moyennant les pixels Raman et de fluorescence et les images composantes sont calculées en tenant compte de la pleine résolution des images Raman et de fluorescence. La première composante décrit les variations d'intensité entre les pixels des parois et les pixels à l'intérieur des cellules.

Figure 2 Profils spectraux obtenus par analyse de co-inertie : composante 2.



La seconde composante (Figures 2 et 3) met en évidence une opposition entre des signaux des polysaccharides et de la lignine. Les parois du phloème sont enrichies en polysaccharides et les parois du sclérenchyme et du xylème sont enrichies en lignines. Les trois méthodes spectrales montrent des différences. Le contraste le plus important est obtenu avec le Raman plus sensible aux composés phénoliques. L'interprétation à partir des trois microspectroscopies suggère que le xylème contient plus de polysaccharides que le sclérenchyme.

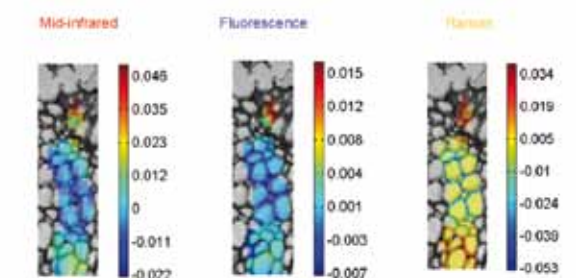


Figure 3 Composante 2 obtenue par analyse de co-inertie. Bleu : enrichissement en polysaccharides, rouge, enrichissement en lignine.

CONCLUSION

Cette étude donne lieu à des développements méthodologiques originaux tant du point de vue de l'acquisition des données que de leur analyse conjointe. Elle ouvre la possibilité d'obtenir des informations *in situ* très complètes sur l'hétérogénéité d'organisation des polymères pour des échantillons aussi complexes que des tissus végétaux.

Références

1. M. Pauly, K. Keegstra (2008) *Plant J.* 54, 559-568
2. M. Kačuráková, N. Wellner, A. Ebringerová, Z. Hromádková, R.H. Wilson, P.S. Belton, (1999) *Food Hydrocolloids* 13, 35-41.
3. W.F. Anderson, D.E. Akin (2008) *J Ind Microbial Biotechnol* 35,355-366,
4. M. Hanafi, G. Mazerolles, E. Dufour, E. M. Qannari (2006) *J. Chemometr.* 20, 1-12
5. F. Allouche, M. Hanafi, F. Jamme, P. Robert, F. Guillon, M. F. Devaux, (2012) *J. Chemometer Intell Lab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.08.010>

Microanalyse à haute résolution du bois et dendrochronologie des arbres tropicaux

Chercheurs impliqués

S. Ponton¹, J.-L. Dupouey¹, C. Rose¹, A. Giuliani^{2,3}, D. Thiaudière²

1. UMR 1137 EEF, INRA UHP, Nancy, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Stéphane Ponton, Écologie et Écophysiologie Forestières, Nancy
ponton@nancy.inra.fr



RÉSUMÉ

Des analyses microélémentaires ont été réalisées sur des échantillons d'arbres tropicaux par spectroscopie de fluorescence X sur la ligne de lumière DIFFABS. Les profils de variations révélés, pour des éléments peu abondants dans le bois, permettent de reconstruire *a posteriori* la croissance d'arbres pour lesquels les méthodes dendrochronologiques classiques ne sont pas applicables.

ABSTRACT

The spatial distribution of trace elements in the wood of tropical trees was investigated by X-ray fluorescence elemental analysis on the DIFFABS beamline. The results revealed cyclic patterns of variation useful for tree dating and retrospective growth analysis of tropical trees.

À cause du rôle dominant que jouent les forêts tropicales dans le cycle global du carbone, les variations de leur dynamique, sous l'influence des changements de leur environnement (climat, pollution, etc.), peuvent à leur tour affecter le climat. Aujourd'hui, les seules estimations disponibles de la croissance des arbres tropicaux viennent de réseaux de placettes d'étude permanentes trop récentes pour évaluer les évolutions à long-terme. Dans ce contexte, il est par exemple difficile de caractériser l'effet des variations climatiques inter-annuelles sur la croissance des arbres, d'estimer l'évolution à long terme de la productivité des forêts tropicales (comme cela a été fait pour les forêts tempérées ou boréales), ou encore d'évaluer l'effet des changements globaux sur leur fonctionnement. Même l'information la plus basique, l'âge des arbres tropicaux, n'est généralement pas disponible¹. Pourtant, aucune sylviculture durable n'est envisageable sans connaître l'âge des arbres exploités.

Les approches dendrochronologiques (*i.e.* basées sur l'étude des cernes des arbres) se sont montrées particulièrement efficaces pour apporter des connaissances écologiques concernant les écosystèmes forestiers non tropicaux^{2,3}. L'analyse rétrospective des patrons de croissance donne non seulement un accès direct à l'âge des arbres mais permet également la reconstruction *a posteriori* des effets des changements passés de l'environnement sur la physiologie des arbres sur plusieurs décennies, voire siècles. Cependant, l'impossibilité d'identifier des cernes de croissance annuels chez la plupart des espèces ligneuses tropicales a jusqu'à présent empêché le développement de la dendrochronologie tropicale⁴.

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence, à partir d'analyses microélémentaires du bois, l'existence de marqueurs permettant de retracer rétrospectivement la croissance des arbres tropicaux. L'expérimentation a porté sur des échantillons provenant de 3 individus de

l'espèce *Pericopsis elata* issus d'une plantation de 56 ans en République Démocratique du Congo. Le choix du matériel végétal a porté sur des arbres de plantation qui seuls offrent l'avantage d'avoir un âge connu *a priori*, condition nécessaire pour valider l'approche testée. La démarche a consisté à réaliser des profils de mesure en partant du cœur de l'arbre jusqu'à l'écorce, avec une résolution de 200 μm (Figures 1 & 2).

Les échantillons ont été soumis à un rayonnement X monochromatique de 10,7 keV. Les variations de concentrations radiales des éléments K, Ca, Mn, Fe, Cu et Zn ont été mesurées par un spectromètre à sélection d'énergie.



Figure 2 Photographie d'un échantillon positionné sur la table à translation de la ligne DIFFABS.

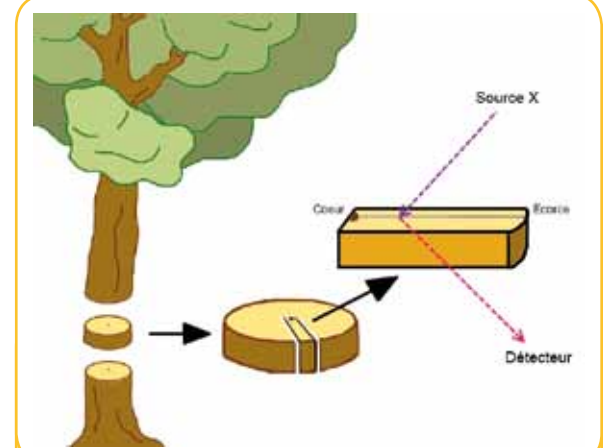


Figure 1 Localisation schématique du profil de mesure allant du cœur de l'arbre vers l'écorce.

La Figure 3 montre les profils de variation pour les éléments Ca et Cu d'un des 3 barreaux. Pour ces deux éléments, ainsi que pour Mn et Fe, les analyses révèlent clairement des variations cycliques tout au long du profil. Sur cet échantillon, 56 cycles sont dénombrés du cœur à l'écorce pour l'élément Ca qui présente les cycles les plus marqués. Bien que globalement moins clair que celui du Ca, le signal du Cu permet par endroit de désambiguïser le décompte des cycles.

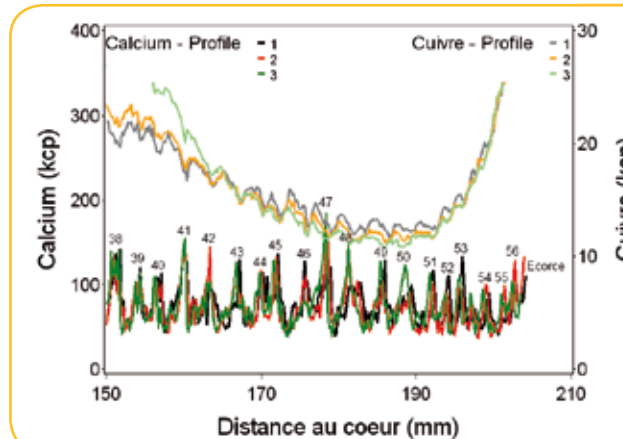


Figure 3 Variations radiales des concentrations en Ca et Cu (en milliers de coups) dans un barreau de *Pericopsis elata*. Pour chaque élément, 3 profils parallèles ont été réalisés. Les cycles de variations sont dénombrés (les numéros sont positionnés sur les pics) et permettent de retrouver l'âge de l'arbre. Pour des raisons de lisibilité, seuls les 50 derniers mm du barreau sont représentés ; 37 pics ont été comptabilisés sur les 150 premiers mm.

Ces résultats confirment l'existence de signaux chimiques, marqués par les variations cycliques de l'environnement, archivés dans le bois, et permettant la reconstruction *a posteriori* de la croissance des arbres tropicaux. Ils soulignent également la pertinence de l'utilisation du rayonnement synchrotron pour extraire ce signal discret. Ce travail s'inscrit dans un domaine pionnier où seul un exemple d'étude similaire a pour l'instant été publié⁵.

CONCLUSION

Ces premiers résultats démontrent la potentialité de la ligne DIFFABS pour la réalisation de profils à haute résolution des variations d'éléments peu abondants dans le bois. Parmi les 6 éléments mesurés ($Z < 30$), 4 présentent des variations cycliques de leur concentration le long des profils de mesure. Les différents éléments apparaissent complémentaires pour reconstituer des séquences chronologiques qui permettent non seulement de déterminer l'âge des arbres tropicaux mais également d'établir toute leur dynamique de croissance passée.

Références

1. M. Martinez-Ramos, E.R. Alvarez-Buylla (1998) *Trends Plant Sci.*, 3, 400-405.
2. J.-L. Dupouey, S. Leavitt, E. Choinsnel, S. Jourdain (1993) *Plant Cell Env.*, 16, 939-947.
3. S. Ponton, J.-L. Dupouey, N. Bréda, F. Feuillat, C. Bodénès, E. Dreyer (2001) *Plant Cell Env.*, 24, 861-868.
4. M. Worbes (2002) *Dendrochronologia*, 20, 217-231.
5. P.M. Poussart, S.C.B. Myneni, A. Lanzirotti (2006) *Geophys. Res. Lett.*, 9, 297-300.

Suivi de l'oxydation d'une émulsion lipidique

par imagerie dynamique de fluorescence

Chercheurs impliqués

M-E. Cuvelier¹, C. Bonazzi¹, F. Courtois¹, S. Keller¹, M-N. Maillard¹, J-M. Vauvre¹, O. Vitrac¹, F. Jamme^{2,3}, M. Réfrégiers²

1. UMR 1145 Genial, AgroParisTech, INRA, Cnam, Massy, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Marie-Élisabeth Cuvelier, Ingénierie Procédés Aliments
Massy, France
marie-elisabeth.cuvelier@agroparistech.fr



L'oxydation des lipides est une cause majeure de perte de qualité des produits alimentaires, mais elle reste difficile à prédire. Les mécanismes radicalaires d'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) sont bien connus mais, en milieu multiphasique, le rôle de l'oxygène, des antioxydants ou de l'organisation des phases sur ces réactions est peu décrit ou sujet à débat¹. Pour avancer dans l'étude de la réactivité des lipides et des antioxydants, nous développons des méthodes pour obtenir expérimentalement des données cinétiques nous permettant d'établir des modèles mathématiques stoechio-cinétiques^{2,4}.

En allant sur la ligne de lumière DISCO de SOLEIL nous avons pour objectif de tester la faisabilité de l'imagerie dynamique pour visualiser l'avancée de l'oxydation au cœur des globules gras d'une émulsion. Pour accélérer le processus d'oxydation des acides gras et permettre un suivi cinétique sur moins d'une heure, nous avons induit les réactions par le réactif de Fenton (H_2O_2 , fer)⁵. Toutes les expériences ont été faites avec de l'huile de tournesol, préalablement débarrassée de ses tocophérols endogènes et émulsionnée à 2,5 % dans de l'eau à pH 6 à l'aide de Tween 40. Les émulsions sont disposées entre deux lamelles de quartz et regardées au microscope de la station Telemos de DISCO, muni d'une caméra EMCCD (Digital Caméra, Hamamatsu) (x100).

Les essais d'observation directe des diènes conjugués (produits primaires de l'oxydation des AGPI) étant non concluants, nous avons opté pour l'ajout dans l'émulsion de β -carotène (700 $\mu\text{mol/kg}$) et nous avons observé pendant 30 minutes la disparition de sa fluorescence (excitation 286 nm) au cours de sa co-oxydation par les AGPI oxydés. Les difficultés rencontrées durant l'observation venaient à la fois d'une mobilité des globules gras et du séchage de l'émulsion (Figure 1), ce qui nous a contraints à refocaliser régulièrement et à opter pour une multi-acquisition de 3 à 10 images de 50 ms, avec un intervalle d'1 ms. Une autre difficulté est venue du fait que les globules gras sont situés à différents plans focaux, ce qui conduit à de grandes différences d'intensité de fluorescence entre les globules gras et entre les essais.

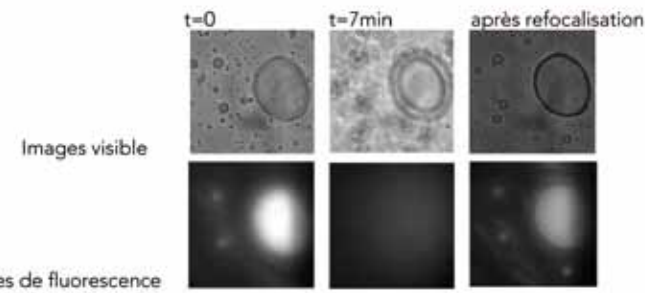


Figure 1 Images de fluorescence de l'émulsion huile dans l'eau avec β -carotène. Influence de la défocalisation due au dessèchement de l'émulsion sur la mesure de fluorescence.

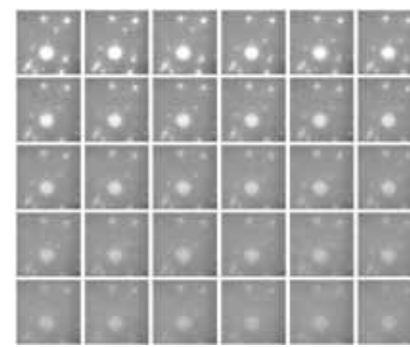


Figure 2 Images de fluorescence de l'émulsion avec β -carotène. Témoin sans induction de l'oxydation sur 30 min. Une refocalisation a été faite toutes les 3 images.

CONCLUSION

Ces premiers résultats montrent les potentialités de la ligne DISCO dans les UV pour faire de l'imagerie dynamique de l'oxydation des lipides dans un milieu émulsionné : le microscope Telemos a permis de suivre la perte de l'auto-fluorescence du β -carotène utilisé comme co-substrat sur une cinétique de 30 min. Les conditions de l'acquisition doivent être améliorées afin d'observer spécifiquement ce phénomène en limitant le photo-blanchiment. En outre, si les globules gras pouvaient être totalement immobilisés, le microscope Polyphem équipé d'un spectrophotomètre devrait permettre d'observer la diminution de fluorescence de l'interface vers le centre du globule.

Par ailleurs, les premiers essais d'imagerie d'auto-fluorescence des antioxydants phénoliques sont prometteurs pour les composés lipophiles, clairement localisés dans les globules gras. L'étude de leur réactivité vis-à-vis de l'oxydation doit maintenant être entreprise.

Un essai témoin sans induction par la réaction de Fenton et trois essais avec induction ont été réalisés. La perte de fluorescence du β -carotène est bien visible dès les premières minutes (Figure 2). Le traitement des images a consisté à mesurer le niveau moyen de gris de 3 globules et à en soustraire le fond de l'image. Une cinétique moyenne des valeurs normalisées a alors été tracée pour chaque essai en fonction du temps de l'essai et en fonction de la durée d'exposition au rayonnement UV.

L'analyse des cinétiques (Figure 3) montre une bonne répétabilité des 3 essais avec induction, significativement différents de l'essai témoin. Il peut être estimé que 50 % de fluorescence sont perdus au bout de 350 s avec induction, contre 480 s sans induction : cette différence pourrait être attribuée à la co-oxydation par les radicaux lipidiques. Il convient néanmoins de souligner que la perte de fluorescence est majoritairement due au photo-blanchiment initié par l'exposition prolongée aux UV.

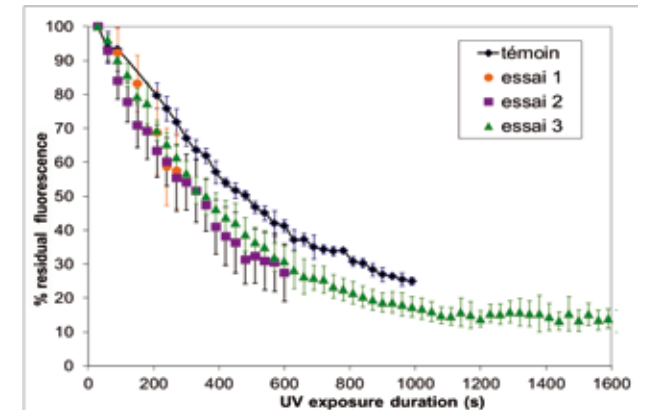


Figure 3 Perte de fluorescence du β -carotène en fonction de la durée d'exposition au rayonnement UV de l'émulsion témoin sans induction et de trois émulsions avec induction de l'oxydation par le réactif de Fenton.

