

Préparations de matériel lignocellulosique, cellules d'observation et contraintes associées pour une imagerie multi-techniques de la dégradation enzymatique

Sylvie Durand¹, Camille Alvarado¹, Brigitte Bouchet¹,
Stéphane Lefrançois² et Laurent Helary¹

Résumé. La préparation des échantillons est une étape essentielle pour leur étude par microscopie photonique et microspectroscopie. Différentes préparations de coupes d'échantillons ont été testées pour l'observation sans marquage préalable de la localisation des enzymes, des constituants des parois végétales et de leurs évolutions au cours de la dégradation. La préparation de coupes paraffine a été retenue pour l'acquisition d'images spectrales et hyperspectrales en temps réel. Deux méthodes d'imagerie complémentaires et corrélables ont été utilisées :

- la microscopie de fluorescence avec une excitation dans l'UV profond permet d'obtenir des informations sur la localisation des enzymes par imagerie multi-échelles.
- la microspectroscopie FT-IR avec l'utilisation d'une cellule microfluidique permet le suivi en temps réel du changement de composition des parois sous l'action des enzymes.

Mots clés : préparation d'échantillon, imagerie en temps réel, enzyme, fluorescence, Infrarouge.

Abstract. Various preparations of sample sections have been tested to observe enzyme localization without any previous labelling, some vegetal wall components and their evolution during the degradation. Preparation of paraffin sections has been chosen to obtain spectral and hyperspectral images in real time. Two methods of closely related and complementary imaging were set out :

- fluorescence microscopy with excitation in deep UV allows to obtain some information about the location of enzymes by multi-scale imaging
- FT-IR microspectroscopy with the use of microfluid cell allows to follow in real time the cell wall component change under enzyme action.

Keywords : sample preparation, real time imaging, enzyme, fluorescence, Infrared

Introduction

La biomasse lignocellulosique issue de tissus végétaux est essentiellement composée de polysaccharides et de lignines. Elle constitue une réserve de polymères carbonés renouvelables, mobilisables pour la production de nombreuses molécules biosourcées, comme le bioéthanol ou les bioplastiques. Pour obtenir ces molécules, la conversion enzymatique de ces ressources végétales est une voie prometteuse car elle permet une hydrolyse

¹ INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, 44316 Nantes cedex 3, France

² Synchrotron SOLEIL, 91192 Gif-sur-Yvette cedex, France

sylvie.durand@inra.fr; camille.alvarado@inra.fr

des constituants en conditions douces. Toutefois à l'état natif, la dégradabilité enzymatique des polysaccharides dans des substrats complexes comme les lignocelluloses est limitée. Côté substrat, la lignine est considérée comme la principale source de récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. Elle agirait comme une barrière physique. Côté enzymes, l'accessibilité et la capacité des enzymes à se fixer sur les polysaccharides sont des facteurs à prendre en compte. Pour que la réaction ait lieu, les enzymes doivent tout d'abord diffuser vers le substrat, puis s'adsorber spécifiquement sur leur site de reconnaissance (Kumar & Wyman, 2009, Arantes & Saddler, 2010). Au sein de la paroi, les lignines peuvent former avec les hémicelluloses des liaisons covalentes qui peuvent limiter la diffusion de l'enzyme (Boukari et al., 2009). Enfin, une hétérogénéité de susceptibilité en fonction des tissus est observée (Devaux et al., 2018).

Dans ce contexte, des techniques d'imagerie sont mises en œuvre pour mieux comprendre le phénomène de récalcitrance en fonction des types cellulaires. Les techniques de microspectroscopie permettent d'obtenir une information moléculaire localisée par le couplage des spectrophotomètres avec des microscopes. Elles permettent d'éviter de marquer les molécules d'intérêt et donc d'observer l'échantillon dans un état plus proche de son état natif en entraînant le moins d'artéfact possible. Dans les travaux publiés par l'équipe, l'imagerie spectrale par fluorescence et dans le moyen Infrarouge ont été utilisées car elles apportent des informations complémentaires pour identifier les constituants chimiques des parois. Alors que les composés phénoliques ont une signature caractéristique en fluorescence UV et visible, les polysaccharides présentent des spectres caractéristiques dans l'Infrarouge (Allouche et al., 2012). La fluorescence sous excitation dans l'UV profond, accessible au synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE) sur la ligne de lumière DISCO (Dichroism, Imaging, mass Spectrometry for Chemistry and biOlogy), permet de visualiser les protéines sans marquage préalable grâce à l'autofluorescence du tryptophane. La technique permet de suivre la localisation d'enzymes au cours de la dégradation (Devaux et al., 2018, Tawil et al., 2011). Enfin, la ligne Infrarouge SMIS (Spectroscopy and Microscopy in the Infrared using Synchrotron) du synchrotron a développé une cellule microfluidique pour suivre en dynamique l'évolution des spectres au cours d'une réaction (Frédéric et al., 2012).

La préparation de l'échantillon est une étape essentielle pour l'observation en microscopie optique photonique et en microspectroscopie. Elle conditionne l'obtention de résultats de haute qualité à partir d'échantillons végétaux. Il n'existe pas de mode opératoire universel pour la préparation d'échantillons pour l'imagerie et chaque technique d'imagerie impose des contraintes pour l'observation des échantillons. La nature de l'échantillon (plante entière, organe, tissus, poudre...), son état physique (frais, hydraté, sec...), les contraintes de récolte et de vitesse de conditionnement des échantillons ainsi que la nature des observations recherchées doivent être pris en compte. Dans tous les cas, la technique de préparation doit être optimisée et ceci à chaque étape: les prélèvements, leur préservation, le choix de la technique de coupe, son épaisseur doivent être contrôlés de manière très précise. Il faut également souligner l'importance des supports de coupes, lame ou fenêtre d'observation, dont la composition doit être compatible avec les plages spectrales utilisées par les systèmes d'acquisition.

Dans ce cahier technique, nous présentons en détail la préparation des échantillons et les dispositifs d'acquisition retenus dans Devaux et al. (2018). Ces méthodes sont adaptées à l'étude des tissus végétaux tels que les tiges de graminées, lin et *Brachypodium*, et les graines de céréales, blé et maïs. La tige de maïs a été choisie comme plante modèle représentant les tiges de graminées. La préparation de coupe retenue avait pour objectif d'être adaptée à l'imagerie de fluorescence aux échelles macroscopiques et microscopiques et à la microspectroscopie dans le moyen Infrarouge.

Enfin, pour observer les dégradations sur coupe par imagerie en temps réel, l'échantillon doit être immobilisé et placé dans le milieu de réaction. Dans nos travaux décrits dans Devaux et al. (2018), une cellule microfluidique a été utilisée pour les observations dans le moyen Infrarouge et un montage spécifique a été développé pour

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2019 (98)

observer les dégradations par imagerie de fluorescence. Nous avons retenu une même préparation d'échantillons pour les deux types d'imagerie en utilisant des coupes sériées.

