

Les F-techniques révèlent l'architecture des parois lignifiées

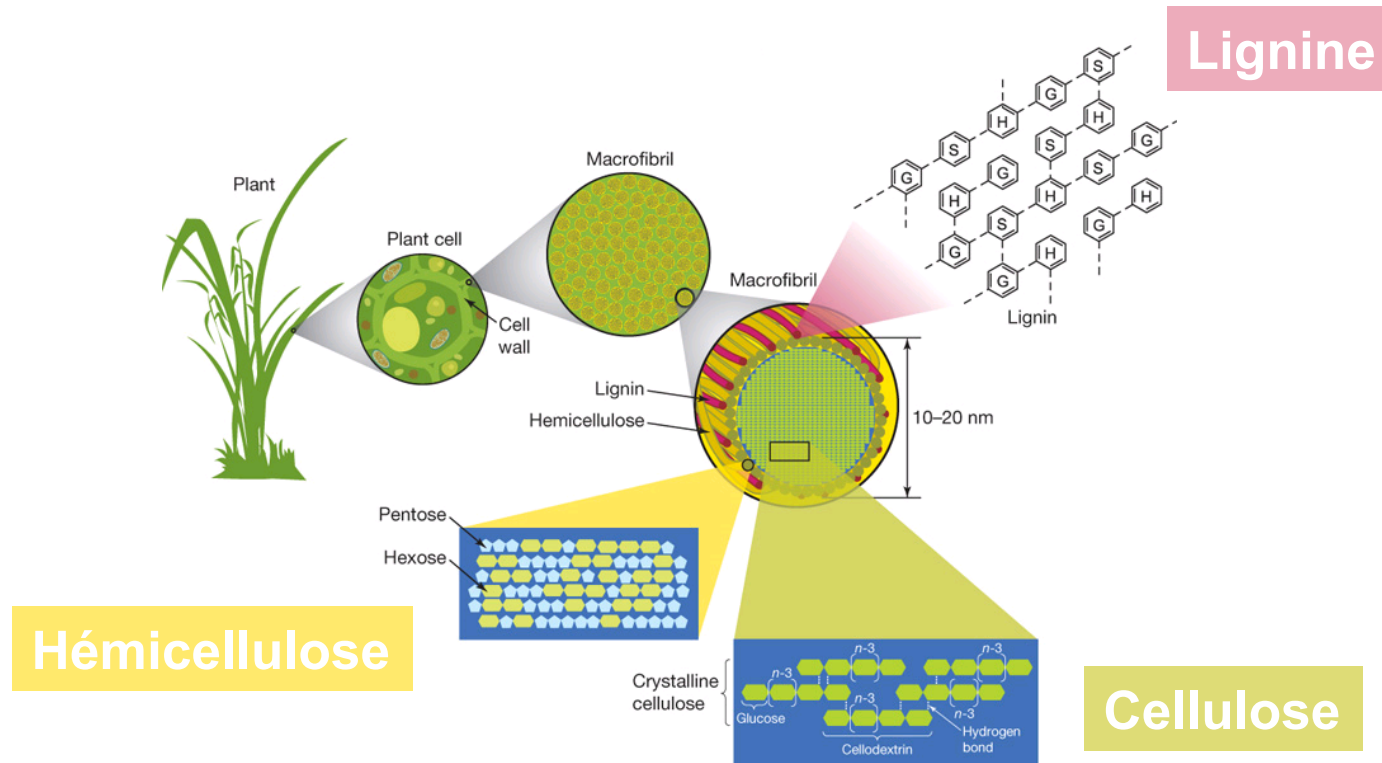


Anouck HABRANT - Gabriel PAËS - Brigitte
CHABBERT



Contexte

La biomasse lignocellulosique (BL) constitue le “squelette” des végétaux et son utilisation en tant que matière première est potentiellement une ressource renouvelable pour fournir des produits chimiques, matériaux et bio-carburants (2G)