Références

1. D. Mc Clements, E. Decker (2000) *J. Food Sci.*, 65, 1270-1280.
2. M-N. Peyrat-Maillard, M-E. Cuvelier, C. Berset (2003) *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 80, 1007-1012.
3. T. Rougier, C. Bonazzi, B. Broyart, J-D. Daudin (2007) *Drying Technol.*, 25, 341-348.
4. O. Roman, F. Courtois, M-N. Maillard, A-M. Riquet (2012) *J. Amer. Oil Chem. Soc. online first*, 13 march 2012
5. R. Tikekar, A. Johnson, N. Nitin (2011) *Food Res. Intern.*, 44, 139-145.

RÉSUMÉ

La perte de fluorescence du β -carotène incorporé dans les globules gras d'une émulsion contenant des lipides insaturés a été suivie par imagerie dynamique de fluorescence sur la ligne de lumière DISCO. Les premiers essais ont permis de montrer la faisabilité du suivi cinétique sur des durées de 30 min. Les résultats révèlent une perte majeure due à la durée d'exposition au rayonnement UV.

ABSTRACT

The loss of fluorescence of β -carotene incorporated into the fat globules of an emulsion containing unsaturated lipids was followed by dynamic imaging of fluorescence on DISCO beamline. The first tests demonstrated the possibility of following 30 min-kinetics. The results show a major loss due to the exposure to UV radiation.

Corrélations entre la répartition des lipides et de FABP7 dans des cerveaux embryonnaires de rat

Chercheurs impliqués

J. Aioun¹, E. Maximin¹, C. Bordat¹, F. Jamme^{2,3}, B. Langelier¹, M. Lavialle¹, C. Heberden¹

1. INRA UR909 NURELICE, Jouy-en-Josas, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes Frances

Contact

Josiane Aioun, Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales Jouy en Josas
josiane.aioun@jouy.inra.fr



RÉSUMÉ

L'analyse lipidique sur coupes de cerveaux d'embryons de rat a été étudiée sur la ligne de lumière SMIS. Le rapprochement entre cartes histologique et chimique a permis de corrélérer la présence de la FABP7, protéine de transfert des acides gras, à celle des lipides. Par ailleurs, il a pu être établi que la teneur en AGPI du régime maternel jouait sur la composition en phospholipides des cerveaux des embryons.

ABSTRACT

The modifications of lipid compositions of rat embryonic brains were analysed by infrared microspectrometry, using the SMIS beamline. We demonstrated that FABP7 abundance was correlated with lipid localisation. Moreover, the phospholipid composition of the embryonic brains is modified by the maternal fatty acid supply.

Les analyses lipidiques classiques permettent d'isoler et quantifier les espèces moléculaires et la composition en acides gras d'extraits de tissus ou organes, mais ne renseignent pas sur la distribution *in situ* des lipides, ni sur les possibles hétérogénéités de leur répartition dans le tissu, contrairement aux techniques d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* couramment utilisées pour la détection des protéines ou des acides nucléiques.

Notre laboratoire s'intéresse au rôle des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) sur les fonctions cérébrales, et plus précisément à celui de l'acide docosahexaénoïque (DHA), acide gras à longue chaîne, particulièrement abondant dans les phospholipides membranaires des cellules cérébrales. Le DHA exclusivement apporté par l'alimentation est indispensable pour un neuro-développement harmonieux. Il s'accumule progressivement dans les structures cérébrales pendant la gestation. Bien que les effets d'une carence en DHA au cours du neuro-développement soient bien documentés, les mécanismes d'accumulation et d'incorporation dans le système nerveux sont mal connus. L'efficacité de cette accumulation dépend de l'apport et du statut maternel en DHA¹. De plus, il a été montré que la FABP7, protéine cytoplasmique de transfert des acides gras, qui présente une forte affinité pour le DHA, est exprimée de façon très précoce pendant le neuro-développement² (E12).

Nous avons utilisé la brillance de la source synchrotron de SOLEIL couplée à la ligne SMIS pour analyser par microspectrométrie infrarouge la distribution *in situ* des lipides sur coupes de cerveaux de rats embryonnaires, afin de répondre aux deux questions suivantes :

- La FABP7 intervient-elle dans l'accumulation du DHA dans le cerveau embryonnaire ?
- Les variations de composition lipidique induites par la teneur en DHA du régime maternel sont-elles détectables dans les zones riches en FABP7 ?

L'étude a été réalisée sur des embryons de rat Wistar nés de mères recevant 15 jours avant l'accouplement et pendant la gestation un régime semi synthétique à teneur variable en AGPI :

- soit dépourvu en DHA (groupe carencé en DHA),
- soit enrichi en DHA (groupe supplémenté en DHA).

Les embryons ont été prélevés à 15 jours de gestation, période où la FABP7 est fortement exprimée. Les cerveaux ont été débités en coupes sagittales de 8 µm à l'aide d'un cryostat et les coupes ont été recueillies alternativement sur lames de verre (pour la localisation de la FABP7 par immunohistochimie) ou sur lames de réflexion pour microspectroscopie IR destinées à l'établissement des cartographies chimiques des lipides sur la ligne SMIS.

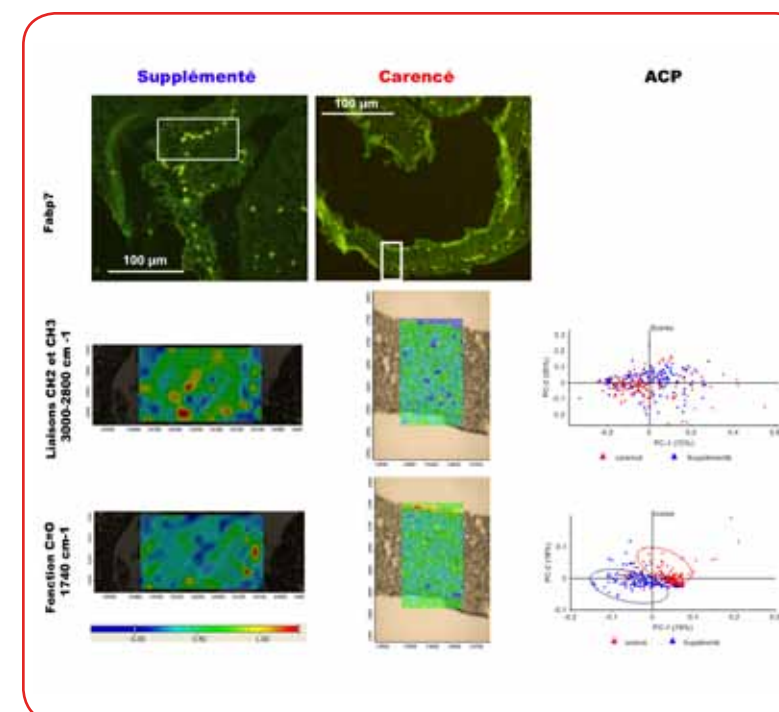


Figure 1 Cartographie comparée de la FABP7, des lipides et des phospholipides chez des embryons de 15 jours et analyse en composantes principales

La FABP7 et les lipides sont localisés dans les mêmes zones dans le cerveau embryonnaire de rat

La comparaison de la distribution de la FABP7 et de celle des lipides montre une bonne corrélation entre l'expression de la protéine et la concentration en lipides imagés dans la région spectrale 3000-2800 cm⁻¹ (chaîne aliphatique), et à 1740 cm⁻¹ (fonction ester des phospholipides) (Figure 1). Les cartographies chimiques permettent donc de bien visualiser les zones riches en lipides; une analyse complémentaire de ces données par analyse en composante principale (ACP) permet de montrer les différences qualitatives en phospholipides.

La teneur en AGPI du régime maternel influence la composition en phospholipides des cerveaux embryonnaires

Pour chaque régime nous avons choisi une cartographie chimique représentative sur laquelle nous avons établi le spectre moyen. Les spectres obtenus à partir des cerveaux d'animaux soit carencés soit supplémentés ont été comparés afin d'identifier les régions spectrales modifiées. Des variations spectrales ont été identifiées dans la région 3000-2800 cm⁻¹ (lipides) et au niveau de la région 1740 cm⁻¹ (phospholipides). L'ACP (Figure 1) réalisée dans ces zones spectrales met nettement en évidence une variation de la composition en phospholipides en fonction du régime maternel dans les zones cérébrales étudiées (Figure 1).

CONCLUSION

Ces résultats originaux montrent une corrélation entre la distribution de FABP7 et l'accumulation des lipides dans le cerveau embryonnaire de rat. Par ailleurs, l'utilisation de la ligne SMIS a permis de mettre en évidence *in situ* que le niveau d'apport en DHA pendant la gestation joue sur la composition en phospholipides des membranes cérébrales embryonnaires. La brillance de la source synchrotron de SOLEIL nous a permis d'atteindre une résolution à l'échelle cellulaire inaccessible avec du matériel de laboratoire courant.

Références

1. S. M. Innis (2008) Brain Res., 1237, 35-43.
2. Y. Arai, N. Funatsu, K. Numayama-Tsuruta, T. Nomura, S. Nakamura, N. Osumi (2005) J. Neurosci., 25, 9752-9761.



Mesure des énergies d'ionisation du *E*-lycopène, de ses isomères *Z* et de ses produits d'oxydation

par photoionisation à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse

Chercheurs impliqués

M. Carail¹, C. Caris-Veyrat¹, A. Giuliani^{2,3}, P. Goupy¹

1. UMR408, INRA, Université d'Avignon, Avignon, France

2. Synchrotron SOLEIL Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Catherine Caris-Veyrat, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale Avignon
catherine.caris@avignon.inra.fr



Les caroténoïdes sont des micronutriments de notre alimentation principalement présents dans les fruits et légumes. Ces molécules possèdent un intérêt nutritionnel certain ; ainsi le β -carotène est le principal précurseur de la vitamine A et la source majeure de cette vitamine dans notre alimentation. D'autres caroténoïdes comme le lycopène, principal pigment de la tomate, pourraient également avoir des effets bénéfiques sur la santé. En effet, des études épidémiologiques et des études d'intervention chez l'homme ont montré qu'un régime riche en fruits et légumes, et en particulier en tomates, pouvait participer à la prévention de maladies dégénératives (cancers, maladies cardiovasculaires). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés. Deux hypothèses majeures sont avancées : un effet antioxydant, que nous pensons se produire principalement dans le compartiment gastro-intestinal compte-tenu de la faible biodisponibilité des molécules¹, et une action de signalisation cellulaire, telle une stimulation de gènes impliqués dans le processus de protection contre la cancérogenèse². Ces deux types d'action peuvent être exercés soit par le caroténoïde lui-même, soit par des molécules dérivées ingérées avec l'aliment ou formées *in vivo* (métabolites) ; ces dernières molécules sont en général issues de l'oxydation des caroténoïdes.

L'élucidation de ces mécanismes nécessite une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques des caroténoïdes et de leurs produits d'oxydation. Ainsi l'effet antioxydant dépend étroitement de la réactivité des molécules et en particulier de la facilité avec laquelle elles vont pouvoir réduire un agent oxydant, par exemple en cédant un électron. Cette capacité à céder un électron peut être reliée à l'énergie d'ionisation de la molécule. Pour les caroténoïdes, la seule valeur accessible dans la littérature est celle du β -carotène (6,5 eV).

Alors que l'ionisation des caroténoïdes, que ce soit par electrospray ou ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), est difficile compte-tenu de la lipophilie des molécules, la photoionisation à pression atmosphérique s'est avérée être une méthode de choix pour leur étude par spectrométrie de masse. Grâce à l'accordabilité du rayonnement synchrotron de la ligne DISCO, nous avons pu déterminer les seuils d'ionisation du lycopène sous sa forme *E* (toutes les doubles liaisons conjuguées sont *E* ou *trans*) et sous différentes formes *Z* (une ou plusieurs des doubles liaisons conjuguées est/sont *Z* ou *cis*) et de certains de ses produits d'oxydation que nous avons synthétisés, des apo-lycopénals^{3,4} (Figure 1).

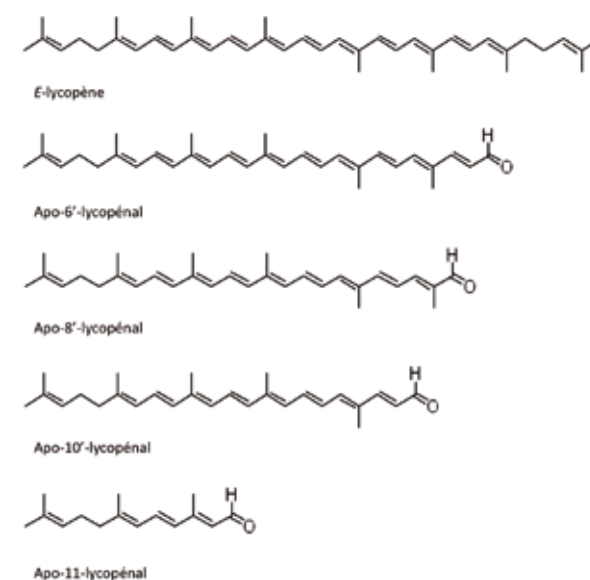


Figure 1 Structure chimique du *E*-lycopène et de ses produits d'oxydation étudiés.

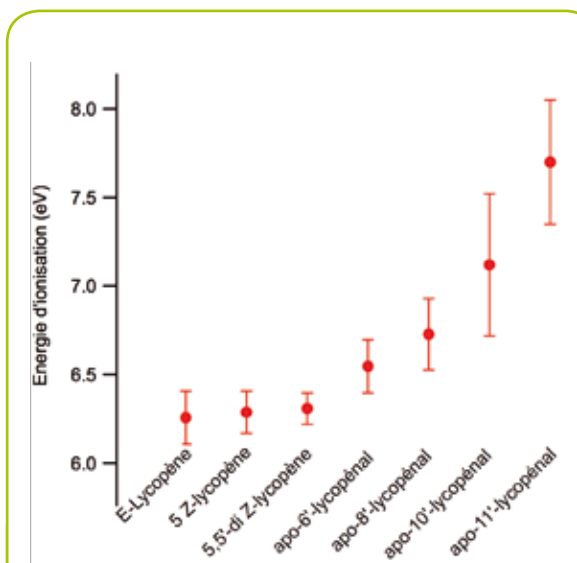


Figure 2 Énergie d'ionisation du *E*-lycopène, de ses isomères *Z* et de ses produits d'oxydation.

La figure 2 montre les valeurs d'énergies d'ionisation expérimentales. Celle du *E*-lycopène est la plus faible (6,33 eV) identique à celle de ses deux isomères *Z* aux erreurs de mesure près. Concernant les apo-lycopénals, plus leur chaîne carbonée est longue, plus leur potentiel d'ionisation est bas, ce qui est significatif d'une capacité réductrice croissante avec la longueur de la chaîne carbonée.

Ces données expérimentales sont corroborées par des calculs (programme PM3, logiciel Hyperchem) donnant la valeur de l'énergie de la HOMO ainsi que par la capacité antioxydante de ces molécules évaluée dans un modèle expérimental de stress oxydant dans le tractus gastro-intestinal⁴.

RÉSUMÉ

La photoionisation à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse et utilisant le rayonnement synchrotron de la ligne de lumière DISCO a permis de photoioniser efficacement le lycopène et ses produits d'oxydation. Pour la première fois, les énergies d'ionisation de ces caroténoïdes ont pu être mesurées.

ABSTRACT

Lycopene and its oxidation products were efficiently ionized by atmospheric pressure photoionisation coupled to a mass spectrometer using Synchrotron radiation of DISCO beamline. Ionisation energies of these carotenoids could be measured for the first time.

CONCLUSION

Les résultats obtenus démontrent l'intérêt de l'installation de photoionisation à pression atmosphérique de la ligne DISCO pour la caractérisation physico-chimique de molécules d'intérêt nutritionnel lesquelles, de par leur lipophilie et leur fragilité, sont difficiles à caractériser en laboratoire avec des méthodes d'ionisation traditionnelles. Le type de mesure d'énergie d'ionisation effectué sur le lycopène et ses produits d'oxydation sera étendu à d'autres caroténoïdes présents dans notre alimentation et d'intérêt nutritionnel.

Références

1. E. Vulcain, P. Goupy, C. Caris-Veyrat, O. Dangles (2005) *Free Radical Res.*, 39 547-563.
2. K. Linnewiel, H. Ernst, C. Caris-Veyrat, A. Ben-Dor, A. Kampf, H. Salman, M. Danilenko, J. Levy, Y. Sharoni (2009) *Free Radical Biol. Med.*, 47, 659-667.
3. E. Reynaud, G. Aydemir, R. Rühl, O. Dangles, C. Caris-Veyrat (2011) *J. Agric. Food Chem.*, 59, 1457-1463.
4. P. Goupy, E. Reynaud, O. Dangles, C. Caris-Veyrat (2012) *New J. Chem.*, 36, 575-587.