Matériels et méthodes

Echantillons : Tiges de maïs

Des plantes de maïs de Génotype F2 ont été cultivées à l'INRA de Lusignan, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères. Les prélèvements ont été réalisés au stade de développement floraison femelle. Des entrenœuds sous épis ont été prélevés (**Figure 1**) et conservés dans l'éthanol 70 % en chambre froide à 4°C. L'entrenœud d'une longueur moyenne de 15 cm est divisé en trois tronçons et seul le tronçon du milieu de l'entrenœud a été considéré.



Figure 1. Stade de floraison femelle : prélèvement de l'entrenœud sous épi. (Crédit photo : Marie-Françoise Devaux)

Systèmes d'acquisition

Trois types d'imagerie ont été utilisés pour l'ensemble du projet : macroscopie pour l'imagerie fond clair, microscopie de fluorescence dans l'UV profond avec la source synchrotron, la microspectroscopie dans le moyen Infrarouge avec la source de lumière synchrotron.

Appareils

Macroscopie fond clair (INRA Nantes) :

Les observations macroscopiques en fond clair, ont été réalisées sur un microscope AZ100M (*Nikon*, Japon).

Microscopie de fluorescence dans l'UV profond au synchrotron SOLEIL (ligne DISCO) :

Les acquisitions en fluorescence ont été réalisées sur le microscope inversé appelé « TELEMOS » Axio Observer Z1 (*Carl Zeiss GmbH*, Allemagne) (Jamme et al., 2013) sur la ligne DISCO (Giuliani et al., 2009). La longueur d'onde d'excitation dans l'UV profond a été fixée à 275 nm.

Microspectroscopie dans le moyen Infrarouge, source synchrotron SOLEIL (ligne SMIS) :

Afin d'améliorer la sensibilité du signal et la résolution spatiale, des spectres ont été acquis sur le microspectromètre Nicolet 5700 équipé d'un microscope Continuum XL (*Thermo Fisher Scientific, USA*) utilisant la lumière synchrotron de SOLEIL (ligne SMIS). Les spectres ont été collectés entre 4000 et 650 cm⁻¹.

Contraintes d'observation

Dans le tableau ci-dessous sont indiquées les caractéristiques des images et les contraintes d'observation liées à chaque instrument. Les champs de vue et les tailles des pixels dépendent des objectifs utilisés (**Tableau 1**).

Tableau 1. Caractéristiques des observations

	Macroscopie (INRA de Nantes)	Microscopie de fluorescence (DISCO - Synchrotron SOLEIL)	Microspectroscopie Infrarouge (SMIS - Synchrotron SOLEIL)
Champ de vue	Objectif x2 Zoom x3 1392x1040 µm ² *	Objectif x10 : 1230x1230 µm ² * Objectif x40 : 320x320 µm ² *	Objectif x32 max : 250x250 µm ² *
Taille du pixel	1,86 µm par pixel	Objectif x10 : 1,2 µm Objectif x40 : 0,313 µm	Définition des fenêtres d'ouverture 12x12 µm ²
Contrainte d'épaisseur de coupe	< 150 µm	1-150 µm	10-20 µm
Support de l'échantillon	Lame de verre	Lamelle de Quartz	Fenêtre de Sulfure de Zinc (ZnS)

* Il est possible de réaliser des mosaïques d'images pour explorer des échantillons plus larges que le champ de l'objectif.

Différents supports sont nécessaires en fonction de la méthode d'imagerie choisie.

Les supports échantillons utilisés sur la ligne DISCO du synchrotron sont des lamelles en Quartz. Le Quartz a l'avantage par rapport au verre de ne donner aucun signal parasite en fluorescence sous excitation dans l'UV profond (275 nm).

En microspectroscopie Infrarouge, une fenêtre d'ouverture de champ (un sténopé) avec une taille projetée ajustable entre 5x5 et 75x75 µm² est utilisée pour définir la surface analysée par le microscope. Des considérations de résolution spatiale et de rapport signal sur bruit contraignent le choix de la taille du sténopé.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2019 (98)

Dans notre exemple, une fenêtre de 12×12 (144) μm^2 est utilisée. Une lame de ZnS résistante à l'eau, transparente en visible et dans le domaine moyen Infrarouge jusqu'au domaine des sucres est le meilleur matériel support échantillon. L'épaisseur de la lame doit être choisie pour assurer la solidité du montage tout en limitant les aberrations chromatiques. Des épaisseurs de l'ordre de 1 mm satisfont ces conditions (Birarda et al., 2010).

En fonction des applications, des images hyperspectrales complètes sont acquises en scannant point par point la surface choisie, ou des mesures ponctuelles sont réalisées après avoir sélectionné les points de mesure sur les tissus.

Cellules de mesures

L'observation de dégradations enzymatiques en temps réel pour obtenir des informations sur la cinétique des réactions nécessite de réaliser les dégradations directement sous l'imageur. Nous proposons deux types de cellules : une cellule « fermée » (sans circulation) où l'échantillon est placé dans le milieu liquide qui contient l'enzyme et une cellule microfluidique développée sur la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL (Frederick et al., 2012) dans laquelle l'enzyme circule et les produits de dégradation sont évacués au fur et à mesure. Le premier type de cellule a été utilisé pour l'imagerie fond clair et de fluorescence où les produits de dégradation (oses simples) ne donnent pas de signal. En Infrarouge, en revanche, il était important que les produits soient éliminés au cours du temps.

Cellule fermée

Afin d'observer en dynamique des dégradations enzymatiques sur coupes à la fois en macroscopie fond clair et en microscopie de fluorescence, le montage suivant (Figure 2) a été mis au point.

La coupe est placée sur une lamelle ronde en Quartz (R525000, 25 mm, *Esco Optics*, USA) ou en verre (1009-0431, *Fisher Scientific*) selon le ou les systèmes retenus.

Un cadre Gene Frame (016266-AB0576, 1.0×1.0 cm^2 , 25 μL , *Thermo Scientific*) avec deux faces adhésives est collé sur la lamelle sur laquelle se trouve l'échantillon préparé. Le cadre de surface 1 cm^2 et d'épaisseur 250 μm permet de délimiter un volume de 25 μL .

Ensuite, 30 μL d'enzyme diluée convenablement sont déposés dans le cadre. Ce volume est nécessaire pour bien remplir le cadre et éviter ainsi l'apparition de bulles d'air. La dilution de l'enzyme dépend de son activité et de la vitesse de dégradation recherchée.

Une seconde lamelle en Quartz ou en verre est placée par-dessus le montage afin de rendre le milieu étanche et s'affranchir du risque d'évaporation tout le long de la cinétique.