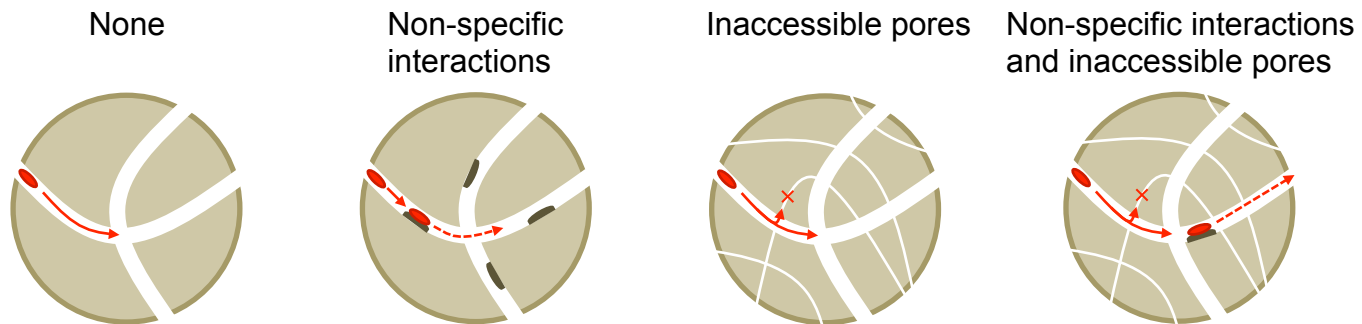


Rubin EM 2008, Nature 454, p. 841

Contexte

MAIS la BL est très complexe aux niveaux architectural (structure multi-échelle) et chimique (variabilité des polymères et de leurs interactions)

La transformation de la BL par des voies vertes (micro-organismes, enzymes) efficaces est encore limitée par des contraintes d'accessibilité (porosité, interactions non spécifiques) et d'inefficacité enzymatique

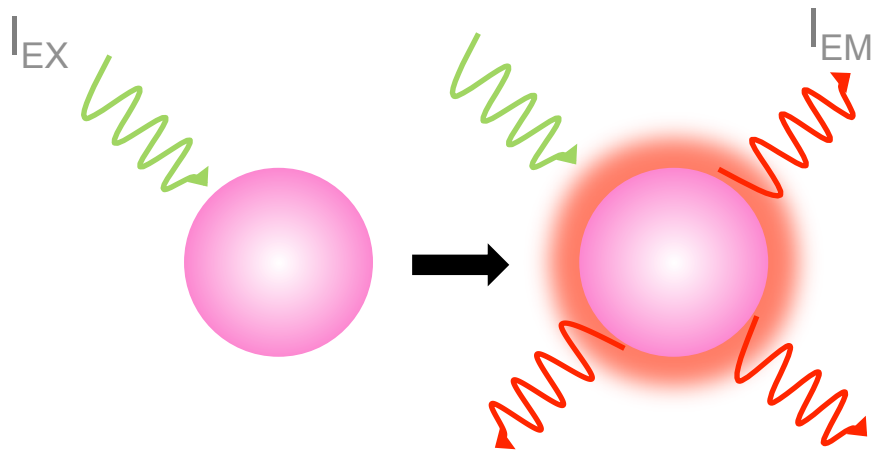


Une solution : utiliser des pré-traitements physico-chimiques qui vont fragiliser la BL et faciliter l'action des enzymes

Objectifs

Caractériser l'impact des pré-traitements sur :

- Les propriétés de fluorescence de la BL, à relier à la composition et l'architecture
- La mobilité de sondes fluorescentes



F-techniques

Les propriétés de fluorescence d'un fluorophore sont très sensibles et fortement dépendantes de son environnement (interactions) et se traduisent au niveau de :

- L'intensité de fluorescence
- Les λ_{EX} et λ_{EM}
- Le temps de vie de fluorescence

