

APPORTS DES TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES EN BIOLOGIE VÉGÉTALE

Camille LARUE^{1*}, Ana Elena PRADAS DEL REAL², Marie CARRIÈRE³, Géraldine SARRET⁴, Hiram CASTILLO-MICHEL⁵

camille.larue@ensat.fr

1. EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France
 2. IMIDRA (*Madrid Institute for Agricultural Research*), A-II, Km: 38.200, Alcalá de Henares, Espagne
 3. INAC-SyMMES, CIBEST, Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38000 Grenoble, France
 4. ISTERre (*Institut des Sciences de la Terre*), Univ. Grenoble Alpes, CNRS, 38000 Grenoble, France
 5. ESRF *The European Synchrotron*, CS 40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France
- *auteur principal

ABSTRACT

Although spectroscopic techniques based on very large research infrastructures are commonly used in disciplines such as physics or material sciences, they are less common among plant biologists. However, they give access to information that can greatly advance our understanding of biological mechanisms.

Micro X-ray fluorescence spectroscopy (μ XRF) based on synchrotron radiation makes it possible to obtain elemental distribution maps with a lateral resolution down to submicrometer scale and high sensitivity. In addition to μ XRF, some synchrotron beamlines have the capability to perform micro-X-ray absorption spectroscopy (μ XAS) analysis. This technique allows to probe the local structure of the element of interest and to determine its oxidation state and its ligands. This

is for example very useful in ecotoxicology to understand the behavior and fate of a contaminant to better evaluate its bioavailability and possible impacts on the environment. Alternatively, in agronomy this information can be used to improve plant nutrition. These techniques are, however, extremely dependent on a proper sample preparation. For about ten years, much progress has been made both on the equipment of synchrotron beamlines and on the sample preparation techniques to take into account the particular nature of biological samples (highly hydrated, fragile and sensitive to radiation). These different points will be developed through the example of plants (*Lactuca sativa*, lettuce) exposed to a foliar iron salt supply and addition of silver nanoparticles.

KEY WORDS

Distribution, Mapping, Plant, Speciation, Spectroscopy, Synchrotron

RESUME

Si les techniques spectroscopiques basées sur les très grandes infrastructures de recherche (TGIR) sont couramment utilisées dans des disciplines telles que la physique ou encore les sciences des matériaux, elles sont moins répandues chez les biologistes. Elles permettent pourtant d'accéder à des informations qui peuvent faire grandement avancer notre compréhension des mécanismes biologiques.

La micro-spectroscopie par fluorescence X (μ XRF) basée sur le rayonnement synchrotron permet de réaliser des cartographies élémentaires avec une résolution latérale pouvant descendre à quelques centaines de nanomètres et une grande sensibilité. En parallèle à la μ XRF, certaines lignes de lumière au synchrotron permettent de coupler la micro-spectroscopie d'absorption des rayons X (μ XAS). Grâce à cette technique, on peut sonder la structure de l'élément d'intérêt et déterminer en particulier son état d'oxydation et ses ligands. C'est par exemple très utile en écotoxicologie pour comprendre le comportement et le devenir d'un contaminant pour mieux évaluer son impact sur l'environnement ou en agronomie pour enrichir des cultures en éléments minéraux. Ces techniques sont cependant extrêmement tributaires d'une bonne préparation d'échantillons. Depuis une

dizaine d'années environ, de nombreux progrès ont été fait tant sur l'équipement des lignes de lumière que sur les techniques de préparation d'échantillons pour prendre en compte la nature particulière des échantillons biologiques (hautement hydratés, fragiles et sensibles aux rayonnements). Ces différents points seront développés au travers de l'exemple de plantes (*Lactuca sativa*, salade) exposées à un apport foliaire en fer avec ajout de nanoparticules d'argent.

MOTS CLES

Cartographie, Distribution, Plante, Spéciation, Spectroscopie, Synchrotron

INTRODUCTION

Les **plantes** sont un élément central des écosystèmes en tant que producteurs primaires, et sont d'une importance capitale pour l'approvisionnement alimentaire mondial. Comme tous les organismes vivants, les plantes ont des mécanismes extrêmement complexes pour réguler l'homéostasie des métaux afin d'assurer un fonctionnement optimal. Au fil des années, les connaissances dans ce domaine ont évolué (famille de transporteurs, forme chimique transportée, chélateurs,...) grâce à l'utilisation de techniques analytiques combinant résolution spatiale, bonne sensibilité et identification chimique [1].