Levure *Saccharomyces cerevisiae* soumise au stress nano-argent :

analyse haute résolution de la composition cellulaire par microspectroscopie infra-rouge

Chercheurs impliqués

C. Saulou^{1,2,*}, C. Maranges¹, M. Mercier-Bonin¹, B. Despax², P. Raynaud², F. Jamme^{3,4}, P. Dumas³, I. Fourquaux⁵

1. UMR 792 ISBP, INRA INSA CNRS, Toulouse, France
2. UMR 5213 LAPLACE, CNRS UPS INPT, Toulouse, France
3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
4. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France
5. CMEAB, Toulouse, France

(*) désormais Enseignant Chercheur UMR 782 GMPA, INRA AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France

Contact

Muriel Mercier-Bonin, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse
muriel.mercier-bonin@insa-toulouse.fr

RÉSUMÉ

Les modifications de la composition cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, après sa mise en contact avec un revêtement antimicrobien contenant du nano-argent, ont été analysées à l'échelle de la cellule unique, par microspectroscopie FTIR sur la ligne de lumière SMIS. Les décalages observés sur le pic amide I indiquent une altération de la structure secondaire des protéines, probablement liée à la transition d'une conformation active à inactive.

ABSTRACT

Changes in the cell composition of *Saccharomyces cerevisiae*, after exposure to antimicrobial nano-silver coating, were assessed for the protein region using Synchrotron FTIR microspectroscopy of single cells on the SMIS beamline. The significant downshift of the amide I peak was indicative of the disordered secondary structures of proteins, probably due to the transition between active and inactive conformations under silver-induced stress conditions.

Contexte

La maîtrise de l'adhésion des microorganismes aux surfaces puis de leur prolifération est généralement considérée comme l'un des enjeux majeurs de la lutte contre les biofilms (*i.e.*, écosystèmes complexes et dynamiques, constitués d'une communauté de micro-organismes, adhérents à une surface réceptrice et englobés dans une matrice extracellulaire). La stratégie préventive développée dans ce travail repose sur l'élaboration par procédé de dépôt plasma de films nanocomposites, constitués d'une matrice organosiliciée dans laquelle sont incluses des nanoparticules d'argent (ou "nano-argent") (Figure 1). L'activité antimicrobienne du revêtement a été démontrée *in vitro* sur la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*, avec un abattement de 1,9 log de la population viable cultivable¹. L'effet observé a pu être attribué au relargage de nanoparticules et/ou d'ions Ag⁺, lié à la dissolution de l'oxyde d'argent formé en périphérie des nanoparticules, au contact du milieu biologique¹.

Objectifs

Pour élucider les mécanismes d'action de l'argent (ionique ou nano-argent), l'analyse *in situ* des modifications de la composition cellulaire a été réalisée chez *S. cerevisiae*, par microspectroscopie FTIR en rayonnement synchrotron, sur la ligne de lumière SMIS. De par sa brillance élevée, le faisceau synchrotron est, en effet, la seule source lumineuse permettant l'analyse microspectroscopique de composés de petite taille, comme les micro-organismes²⁻⁴. Ce travail constitue, à notre connaissance, la première démonstration des potentialités de la micro-spectroscopie FTIR en rayonnement synchrotron pour l'exploration de la composition biochimique des levures, à l'échelle de la cellule unique, ainsi que l'investigation de l'effet de l'argent sur certains composés-clés (protéines, acides nucléiques, polysaccharides).

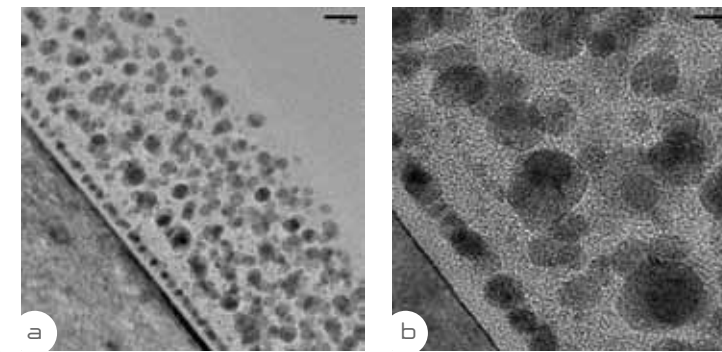


Figure 1 (a) et (b) Photographies en Microscopie Electronique en Transmission du revêtement nanocomposite (a : échelle = 20 nm et b : échelle = 5 nm).

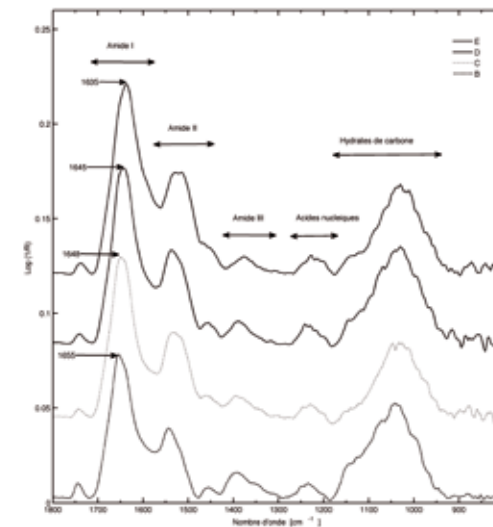


Figure 2 Spectres FTIR bruts des levures *S. cerevisiae* et régions spectrales caractéristiques (1800 – 800 cm⁻¹), pour les échantillons suivants : (B) levures "fraîches", cultivées en milieu YPD gélosé puis resuspendues dans de l'eau déionisée ; (C) levures après 24 h en suspension dans une solution saline (NaCl 0,15 M) ; (D) levures après 24 h de contact avec la matrice organosiliciée en solution saline ; (E) levures après 24 h de contact avec le revêtement nanocomposite en solution saline. La position du pic amide I est indiquée sur la figure. À noter que, par souci de clarté, ne figurent pas les données relatives aux levures après 2 h d'exposition à l'argent ionique (AgNO₃ 2 mM dans eau déionisée).

La comparaison des spectres obtenus avant et après exposition des levures à de l'argent ionique (AgNO₃) montre un décalage d'environ 30 cm⁻¹ du pic à 1655 cm⁻¹ (spectre B), qui passe à 1628 cm⁻¹ (résultats non montrés). L'analyse spectroscopique des levures après contact avec le nano-argent (spectre E) révèle un déplacement du même type, quoique moins marqué (~ 20 cm⁻¹) (Figure 2). Un tel décalage indique une altération de la structure secondaire des protéines, correspondant probablement à la transition d'une conformation active à inactive, induite par l'argent (formes ionique et/ou nanoparticulaire) et ciblée à la fois sur les entités pariétales et cytoplasmiques. Le fonctionnement des enzymes intracellulaires peut alors être perturbé, provoquant une inhibition de certaines voies métaboliques-clés, telles que les mécanismes de défense face au stress oxydant.

CONCLUSION

L'argent, qu'il soit sous forme ionique ou nanoparticulaire, présente un mécanisme d'action général, induisant des altérations au niveau protéique sur l'ensemble de la levure⁵. Cet effet multi-cibles a été confirmé par des observations de l'ultra-structure cellulaire en Microscopie Electronique en Transmission. Face à des enjeux – cognitifs et applicatifs – majeurs et grâce aux développements effectués sur la ligne SMIS, l'approche menée sur *S. cerevisiae* a ensuite été déclinée sur le modèle procaryote *Escherichia coli* soumis au stress argent. Les données spectrales ainsi acquises ont été couplées à la réponse transcriptomique de la bactérie.

Références

1. C. Saulou, B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, A. Seyeux, P. Marcus, J.-N. Audinot, M. Mercier-Bonin (2011) *Plasma Process. Polym.*, DOI: 10.1002/ppap.201100033
2. K. Jilkine, K.M. Gough, R. Julian, S.G.W. Kaminskyj (2008) *J. Inorg. Biochem.* 102, 540-546
3. S.G.W. Kaminskyj, K. Jilkine, A. Szeghalmi, K.M. Gough (2008) *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 1-8
4. A. Szeghalmi, S.G.W. Kaminskyj, K.M. Gough (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1779-1789
5. Saulou C., Jamme F., Maranges C., Fourquaux I., Despax B., Raynaud P., Dumas P., Mercier-Bonin M. (2010). *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 1441-1450

Vers la compréhension de la résistance à la congélation de bactéries lactiques grâce à la microspectroscopie infrarouge haute résolution

Chercheurs impliqués

F. Fonseca¹, S. Passot¹, J. Gautier¹, P. Dumas², F. Jamme^{2,3}

1. UMR 782 GMPA, INRA AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 INRA, Nantes, France

Contact

Fernanda Fonseca, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires Thiverval-Grignon, France
fernanda.fonseca@grignon.inra.fr



RÉSUMÉ

L'état physique des lipides membranaires et des protéines cellulaires de deux populations de bactéries lactiques présentant une résistance différente à la congélation a été caractérisé cellule par cellule en utilisant la microspectroscopie infrarouge de la ligne de lumière SMIS. Les résultats ont permis d'évaluer l'hétérogénéité au sein d'une population bactérienne en termes de composition lipidique et protéique et d'identifier des marqueurs susceptibles d'être associés à une meilleure résistance à la congélation.

ABSTRACT

The physical state of membrane lipids and cell proteins of two populations of lactic acid bacteria exhibiting different freezing resistance has been characterized, cell by cell, using high resolution FTIR at SMIS beamline. This has allowed quantifying the cell heterogeneity in lipid composition and proteins structure and relating the biophysical properties to the freezing resistance.

La membrane des bactéries lactiques apparaît comme la cible principale de phénomènes de dégradation ayant lieu au cours de la congélation. La composition du milieu de fermentation, en modifiant la composition lipidique de la membrane et la synthèse protéique des bactéries lactiques, joue un rôle majeur dans l'amélioration de leur résistance à la congélation. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) se révèle être un outil puissant non invasif permettant la caractérisation *in situ* des modifications des lipides membranaires et de la structure des protéines cellulaires. Compte tenu de la très petite taille des bactéries lactiques, seul le rayonnement infrarouge synchrotron assurant une résolution spectrale de 4 à 6 μm^2 permet la caractérisation biophysique de bactéries individuellement ou d'un nombre réduit de cellules.¹

Deux populations de cellules de *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* CFL1 présentant un état physiologique différent ont été produites par fermentation en utilisant deux milieux de culture différents, l'un à base de MRS et l'autre de lactosérum doux. Les bactéries cultivées dans le milieu MRS présentent une meilleure résistance à la congélation. Les culots bactériens obtenus ont été lavés puis déposés sur des hémisphères en ZnSe de 4 mm de diamètre. Après séchage dans un dessiccateur, ces hémisphères permettant une résolution de 2-3 microns ont été analysés en utilisant le microscope Continuum XL de la ligne de lumière SMIS. Les spectres infrarouge d'environ 50 cellules individualisées ou petits amas de cellules ont été enregistrés.

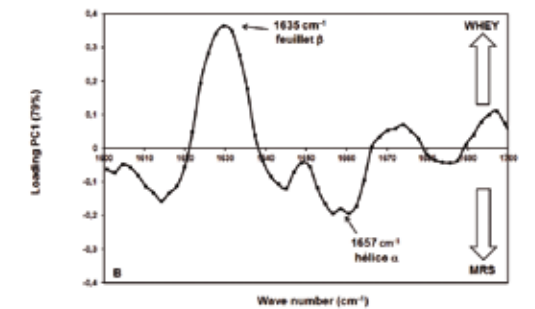
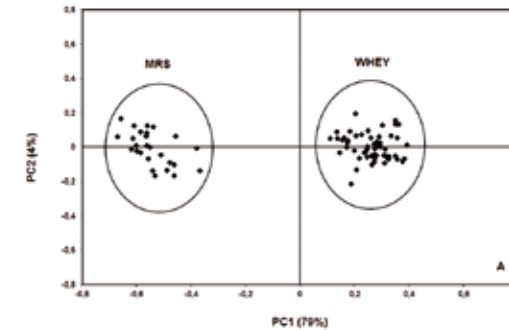


Figure 1 (A) Représentation graphique de la variation de la dérivée seconde des spectres dans la région amide I (1700 – 1600 cm^{-1}) en fonction du milieu de culture, dans le plan 1-2 de l'ACP. La composante 1 (PC1) permet de différencier les cellules sur la base du milieu de culture. (B) Les cellules cultivées dans du lactosérum présentent un décalage significatif du pic ($\sim 30 \text{ cm}^{-1}$) (i.e. plus des structures secondaires en feuillet β en comparaison aux cellules cultivées dans du milieu MRS (i.e. plus de structures secondaires hélice α).

L'analyse statistique multi variée (ACP) de la dérivée seconde des spectres dans la région amide I (Figure 1A) caractéristique des protéines cellulaires montre deux clusters indépendants selon la première composante (PC1), permettant de discriminer les cellules selon le milieu de culture utilisé.

À partir du "loading" (Figure 1B) il apparaît que les cellules cultivées dans du lactosérum présentent des protéines caractérisées par des structures secondaires en feuillet β alors que celles cultivées dans du milieu MRS présentent plus de structures en hélice α . L'ACP de la dérivée seconde des spectres dans la région des groupements CH_2 caractéristiques des lipides membranaires révèle une grande hétérogénéité dans le comportement lipidique des cellules cultivées dans du MRS (Figure 2).

La meilleure résistance à la congélation associée au milieu MRS pourrait être associée à une plus grande proportion de protéines en structure de type hélice α et une plus grande hétérogénéité dans la composition des lipides de membrane.

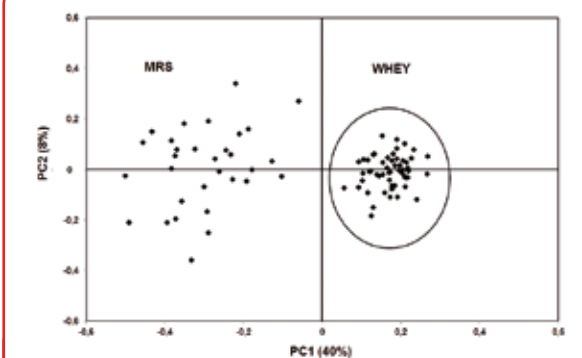


Figure 2 Représentation graphique de la variation de la dérivée seconde des spectres obtenus dans la région 2870 – 2840 cm^{-1} (bande d'élongation symétrique des groupements CH_2 correspondant aux lipides de membrane). Les cellules cultivées dans du MRS ont montré une grande hétérogénéité dans le comportement lipidique, tandis que les cellules cultivées dans du lactosérum doux ont présenté un comportement de cluster plus homogène.

CONCLUSION

Forts de ces premiers résultats très encourageants et grâce à l'acquisition d'une platine de congélation qui sera adaptée au microscope infrarouge de la ligne, nous pourrions avancer sur le développement d'essais en dynamique permettant d'explorer les modifications moléculaires impliquées dans la dégradation des fonctionnalités de cette bactérie lors du procédé de congélation. Par ailleurs, afin de relier le comportement de lipides membranaires à la fluidité de la membrane de chaque cellule, des analyses *in situ* d'imagerie de fluorescence UV avec une résolution latérale élevée, sont prévues sur la ligne DISCO en juin 2012.

Références

1. C. Saulou, F. Jamme, C. Maranges, I. Fourquaux, B. Despax, P. Raynaud, P. Dumas, M. Mercier-Bonin (2010) *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 1441-1450.

Mise en évidence des modifications métaboliques induites par

l'accumulation de lipides dans la levure *S. cerevisiae* par sFTIR sur cellules uniques

Chercheurs impliqués

M. Froissard¹, F. Jamme^{2,3}, J.D. Vindigni¹

1. UMR 1318 Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA AgroParis-Tech, Versailles, France

2. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

3. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

Contact

Marine Froissard, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles
marine.froissard@versailles.inra.fr



RÉSUMÉ

L'utilisation combinée du faisceau synchrotron de la ligne SMIS et d'hémisphère en ZnSe nous a permis d'obtenir des spectres FTIR sur cellules uniques. Nos résultats ont révélé une hétérogénéité du métabolisme cellulaire au sein d'une population issue d'une même souche. Nous avons également observé de fortes modifications entre souches ayant une capacité variable de stockage des lipides neutres.

ABSTRACT

The combination of SMIS beamline synchrotron radiation and ZnSe hemisphere led us to obtain single-cell FTIR spectra. Our results revealed cell metabolism heterogeneity in a population coming from a single clone. We also observed clear modifications between strains exhibiting various capacities in neutral lipid storage.

Dans le contexte actuel d'épuisement des ressources fossiles, d'augmentation du prix du pétrole et de protection de l'environnement, la valorisation énergétique des huiles issues de la biomasse et la chimie verte prennent de l'importance. En effet, ces huiles et leurs dérivés biodégradables présentent un intérêt grandissant en remplacement des produits d'origine fossile. Deux sources sont envisagées, celle des huiles végétales déjà bien implantées, et celle des huiles de microorganismes (algues et levures), actuellement en plein essor. C'est dans ce cadre que se positionnent nos recherches visant à identifier des facteurs influant sur la qualité et la quantité de lipides produits par la levure. Grâce à la modification génétique de *S. cerevisiae* par l'expression de protéines impliquées dans le stockage des huiles chez les plantes, nous avons obtenu des souches capables d'accroître leur capacité de stockage des lipides de réserve. Ces souches apparaissent comme un outil de choix pour évaluer la dynamique du stockage des lipides et son impact sur le métabolisme général des cellules. Grâce à la présence du laboratoire de biologie au sein de SOLEIL, nous avons pu développer un protocole qui permet l'analyse par

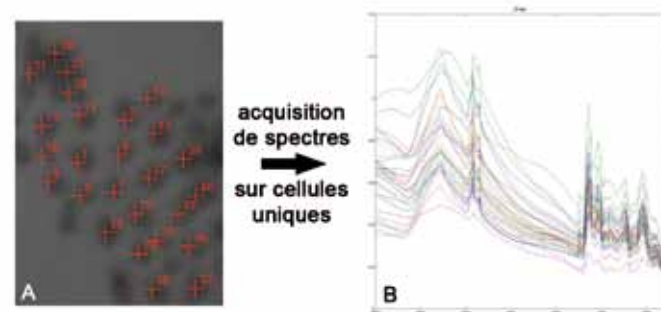


Figure 1 Spectres FTIR sur cellules uniques de *S. cerevisiae* exprimant AtClo1 après 42 heures de culture.
A, image en lumière visible de cellules séchées sur hémisphère de ZnSe.
B, spectres obtenus à partir de cellules d'un même hémisphère.

infrarouge de cellules à différents temps de croissance (1 jour = 18 heures et 2 jours = 42 heures) et récoltées fraîchement. Les cellules ont ainsi pu être prélevées, concentrées par centrifugation puis lavées à l'eau quelques minutes avant les observations. Une goutte de la suspension cellulaire a été séchée sur hémisphère ATR de zinc sélénium (ZnSe) de 4 mm de diamètre.