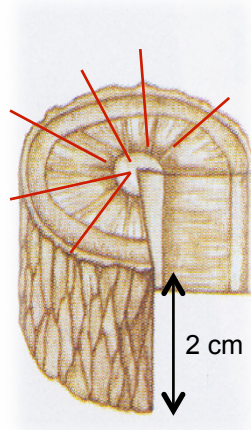
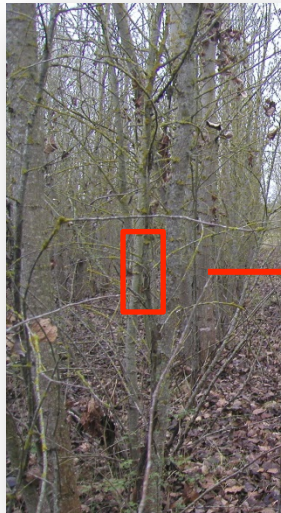
Résultat attendu

Corréler les propriétés de la BL avec la mobilité des sondes par l'utilisation des F-techniques

Pré-traitements de la BL

Peuplier

(courte rotation)



Témoin = brut

Eau 4°C

Hydrothermique

Eau 170°C

Alcalin

NH₃ à temp. ambiante

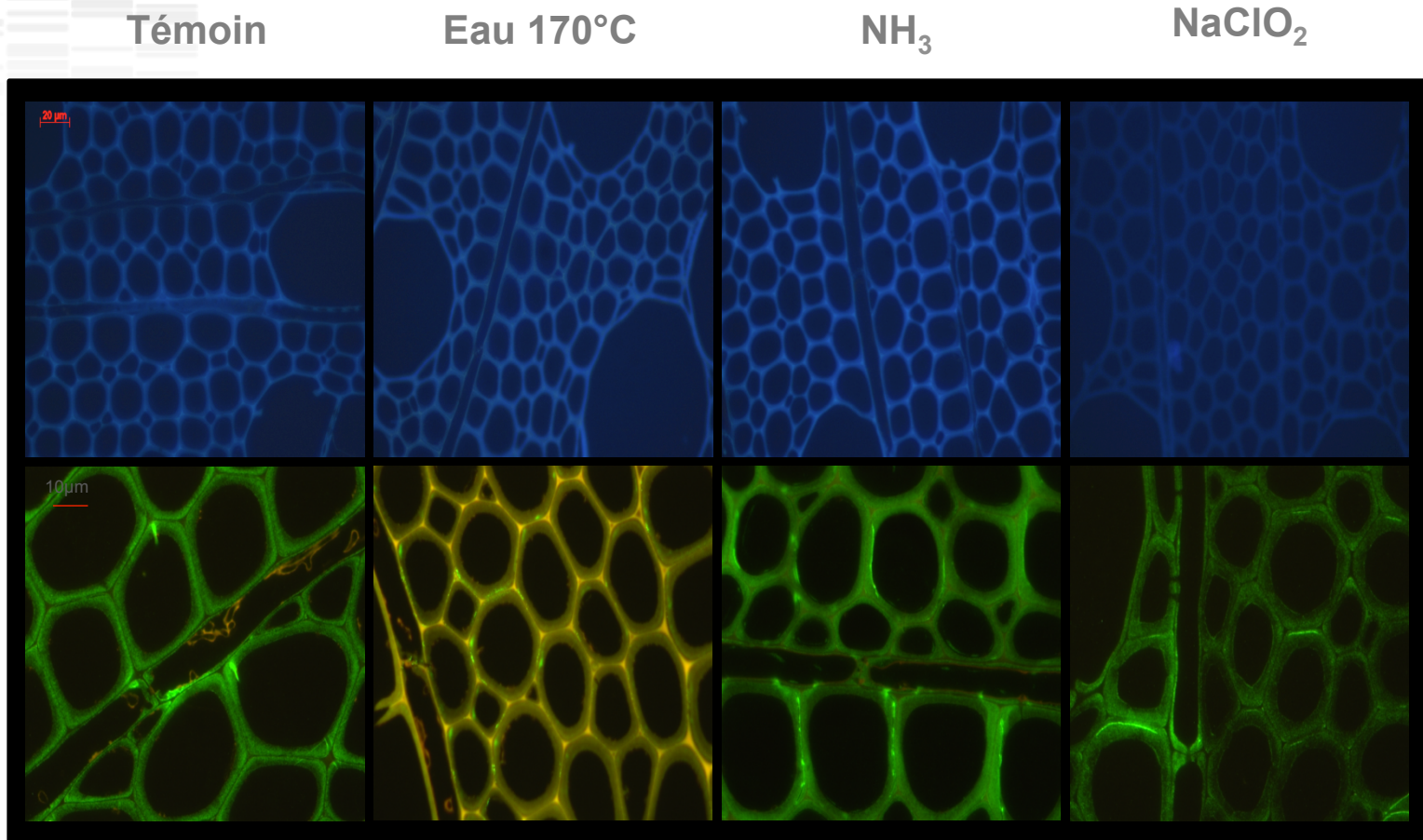
Chlorite

NaClO₂/acide acétique 70°C