Un nouveau domaine de recherche en essor est celui des **nanotechnologies** ou comment exploiter les propriétés de la matière à l'échelle nanoparticulaire dans différentes applications industrielles. Les nanomatériaux sont définis comme des matériaux (naturel ou d'origine anthropique) qui contiennent plus de 50% de particules avec une distribution en taille comprise entre 1 et 100 nm [3]. En raison de leur rapport surface/volume élevé (> 1% d'atomes à la surface), ils présentent différentes caractéristiques par rapport au même matériau macro ou micro dimensionné, par exemple une réactivité de surface accrue ou une meilleure conductivité. Les nanomatériaux sont, aujourd'hui, présent dans un grand nombre de produits de consommation courante (textiles, produits d'hygiène, cosmétiques, appareils médicaux, médicaments, produits alimentaires, peintures, etc...). Du fait de leurs propriétés, ils suscitent des interrogations nouvelles quant à leur toxicité pour l'homme et l'environnement après dissémination.

En France, toute entité produisant ou important des nanomatériaux est soumise à une déclaration obligatoire dans la base R-nano gérée par l'ANSES (Agence française de Sécurité Sanitaire). La dernière analyse de cette base fait ressortir que la majorité des applications se situe dans la catégorie « **produits phytopharmaceutiques** » (68% des déclarations). Ils peuvent jouer différents rôles au sein de ces produits. Ils peuvent agir, par exemple, en tant que vecteur en facilitant l'internalisation de différentes substances. Ces substances sont soit chargées à l'intérieur des nanomatériaux soit adsorbées à leur surface. Ils peuvent également permettre un relargage contrôlé des molécules actives (par exemple sous condition de pH). Ils peuvent aussi être utilisés pour leurs propriétés propres, c'est le cas, par exemple, des nanoparticules d'Ag qui ont des propriétés antibactériennes. Parmi les nanomatériaux les plus couramment évoqués, on retrouve les nanoparticules de TiO_2 , Ag, CuO, et ZnO [4]. Les études publiées concernant les interactions plantes/nanomatériaux ont, entre autres, démontré le transfert des nanomatériaux dans les végétaux à la fois par voie racinaire et par voie foliaire, des impacts physiologiques menant soit à un rendement accru dans certains cas, soit à des symptômes toxiques dans d'autres, et des transformations chimiques [5].

Ainsi, dans cette expérience, nous avons voulu étudié la combinaison de deux pratiques agricoles qui sont la fertilisation foliaire en Fe (sous forme EDTA) ayant pour but à la fois de permettre une meilleure croissance de la plante mais également dans certains pays de palier à des problèmes de carences humaines en Fe et l'apport foliaire de nanopesticides (nanoparticules d'Ag antibactériennes). La question qui se pose est de savoir qu'elles peuvent être les interactions de ces deux produits, est-ce que la présence de nanoparticules d'Ag pourrait permettre une meilleure assimilation du Fe ou au contraire la diminuer ?

Pour cela, nous avons exposé des feuilles de salade, soit à du Fe seul soit à du Fe et des nanoparticules d'Ag. Nous nous sommes ensuite appuyés sur une sélection de techniques spectroscopiques permettant de déterminer la distribution (μ XRF) et la spéciation (μ XAS) d'éléments dilués dans une matrice complexe. Le principe de fonctionnement de ces différentes techniques sera explicité et elles seront appliquées à notre cas d'étude. Un paragraphe sera également dédié à la préparation d'échantillons qui est un prérequis indispensable pour obtenir des résultats fiables.

MISE EN PLACE EXPERIMENTALE

Des plantules de laitue (*Lactuca sativa*, var. Laitue Romaine) d'environ 2 semaines ont été acquises chez un maraicher, ces laitues ont été transférées dans du compost pour poursuivre leur croissance en conditions contrôlées (photopériode jour/nuit 16 h/8 h, température jour/nuit 24/20 °C et humidité relative jour/nuit 49/74%) jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade cinq feuilles (**Figure 1A**). Elles ont été arrosées avec de l'eau du robinet *ad libitum*.