Les spectres (Figure 1) ont été enregistrés en utilisant le microscope Continuum XL disponible sur la ligne SMIS³ avec une résolution spatiale de 4x4 µm, correspondant à la taille moyenne d'une cellule (Figure1). Nous avons analysé une souche accumulant des lipides de réserve suite à l'expression d'une protéine du corps lipidique d'*A. thaliana*, la caléosine AtClo1, ainsi qu'une souche de référence n'exprimant pas de protéine hétérologue. Un traitement statistique (analyse en

composantes principales, ACP) a été effectué sur l'ensemble des spectres obtenus et a révélé des variations significatives. La large répartition des nuages de points sur la représentation des individus de l'ACP (Figure 2A, population témoin/none ou avec AtClo1/clo) reflète l'hétérogénéité de la composition cellulaire (lipides, protéines, sucres) au sein d'une même population clonale. L'analyse nous montre également que les deux populations ont des compositions cellulaires significativement différentes (Figure 2A, séparation des populations none et clo). On observe dans la population exprimant la protéine AtClo1 une augmentation significative des lipides révélée par des modifications au niveau des bandes de vibration des esters et des CH, mais également une augmentation des phosphates. À l'inverse, il est possible de détecter une diminution du glycogène et des modifications au niveau des protéines (Figure 2B).

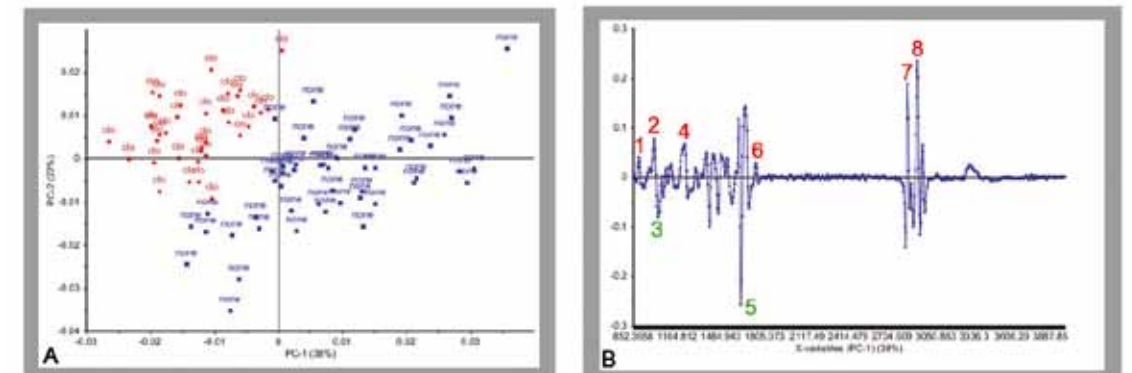


Figure 2 Analyse en composantes principales des spectres obtenus sur les cellules de référence (none) et sur des cellules exprimant AtClo1 (clo) après 42 heures de culture.
A, représentation des individus.
B, variables et corrélations. 1 : 890 cm⁻¹ C-C, C-O acide gras ; 2 : 1008 cm⁻¹ C=C ; 3 : 1032 cm⁻¹ C-O glycogène ; 4 : 1226 cm⁻¹ PO2- ; 5 : 1640 cm⁻¹ amide 1 ; 6 : 1740 cm⁻¹ C=O ester ; 7-8 : 2850, 2930 cm⁻¹ C-H.

CONCLUSION

Avec une résolution spatiale de 4x4 µm, obtenue par le passage de la lumière infrarouge synchrotron au travers d'un hémisphère de ZnSe, nous avons analysé la composition chimique de cellules uniques de *S. cerevisiae*. Nous avons ainsi mis en évidence qu'une augmentation de la teneur en lipides neutres induit d'importantes modifications métaboliques, ce qui prouve que la cellule régule ses pools de carbone. Nous avons observé une corrélation inverse entre teneur en lipides et glycogène. Ces résultats ont permis d'orienter la suite de nos recherches. Nous avons confirmé la corrélation inverse entre lipides de réserve et sucres de réserve par des dosages biochimiques. Nous allons maintenant procéder à des analyses transcriptomiques afin d'identifier les régulateurs et les mécanismes cellulaires mis en jeu lors du stockage des lipides de réserve pour aller vers l'obtention de levures performantes pour des applications biotechnologiques.

Références

1. M. Froissard, S. D'Andréa, C. Boulard, T. Chardot (2009), *FEMS Yeast Res.*, 9, 428-438
2. C. Boulard, M. Froissard. *Techniques de l'Ingénieur*, sous presse.
3. P. Dumas, F. Polack, B. Lagarde, O. Chubar, J.L. Giorgetta, S. Lefrançois (2006) *Infrared Phys. Tech.*, 49, 152-160

Imagerie dynamique de l'imprégnation

en huile de produits frits étudiée en fluorescence UV

Chercheurs impliqués

O. Vitrac¹, J.-M. Vauvre¹, A. Patsioura¹, F. Jamme^{2,3}

1. UMR 1145 GENIAL, INRA AgroParisTech, Massy, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Olivier Vitrac, Ingénierie Procédés Aliments, Massy, France
olivier.vitrac@agroparistech.fr

RÉSUMÉ

La percolation de l'huile a été imagée sur la ligne de lumière DISCO dans des conditions simulées de refroidissement après friture au sein d'un parenchyme de pomme de terre et au sein d'un enrobage sans structure cellulaire. L'imagerie dynamique de la fluorescence UV et visible a permis la mise en évidence non-invasive de l'écoulement biphasique huile/air au sein des structures poreuses étudiées.

La dimension temporelle de la percolation permettra ainsi de valider un modèle tridimensionnel d'imprégnation en huile de produits frits.

ABSTRACT

Oil percolation in potato parenchyma tissues and in batter was imaged on DISCO beamline in simulated conditions of cooling immediately after immersion frying. UV-VIS dynamic imaging enabled the direct and non-invasive study of biphasic flow oil/air within considered porous structures. Adding a temporal dimension will thus contribute to the validation of a 3D percolation model of oil uptake in fried products.

Les produits frits sont très appréciés par les consommateurs mais sont également une source importante de matières grasses. Il a été préalablement montré que l'imprégnation en huile a lieu au cours du refroidissement¹ par adhésion et percolation sous l'action de la pression capillaire et de la dépression créée par la condensation de la vapeur². La caractérisation de la distribution de l'huile en microscopie confocale à balayage laser UV et visible a permis de reconstruire la distribution spatiale de l'huile dans la croûte de frites³. Les deux-tiers de l'huile sont localisés dans la première couche cellulaire endommagée par la coupe, 15 % dans la deuxième couche et le complément dans la troisième couche.

Afin d'élucider la dynamique de la percolation à travers la première et deuxième couche, une méthode de suivi de la perméation en huile dans des conditions de refroidissement simulées a été mise en place sur la ligne DISCO. La méthode permet d'observer littéralement l'imprégnation en huile à l'échelle d'une ou plusieurs cellules, comme si l'observateur était localisé entre le cœur humide et la croûte. Les conditions extrêmes de la friture ont été contournées en équilibrant au préalable une croûte modèle (coupe microtomique de deux couches cellulaires de parenchyme de pomme de terre débarrassées de leur contenu cellulaire) avec de la vapeur surchauffée à la même température (120°C) que celle générée dans des conditions réelles de friture⁴. Parce que la structure cellulaire "modèle" n'a jamais été en contact avec l'huile, elle garde les mêmes propriétés de mouillage que la croûte "réelle", qui est protégée en cours de friture de tout contact avec l'huile par la suppression interne générée par l'ébullition et le film de vapeur qui en résulte. Afin de pouvoir comprendre l'effet de l'agencement de la structure cellulaire, la dynamique de percolation de l'huile est également comparée avec celle obtenue avec l'enrobage d'un produit panné, sans structure cellulaire.

Le montage de mesure placé sur la platine du microscope est décrit sur la Figure 1. Il est important de noter que l'huile et l'échantillon sont maintenus à une même température pendant toute la durée de l'expérience.

La température de 100°C a été retenue au lieu de 120°C du fait du système de régulation mettant en jeu un circuit de refroidissement à eau liquide. Parce que les seules forces motrices sont la pression capillaire et la gravité en présence d'une phase incondensable peu compressible (l'air), la dynamique de percolation est ralentie par rapport aux conditions réelles de refroidissement. Malgré ces différences, il est supposé que les chemins de percolation et les principaux mécanismes restent inchangés. La structure cellulaire et l'imprégnation en huile, marquée avec le 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène, sont imagées simultanément en configuration d'épi-

fluorescence à partir d'une excitation à 295 nm. Les résultats montrent une dynamique hétérogène dans l'espace et dans le temps en présence d'une structure cellulaire (Figure 2a). L'interprétation correspondante est détaillée sur la Figure 3 à l'échelle cellulaire et à l'échelle du tissu entier (Figure 4). L'imprégnation est très rapide dans la première couche cellulaire et ralentie dans la deuxième du fait de la viscosité de l'huile et la présence d'un écoulement diphasique (air+huile). En l'absence de structure cellulaire, la percolation est hétérogène mais régulière dans le temps.

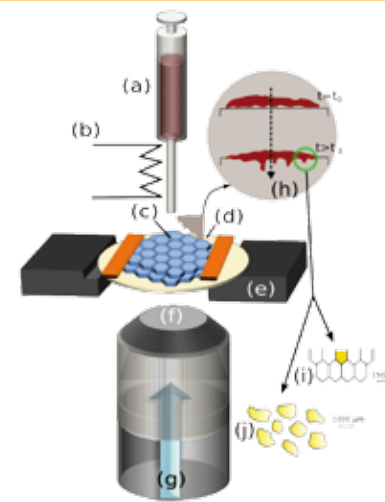


Figure 1 Configuration du dispositif sur la platine du microscope TELEMOS. (a) micro-seringue permettant de déposer un volume d'huile contrôlé ; (b) aiguille chauffée ; (c) échantillon équilibré au préalable avec de la vapeur d'eau surchauffée ; (d) surplaque chauffée ; (e) objectif (x10 ou x40) ; (f) objectif (x10 ou x40) ; (g) rayonnement synchrotron ; (h) percolation dans le plan vertical ; (i) parenchyme de pomme de terre (vitreux dans les conditions de mesure) ; ou (j) enrobage avec panure (idem).

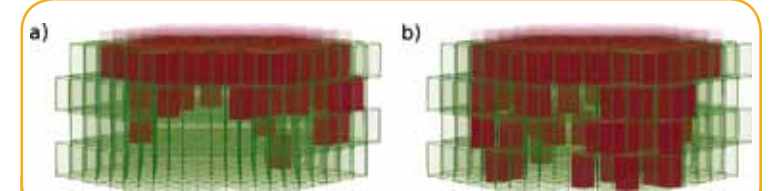


Figure 2 Cinétique en fausse couleur de la percolation (le temps est compté positivement à partir du dépôt du film d'huile en surface) : a) remplissage d'une cellule de parenchyme ; b) percolation au sein d'un enrobage.

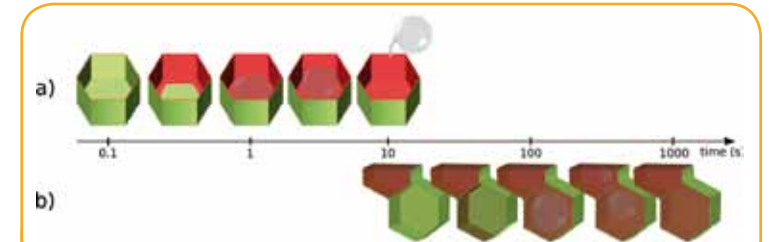


Figure 3 Interprétation de la percolation biphasique huile (en rouge)/air (en gris) à l'échelle cellulaire : a) cellule tronquée en contact avec un film d'huile ; b) migration de l'huile entre les couches 1 et 2.

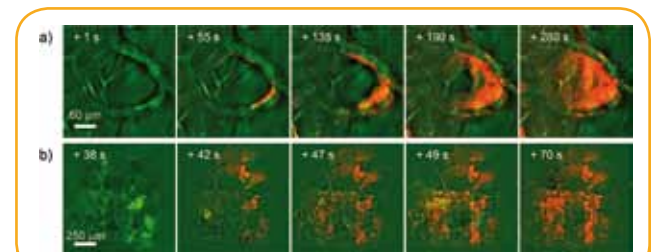


Figure 4 Reproduction des observations à l'aide d'un modèle de percolation tridimensionnel en cours de paramétrisation. a) profil d'imprégnation en huile d'un parenchyme peu endommagé ; b) même profil pour un parenchyme endommagé par des prétraitements (ex. séchage, congélation).

CONCLUSION

La méthodologie développée valide les principes d'une utilisation de la microscopie de fluorescence (dispositif TELEMOS de la ligne DISCO) pour l'étude de phénomènes dynamiques, y compris à haute température. La fluorescence naturelle dans le domaine UV permet en particulier d'imager simultanément et rapidement de nombreux constituants pariétaux et cellulaires avec une bonne sensibilité et résolution. Ces travaux préliminaires préparent l'étude directe de la percolation en huile en présence d'une ébullition résiduelle et d'une condensation superficielle.

Références

1. G. Ufheil, F. Escher (1996) *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.*, 29, 640-644.
2. O. Vitrac, G. Trystram, A.L. Raoult-Wack (2000) *Eur. J. Lipid Sci. And Technol.*, 102, 529-538.
3. N. Achir, O. Vitrac, G. Trystram (2010), *Food Res. Int.*, 43, 307-314.
4. N. Achir, O. Vitrac, G. Trystram (2008), *Chem. Eng. Process.*, 47, 1953-1967.

Mécanismes moléculaires de diffusion de substances de type additifs dans les matrices plastiques étudiés par imagerie de fluorescence

application à la sécurité sanitaire des emballages

Chercheurs impliqués

O. Vitrac¹, X. Fang¹, F. Jamme^{2,3}, M. Refregiers²

1. UMR 1145 GENIAL, INRA AgroParisTech, Massy, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

Olivier Vitrac, Ingénierie Procédés Aliments Massy, France
olivier.vitrac@agroparistech.fr

RÉSUMÉ

Les coefficients de diffusion de molécules homologues ont été mesurés dans des polymères semi-cristallins par une méthode à profil de concentration utilisant la microspectroscopie de fluorescence sur la ligne de lumière DISCO. Ces résultats ont permis de mettre en évidence des mécanismes universels de translation de molécules de type additif dans des matrices thermoplastiques. Ceux-ci pourront être utilisés pour mieux approcher l'exposition des consommateurs aux substances issues des matériaux au contact des aliments ou pour concevoir des emballages alimentaires plus sûrs.

ABSTRACT

Diffusion coefficients of homologous molecules were measured in semi-crystalline polymers by means of a concentration profile method involving fluorescence microspectroscopy on DISCO beamline. These results highlighted some universal mechanisms of the translation of additive-like molecules in thermoplastics, which will be used to improve estimates of consumer exposure to substances originating from contact materials or for the design of safer food packaging.

La sécurité sanitaire des matériaux au contact des aliments fait aujourd'hui l'objet d'une controverse scientifique importante. Une manière d'objectiver le risque réel est de quantifier le niveau de contamination des aliments par les matériaux et ainsi contribuer à une évaluation de l'exposition réelle des consommateurs en fonction des pratiques industrielles et domestiques. Des méthodes de modélisation avancée ont été proposées pour y parvenir¹ mais elles requièrent une estimation réaliste des coefficients de diffusion (D) dans les conditions thermodynamiques d'usage, or ils ne sont disponibles que pour un nombre limité de substances et de matrices polymères. La simulation de la dynamique moléculaire est une alternative pour les polymères amorphes ou fondus de polymères² mais elle échoue à prédire les bonnes dépendances à la masse moléculaire (M) dans les matrices semi-cristallines courantes.

L'obtention de lois d'échelle de référence du type $D_{(T,M)} \propto M^{-\alpha(T)}$ à partir de molécules homologues est la première étape nécessaire à la construction d'un cadre prédictif pour les coefficients de diffusion dans les matrices thermoplastiques. Ces données pourront en effet être utilisées pour extrapoler les coefficients de diffusion de molécules de type additifs (ex. antioxydants de type phénols ou sulfites encombrés) ou résidus (ex. amines aromatiques). Dans cette logique, les coefficients de diffusion de plusieurs séries de molécules aromatiques homologues linéaires, ramifiées, rigides ou flexibles présentes à l'état de trace ont été mesurés sur la ligne DISCO par une méthode à profil (Figure 1). Les concentrations à l'état de trace ont été déterminées dans des matrices linéaires (i.e. non aromatiques) de polymères par émission de fluorescence en présence d'une excitation dans la gamme 285 – 295 nm. Un logiciel spécifique a été développé pour i) éliminer les biais (identification des lignes de base, recalage des positions, figures de diffraction) et ii) l'identification automatique des coefficients de diffusion par comparaison avec un modèle numérique.