1 cm

Fluorescence des tissus

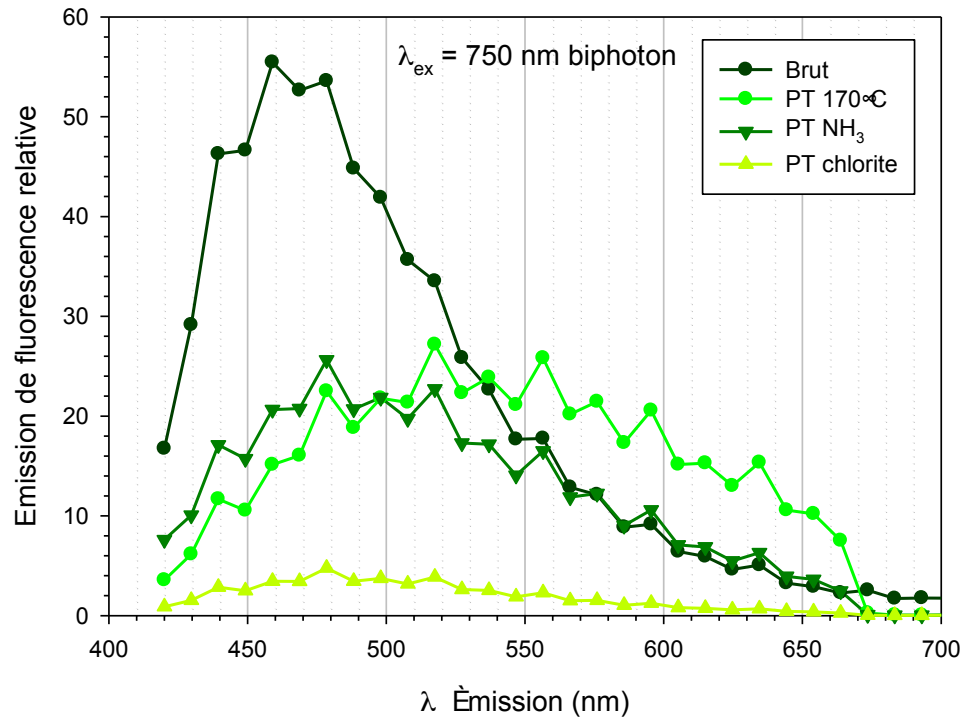


Baisse de l'autofluorescence surtout avec le PT NaClO₂ : baisse proportion lignine
Marquage faible des xylanes avec le PT eau 170°C : perte hémicelluloses

Fluorescence spectrale

L'intensité du spectre d'émission d'un fluorochrome dépend de la longueur d'onde d'excitation, de la concentration et du coefficient d'extinction molaire