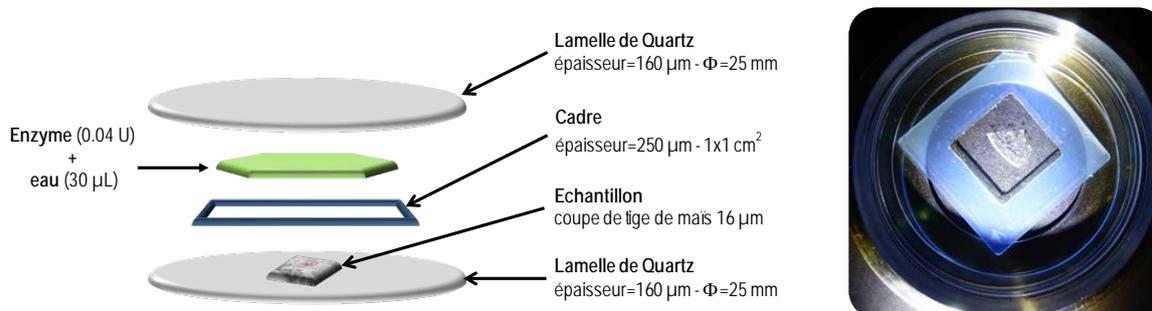


Figure 2. Schéma du montage pour des observations en macroscopie et en microscopie de fluorescence. Le montage est présenté avec des lamelles de quartz nécessaires pour la fluorescence dans l'UV profond et un exemple de dilution d'enzymes. (Crédit photo : Marie-Françoise Devaux)

Microspectroscopie dans le moyen Infrarouge

Afin de suivre en temps réel les cinétiques de dégradations enzymatiques sous le microspectromètre FT-IR, nous avons utilisé la cellule microfluidique développée au synchrotron pour l'observation de cellules vivantes (Frederick et al., 2012) (Figure 3). La cellule microfluidique est constituée de deux parties métalliques chauffantes permettant de placer deux fenêtres transparentes à l'Infrarouge. Dans notre montage, nous avons utilisé deux fenêtres en ZnS de 4 cm de diamètre et d'épaisseur de 1 et 2 mm. La fenêtre inférieure de 1 mm d'épaisseur est perforée de quatre trous pour assurer la circulation du milieu aqueux. Ces fenêtres ne sont pas standard et doivent être fabriquées sur commande (*Crystal GmbH*, Allemagne). Les deux fenêtres sont séparées par un masque de 25 μm d'épaisseur découpé à l'aide d'un emporte-pièce dans un film en copolymère d'éthylène-tétrafluoroéthylène (ETFE) (FP361025, *GoodFellow*, France) pour définir une cavité d'un volume d'environ 4 μL et assurer l'écoulement des liquides dans la cellule. L'épaisseur de la cellule doit être suffisamment petite pour éviter l'extinction totale du signal Infrarouge liée à la présence du milieu liquide. La cellule est rendue étanche par huit micro-joints plats (N°15189, JP400*190*0.45, *Isoswiss Horloger*, Suisse). Des tubes téflons (1527M, *Cluzeau Info Labo*) : 1/16" x 0.25 mm (0.010") sont vissés de chaque côté de la cellule à l'aide des embouts adaptés. L'un des tubes est relié à une pompe pousse seringue (*WPI*, World Precision Instruments Alladin 1000). La coupe est déposée sur la fenêtre inférieure, et l'eau puis la solution d'enzymes sont introduites dans la cellule à l'aide de la pompe à seringue avec un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ et les produits de réaction sont évacués.

Un montage avec deux pompes indépendantes et donc deux types de milieu de réaction peut être envisagé, la cellule étant percée de quatre trous d'alimentation/évacuation. Dans le présent travail, nous avons utilisé la cellule montée avec une seule pompe. La cellule peut être thermostatée en connectant les éléments chauffants et un thermocouple type J à un contrôleur PID type Omron E5CB.



Figure 3. Schéma de la cellule microfluidique développée sur la ligne SMIS du synchrotron (Crédit photo : Marie-Françoise Devaux)

Préparations des coupes de tiges de maïs

La préparation des échantillons doit prendre en compte à la fois les contraintes des systèmes d'acquisition, des cellules de mesures, la taille et la nature des échantillons. Afin de réaliser des coupes sériées observables à la fois en fluorescence et en Infrarouge, nous devons obtenir des coupes d'épaisseur comprise entre 10 et 20 μm . L'épaisseur de coupe des échantillons retenue pour la macroscopie, la microspectroscopie dans le moyen Infrarouge menées au synchrotron était de 16 μm pour les sections de tiges de maïs quel que soit le tissu

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2019 (98)

considéré. Elle s'est révélée adaptée à toutes nos applications (à sec, en cellule microfluidique, sur tous supports...). Nous décrivons ici les critères de choix des méthodes retenues et la procédure mise en place.

Choix de la préparation des échantillons et de la technique de coupe

La technique permettant de se rapprocher de l'état natif et entraînant le moins d'artéfacts serait de réaliser des coupes de tiges de maïs à l'aide d'un microtome à lame vibrante ou d'un cryotome immédiatement après la récolte en champs puis d'observer la cinétique de dégradation. Du fait du délai entre récolte et observations de dégradation, les échantillons à couper ont été conservés dans l'alcool à 70°. Il est possible d'obtenir des coupes transversales de tiges de maïs entières (Legland et al., 2014), en utilisant un microtome à lame vibrante (HM650V, Microm, France). Toutefois, la plus petite épaisseur de coupe réalisée est d'environ 100-150 μm pour ce type de substrat avec cet équipement.

Nous avons rencontré de grandes difficultés dans la confection des cryo-coupes du fait de la taille des cellules et des échantillons à couper ainsi que de la dureté des tissus conducteurs ; les coupes obtenues ne sont pas complètes et sont inexploitable pour nos analyses.

Nous avons mis de côté la possibilité d'inclure en résine les morceaux de tige de maïs pour deux raisons majeures : la première est que les résines d'inclusion types Epoxy ou acryliques présentent des signaux interférents en Infrarouge, et la seconde est que l'épaisseur maximale de coupe réalisable avec un échantillon inclus en résine est d'environ 5 μm selon l'ultramicrotome utilisé.

Finalement, nous avons retenu une préparation comportant l'inclusion en paraffine. Cette technique de préparation d'échantillon nous permet de réaliser des coupes fines mais surtout de retirer la paraffine après l'obtention de ces coupes. Ceci nous évite d'une part, un éventuel signal parasite en fluorescence et en Infrarouge de la paraffine et d'autre part, une difficulté de l'enzyme à se fixer sur les tissus.

De plus, cette préparation nous permet de conserver les échantillons plusieurs années en bloc de paraffine et de réaliser les coupes en fonction des besoins. Cela laisse la possibilité d'envisager des expériences complémentaires telles que les marquages immuno-cytochimiques, les colorations histologiques, et le Raman.

Inclusion en paraffine

L'inclusion en paraffine est réalisée à partir des échantillons conservés dans l'alcool à 70°. Le tronçon du milieu de l'entreenœud est découpé avec une lame de rasoir renforcée en tranches de 5 mm. Des cubes de 5 mm³ sont prélevés comme indiqué sur la photo (Figure 4). Cette taille d'échantillon a été choisie car adaptée aux inclusions en paraffine et aux champs de vue observables par les différents imageurs.