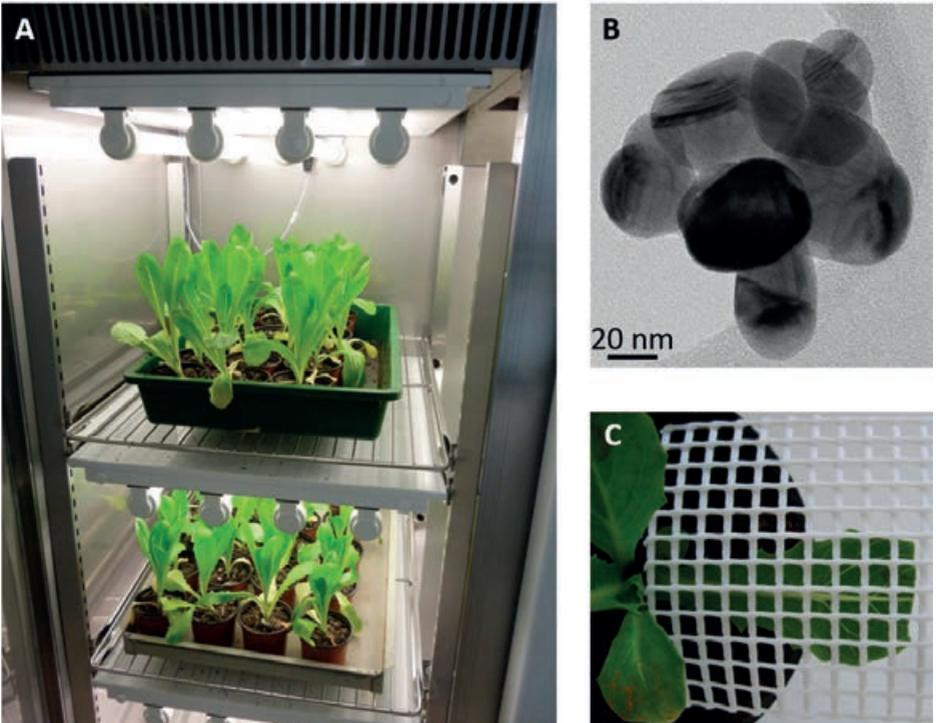


Figure 1 : Exposition foliaire des salades. **A**. Conditions de culture contrôlées. **B**. Nanoparticules d'argent en MET. **C**. Système pour évaluer la dose de produits à amener en fonction de la superficie de la feuille (1 carré représente 25 mm²).

Les nanoparticules utilisées ont été fournies par la société PPG (Pittsburgh, Pennsylvanie, États-Unis). Ce sont des nanoparticules d'Ag sans enrobage, de forme majoritairement ronde et de diamètre nominal moyen de 39 ± 13 nm (**Figure 1B**). Leur surface spécifique a été mesurée à 4.1 m²/g. Avant exposition,

une suspension mère fraîche a été préparée avec de l'eau ultrapure (500 mg/L) et homogénéisée pendant 3 minutes dans un bain à ultrasons. Les nanoparticules en suspension avaient un diamètre hydrodynamique de 48 ± 29 nm, c'est-à-dire qu'elles étaient relativement bien dispersées, ce qui a été confirmé par un potentiel zeta élevé de -30 mV. La dissolution des nanoparticules dans l'eau a été évaluée à environ 5 % (mesure à l'électrode spécifique). Pour le fer, la forme Fe-EDTA a été choisie car représentative des produits à base de fer appliqués par voie foliaire dans l'agriculture (à l'inverse la forme Fe-EDDHA est privilégiée pour les apports au sol). Une solution mère de 500 mg/L a également été préparée juste avant exposition.

L'exposition a été réalisée en une seule fois sur la face adaxiale des feuilles. Pour se faire, 1 μ L a été déposé par 25 mm² de surface foliaire menant à une concentration finale appliquée d'environ 50 μ g/g de matière fraîche (MF) (**Figure 1C**). Trois traitements ont été mis en place : plante témoin avec uniquement de l'eau ultrapure, plante avec 50 μ g/g Fe-EDTA et plante avec 50 μ g/g Fe-EDTA + 50 μ g/g nanoparticules d'Ag. Lors de notre expérience au synchrotron, nous nous sommes focalisés sur le statut du fer, pour cette raison le traitement avec de l'Ag seul n'a pas été réalisé.

Après une exposition de 7 jours, les plantules ont été récoltées et les feuilles ont été soigneusement lavées avec de l'eau ultrapure avant préparation pour les analyses synchrotron.

PREPARATION D'ÉCHANTILLONS

La préparation des échantillons est une étape critique pour les techniques d'imagerie comme la μ XRF et encore plus critique pour les techniques axées sur la spéciation élémentaire (μ XAS) [2]. Ainsi, pour la μ XRF, les protocoles de préparation des échantillons doivent essentiellement préserver la distribution élémentaire. Pour la μ XAS, il faut également préserver la forme chimique de l'élément d'intérêt, ce qui impose des contraintes supplémentaires (comme par exemple, l'impossibilité d'utilisation des fixateurs chimiques).