Spectre d'émission en fonction du PT

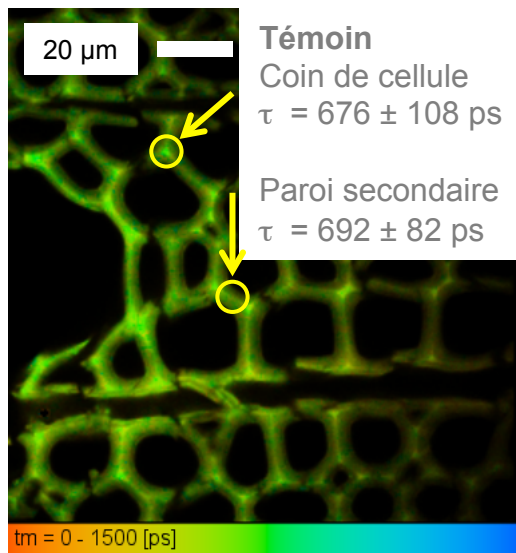


Effets hypochromique (\searrow intensité) et bathochromique ($\nearrow \lambda_{EM}$) des PT : baisse de proportion des composés phénoliques et modification de la nature des fluorochromes

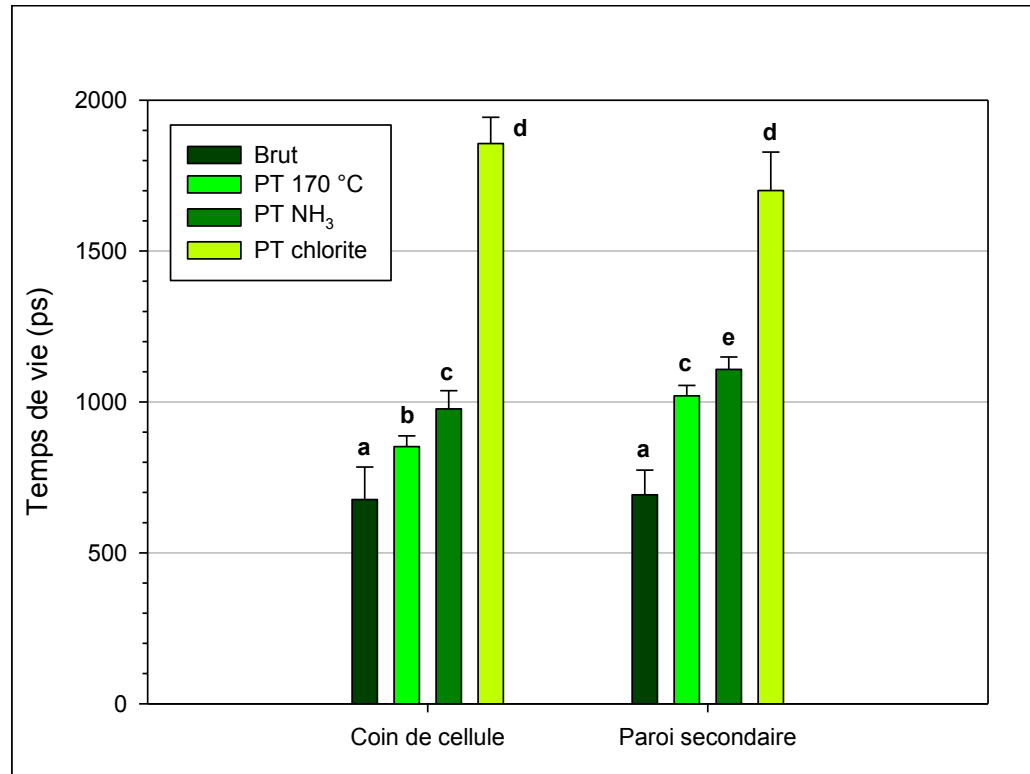
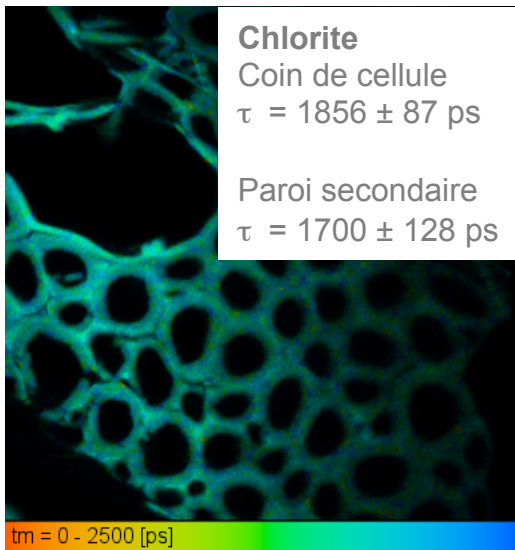
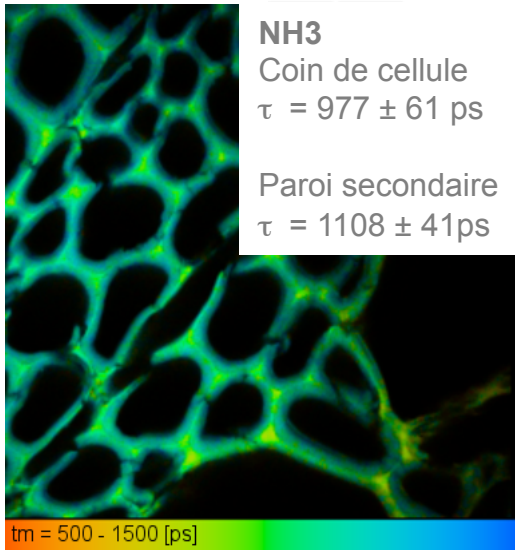
Temps de vie de fluorescence (FLIM)