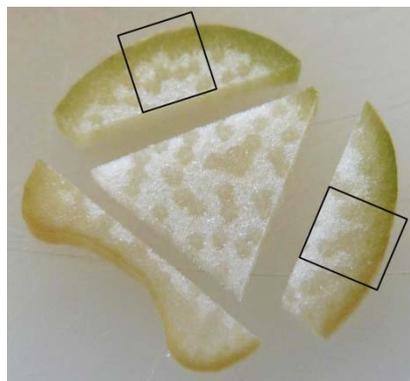


Figure 4. Prélèvements de cubes d'intérêt (Crédit photo : Marie-Françoise Devaux)

Nous avons opté pour une fixation au FAA (10 % de formaldéhyde à 37 %, 5 % d'acide acétique glacial, 85 % d'éthanol à 60 %) pendant 48 heures ou plus à 4°C. Les échantillons sont ensuite transférés dans un automate d'inclusion (Automatic Tissue Tek VIP 3000, *Sakura*) dans lequel ils sont déshydratés et imprégnés dans la paraffine.

Coupes

Nous avons ensuite réalisé des coupes de 16 µm à l'aide d'un microtome à paraffine (HME340E, *Microm*, France) équipé de lames (SEC35, *Microm*, France) que nous avons déposées sur des lames trois puits (10393881, Fischer Scientific) afin de faciliter les prétraitements des coupes. Le choix de cette épaisseur a été optimisé afin d'avoir un signal suffisant en Infrarouge tout en étant non saturé sur l'ensemble des tissus de la tige. Enfin, nous avons vérifié que cette épaisseur permettait l'acquisition d'images en fluorescence de bonne qualité. Les coupes ont ensuite été déparaffinées dans trois bains successifs de 3 minutes d'Histochoice (H2779, *Sigma*), suivis de trois bains d'éthanol 96% de 3 minutes également.

Prétraitements des coupes

Dans les travaux présentés ici, on s'intéresse aux polysaccharides et aux lignines présents dans les parois. Deux prétraitements enzymatiques ont été réalisés sur les coupes afin d'éliminer les signaux de l'amidon et des protéines. Dans le moyen Infrarouge le signal d'amidon masque celui des autres polysaccharides et le signal des protéines interfère avec celui des composés phénoliques, en particulier des lignines. En fluorescence, le signal des protéines endogènes ne se distinguerait pas de celui des enzymes utilisées pour la dégradation. Ces prétraitements sont indispensables pour les études sur les coupes issues de stades jeunes de développement dans lesquels de l'amidon résiduel est présent dans les cellules de la tige. Par souci d'homogénéité de traitement et pour être certains d'être affranchis de ces signaux, nous avons également éliminé l'amidon et les protéines pour les autres stades de maturité étudiés au laboratoire et donc pour le stade floraison femelle présenté ici.

Pour cela nous avons fait agir sur les coupes une α -amylase (A3176, *Sigma*) (1 mg protéines /mL, tampon phosphate 0.02 M pH:6.8, 6 heures à 37°C) et une protéase (P5380, *Sigma*) (10 mg protéines /mL, tampon phosphate 0.1 M pH:7.2, 3 heures à 40°C).

A ce stade, nous pouvons noter que les coupes de tiges de maïs sont suffisamment résistantes pour être transférées depuis les lames à puits sur les supports en ZnS pour l'Infrarouge ou sur des lamelles de Quartz ou de verre pour la fluorescence.

Exemples de dégradation enzymatique sur coupe

Des cinétiques de dégradation enzymatique sur coupe de tige de maïs ont été réalisées et observées à plusieurs échelles :

- échelle macroscopique (1 à 10 millimètres) en fond clair pour suivre la dégradation des différentes assises cellulaires à l'INRA de Nantes,
- échelle microscopique (1 à 0,3 microns) en fluorescence au synchrotron SOLEIL pour localiser l'enzyme et suivre l'évolution de la structure des parois,
- échelle de l'imagerie chimique par microspectroscopie dans le moyen Infrarouge au synchrotron SOLEIL pour suivre chimiquement l'évolution des constituants de la paroi cellulaire.

Coupes de tiges de maïs

La figure (Figure 5) montre des images d'une coupe transversale de tiges de maïs obtenues après déparaffinage et prétraitements. Les deux images ont été acquises au microscope en fond clair. Cette figure représente une vue globale de la coupe, permettant de repérer les régions d'intérêt qui seront observées à plus fort grossissement.

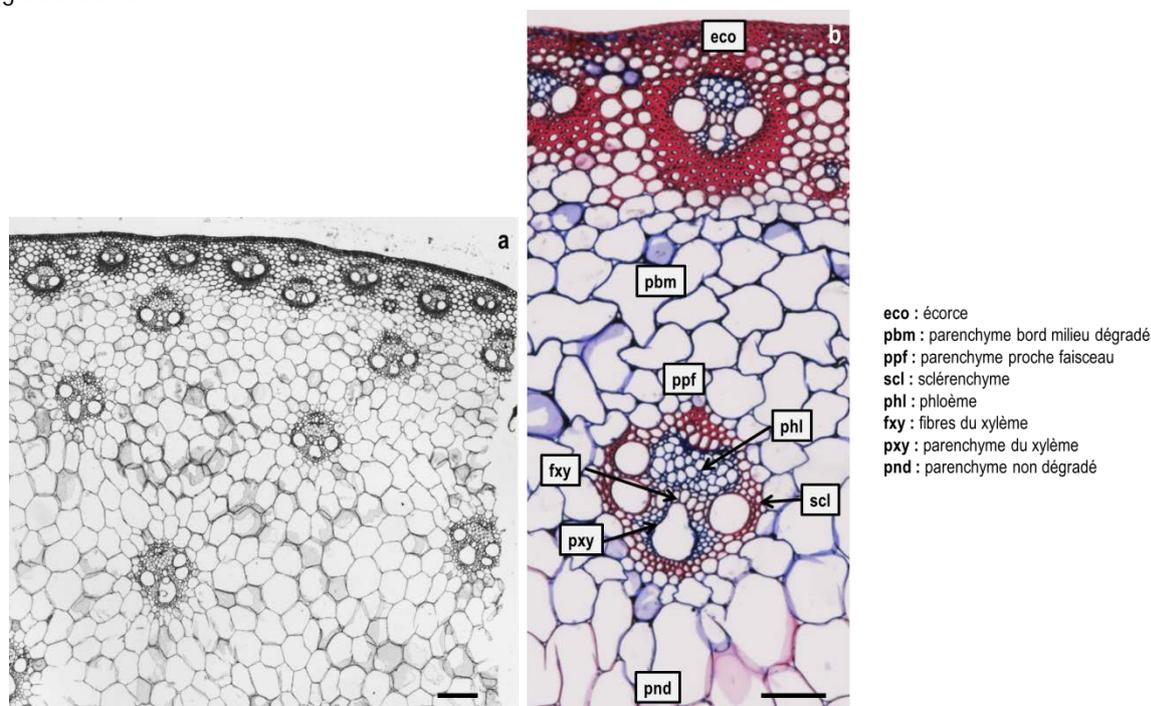


Figure 5. Coupe déparaffinée de 16 μm de tige de maïs. (a) observation en fond clair. (b) observation en fond clair après coloration FASGA au microscope. (barre sur l'image a : 200 μm et sur l'image b : 100 μm)