Les résultats ont permis d'observer des comportements soupçonnés mais jamais mis en évidence. La dépendance à la masse moléculaire pour des oligophényles (degré de polymérisation de 2 à 4) est très importante, avec des valeurs de α supérieures 5 qui augmentent quand la température diminue (Figure 2a). Une conséquence pratique est que l'énergie d'activation (E_a) dépend de n et ce de manière non intuitive : l'énergie d'activation est plus importante quand n est impair que quand n est pair (Figure 2b). En remarquant que l'énergie d'activation nous renseigne sur l'échelle de temps pour atteindre des déplacements indépendants du centre de masse du diffusant, la dépendance non-monotone de E_a avec n démontre le

rôle des déplacements corrélés (positivement ou négativement) sur les valeurs de D . Les effets géométriques associés à la distance entre deux cycles aromatiques sont présentés sur la Figure 3. L'ajout d'un carbone entre deux cycles aromatiques entraîne une réduction de coefficient de diffusion d'un facteur trois. Plus la distance entre les deux cycles aromatiques est grande, plus la probabilité d'obtenir un déplacement concerté (corrélations positives des centres de masse des cycles aromatiques) est improbable. Cette réduction de probabilité est une caractéristique du diffusant et est indépendante du polymère considéré et de l'écart à la température de la transition vitreuse.

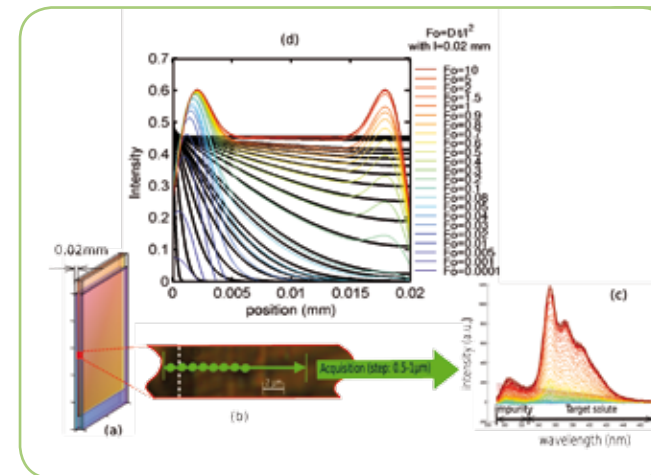


Figure 1 Principe d'identification des coefficients de diffusion par la mesure des profils de concentration par microspectroscopie de fluorescence : a) la diffusion est amorcée en plaçant un matériau formulé (qui contient la substance à étudier) entre deux couches de matériau vierge de même type ; b) échantillonnage le long de la section (après découpe microtomique) ; c) spectres d'émission de fluorescence ; d) profils de concentration théoriques (noir) et même profils après prise en compte de la diffraction (couleur) pour différents temps de contact adimensionnés (nombres de Fourier).

CONCLUSION

Les lois d'échelle mises en évidence pour des molécules de taille moyenne (molécules non-enchevêtrées et ne ressemblant pas au monomère du polymère hôte) ne correspondent à aucun mécanisme de diffusion connu (Stokes-Einstein, Rouse, reptation...). Pour des diffusants semi-rigides, les lois sont imposées par la géométrie du diffusant plutôt que par les propriétés de la matrice polymère (densité, cristallinité, température de transition vitreuse).

Ces résultats suggèrent qu'il serait possible de concevoir des molécules actives (ex. antioxydant) avec des propriétés de mobilité contrôlées. Des applications sont attendues pour la conception d'emballages plus inertes ou de matériaux à vieillissement maîtrisé.

Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence l'intérêt de la spectroscopie de fluorescence UV couplée à la microscopie (dispositif POLYPHEME) pour l'identification et la quantification de substances aromatiques arbitraires dans des matrices semi-cristallines semi-transparentes présentes à l'état de traces (<100 mg.kg⁻¹). Les développements proposés peuvent être utilisés pour la mesure de coefficients de diffusion entre 10⁻¹⁸ et 10⁻¹² m².s⁻¹ dans les solides.

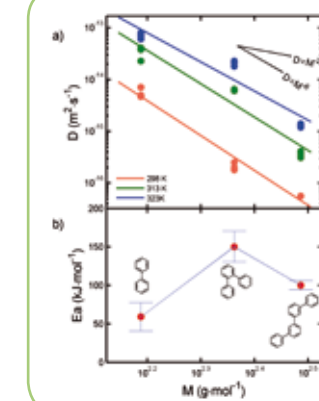


Figure 2 a) Coefficient de diffusion d'oligophényles ($n=2,3,4$) dans un polypropylène (cristallinité = 30 %) et b) énergie d'activation correspondante.

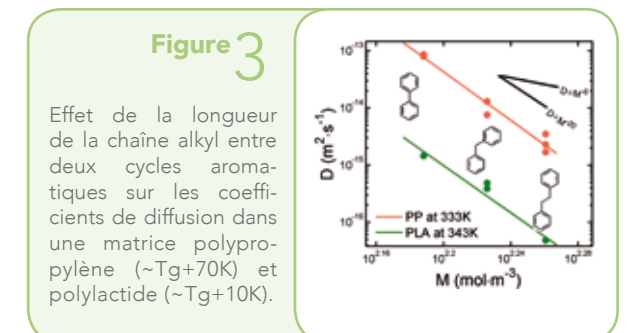


Figure 3 Effet de la longueur de la chaîne alkyl entre deux cycles aromatiques sur les coefficients de diffusion dans une matrice polypropylène (~T_g+70K) et polylactide (~T_g+10K).

Références

- O. Vitrac, M. Hayert (2005) *AIChE J.*, 51, 1080-1095.
- M. Durand, H. Meyer, O. Benzerara, J. Baschnagel, O. Vitrac (2010) *J. Chem. Phys.*, 132, 194902-194911.

Orientation macromoléculaire déterminée par microspectroscopie infrarouge dans les matériaux à mémoire de forme en amidon

Chercheurs impliqués

A. Buléon¹, L. Chaunier¹, P. Dumas², F. Jamme^{2,3}, D. Lourdin¹, C. Véchambre¹

1. UR 1268 BIA, INRA, Nantes, France

2. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

3. UAR 1008 CEPIA, INRA, France

Contact

Denis Lourdin, Biopolymères Interactions Assemblages Nantes
denis.lourdin@nantes.inra.fr



Les polymères à "mémoire de forme" sont capables de changer irréversiblement d'une forme temporaire en une autre forme dite permanente lorsqu'ils sont chauffés à une certaine température¹. Nous avons montré qu'il était possible de réaliser des matériaux à mémoire de forme en amidon, stimulables par chauffage mais également par augmentation de l'humidité. Les applications envisagées pourraient être des dispositifs médicaux implantables et résorbables, des capteurs (température ou humidité) ou des produits céréaliers alimentaires.

L'effet mémoire de forme combine les propriétés d'élasticité entropique de l'état caoutchouteux et la nature métastable de l'état vitreux. Les mécanismes moléculaires reposeraient sur la co-existence de domaines macromoléculaires souples au dessus de leur température de transition vitreuse (Tg) et de points de réticulation chimique ou physique. La forme temporaire est obtenue par déformation mécanique au dessus de la Tg et en dessous de la température de disparition des points de réticulation. Elle est ensuite figée au cours d'un refroidissement rapide. Un chauffage ultérieur au dessus de Tg va redonner de la mobilité aux segments orientés qui vont agir comme des ressorts, rappelés à la forme permanente par les points de réticulation. L'objectif de ces travaux est d'identifier les éléments de structure de l'amidon à l'origine de l'effet mémoire de forme afin d'optimiser le choix de la matière première et son histoire thermomécanique en fonction de l'application visée.

Les matériaux sont obtenus par extrusion d'amidon de pomme de terre dans des conditions classiques de température (120 °C) et d'hydratation (26 %). À l'issue de cette transformation l'amidon est à l'état amorphe vitreux. Les matériaux contraints (forme temporaire) sont ensuite obtenus par thermomoulage au dessus de leur Tg en appliquant une déformation uniaxiale de 400 %. Le refroidissement sous contrainte induit des contraintes résiduelles qui génèrent des phénomènes de biréfringence en lumière polarisée (Figure 1).

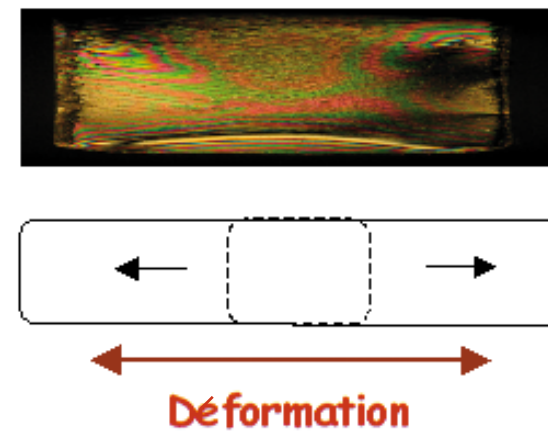


Figure 1 Visualisation des contraintes résiduelles en lumière polarisée au sein d'un échantillon amorphe vitreux sous forme temporaire.

Les matériaux non contraints (forme permanente) sont obtenus avant le thermomoulage ou après recouvrance de forme, par relaxation en humidité ou en température après le thermomoulage. Ces échantillons ont été étudiés par microspectroscopie infrarouge en réflexion afin d'obtenir des informations sur la conformation des macromolécules et leur orientation en utilisant la polarisation naturelle du faisceau synchrotron. Une cartographie d'une centaine de points par échantillon a été établie. Sur chaque point (12x12 µm²), un spectre parallèle (PAR) puis perpendiculaire (PER) à la direction de déformation ont été enregistrés.

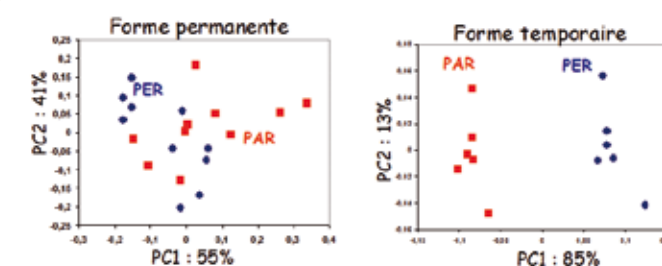


Figure 2 Discrimination des spectres PER et PAR obtenus sur des échantillons sous la forme permanente et temporaire.

Les couples de spectres obtenus ont été triés par une analyse en composantes principales (ACP) (Figure 2). Aucune discrimination n'est obtenue entre les spectres PAR et PER des échantillons non contraints, ce qui est caractéristique d'une structure isotrope. Pour les échantillons contraints l'analyse statistique révèle des différences entre les spectres obtenus parallèlement et perpendiculairement à l'axe de déformation. Dans ce cas, les spectres PAR sont bien discriminés des spectres PER, par la première composante de l'ACP qui représente 85 % de la variance totale entre les spectres. Ces échantillons contraints ont donc une structure anisotrope et l'existence d'une orientation moléculaire observée également par diffusion des rayons X aux grands angles est confirmée. Le tracé du premier vecteur propre de l'ACP (Figure 3), montre que les spectres PAR sont principalement caractérisés par des pics d'absorbance à 1083 et 1023 cm⁻¹ alors que les spectres PER sont caractérisés par des pics à 1150, 1049 et 987 cm⁻¹. Ces pics peuvent être associés à des éléments structuraux de l'amidon sur la base de travaux antérieurs².

Ainsi, les éléments orientés parallèlement à la déformation appartiennent à des domaines amorphes. À l'opposé, ce sont des ordres locaux tels que des fragments de simples ou de doubles hélices qui apparaissent lorsque le faisceau est perpendiculaire à l'axe de déformation. Cette organisation locale, appelée paracristallinité, pourrait constituer les nœuds de réticulation nécessaires aux mécanismes moléculaires décrits précédemment.

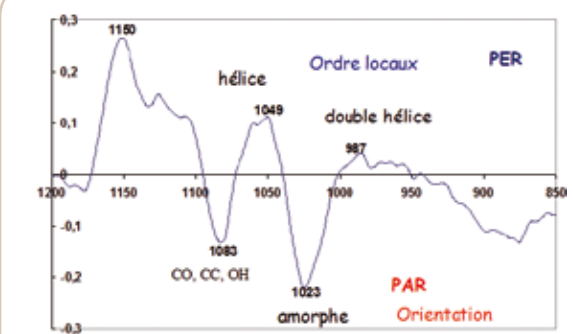


Figure 3 Tracé du premier vecteur propre de l'ACP sur les spectres IR de la forme temporaire révélant les bandes associées aux structures parallèles et perpendiculaires au plan de polarisation du faisceau infrarouge.

RÉSUMÉ

L'anisotropie de structure à l'origine des contraintes résiduelles impliquées dans l'effet mémoire de forme de l'amidon a été étudiée par micro-spectroscopie infrarouge polarisée sur la ligne de lumière SMIS. Les résultats démontrent clairement qu'il y a une orientation des macromolécules à l'état amorphe, dans la direction de déformation. L'analyse statistique des spectres infrarouges montre également qu'il y a une orientation de domaines organisés à une échelle très locale ou faiblement cristallins, perpendiculairement à l'axe de déformation des échantillons.

ABSTRACT

The structural anisotropy which originates residual stress in shape memory starch materials has been studied by synchrotron infrared polarized microspectroscopy on SMIS beamline. Macromolecular orientation in the deformation direction is clearly demonstrated. Statistical analysis shows local orders or crystals perpendicular to the deformation direction.

CONCLUSION

La microspectroscopie infrarouge sur source synchrotron a permis de montrer pour la première fois une orientation moléculaire dans un matériau biopolymère³ à mémoire de forme. Cette orientation qui concerne essentiellement les domaines amorphes de l'amidon coexiste avec des ordres locaux tels que des simples ou doubles hélices qui ne sont pas détectés par les techniques classiques de diffusion des rayons X.

Références

1. A. Lendlein, S. Kelch (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2034-2057.
2. P. Bernazzani, C. Chapados, G. Delmas (2000) *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.* 38, 1662-1677.
3. C. Véchambre, A. Buleon, L. Chaunier, F. Jamme, D. Lourdin (2010) *Macromolecules* 43, 9854-9858

SMIS

Spectroscopie et Microscopie Infrarouge utilisant le rayonnement Synchrotron

Chercheurs impliqués

F. Jamme^{1,2}, C. Sandt¹, J. Frederick¹, S. Lefrançois¹ et P. Dumas¹

1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France
2. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France

Contact

Frédéric Jamme et Paul Dumas, Synchrotron SOLEIL, Gif sur Yvette, France
jamme@synchrotron-soleil.fr
dumas@synchrotron-soleil.fr



RÉSUMÉ

La ligne de lumière SMIS du synchrotron SOLEIL est ouverte aux utilisateurs depuis janvier 2008. De nombreux chercheurs de l'INRA ont pu exploiter les caractéristiques de cette ligne, en particulier la brillance élevée de la source infrarouge (IR) issue du rayonnement synchrotron. Différents environnements d'échantillons ont été développés et mis à disposition auprès des utilisateurs INRA sur les microscopes disponibles.

ABSTRACT

The SMIS beamline is open to users since January 2008. Thanks to the infrared synchrotron brightness, a large number of INRA projects have been successfully carried out. Various sample environments have been developed and adapted to the infrared (IR) microscopes.

Microscopie Synchrotron Infrarouge

Un essor important des applications de la microscopie IR utilisant une source synchrotron a eu lieu au cours des dix dernières années, en particulier dans plusieurs domaines scientifiques (biologie, sciences de la terre et de l'environnement, chimie, matière molle, archéologie, matériaux dans des conditions extrêmes). Les facteurs essentiels de cet essor sont le gain en résolution spatiale (proche de la limite de diffraction) et la très bonne qualité spectrale (signal sur bruit) qui ouvrent des perspectives analytiques dans le domaine subcellulaire. D'un point de vue plus quantitatif, la brillance du faisceau synchrotron IR est de deux ordres de grandeur supérieur à celui d'une source thermique équipant les spectromètres de laboratoire. Malgré le flux de photons inférieur délivré par le rayonnement synchrotron, la densité de photons focalisés a permis des avancées marquantes dans de nombreux domaines, en particulier en biologie. À ce jour, 23 lignes de lumière IR sont soit opérationnelles, soit en phase de construction dans le monde.

La ligne de lumière SMIS

La ligne de lumière SMIS du Synchrotron SOLEIL utilise un aimant de courbure pour extraire deux types de radiations IR : champ constant (BM) et bord de dipôle (ER). Ces deux modes d'émission sont équivalents, offrant approximativement les mêmes flux et brillance, mais des propriétés de polarisation différentes. Sur la ligne SMIS, ces deux types d'émission ont été séparés afin de permettre l'utilisation simultanée de cette source sur deux postes expérimentaux, équipés chacun d'un microscope spécifique. La stabilité du faisceau synchrotron, en position et temporelle (plusieurs jours), permet d'enregistrer de longues acquisitions et offre un grand confort d'utilisation.¹⁻³

Gamme spectrale

Afin d'étendre la gamme d'énergie accessible pour ces analyses, plusieurs détecteurs sont disponibles. En utilisant une combinaison de différents détecteurs

(MCT, Bolomètre et Cu-Ge) la ligne de lumière SMIS couvre une très large gamme spectrale (100-8000 cm⁻¹). Par ailleurs, afin de permettre une grande flexibilité dans l'échantillonnage, plusieurs objectifs de mesure sont disponibles (transmission, réflexion, réflexion totale atténuée, incidence rasante).