Le temps de vie de fluorescence τ d'un fluorochrome correspond à la durée où il reste dans son état excité : τ est très dépendant de son environnement (interactions, pH,...) mais indépendant de sa concentration

Influence du PT sur le τ des composés fluorescents en fonction de la localisation cellulaire dans le xylème, $\lambda_{\text{ex}} = 750\text{nm}$ (bi-photon)



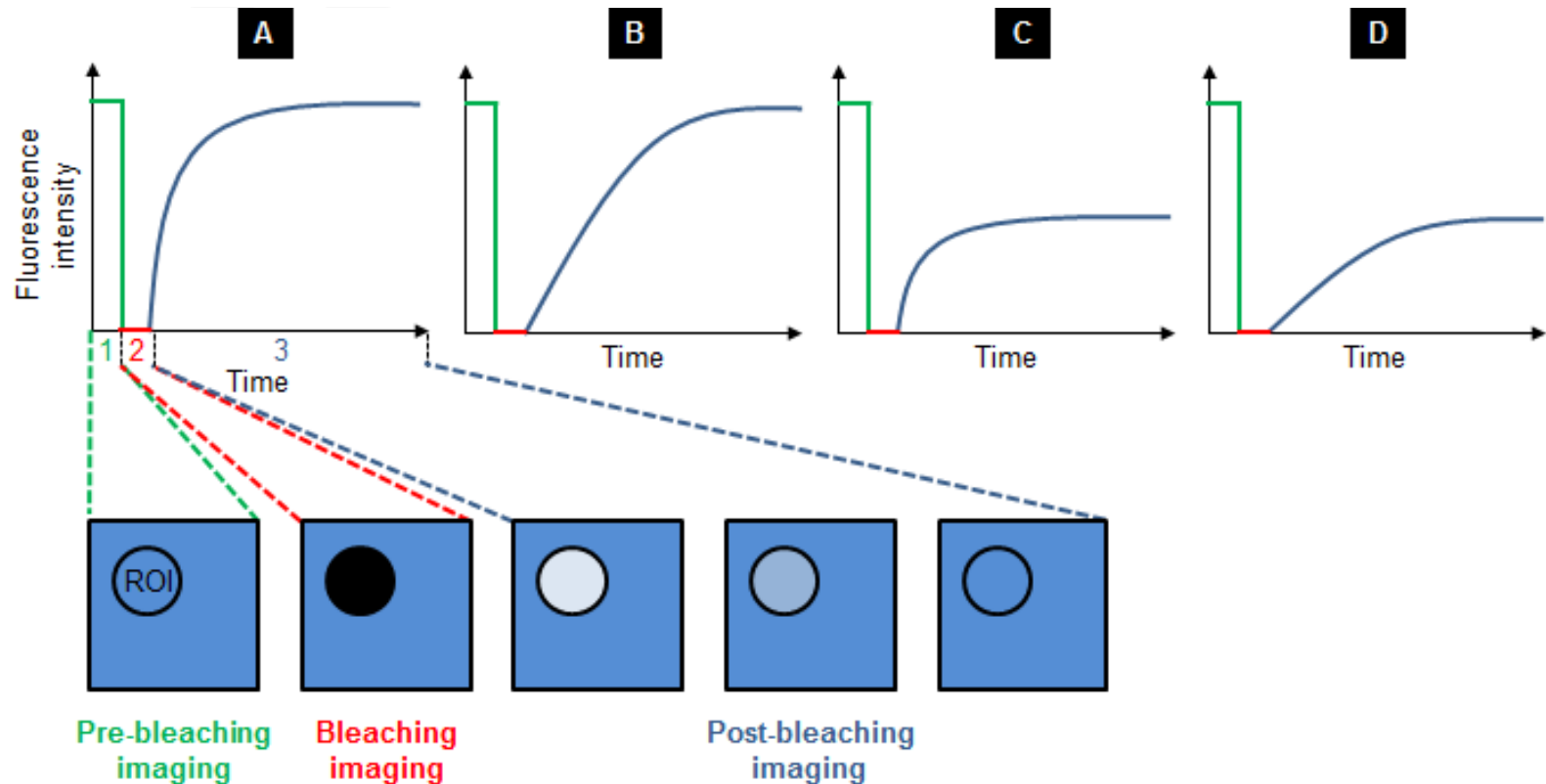
Temps de vie de fluorescence (FLIM)



Augmentation de τ : destructuration de la lignine, plus importante dans les parois secondaires pour PT 170 et NH₃ que dans les coins de cellule, et très élevée avec le PT chlorite

Mobilité de sondes fluorescentes (FRAP)

Principe : mesure du retour de fluorescence après blanchiment d'une zone d'intérêt