La région imagée (Figure 5a) correspond à la partie externe d'une section de tige de maïs et comprend l'écorce et un peu de moelle. L'épaisseur de coupe permet de bien observer la structure cellulaire de l'échantillon et de distinguer les différents types cellulaires. On observe que l'écorce est constituée de nombreux faisceaux vasculaires de petite et moyenne tailles et de petites cellules à parois épaisses. Ensuite, en progressant vers le centre de la tige, les faisceaux sont plus grands et dispersés dans des cellules de parenchymes elle-même plus grandes et à paroi fine.

L'image (Figure 5b) montre une région de la coupe après coloration histologique FASGA (Mechin et al., 2005). Les tissus lignifiés apparaissent en rouge/rose, alors que les tissus non lignifiés ou faiblement lignifiés sont colorés en bleu.

Les tissus lignifiés sont représentés par l'écorce située en périphérie de la coupe ainsi que par le sclérenchyme, les fibres du xylème et le parenchyme non dégradé. Les parois des tissus non lignifiés, le phloème et les parenchymes proche écorce, proche faisceau, et xylémien, sont constitués majoritairement de polysaccharides.

Préparation de l'enzyme

Nous avons utilisé pour les expériences suivantes une préparation enzymatique commerciale de dégradation des polysaccharides pariétaux, la cellulose : Celluclast® 1.5L (lot n°CCN03123, Novozymes) produite par le

champignon *Trichoderma reesei*. L'activité de l'enzyme déterminée sur Carboxy Methyl Cellulose est de 6113 nkat/mL et la préparation contient également une activité sur arabinoxylyanes solubles (384 nkat/mL) et sur arabinoxylyanes insolubles (602 nkat/mL). La préparation enzymatique a été dessalée sur une colonne PD-10 (GE Healthcare, *Bio-Sciences AB*) et a été diluée pour avoir une activité enzymatique de 22.3 nkat/mL. Cette dilution a été choisie de façon à obtenir la dégradation d'une coupe de 16 μm en moins de 2 heures à 20°C en y déposant 30 μl d'enzyme.

Echelle macroscopique

Cette étape nous a permis en fond clair de suivre sur une cinétique de 90 minutes la dégradation des différents types cellulaires de la tige de maïs en présence de l'enzyme (**Figure 6**).

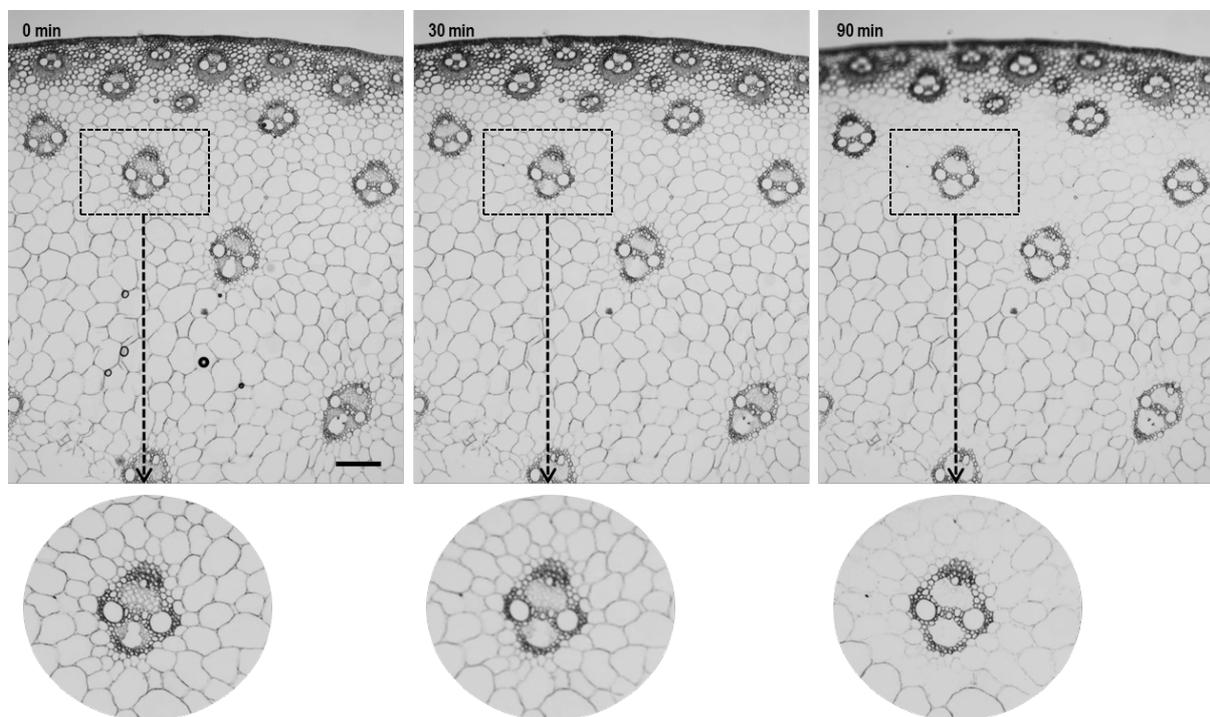


Figure 6. Cinétique de dégradation enzymatique (0, 30 et 90 min) sur une coupe de tige de maïs au microscope en fond clair. Champ de vision: $1392 \times 1040 \mu\text{m}^2$, $1,86 \mu\text{m}/\text{pixel}$. (barre: $250 \mu\text{m}$)

Différentes vitesses de dégradation sont observées en fonction des types cellulaires : le phloème, le parenchyme du xylème, le parenchyme proche écorce et proche faisceau se dégradent le plus rapidement (**Figure 6**). Nous observons que les tissus plus lignifiés (écorce, xylème, sclérenchyme, et parenchyme loin faisceau) ne semblent pas se dégrader en présence de l'enzyme.

Cette expérience nous a permis de vérifier la dégradation enzymatique sur coupe : ajustement de la dilution de l'enzyme et identification des tissus digérés partiellement, totalement ou pas du tout par l'enzyme, et ainsi d'établir des zones d'intérêt à explorer plus finement en utilisant les potentialités du synchrotron.