Équipement et environnement d'échantillons

Depuis 2010, la ligne de lumière SMIS possède 4 microscopes IR et un microscope Raman. En effet, devant la forte demande de temps de faisceau, une branche de la ligne SMIS a été dédiée à la biologie, des microscopes supplémentaires ont été installés et un microscope Raman est maintenant disponible pour les utilisateurs.

Platine de chauffage et refroidissement

Cette platine de haute précision et stabilité (FTIR600, Linkam, GB) permet des mesures IR en réflexion et transmission sur une large gamme de température (-196 à 600 °C). Contrôlée par ordinateur, il est possible de réaliser différentes cinétiques jusqu'à 100 °C/min et rampes de température. L'atmosphère contrôlée sous flux d'azote permet d'éviter la formation de vapeur d'eau à très basse température.

Platine d'étirement INRA/SOLEIL

La polarisation naturelle du faisceau IR extraite sur la première branche de la ligne (émission à champ constant) permet de réaliser des études de dichroïsme IR. Ainsi, une platine d'étirement (TST 350, Linkam, GB) a été adaptée et mise en

place sous le microscope IR. Cette platine permet d'enregistrer des spectres IR, *in situ*, en contrôlant le déplacement (jusqu'à 80 mm), la force (de 0 à 200 N) et la température (de -196 °C à 350 °C) de l'échantillon. Cette platine a été utilisée pour l'étude de l'amidon à mémoire de forme⁴.

Platine de congélation INRA/SOLEIL

Cette platine (THMS350V, Linkam, GB) a été spécialement conçue pour réaliser des mesures à basse température sous atmosphère contrôlée. Il est possible ainsi de réaliser des expériences en température sous atmosphère et pression (10⁻³ mbar) contrôlées. Un projet sur l'étude des suspensions de bactéries lactiques concentrées est en cours de réalisation (collaboration INRA GMPIA).

Microscope à grande distance de travail

Pour des environnements d'échantillon de grande taille, les objectifs commerciaux ont une distance frontale trop courte : 15 mm pour l'objectif x15 et 9 mm pour l'objectif x32. Ainsi, un microscope a été construit et mis en place sur la ligne SMIS. Ce microscope d'un grandissement de x15 offre une distance frontale de 47 mm, avec une ouverture numérique de 0,5. Le système mécanique qui permet le maintien des deux miroirs sphériques et autorise tous les mouvements nécessaires à l'alignement ont été conçus à SOLEIL par Stéphane Lefrançois (SMIS) en étroite collaboration avec le groupe Optique. Le microscope est capable de fonctionner en réflexion et en transmission ainsi que d'effectuer une détection dans l'IR moyen et lointain (avec un détecteur MCT de 50 microns et deux bolomètres).



Figure 1 La ligne de lumière SMIS

CONCLUSION

La ligne de lumière SMIS offre, sur une large gamme spectrale IR, une résolution spatiale à la limite de diffraction et un très bon signal sur bruit⁵. Les développements réalisés depuis son ouverture permettent d'étudier de nombreux échantillons dans diverses conditions expérimentales (température, vide, haute pression).

Références

1. F. Jamme, P. Robert, B. Bouchet, L. Saulnier, P. Dumas, F. Guillon (2008) *Applied Spectroscopy* 62, 895-900.
2. C. Saulou, F. Jamme, C. Maranges, I. Fourquaux, B. Despax, P. Raynaud, P. Dumas, M. Mercier-Bonin (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1441-1450.
3. P. Robert, F. Jamme, C. Barron, B. Bouchet, L. Saulnier, P. Dumas, F. Guillon (2011) *Planta* 233, 393-406.
4. C. Véchambre, A. Buléon, L. Chaunier, F. Jamme, D. Lourdin (2010) *Macromolecules* 43, 9854-9858.
5. P. Dumas, F. Polack, B. Lagarde, O. Chubar, J.-L. Giorgetta, S. Lefrançois (2006) *Infrared Physics & Technology* 49, 152-160.

La ligne de lumière DISCO, de sa conception à son exploitation

Chercheurs impliqués

A. Giuliani^{1,2}, F. Jamme^{1,2}, F. Wien¹, V. Rouam¹, M. Réfrégiers¹

1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

2. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

giuliani@synchrotron-soleil.fr
refregiers@synchrotron-soleil.fr



RÉSUMÉ

La ligne de lumière DISCO possède trois stations expérimentales utilisant la portion visible - ultraviolette du rayonnement synchrotron. En plus de la station d'imagerie, elle comprend une station de dichroïsme circulaire et une station d'irradiation. Cette dernière peut recevoir un système de spectrométrie de masse après photoionisation à pression atmosphérique.

ABSTRACT

The DISCO beamline possesses three experimental stations that use the visible - ultraviolet part of the synchrotron radiation. In addition to the Imaging end station, the beamline also holds a circular dichroism station and an irradiation one. The latter may be coupled to a mass spectrometry system allowing atmospheric pressure photoionisation.

La ligne DISCO est l'une des 27 lignes de lumières du Synchrotron SOLEIL.¹ Elle est assez unique en son genre par plusieurs aspects. Tout d'abord elle est une des rares lignes de lumière à utiliser la portion visible et ultra-violette de rayonnement synchrotron. DISCO fait ainsi le lien entre les lignes exploitant l'infrarouge (IR) d'une part, et les lignes dédiées aux ultraviolets (UV et aux X-mous) d'autre part. DISCO est une ligne sur aimant de courbure. De façon à maximiser le flux de photons entre 1 et 20 eV, une partie importante de la nappe de photons est prélevée, de façon similaire aux lignes IR. En raison de la divergence du faisceau de photons, un système de miroirs a été installé près de la source pour focaliser le faisceau. La puissance émise par la source possède une distribution selon l'axe vertical qui dépend de la longueur d'onde. Les rayonnements énergétiques qui portent la majorité de la puissance sont émis très près du plan de l'orbite des électrons. Ainsi, en positionnant un absorbeur refroidi exactement dans le plan de l'orbite, il est possible d'occulter ces rayonnements indésirés et d'éviter d'y exposer les premiers miroirs. Le faisceau de photons produit par DISCO est donc séparé en deux nappes.

La figure 1a représente le montage optique et la figure 1b un plan de la ligne. En aval des deux premiers miroirs M1 et M2, un autre couple de miroirs (M3, M4) dévie le faisceau horizontalement, vers un miroir de prélèvement (M51), qui envoie un quart du faisceau dans la branche d'imagerie (CX3 sur la figure 1). Les trois quarts restant de la nappe sont envoyés sur un monochromateur, lequel alimente les stations expérimentales, CX2 et CX1 sur la figure 1. L'une de ces stations est dédiée aux analyses par dichroïsme circulaire par absorption du rayonnement synchrotron (SRCD), et l'autre station est

une branche d'irradiation à pression atmosphérique appelée APEX. DISCO possède donc trois stations expérimentales, dont deux fonctionnent simultanément.

Station d'imagerie

Les équipements disponibles sur la station d'imagerie sont décrits en détail page 75 dans l'article intitulé "Imagerie sur la ligne de lumière DISCO (Dichroism, Imaging and mass Spectrometry for Chemical and biological systems)"².

La station de mesure du dichroïsme circulaire (SRCD)

Un réseau en incidence normale délivre un rayonnement monochromatique compris entre 600 et 125 nm avec un pouvoir de résolution R entre 300 et 120 et pour un flux de photon d'environ 2x10¹⁰ photons/s. Le faisceau issu du monochromateur, et sélectionné par un système de fentes réglable, passe à travers un polariseur linéaire et est polarisé par un modulateur. La détection est assurée par un tube photomultiplicateur. Le système de porte-échantillon est monté sur un système de tiroirs échangeables, ce qui permet de changer rapidement de configuration. La chambre comporte des entrées pour permettre une activation de l'échantillon par laser ou encore un diagnostic additionnel. Un porte-échantillon permet des chargements manuels avec des cellules en quartz ou CaF₂ de trajets optiques compris entre 2 µm et quelques mm. Pour des applications nécessitant un haut débit d'échantillons, un système couplé à un passeur d'échantillons est disponible. Enfin, un système de porte-échantillon tournant peut être utilisé, par exemple pour des études de dichroïsme sur des échantillons orientés. La chambre ainsi qu'un des tiroirs sont visibles sur la figure 2.



Figure 2 Photographie de la chambre expérimentale de SRCD.

La branche APEX

Cette branche a été conçue pour délivrer un rayonnement UV entre 4 et 20 eV à la pression atmosphérique. Afin de couvrir ce domaine d'énergie de photons, un système de pompage différentiel, visible sur la figure 3, a été installé.³ Le principe consiste à réduire la pression par des systèmes de pompage appropriés à travers quatre étages, afin d'obtenir une pression suffisamment faible et compatible avec l'ultra-haut vide de la ligne de lumière. Un gaz rideau transparent au rayonnement balaye l'orifice d'entrée du pompage et transporte les photons jusqu'au dispositif expérimental. Ce port est ouvert et reçoit les dispositifs amenés par les utilisateurs, comme des réacteurs photochimiques par exemple. Une source de photoionisation à pression atmosphérique (APPI) a été modifiée afin de remplacer la lampe UV du montage initial par le rayonnement disponible sur la ligne DISCO.⁴ Le développement de ces sources d'ions remonte au début des années 2000.^{5,6} Elles ont été développées pour accéder à l'ionisation de composés très hydrophobes. Le couplage avec la ligne de lumière tire parti de l'accordabilité du rayonnement synchrotron.⁴ Notamment, ce montage permet de mesurer les énergies d'ionisation pour des composés non volatils ou fragiles. L'analyse structurale de molécules bio-organiques par APPI est également facilitée par la gamme d'énergie de photons accessible.

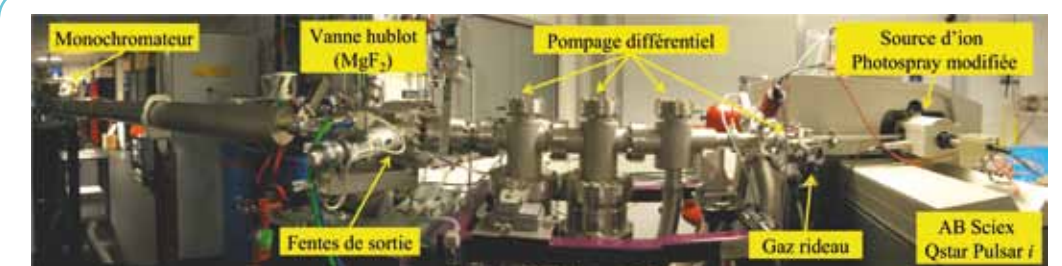


Figure 3 Photographie panoramique de la branche APEX avec le dispositif de photoionisation à pression atmosphérique.

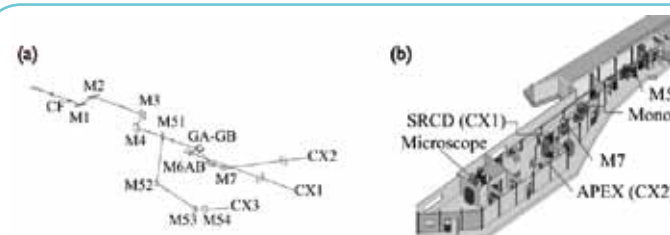
CONCLUSION

DISCO est une ligne de lumière versatile, dédiée à la biologie et à la chimie. Elle couvre un domaine allant du visible au VUV permettant des spectroscopies d'absorption, de dichroïsme circulaire et linéaire, de fluorescence et de photoionisation.

Références

1. A. Giuliani et al. (2009) J. Synchrotron Rad. 16, 835-841
2. F. Jamme et al. (2010) Microsc. Microanal. 16, 507-514
3. A. Giuliani et al. (2011) J. Synchrotron Rad. 18, 546-549
4. A. Giuliani et al. (2011), Nucl. Instr. Meth. B, doi:10.1016/j.nimb.2011.10.038
5. D. B. Robb et al. (2000), Anal. Chem. 72, 3653-3659
6. J.A. Syage and M.D. Evans (2001), Spectroscopy 16, 14-21

Figure 1 (a) Schéma optique de la ligne DISCO, comprenant les éléments optiques et leur distance à la source.
(b) Plan d'installation de la ligne.



Imagerie sur la ligne de lumière DISCO

Dichroism, Imaging and mass Spectrometry for Chemical and biological systems

Chercheurs impliqués

F. Jamme^{1,2}, S. Kascakova¹, S. Villette¹, A. Giuliani^{1,2}, V. Rouam¹, F. Wien¹, B. Lagarde¹ et M. Réfrégiers¹

1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

2. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France

Contact

Frédéric Jamme & Matthieu Réfrégiers, Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

jamme@synchrotron-soleil.fr
refregiers@synchrotron-soleil.fr



RÉSUMÉ

La ligne de lumière DISCO du Synchrotron SOLEIL est ouverte aux utilisateurs depuis septembre 2009. La branche Imagerie utilise le domaine de l'ultraviolet lointain (DUV) pour suivre sans aucun marquage les molécules auto-fluorescentes dans les cellules et tissus. Les développements réalisés en collaboration avec INRA sont présentés.

ABSTRACT

The DISCO beamline is open to users since September 2009. The imaging branch uses the deep ultraviolet (DUV) range to probe the intrinsic fluorescence biomolecules without the need of specific external probes. Numerous developments in collaboration with INRA are presented.

Microscopie Synchrotron en UltraViolet Lointain (DUV)

Certains composants des tissus vivants, comme l'acide aminé tryptophane, le collagène ou les porphyrines (l'un des constituants de l'hémoglobine) ont la propriété d'émettre de la fluorescence lorsqu'ils sont excités par un rayonnement UV, dans le domaine de longueurs d'onde inférieures à 350 nm – on parle alors d'ultraviolet lointain (DUV). De telles molécules peuvent être utilisées comme sondes, par exemple pour suivre l'apparition d'une maladie. De plus, étant naturellement présentes dans le tissu, aucune étape de marquage chimique (ajout d'un composant fluorescent synthétique) n'est nécessaire et l'on évite ainsi de perturber l'activité biologique et le devenir de la molécule qui sera détectée. Mais l'UV lointain était jusqu'alors peu exploité, du fait du manque de sources de lumière (lasers) existant dans cette gamme spectrale. Sur la branche imagerie de DISCO il est possible de réaliser des expériences de microspectroscopie de fluorescence confocale dans le domaine du DUV (jusqu'à 200 nm), et de bénéficier à la fois de la haute brillance et de la résolution spectrale apportées par le rayonnement synchrotron délivré par la ligne de lumière.

La ligne de lumière DISCO

La ligne de lumière DISCO ouverte depuis septembre 2009, couvre une large gamme spectrale du visible aux UV du vide (1000 nm à 60 nm)¹. Trois stations expérimentales sont disponibles : le dichroïsme circulaire utilisant le synchrotron (SRCD), les expériences à pression atmosphériques (APEX) et l'imagerie (IMAGING). Sur la branche Imagerie, le faisceau venant de l'aimant de courbure est monochromatisé par un iHR320 (Horiba Jobin-Yvon, Longjumeau, France) équipé de réseaux optimisés pour la région du DUV. Deux microscopes sont ensuite accessibles pour les utilisateurs :
- un micro-spectrofluorimètre confocal (POLYPHEME)²,
- et un microscope plein champ (TELEMOS)³.

POLYPHEME : un micro-spectrofluoromètre confocal fonctionnant dans le DUV

La lumière monochromatisée est réfléchiée vers un système basé sur un microscope inversé (IX71 Olympus) et couplé à un spectromètre (T6400, Horiba Jobin-Yvon) équipé de réseaux optimisés pour la région des UV lointains. POLYPHEME est entièrement équipé d'optiques transparentes dans l'UV lointain. Plusieurs objectifs achromatiques sont disponibles (10x, 40x et 100x) et une platine nanométrique permet de réaliser des cartographies avec un pas de 100 nm. La détection est assurée par une camera CCD refroidie à -70°C (Andor, Inc., Uptown Water- town, SD, USA).

TELEMOS : un microscope plein champ automatisé en z pour imagerie 3D

De façon à enregistrer des images plein champ, un nouveau microscope dans l'UV lointain a été installé sur la ligne DISCO (janvier 2011). Ce système basé sur un microscope commercial (Axio Observer, Zeiss), a été modifié pour permettre une excitation/émission dans l'UV lointain. De plus, d'après le critère de Rayleigh la résolution latérale dans la région des UV lointains est largement améliorée (≈ 200 nm). Un système de coin cubes et une roue de filtres sont disponibles pour répondre à de nombreuses configurations excitation/émission. Le microscope est équipé d'une tour d'objectifs automatisée selon l'axe vertical. Contrôlée par ordinateur, l'acquisition automatique des cubes d'images (X,Y,Z) permet ensuite une reconstruction 3D de l'échantillon étudié³.

Figure 1 Les microscopes POLYPHEME et TELEMOS de la ligne de lumière DISCO

FLIM

La structurelle temporelle du Synchrotron (~ 350 MHz) permet, grâce à une détection 2D synchrone, de réaliser de l'imagerie de phase et durée de vie de fluorescence dans l'UV pour les molécules de durée de vie supérieure à la ns.