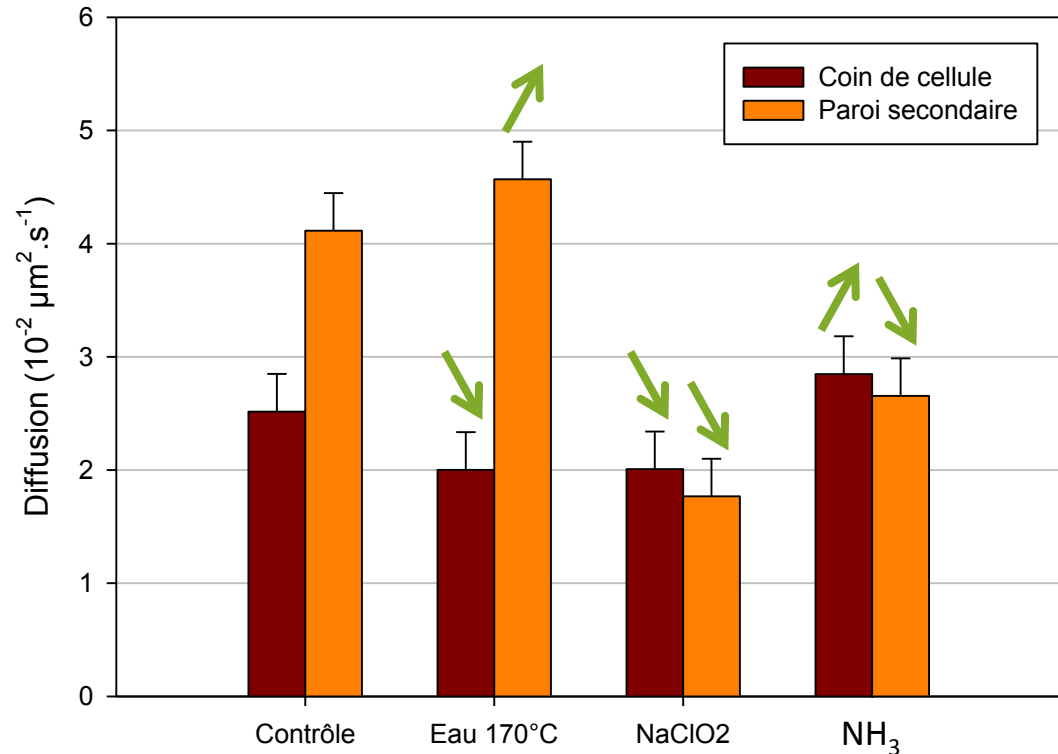
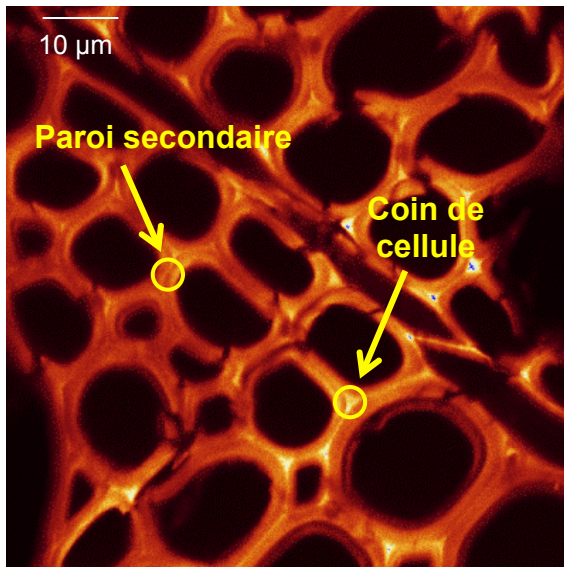


L'analyse de la cinétique et de l'amplitude du recouvrement permet de calculer :

- Le coefficient de diffusion : renseigne sur l'encombrement et les interactions
- La fraction mobile : renseigne sur la compartimentation

Mobilité de sondes fluorescentes (FRAP)

Sections de peuplier PT incubées avec une enzyme rendue fluorescente (xylanase = glycoside hydrolase de la famille 11, greffée à un fluorophore rhodamine, activité inchangée) - mesure de sa diffusion par FRAP



La diffusion de la xylanase varie selon le couple PT / localisation : impact distinct des PT selon la localisation
Diminution de la diffusion des sondes dans les parois secondaires après le PT chlorite

Conclusions & Perspectives

Intérêt de la combinaison des F-techniques

Caractérisation sur la même série d'échantillons – les sondes fluorescentes sont des révélateurs de l'architecture

La diffusion des enzymes n'est pas nécessairement favorisée par la diminution de la teneur en lignine : les coins des cellules sont moins impactés que les parois secondaires.

La réorganisation locale des polymères (notamment interactions hémicellulose/lignine) impacte fortement la diffusion

Perspectives

Analyse sur différentes BL avec différentes sondes fluorescentes

Corrélation mobilité de sonde / rendement de saccharification (thèse démarrée en octobre 2014 – Mickaël Herbaut)

Remerciements

Support financier



FARE
www6.lille.inra.fr/fare



FUTUROL Procéthol 2G
www.projetfuturol.com

Assistance technique

FARE : Hassen Douzane,, Jordane Ossemond

Plateforme de microscopie PICT (Reims) : Christine Terryn

Références

Paës et al., Biomacromolecules 2012

Paës et al., Biomacromolecules 2013

Paës, Molecules 2014