Ligne de lumière DISCO

L'objectif était ici d'observer simultanément les enzymes et les parois grâce à leurs propriétés respectives d'autofluorescence après excitation dans l'UV profond.

Les images multispectrales en champ large ont été acquises avec le microscope TELEMOS à deux grossissements x10 et x40.

La longueur d'onde d'excitation dans l'UV profond était de λ_{ex} 275 nm. Deux plages de longueurs d'onde d'émission de fluorescence ont été utilisées pour suivre l'enzyme (λ_{em} 327-353 nm) et observer les parois cellulaires (λ_{em} 420-480 nm) grâce à leur autofluorescence.

Les illustrations suivantes (**Figures 7 et 8**) résultent de différentes séries d'acquisition reproductibles en fluorescence et après traitement du signal de l'image (Devaux et al., 2018).

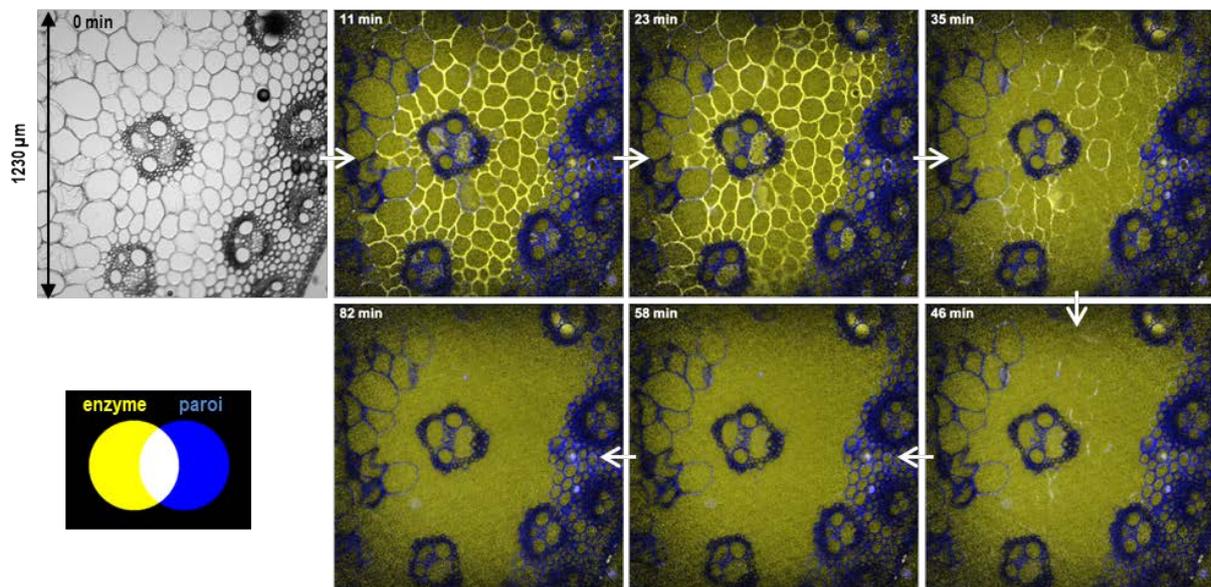


Figure 7. Cinétique de dégradation enzymatique sur une coupe de tige de maïs à 11, 23, 34, 46, 58 et 82 minutes d'hydrolyse : Grandissement x10. Les images ont été corrigées pour le fond et l'éclairage a été homogénéisé. Champ de vision: $1230 \times 1230 \mu\text{m}^2$. Les images couleur sont obtenues en fusionnant les images de l'enzyme (émission entre 327 et 353 nm) dans les canaux rouge et vert et les images des parois (émission entre 420 et 480 nm) dans le canal bleu. La couleur bleue correspond aux parois cellulaires seules; la couleur jaune, à l'enzyme seule; et la couleur blanche : à la colocalisation de l'enzyme avec les parois cellulaires

La figure (**Figure 7**) montre des images couleur obtenues en fusionnant les images de l'autofluorescence des parois (excitation à 275 nm, émission 420-480 nm, représentée en bleu) imputable à la présence des lignines et des acides hydroxycinnamiques et de l'autofluorescence des protéines (excitation 275 nm, émission 327-353 nm, représentée en jaune). Les parois apparaissent en blanc lorsque les deux signaux sont colocalisés.

Les enzymes sont concentrées sur les parois des parenchymes sous l'écorce (pbm), proche faisceau (ppf) sur le phloème (phi), le parenchyme du xylème (pxy) et semblent absentes de la gaine de sclérenchyme des faisceaux (scl), des fibres de xylème (fxy) dans des faisceaux vasculaires, des cellules du parenchyme dans la moelle (pnd) et aussi dans les cellules dans l'écorce.

De plus, nous observons des variations de vitesse de dégradation en fonction des types cellulaires; par exemple, le parenchyme du xylème (pxy) paraît quasiment digéré au bout de 35 minutes, alors que le parenchyme sous l'écorce (pbm) est totalement dégradé au bout de 60 minutes.