En imagerie, on peut analyser aussi bien des distributions à l'échelle de l'organe (feuille entière, on moyenne alors le signal acquis sur la totalité de l'épaisseur analysée) ou des cellules. Dans ce cas, on s'oriente alors vers la préparation de coupes fines (entre 20 et 50 μ m) qui permettent d'acquérir le signal provenant approximativement d'une seule couche de cellules.

Comme alternative à la fixation chimique, de nouveaux protocoles de préparation d'échantillons ont été développés au cours des dix dernières années. Il y a par exemple, la **cryofixation** qui consiste à congeler rapidement un échantillon. Cela permet ainsi de transformer l'eau à l'état liquide contenu dans les tissus en eau à l'état solide amorphe sans induire de nucléation de cristaux de glace hexagonaux qui endommageraient les structures morphologiques et entraîneraient une redistribution élémentaire. Dans ce protocole, l'échantillon est dans un premier temps plongé frais dans une résine visqueuse qui durcit à basse température (on parle de résine OCT® pour Optimal Cutting Temperature). Cette résine a la particularité de ne pas pénétrer les tissus, ne servant ainsi que de support pour la manipulation ultérieure des échantillons. Pour une bonne préservation des structures, l'échantillon doit être de petite taille (quelques mm au maximum). Dans un second temps, l'assemblage résine plus échantillon est congelé en le plongeant dans un cryogène qui peut être du propane, de l'éthane ou de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide [7] (**Figure 2A**).

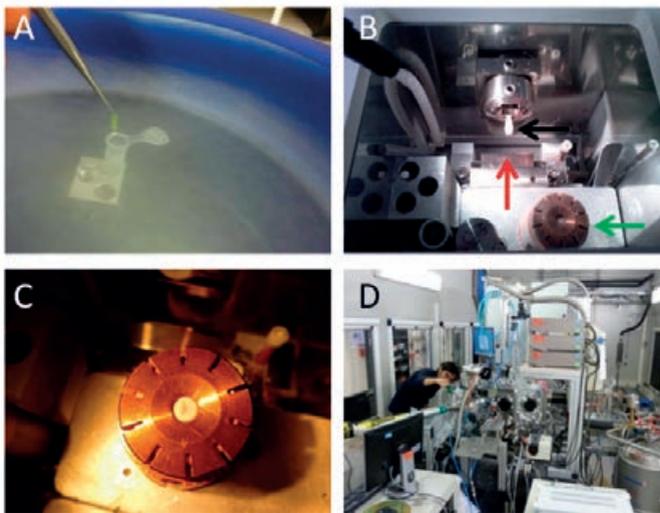


Figure 2 : Préparation d'échantillons. A. Inclusion de l'échantillon (quelques mm) dans de la résine OCT®. Le tube est ensuite plongé dans de l'isopentane refroidie à l'azote liquide. B. Présentation du cryomicrotome et de la chambre de coupe. Flèche noire : échantillon dans son bloc de résine, flèche rouge : lame de coupe en acier inoxydable. Flèche verte porte-échantillon refroidie. C. Porte échantillon en cuivre (matériau conducteur thermique) prêt à être transféré dans la chambre d'analyse. On voit la coupe de feuille en plus foncé au milieu (autour en blanc : résine). D. Cabane expérimentale d'ID21 (ESRF) : transfert de l'échantillon dans la chambre d'analyse équipée avec le système cryogénique (tank d'argon en bas à droite).

L'étape suivante est la **coupe** en conditions cryogéniques en utilisant un cryostat ou cryomicrotome. Pour chaque type de matrice, il est nécessaire d'optimiser la température de la chambre expérimentale et éventuellement celle du porte-objet et du couteau (selon les dispositifs). Pour les échantillons végétaux, globalement une température de -20°C donne de bons résultats. Le type de lame peut aussi être un paramètre d'ajustement (diamant, acier inoxydable, tungstène,...). Enfin, la vitesse de coupe (si elle est automatisée) et l'épaisseur de la coupe sont les derniers paramètres optimisables (**Figure 2B**).