Analyse statistique multivariée

En collaboration avec l'unité BIA du département CEPIA, les données spectrales enregistrées sur le microscope POLYPHEME sont pré-traitées et traitées par analyse statistiques multivariées⁴. De plus, des développements méthodologiques en chimiométrie sont réalisés pour répondre à une approche multimodale et conjointe des images spectrales acquises au Synchrotron SOLEIL (Infrarouge, Fluorescence UV, imagerie X)⁴.

PSF déconvolution et reconstruction 3D

Les cubes images enregistrés sur le microscope TELEMOS sont traités par déconvolution à l'aide de la fonction d'étalement du point du microscope (PSF). Nous utilisons un logiciel de traitement d'images (Huygens Pro, SVI, NI) avec différents algorithmes de traitement d'images afin d'améliorer la résolution spatiale et de reconstruire en 3D l'échantillon étudié.



CONCLUSION

La branche Imagerie de la ligne DISCO offre une excitation unique dans l'ultraviolet lointain (200 - 350 nm), ce qui permet un suivi des biomolécules² sans le besoin d'un marquage extérieur. Les développements réalisés au cours de ces premières années de fonctionnement permettent d'ouvrir de nouvelles possibilités en imagerie de fluorescence UV (3D, temporelle).

Références

1. A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam, F. Wien, J.-L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chubar, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J.-L. Marlats, D. Zerbib, F. Polack, and M. Réfrégiers (2009), *J. Synchrotron Rad.*, 16: 835–84.
2. F. Jamme, S. Villette, A. Giuliani, V. Rouam, F. Wien, B. Lagarde, and M. Réfrégiers (2010), *Microsc. Microanal.*, 16: 507–514.
3. G. Tawil, F. Jamme, M. Réfrégiers, A. Viksø-Nielsen, P. Colonna, and A. Buléon, (2011), *Analytical Chemistry*, 83: 989–993.
4. F. Allouche, M. Hanafi, F. Jamme, P. Robert, F. Guillon, and M. F. Devaux, (2012), *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, in press, doi:10.1016/j.chemolab.2011.08.010.

Utilisation du rayonnement synchrotron pour

l'activation d'ions en spectrométrie de masse tandem

Chercheurs impliqués

A. Giuliani^{1,2}, A. Milosavljevic^{1,3}, F. Canon¹, J.-F. Gil¹, L. Nahon¹, M. Refregiers¹

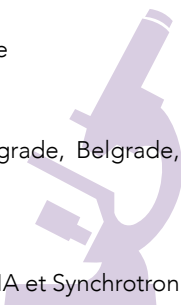
1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

2. UAR 1008 CEPIA INRA, Nantes, France

3. Institut de Physique, Université de Belgrade, Belgrade, Serbie

Contact

Alexandre Giuliani INRA Département CEPIA et Synchrotron SOLEIL
alexandre.giuliani@synchrotron-soleil.fr



La spectrométrie de masse est devenue une technique incontournable pour l'analyse des molécules bio-organiques notamment grâce aux méthodes modernes d'ionisation. Un arrangement instrumental particulier, appelé spectrométrie de masse en tandem, permet d'isoler un ion d'intérêt et de le fragmenter à la suite d'un apport d'énergie interne. L'analyse des fragments renseigne sur la structure du précurseur. Implémentée sur tous les appareils commerciaux possédant des capacités de spectrométrie de masse tandem, la dissociation induite par collision (CID) s'apparente à un chauffage lent de l'ion et, pour un polypeptide, produit des ions caractéristiques issus de la rupture de la liaison peptidique. Néanmoins cette méthode d'activation perd rapidement en efficacité lorsque la taille du précurseur augmente, et ne permet pas de conserver des liaisons faibles sur la chaîne polypeptidique ce qui complique son utilisation pour l'étude des modifications post-traductionnelles et des interactions non-covalentes. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher des méthodes d'activation alternatives.

Un moyen simple et direct de donner de l'énergie à un ion consiste à lui faire absorber un photon dont la totalité de l'énergie est transférée à la cible lors du processus. Ceci n'est possible que s'il y a recouvrement entre le spectre d'absorption de l'espèce d'intérêt et le spectre émis par la source, d'où le besoin en sources émettant dans l'UV. Par ailleurs, la photo-activation d'ions implique de confiner de grandes densités d'ions durant des temps suffisamment longs dans des pièges à ions. Enfin, le paquet d'ions doit être irradié par une source de lumière brillante et accordable dans la gamme d'énergie de photons d'intérêt. Seul le rayonnement synchrotron possède ces caractéristiques dans l'UV lointain (dit VUV). Nous avons donc couplé un piège à ion commercial de type LTQ XL (Thermo Scientific) avec la ligne de lumière VUV DESIRS¹ (Figure 1).

Cette ligne de lumière délivre un rayonnement intense et monochromatique entre 5 et 20 eV, dont la pureté spectrale est garantie par un filtre à gaz. Tout d'abord, l'ion d'intérêt est sélectionné, accumulé dans le piège à ions et irradié durant un temps bien déterminé. Le spectre de masse résultant de l'irradiation est ensuite enregistré.

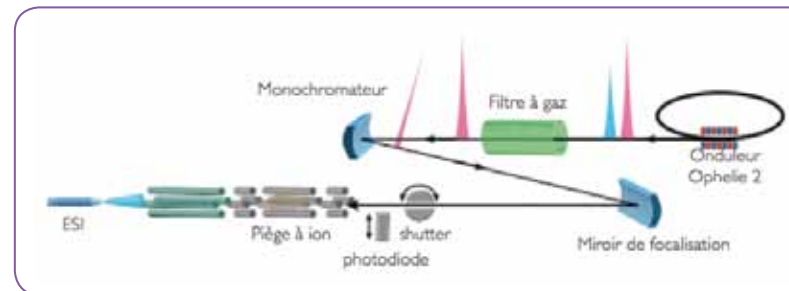


Figure 1 Schéma de principe du couplage entre la ligne de lumière DESIRS et le piège à ions.

Lorsque l'on soumet un petit peptide à une irradiation VUV, deux régimes de fragmentation peuvent être distingués ; sous le seuil d'ionisation, la substance P protonée se dissocie en produisant des ions de séquence de type a- (Figure 2) en accord avec les résultats de dissociation laser.²

Lorsque l'énergie des photons augmente et dépasse le seuil d'ionisation un radical cation peut être produit. La figure 2 montre clairement l'accroissement de la diversité des fragments et de leur abondance. Le processus de photoionisation dissociative vient compléter la photodissociation simple. Les fragments identifiés au-dessus des seuils sont identiques à ceux obtenus par fragmentation induite par électron (EID).³

De plus, la grande sensibilité et l'excellent rapport signal sur bruit de ce couplage inédit permettent d'aborder les thématiques afférentes à la spectroscopie ionique. Par exemple, l'irradiation d'un état de charge donné du cytochrome C (Figure 3) permet d'en déterminer les seuils d'ionisation, lesquels croissent avec l'état de charge de la protéine.⁴ Ainsi, de nouvelles données physico-chimiques sont obtenues par ce montage expérimental permettant notamment de lier des caractéristiques spectroscopiques des biopolymères à leur structure. L'étude de la spectroscopie d'action des poly-anions est aussi rendue possible, ouvrant ainsi la voie à des types de relaxation spécifique.^{5,6}

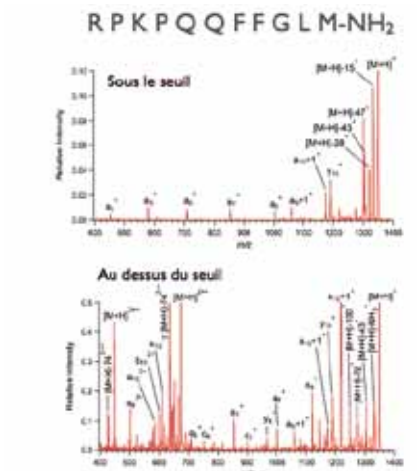


Figure 2 Spectre de masse tandem pour la substance P après irradiation à 8 eV (sous le seuil d'ionisation) et à 15 eV (au-dessus du seuil d'ionisation).

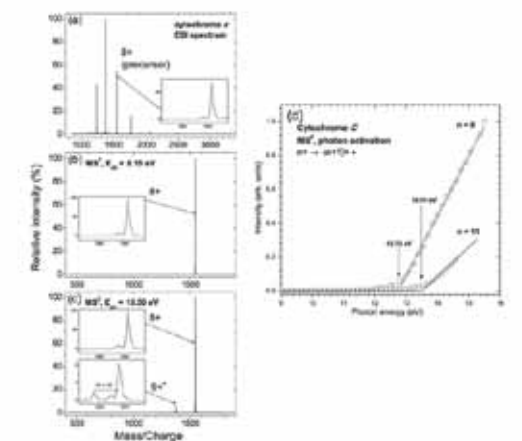


Figure 3 (a) Spectre ESI d'une solution aqueuse de cytochrome C montrant l'ion précurseur. (b) Spectre de masse consécutif à l'irradiation du précurseur à 8.15 eV pendant 80 ms. (c) Spectre de masse consécutif à l'irradiation du précurseur durant 80 ms à 15.5 eV. (d) Rendements de photoionisation enregistrés pour deux pré-curseurs entre 9 et 15.5 eV. L'ajustement aux données expérimentales d'une loi de seuil (lignes continues) permet l'obtention des seuils d'ionisation.

RÉSUMÉ

Nous avons développé une nouvelle méthode de spectrométrie de masse tandem basée sur l'utilisation de lumière ultraviolette (UV) délivrée par le synchrotron SOLEIL. Les applications vont de l'analyse structurale à la spectroscopie ionique.

ABSTRACT

We have developed a new activation method in tandem mass spectrometry, which is based on ultraviolet (UV) light delivered by the SOLEIL synchrotron radiation facility. The applications range from structural analysis to ion spectroscopy.

CONCLUSION

Nous avons produit un couplage entre une ligne de lumière dans l'UV lointain (DESIRS) et un piège à ion afin de photo-activer des ions formés par ESI. Cette nouvelle méthode d'activation pour des ions biomoléculaires permet à la fois des analyses en spectrométrie de masse tandem et des études plus axées sur la spectroscopie ionique, mettant à profit le flux et la pureté spectrale de la ligne. Le couplage avec une autre ligne de lumière dans le VUV (sur aimant de courbure), la ligne DISCO, a été réalisé avec succès pour le volet spectrométrie de masse tandem.

Références

1. A. R. Milosavljević, C. Nicolas, J.-F. Gil, F. Canon, M. Réfrégiers, L. Nahon, A. Giuliani (2012) *J. Synchrotron Rad.*, 19, 174-178.
2. J.P. Reilly (2009) *Mass Spectrom. Rev.* 28, 425-447.
3. Y. M. E. Fung, C. M. Adams, and R. A. Zubarev (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9977-9985.
4. A. R. Milosavljević, C. Nicolas, J. Lemaire, C. Dehon, R. Thissen, J.-M. Bizau, M. Réfrégiers, L. Nahon, A. Giuliani (2011) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 15432-15436.
5. C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon (2012) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 274-281.
6. C. Brunet, R. Antoine, A.-R. Allouche, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon (2011) *J. Phys. Chem., A* 115, 8933-8939.

La ligne de lumière SWING : Small and Wide angles X-rays scatteriNG

Chercheurs impliqués

J. Perez¹, F. Meneau¹, P. Roblin^{1,2} et D. Trévarin¹

1. Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France

2. UAR 1008 CEPIA, INRA, Nantes, France

Contact

javier.perez@synchrotron-soleil.fr
pierre.roblin@synchrotron-soleil.fr

RÉSUMÉ

La ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL est ouverte aux utilisateurs depuis 2007. Elle utilise un rayonnement de haute énergie (rayons X) pour pouvoir caractériser les structures à l'échelle nanométrique. Tout un dispositif optique situé en amont de l'environnement échantillon permet d'obtenir un faisceau de rayons X monochromatique, faiblement focalisé mais très intense. Au niveau de la cabine expérience se situe une plateforme mobile pouvant recevoir tout un ensemble d'environnements échantillon. Les domaines d'étude sont la biologie, la chimie organique et inorganique et les matériaux solides.

ABSTRACT

The SWING beamline of the SOLEIL synchrotron radiation facility is open to users since 2007. It uses a high-energy radiation (X rays) to characterize the structures at the nanoscale. All an optical device located upstream of the sample environment provides a monochromatic X-ray beam, focused and very intense. In the experimental hut, a mobile platform can receive a wide range of sample environments. Scientific domains developed on SWING concern biology, organic chemistry and inorganic solid materials.

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est un outil fondamental pour étudier les macromolécules biologiques. L'avantage majeur de cette méthode est de pouvoir obtenir des informations structurales à partir de macromolécules en solution.

Le SAXS permet en outre d'étudier le comportement en solution de particules natives dans des conditions proches de leur environnement physiologique, et d'évaluer les variations structurales liées à une modification des conditions externes. Le SAXS a connu un essor considérable ces dix dernières années :

- sur le plan technique avec l'amélioration des performances des lignes de lumière, les faisceaux sont de plus en plus intenses, réduisant le temps d'acquisition à quelques centaines de millisecondes, et sont de taille réduite permettant d'irradier très localement des échantillons tout en limitant leur consommation.
- au niveau des environnements échantillon : de nouveaux instruments de mesure (spectromètres d'absorption, de diffusion...) pour échantillons liquides ou solides ont été développés pour réaliser des couplages avec le SAXS afin de confronter différentes mesures physiques simultanément sur un même échantillon. Des passeurs automatiques ont été mis en place afin d'optimiser le temps de faisceau, augmentant de ce fait le nombre d'échantillons et d'utilisateurs.
- au niveau du traitement des données : de nombreux programmes ont été développés pour faciliter la manipulation des courbes de diffusion (soustraction, moyenne, mise à l'échelle...) et pour générer des modèles tridimensionnels compatibles avec les données.

La ligne de lumière SWING

La ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL, schématisée sur la figure 1, utilise un onduleur de type U20 permettant de produire un faisceau blanc très intense, et un monochromateur à double cristaux pour produire un faisceau monochromatique dans la gamme des rayons X compris entre 5 keV et 17 keV. Tout un ensemble d'éléments optiques : double miroir de type Kirkpatrick-Baez et 5 jeux de fentes, est utilisé pour focaliser le faisceau et éliminer la diffusion parasite. Les dimensions du faisceau optimisé sont de 50 μm en vertical et 400 μm en horizontal. Au niveau de la cabine expérimentale se trouve une table motorisée en X, Y et Z permettant d'installer différents types d'environnements échantillon. Le signal de diffusion est enregistré sur un détecteur de type CCD de 17 x 17 cm^2 , placé dans une chambre cylindrique maintenue sous un vide primaire afin de limiter la diffusion parasite de l'air. La distance détecteur-échantillon est modulable (0,5 m à 7 m) afin de pouvoir couvrir une gamme de diffusion comprise entre 5.0×10^{-4} et $3 \text{ \AA}^{-1}$.

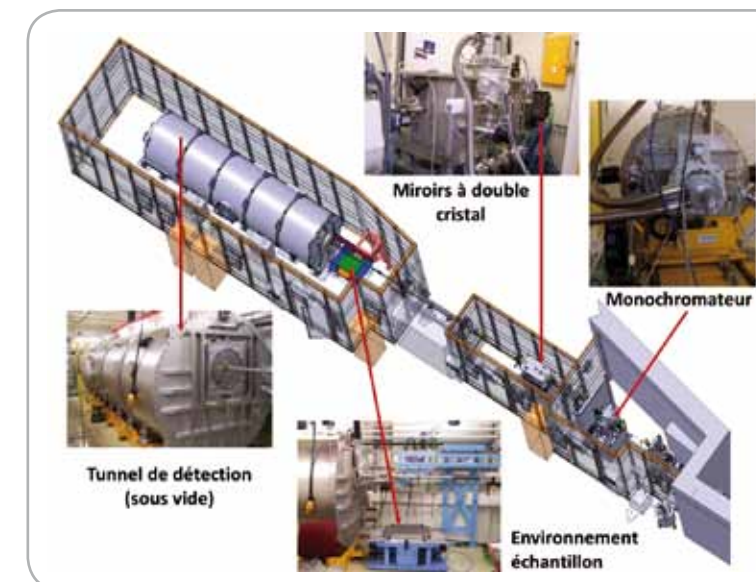


Figure 1 Schéma général de la ligne SWING.

CONCLUSION

La ligne de lumière SWING propose ou peut adapter une grande variété d'environnements d'échantillon pour caractériser la matière à l'échelle nanométrique, soit en associant d'autres techniques de mesure, soit en faisant varier les paramètres physiques de l'échantillon.

Les environnements échantillon

Depuis son démarrage la ligne de lumière SWING s'est équipée d'une HPLC en ligne (Figure 2) permettant d'une part d'injecter directement des solutions dans le capillaire de mesure grâce au robot injecteur intégré dans l'instrument, et d'autre part d'effectuer une étape supplémentaire de purification au travers d'une colonne de tamisage moléculaire, afin d'éliminer d'éventuels contaminants.¹

Ce dispositif assure une parfaite monodispersité de l'échantillon et permet de soustraire la contribution du solvant sans ambiguïté. Depuis sa mise en service, l'HPLC a connu de nombreuses évolutions, la première consistant à pouvoir régénérer une colonne parallèlement aux injections directes. La deuxième évolution réside dans l'ajout d'un robot de lavage de capillaire qui injecte automatiquement une solution nettoyante après chaque mesure. La dernière évolution en date concerne l'automatisation des mesures, où l'HPLC, le détecteur SAXS et le robot de lavage ont été synchronisés afin de pouvoir mesurer successivement des séries d'échantillons à partir d'un paramétrage unique. Pour les échantillons plus visqueux, précipités ou incompatibles avec l'utilisation de l'HPLC, un nouveau passeur d'échantillons est en cours de développement.