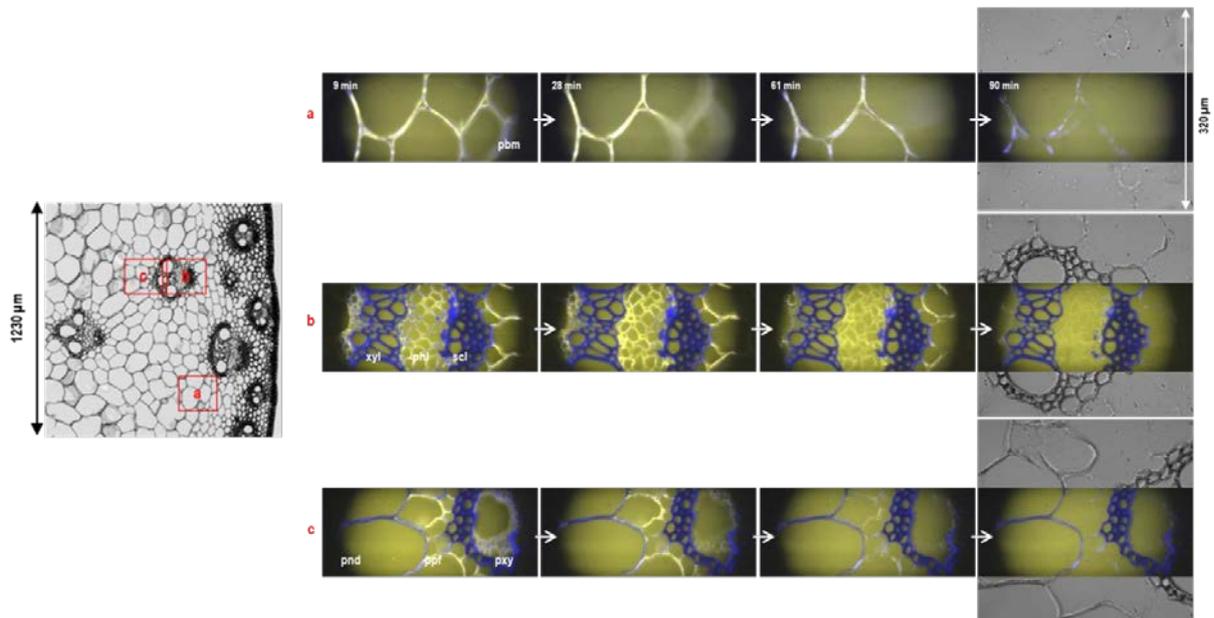


Figure 8. Cinétique de dégradation enzymatique sur une coupe de tige de maïs à 9, 28, 61 et 90 minutes d'hydrolyse : Grandissement x40. Les images ont été corrigées pour le fond et l'éclairage a été homogénéisé. Champ de vision: 320 × 320 µm². Les images couleur sont obtenues en fusionnant les images de l'enzyme (excitation 275 nm - émission entre 327 et 353 nm) dans les canaux rouge et vert et les images des parois (excitation 275 nm - émission entre 420 et 480 nm) dans le canal bleu. La couleur bleue : parois cellulaires seules; la couleur jaune : enzyme seule; et la couleur blanche : co-localisation de l'enzyme avec les parois cellulaires.

(a) zone du parenchyme proche de l'écorce, (b) zone du faisceau et (c) zone du parenchyme proche du faisceau.

La figure (**Figure 8**) montre des images couleur de fluorescence acquise au grossissement x40 de trois régions ciblées de la coupe « a, b et c » à différents temps pendant la cinétique de dégradation.

La première région « a » est composée du parenchyme sous l'écorce (pbm), la seconde région « b » regroupe le faisceau avec le sclérenchyme (scl), le phloème (phl), les fibres du xylème (fxy) et pour terminer la troisième région « c » est constituée du parenchyme du xylème (pxy), du parenchyme proche faisceau (ppf) et du parenchyme loin faisceau (pnd).

Ce grandissement nous confirme les observations réalisées à l'objectif x10 concernant les différentes vitesses de dégradation selon les types cellulaires.

L'observation à l'objectif x40 nous apporte une nouvelle information sur le mode de dégradation de la structure de la paroi. Sur la région « a », nous constatons une séparation des cellules suggérant une dégradation relativement rapide de la lamelle moyenne.

Les acquisitions en fluorescence dans l'UV profond ont montré que seules les parois cellulaires sur lesquelles l'enzyme était concentrée étaient dégradées. Aucun changement n'a été observé sur les parois cellulaires lignifiées : l'autofluorescence de l'enzyme n'y a jamais été observée et les parois cellulaires sont demeurées inchangées.

Ligne de lumière SMIS

La microspectroscopie Infrarouge a été retenue pour suivre les changements de composition des parois des différents types cellulaires au cours de la dégradation enzymatique. Les cinétiques de dégradation enzymatique ont été réalisées en utilisant la cellule microfluidique.

Les mesures de microspectroscopie Infrarouge ont été mises en œuvre en ajustant la fenêtre de mesure à $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ de façon à obtenir un rapport signal sur bruit optimisé. Chaque spectre résultait de l'addition de 128 scans. Le milieu aqueux (eau et enzyme) a été utilisé comme référence pour calculer les spectres Infrarouges. Les spectres ont été collectés entre 4000 et 650 cm^{-1} avec une résolution spectrale de 8 cm^{-1} en utilisant l'objectif $\times 32$ et analysés entre 1550 et 950 cm^{-1} pour observer à la fois la région des sucres et celle des composés phénoliques. La région entre 1550 et 1800 cm^{-1} n'a pu être analysée en raison de la présence d'un signal bruité généré par les mesures en milieu aqueux. Le suivi de dégradation a été réalisé pendant 75 minutes sur 4 points à raison d'un spectre toutes les 6 minutes.

L'ensemble des spectres Infrarouges a été traité par des fonctions écrites au laboratoire dans l'environnement Matlab 2015a (*The MathWorks*, France). La ligne de base a été corrigée par segments affine entre les points 950 , 1180 et 1550 cm^{-1} . Pour chaque spectre les points limites ont été ajustés au minimum voisin. Les spectres sans enzyme ont été normalisés en fixant l'aire sous le spectre égale à 1. Les spectres acquis pendant une cinétique de dégradation ont été normalisés par le maximum du spectre au temps 0 de cette cinétique.

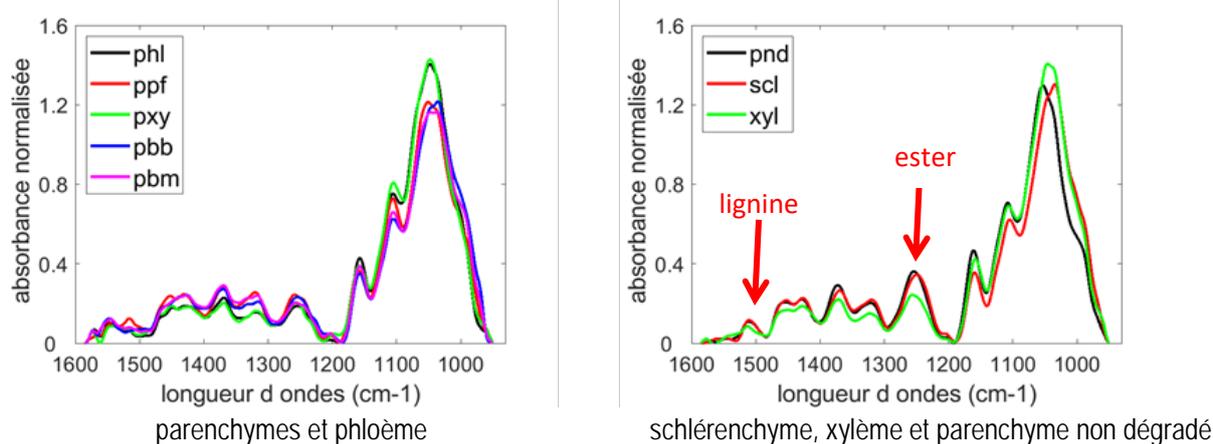


Figure 9. Spectres sans enzyme corrigés pour la ligne de base et normalisés

La figure (Figure 9) montre des spectres des différents types cellulaires sans enzyme et montre que les spectres acquis en milieu liquide à l'aide de la cellule microfluidique ont une allure interprétable sans déformation majeure dans la région 1550 et 950 cm^{-1} . Pour les différents types cellulaires étudiés, on retrouve la présence de lignine et de liaisons ester dans les types cellulaires dont la paroi ne se dégrade pas. Des variations d'absorption dans la région des sucres sont observées présageant de variations de composition des parois en polysaccharides en fonction des types cellulaires.