Après la coupe, l'échantillon est généralement placé entre deux feuilles de polymère (par exemple, Ultralene, Pioloform ou Mylar) transparents aux rayons X et monté sur le porte-échantillon refroidi (**Figure 2C**). Le polymère joue le rôle de support pour l'échantillon et peut également préserver la chambre expérimentale d'éventuelles contaminations en cas de problèmes lors de l'acquisition. Si un système pour l'analyse cryogénique est disponible sur la ligne de lumière, le porte échantillon peut alors être transféré directement dans la chambre d'analyse en prenant bien garde de ne jamais briser la chaîne du froid (**Figure 2D**). Si ce type de dispositif est inexistant, il faut alors procéder à la lyophilisation de l'échantillon. Cette étape est également très sensible et doit se faire avec beaucoup de précautions (notamment pour les remontées en température et pression pour éviter d'endommager les tissus) [7].

Cette stratégie cryogénique permet la stabilisation du matériel biologique aussi proche que possible de l'état *in vivo*, il est facile à mettre en œuvre et donne de bons résultats pour la cartographie élémentaire et la spéciation aux niveaux tissulaire et cellulaire. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans la littérature quant aux conséquences sur la spéciation et la distribution lorsque la préparation d'échantillon a échoué [8].

Dans le cas présenté, la méthode de la cryofixation a été suivie et l'analyse a été réalisée en conditions cryogéniques sur la ligne de lumière ID21 (European Synchrotron Radiation Facility) [9]. Pour chaque condition d'exposition, trois coupes provenant d'individus distincts ont été analysées.

INSTALLATION SYNCHROTRON

De très nombreuses techniques spectroscopiques existent apportant différentes informations complémentaires sur la structure des échantillons. Ici, nous nous focaliserons uniquement sur deux techniques (μ XRF et μ XAS) disponibles sur de très grandes infrastructures de recherche (TGIR) : les synchrotrons et en s'appuyant en particulier sur l'exemple de la ligne de lumière ID21 à ESRF.

Le terme de synchrotron désigne un grand instrument électromagnétique destiné à l'accélération à haute énergie de particules élémentaires.

Le principe du rayonnement synchrotron est apparu dans les années 1940. Au départ, ce rayonnement était considéré comme un effet parasite des expériences de physique des collisions quand on a découvert qu'il pouvait être utilisé avantageusement pour d'autres expériences. D'effet indésirable exploité pendant les temps morts des instruments, il est devenu petit à petit le mode d'utilisation principal de ces machines, jusqu'à la construction d'installations dédiées au rayonnement synchrotron dans les années 1980.

Aujourd'hui, il existe une cinquantaine de synchrotrons dans le monde dont 2 en France : l'ESRF à Grenoble (1994) et SOLEIL à Saint Aubin (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE - Laboratoire d'utilisation du rayonnement électromagnétique ; 2006).

Le principe de fonctionnement de ces instruments est le suivant [10] : des paquets d'électrons sont créés par un canon à électrons. Ils sont accélérés de façon linéaire dans un linac jusqu'à une vitesse proche de celle de la lumière. Puis, ils passent dans l'anneau d'accélération ou booster dans lequel leur énergie est augmentée jusqu'à plusieurs GeV (2,75 GeV à SOLEIL et 6 GeV à l'ESRF). Les électrons arrivent ensuite dans l'anneau de stockage (374 m à SOLEIL et 844 m à l'ESRF). Dans cet anneau, les paquets d'électrons tournent sans cesse. Leurs trajectoires sont guidées par des aimants de courbure. Ils réalisent des centaines de milliers de tours par seconde. Lors de ces trajectoires, à chaque courbure, un rayonnement de freinage est émis sous forme d'onde électromagnétique, c'est le rayonnement synchrotron. Ce rayonnement polychromatique de photons est émis tangentiellement à la trajectoire et est envoyé vers les lignes de lumière. Il possède un large spectre en énergie. Pour obtenir un rayonnement plus intense et plus restreint en énergie, on peut se servir d'éléments d'insertion appelés onduleurs. L'émission de ces rayonnements

entraîne une légère perte d'énergie. Pour compenser ce phénomène, des cavités accélératrices sont activées pour ré-accélérer les électrons dans l'anneau de stockage. Tout le système est placé sous un vide poussé ($\approx 10^{-10}$ mbar) pour éviter que les paquets d'électrons n'entrent en collision avec des molécules de l'air. Au niveau de chaque courbure, les photons émis tangentiellement sont utilisés pour mettre en œuvre différentes techniques dont les techniques dites spectroscopiques comme la μ XRF et la μ XAS. Il y a actuellement 49 lignes de lumière qui fonctionnent en parallèle à l'ESRF et 29 à SOLEIL.