Nous disposons également d'un mélangeur rapide composé de 4 chambres de stockage de solution permettant de réaliser des mélanges pour caractériser des cinétiques rapides (100 ms).

Pour pouvoir réaliser des mesures d'échantillons sous contraintes de température, d'étirement ou de cisaillement, nous disposons également d'une platine de chauffage et d'étirement et d'un viscosimètre à cellule de Couette.



Figure 2 Environnement échantillon "HPLC" utilisé pour la biologie.

Références

1. G. David, J. Perez (2009) *Applied cryst.*, 42, 892-900.

Portraits

Alexandre Giuliani, Frédéric Jamme et Pierre Roblin sont ingénieurs de recherche à l'INRA. Leurs parcours ont convergé vers SOLEIL où, depuis 2006 pour Alexandre et Frédéric, et depuis 2009 pour Pierre, ils sont tous trois mis à disposition par le département CEPIA (Caractérisation et Élaboration de Produits Issus de l'Agriculture) de l'INRA de Nantes, encadrés par Alain Buléon. Membres à part entière des équipes de trois "lignes de lumière", les laboratoires de SOLEIL, ils y remplissent les missions classiques de scientifiques de ligne, tout en jouant le rôle de médiateurs auprès des chercheurs INRA (futurs) utilisateurs de SOLEIL.

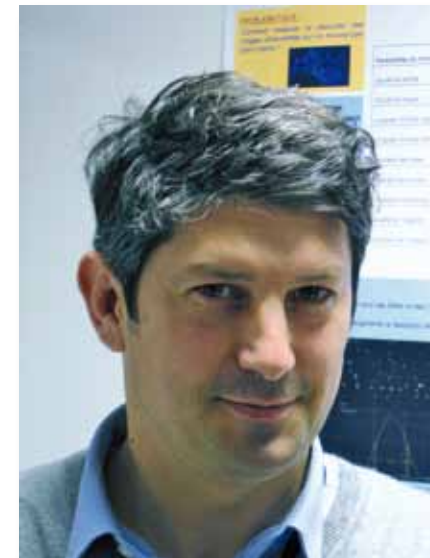
Les centres de rayonnement synchrotron rassemblent en un même lieu plusieurs dizaines de laboratoires disposant chacun d'équipements extrêmement performants pour analyser tout type d'échantillon, sa composition, sa structure, ses propriétés électroniques, chimiques, magnétiques... Ce sont autant d'instruments uniques, sans équivalent dans les laboratoires, mis à disposition de la communauté scientifique. Mais encore faut-il connaître leur existence, leurs caractéristiques, leurs performances et surtout savoir s'il est judicieux de les utiliser sur l'échantillon que l'on étudie pour obtenir ce que l'on recherche à son sujet !

C'est dans le but d'accompagner les scientifiques de l'INRA dans cette approche d'un Très Grand Instrument comme SOLEIL qu'a été mis en place le dispositif INRA-SOLEIL. Avant même que SOLEIL ne soit entièrement construit, **Alain Buléon**, directeur de recherches au sein de l'Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages du CEPIA a sollicité les collègues de son département afin d'évaluer leurs demandes et besoins potentiels en "techniques synchrotron" et de mettre en adéquation les thématiques de recherche INRA et les équipements de SOLEIL. Grâce à ce travail prospectif en amont, les attentes de ces utilisateurs ont pu être identifiées et prises en compte, et une connaissance mutuelle s'est développée, quotidiennement renforcée par la présence des trois ingénieurs INRA/SOLEIL.



Alexandre GIULIANI

Alexandre effectue son master et son doctorat de Chimie à l'Université de Liège (Belgique) sur la spectroscopie électronique de molécules en phase gazeuse, sujet qui le conduit à utiliser différentes installations de rayonnement synchrotron : Angleterre (SRS), États-Unis (NSLS) puis Danemark (ASTRID). Lors de son post-doctorat (ICSN, Gif-sur-Yvette), Alexandre approfondit ses connaissances en spectrométrie de masse et commence à interagir avec l'équipe de la ligne de lumière DISCO, sur laquelle il est à présent le scientifique référent pour cette technique d'analyse.



Frédéric JAMME

Docteur en Physique des Surfaces, c'est au cours de sa thèse, effectuée à l'Université de Nottingham (GB), que Frédéric s'initie aux techniques d'analyse utilisant le rayonnement synchrotron infrarouge (synchrotron SRS, Angleterre). Il poursuit dans cette voie par un post-doctorat à SOLEIL, sur la ligne de lumière infrarouge SMIS spécialisée en imagerie. Il devient ensuite scientifique sur SMIS, mais également sur une seconde ligne de lumière, DISCO. Ce rattachement à deux lignes est un statut jusqu'alors unique à SOLEIL, qui permet à Frédéric d'élargir son spectre de compétences dans le domaine de l'imagerie moléculaire.

Leur rôle : vous aider à définir comment et pourquoi SOLEIL peut vous être utile

Dès 2006, **Frédéric Jamme** et **Alexandre Giuliani** commencent un travail d'information et de diffusion auprès de différents centres INRA pour expliquer les potentialités de SOLEIL. Rejoints depuis par **Pierre Roblin**, ils continuent à informer les équipes INRA et à évaluer ce que SOLEIL pourrait apporter à leurs recherches. De plus, leur fonction de scientifique de ligne inclut une forte implication dans la conception et la construction même de leur ligne de lumière. Ils connaissent donc parfaitement les instruments d'analyse sur lesquels ils guident à présent les utilisateurs, instruments développés en tenant compte de leur compatibilité avec les recherches INRA.

L'accès gratuit aux lignes de lumière de SOLEIL passe par une étape préliminaire de sélection : il est possible de déposer un projet deux fois par an pour évaluation (voir page 9 pour plus d'information). Parmi les critères pris en compte pour départager les projets soumis, outre l'intérêt et la qualité des études menées, c'est la pertinence de l'emploi des techniques et équipements de SOLEIL qui va primer. D'où l'importance de bien "cibler" la demande. Frédéric, Alexandre et Pierre aident le futur utilisateur à identifier les techniques adaptées à sa recherche, et donc la(es) ligne(s) de lumière susceptible(s) de l'accueillir. Ils apportent assistance et conseil pendant la rédaction du projet qui sera soumis au Comité scientifique en charge d'"allouer le temps de faisceau" pour chaque discipline - autrement dit le Comité de sélection des équipes qui auront accès à SOLEIL.



Pierre ROBLIN

Ingénieur de l'INSA de Toulouse, avec une spécialisation en bio-ingénierie des protéines, Pierre poursuit sa formation par un doctorat (IPBS-Toulouse) et un post-doctorat (LEBS, Gif-sur-Yvette) de biochimie structurale au cours desquels il acquiert une expertise en diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) en travaillant régulièrement aux synchrotrons national DESY (Allemagne) et européen ERSF (Grenoble). Plus "orienté biologie" que ses deux collègues de par sa formation universitaire, Pierre fait partie de la ligne de lumière SWING dédiée à la technique SAXS, où il est responsable des expériences sur les bio-polymères et les protéines.

Votre avantage :
bénéficier de support et d'accompagnement pendant et après les expériences

Si un projet est sélectionné, l'utilisateur convient alors avec les responsables de la ligne de lumière-hôte de ses futures dates d'expériences. Il peut venir à SOLEIL avec ses échantillons "prêts à l'analyse" ou, dans certains cas, les préparer sur place avant l'expérience dans des laboratoires dédiés. Les trois ingénieurs continuent leur encadrement : leur aide va de la formation aux techniques d'analyse employées, pour les "novices" en rayonnement synchrotron, à une assistance plus légère, pour les utilisateurs plus aguerris. Le rythme de travail étant intense (les lignes fonctionnent nuit et jour, 6 jours sur 7), il est appréciable de ne pas être isolé à côté de son échantillon ! Et le travail est bien sûr loin d'être terminé lorsque l'expérience est finie. Toute la phase de traitement des données brutes récoltées à SOLEIL est déterminante, et se fait

également en liaison avec Frédéric, Alexandre et Pierre - qui mènent par ailleurs leurs propres travaux de recherche, et sont également présents pour aider les utilisateurs "non INRA" de leurs lignes de lumière respectives. Au cours, ou à l'issue, de toutes ces interactions, l'équipe de la ligne de lumière et les utilisateurs décident parfois d'entamer une collaboration sur un sujet de recherche donné.

Bientôt : un panel encore plus large de techniques d'analyse disponibles

À l'avenir, les futures lignes de lumière dédiées aux techniques de pointe de nano-imagerie, qui seront accessibles à SOLEIL d'ici fin 2013, devraient représenter un attrait supplémentaire pour les chercheurs de l'INRA. Une raison supplémentaire pour continuer, et même amplifier, le dispositif INRA/SOLEIL.



Alain BULÉON

Directeur de Recherches dans l'unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) du centre INRA de Nantes-Angers, Alain Buléon a été chargé en 2003 par la direction de l'INRA

de mettre en place un dispositif entre l'INRA et le tout nouveau synchrotron SOLEIL. Les objectifs visés étaient les suivants : reconnaissance de l'INRA en tant qu'institut dans le monde du synchrotron, établissement d'un réseau de collaborations entre les deux organismes sur les assemblages complexes du Vivant, et accès aux différentes lignes de lumière de SOLEIL. Après consultation des unités de recherche du département CEPIA, la réflexion engagée a débouché, sous l'impulsion de Paul Colonna (chef du département CEPIA de l'INRA), sur la mise à disposition

d'Ingénieurs de Recherche sur les lignes de lumière les plus pertinentes pour les recherches menées dans l'Institut. Parallèlement, un conseil scientifique des utilisateurs INRA de SOLEIL a été mis en place par A. Buléon, pour aider les chercheurs à mettre en place des projets d'utilisation du synchrotron, organiser des essais préliminaires et rédiger les demandes de temps de faisceau.

Le dispositif a été progressivement élargi à d'autres départements de l'INRA tels que AlimH, BV, MICA, EFPA, avec des applications du rayonnement synchrotron à l'alimentation humaine, la biologie végétale, la microbiologie, l'environnement et le bois. Ainsi de nombreuses présentations des potentialités des équipements du synchrotron SOLEIL sont effectuées au sein de différents centres ou unités de recherche INRA pour informer les chercheurs et monter de nouveaux projets. L'ensemble du dispositif est coordonné par Alain Buléon.

Alain Buléon
Tél. 02 40 67 50 47
buleon@nantes.inra.fr

Frédéric Jamme
Tél. 01 69 35 96 86
jamme@synchrotron-soleil.fr

Alexandre Giuliani
Tél. 01 69 35 97 29
giuliani@synchrotron-soleil.fr

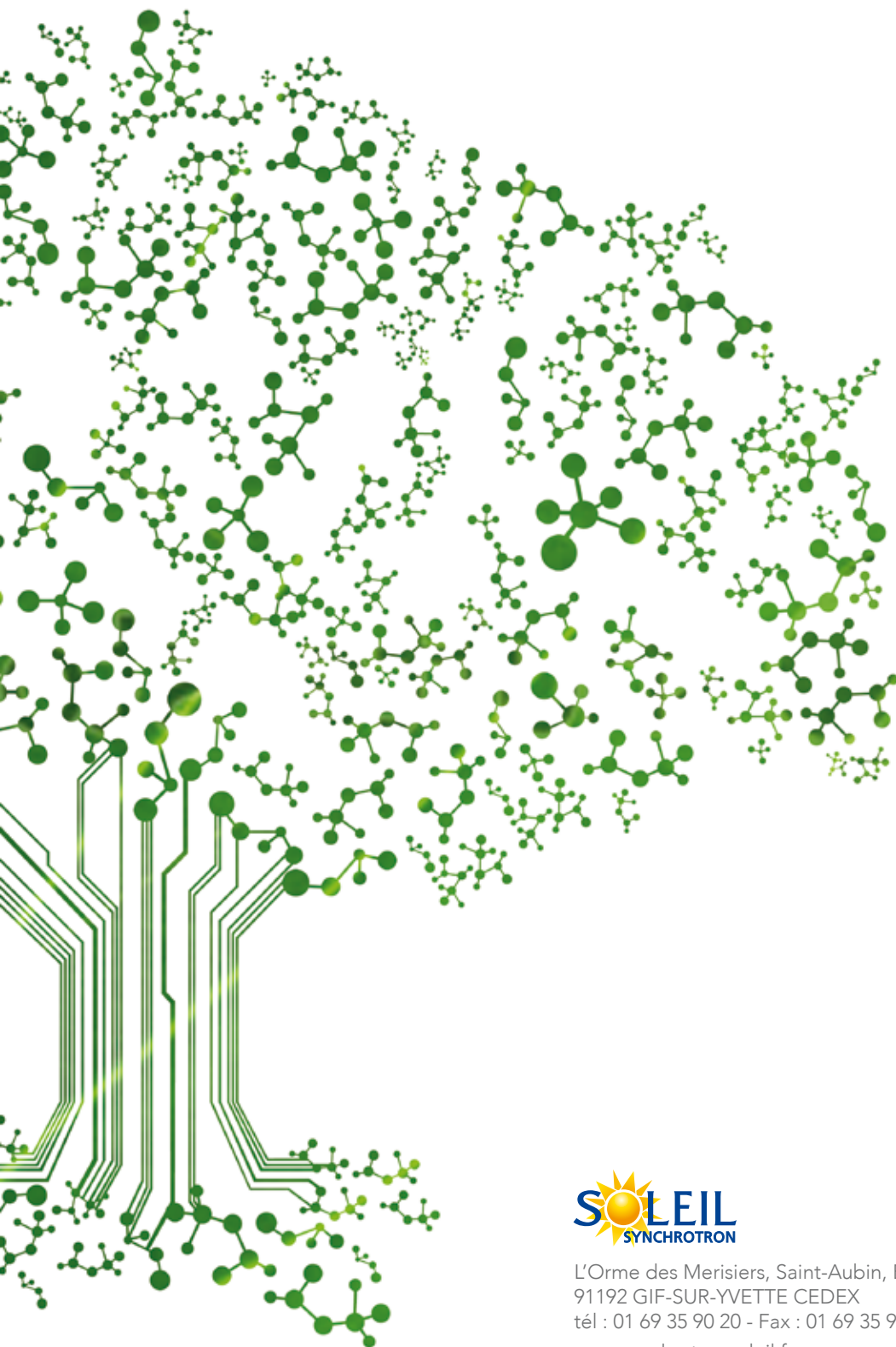
Pierre Roblin
Tél. 01 69 35 81 56
roblin@synchrotron-soleil.fr

Pour les joindre

<http://www4.inra.fr/cepia/Vous-recherchez-des-plates-formes-et-des-outils/Soleil>

Index

- **Acides gras** 54, 56, 32
- **Agrégation** 76, 58, 82
- **Allergie** 70
- **Amylase** 22
- **Amylose** 76
- **Amylosucrase** 76
- **Amidon** 22, 52
- **Argent** 56
- **Bactéries** 32
- **Biocarburants** 22, 26, 30
- **Blé** 62, 70, 16, 26
- **Bois** 60
- **Caroténoïdes** 28, 24
- **Caséine** 18, 36
- **Cellule** 54, 26, 44, 30, 56, 34, 80
- **Cellulases** 26
- **Cerveau** 12
- **Collagène** 14, 72
- **Congélation** 32
- **Cristallisation** 76, 50
- **Cuisson** 72
- **Cristallographie** 20
- **Dendrochronologie** 60
- **Dichroïsme circulaire** 62, 70, 42, 40, 46
- **Emballages** 78
- **Émulsions** 28
- **Fer** 20, 54
- **Filtration** 36
- **Foie** 72
- **Frites** 80
- **Glycosylation** 74
- **Lait** 18, 50, 36
- **Levures** 56, 34
- **Lignocelluloses** 26
- **Lipides** 42, 72, 28, 34, 80
- **Maïs** 22, 30
- **Matériaux** 78, 52
- **Micelles** 18
- **Microspectroscopie IR** 14, 72, 16, 26, 44, 30, 12, 56, 32, 34, 52, 48
- **Microspectroscopie UV** 22, 72, 44, 30, 28, 80, 78, 40
- **Microfluorescence X** 54, 60
- **Muscle** 14
- **Oléagineux** 42
- **Oléosines** 42
- **Orientation** 16, 52
- **Oxydation** 58, 14, 28, 24
- **Photoionisation** 24, 40, 38
- **Pois** 54
- **Polyphénols** 58, 82, 26, 28
- **Polysaccharides** 76, 82, 16, 26, 44, 30
- **Prolamines** 62, 70
- **Propriétés mécaniques** 16, 52
- **Protéines salivaires** 68, 74
- **Protéines fibrillaires** 14
- **Réductase** 20
- **Saccharification** 22, 26
- **SAXS** 64, 74, 18, 76, 58, 50, 36, 66
- **Sève** 64
- **Spectrométrie de masse** 68, 24, 40
- **Tanins** 68, 74, 58, 82
- **Tomate** 20
- **Triglycérides** 50



L'Orme des Merisiers, Saint-Aubin, BP 48
91192 GIF-SUR-YVETTE CEDEX
tél : 01 69 35 90 20 - Fax : 01 69 35 94 54
www.synchrotron-soleil.fr



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

147 rue de l'Université • 75338 Paris Cedex 07

Tél : + 33(0)1 42 75 90 00 • Fax : + 33(0)1 47 05 99 66 • Courriel : infos@inra.fr

www.inra.fr