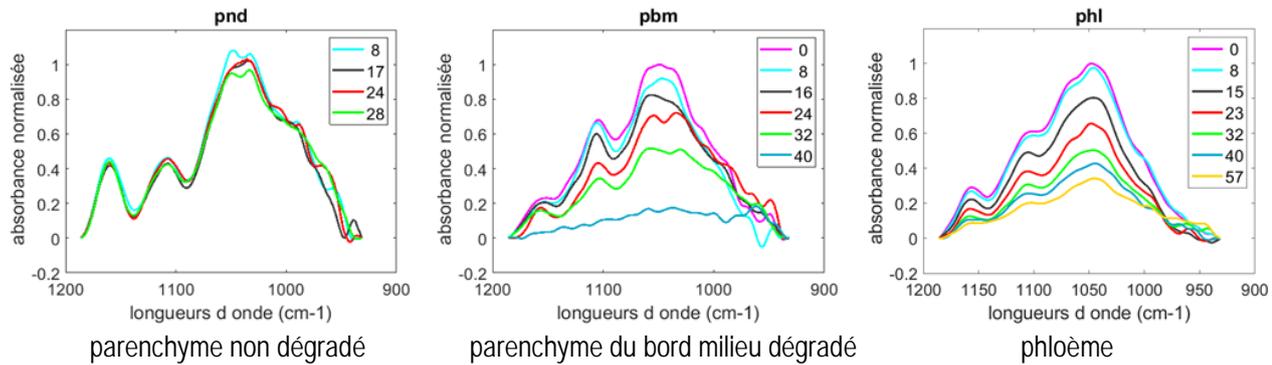


Figure 10. Spectres après dégradation par la cellulase centrés sur la région des sucres (corrigés pour la ligne de base et normalisés par rapport au spectre au temps 0)

La figure (Figure 10) montre l'évolution des spectres au cours de la dégradation enzymatique dans la région des sucres. Pour les tissus résistants à la dégradation, aucune évolution des spectres n'est observée. Pour les tissus qui se dégradent, on observe globalement une diminution de l'absorbance au cours du temps. Outre le caractère dégradable ou non des parois des différents types cellulaires, l'autre facteur mis en évidence est la vitesse de dégradation au cours du temps; ainsi le phloème et le parenchyme du bord milieu sont dégradés plus rapidement que les autres parenchymes.

Les tissus qui ne se dégradent pas sont riches en lignines tandis que les tissus qui se dégradent sont essentiellement constitués de cellulose et d'hémicelluloses.

Conclusion et Perspectives

Grâce à l'association de différentes approches d'imagerie avec une préparation commune des échantillons, nous avons pu aborder les aspects dynamiques de la dégradation enzymatique.

L'imagerie de fluorescence en temps réel nous a permis de localiser l'enzyme aussi bien au niveau tissulaire que cellulaire alors que la technique de microspectroscopie FT-IR nous a permis d'accéder aux changements structuraux et moléculaires des parois cellulaires sous l'action de l'enzyme.

Cette étude a clairement montré des comportements différents des parois vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique en fonction des types cellulaires. Ces comportements sont à rapprocher des variations de composition des parois également mises en évidence.

Cette étude valide le choix de la préparation de l'échantillon par inclusion en paraffine. On peut noter que ce type de préparation pourrait parfaitement être utilisé pour d'autres acquisitions telles que la microspectroscopie Raman ou pour d'autres colorations histologiques.

La prochaine étape consistera à suivre la dégradation enzymatique de biomasse lignocellulosique cette fois-ci sous forme de particules et après prétraitement en exploitant les facilités offertes par les 2 lignes de lumière du synchrotron SOLEIL.

Nous étudions la possibilité de développer toujours en collaboration avec les scientifiques de la ligne DISCO, une cellule à perfusion nous permettant de voir arriver l'enzyme progressivement sur l'échantillon comme ce qui a été réalisé avec la cellule microfluidique sur la ligne SMIS.

Remerciements

Nous souhaitons remercier l'ensemble des acteurs de ce travail : les membres de l'équipe « Paroi Végétale et Polysaccharides Pariétaux », plus particulièrement Fabienne Guillon et Marie-Françoise Devaux pour leur aide scientifique et leurs conseils à la rédaction de cet article, Estelle Bonnin pour son expertise sur les enzymes, ainsi que les membres des lignes de lumière DISCO et SMIS du synchrotron SOLEIL, plus particulièrement Frédéric Jamme, Christophe Sandt et William André.

Références bibliographiques

Allouche F, Hanafi M, Jamme F, Robert P, Barron C, Guillon F, et Devaux MF (2012) Coupling hyperspectral image data having different spatial resolutions using Multiple Co-inertia Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **117(1)** 200–212.

Arantes V, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* **3**: 4.

Birarda G., Greci G, Businaro L, Marmiroli B, Pacor S, Piccirilli F, Vaccari L. (2010). Infrared microspectroscopy of biochemical response of living cells in microfabricated devices. *Vibrational Spectroscopy* **53** : 6-11.

Boukari I, Putaux JL, Cathala B, Barakat A, Saake B, Remond C, O'Donohue M, Chabbert B (2009) In Vitro Model Assemblies To Study the Impact of Lignin-Carbohydrate Interactions on the Enzymatic Conversion of Xylan. *Biomacromolecules* **10(9)** 2489-2498.

Devaux MF, Jamme F, André W, Bouchet B, Alvarado C, Durand S, Robert P, Saulnier L, Bonnin E, Guillon F (2018) Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* **9** : art200

Frederick J, Sandt C, Le François S, Greci G, Vaccari L, Malloggi F, Dumas P (2012) A Microfluidic Device For Single Cell Infrared Microspectroscopy Analysis at the SMIS Beamline in: *11th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation*, Lyon, 9-12 July.

Giuliani A., Jamme F, Rouam V, Wien F, Giorgetta JL, Lagarde B, Chubar O, Bac S, Yao I, Rey S (2009) DISCO: a low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL. *Journal of Synchrotron Radiation* **16** : 835-841.

Jamme F, Kascakova S, Villette S, Allouche F, Pallu S, Rouam V, Refregiers M (2013) Deep UV autofluorescence microscopy for cell biology and tissue histology. *Biology of the Cell* **105(7)** 277-288.

Kumar R, Wyman CE (2009) Cellulase Adsorption and Relationship to Features of Corn Stover Solids Produced by Leading Pretreatments. *Biotechnology and Bioengineering* **103(2)** 252-267.

Legland D, Devaux MF, Guillon F (2014) Statistical Mapping of Maize Bundle Intensity at the Stem Scale Using Spatial Normalisation of Replicated Images. *Plos One* **9(3)** : e90673.

Méchin V, Argillier O, Rocher F, Hébert Y, Mila I, Pollet B (2005) In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(15)** 5872–5881.

Tawil G, Jamme F, Réfrégiers M, Viksø-Nielsen A, Colonna P, Buléon A (2011) In Situ Tracking of Enzymatic Breakdown of Starch Granules by Synchrotron UV Fluorescence Microscopy. *Analytical Chemistry* **83(3)** 989–993.