Une ligne de lumière se décompose en trois cabanes [9]. Dans la cabane optique se situe toute l'optique de la ligne permettant de sélectionner le rayonnement nécessaire à la technique développée (monochromateur), de le focaliser et le collimater (miroirs). La cabane d'expérimentation est l'endroit où se trouve la chambre dans laquelle sont insérés les échantillons (sur une platine motorisée), les différents détecteurs ainsi qu'un microscope pour le repérage des échantillons (**Figure 3**). Les systèmes de refroidissement des échantillons lors de l'acquisition de données sont très importants pour l'analyse d'échantillons biologiques car ils permettent d'étudier des échantillons hydratés congelés (donc au plus proche de leur état natif). De plus, ils limitent les dommages causés par les radiations. Ces systèmes se sont énormément développés ces dix dernières années. Et enfin, la cabane de contrôle permet de piloter toute la ligne à distance grâce à l'informatique puisque les deux premières cabanes sont souvent inaccessibles lorsque l'analyse est en cours.

L'attribution du temps de faisceau se fait par un comité d'experts après étude d'un dossier d'expérience. C'est un processus sélectif et le temps de faisceau distribué à la communauté scientifique est limité. Il est donc nécessaire d'avoir une caractérisation préalable des échantillons par d'autres techniques plus facilement accessibles (quantification par ICP-MS spectrométrie de masse à plasma couplé par induction ou distribution MET /MEB) pour avoir une question de recherche la plus précise et ciblée possible. Les expériences tournent 24h/24 et 7jours/7 sauf pendant les arrêts machine. Le groupe d'utilisateurs doit être prêt à tirer pleinement parti d'une session expérimentale (généralement 4 à 6 jours), cela implique des quarts de nuit.

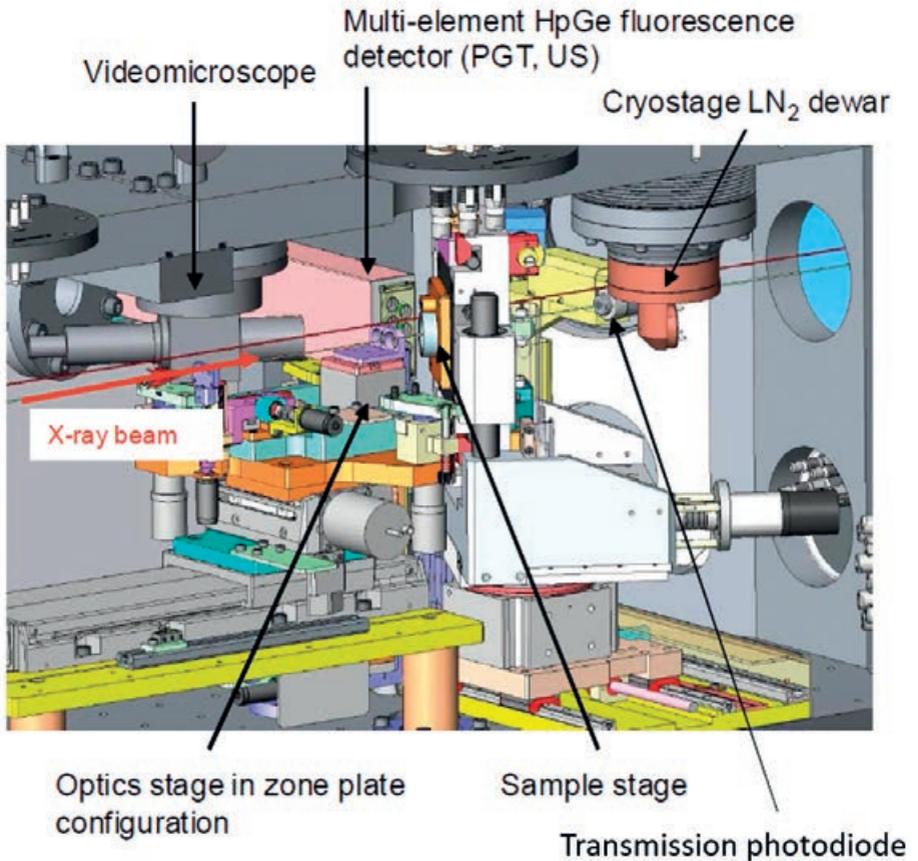


Figure 3 : Exemple de la cabane expérimentale d'ID21 (image issue de Salomé et al., 2013)

DISTRIBUTION ELEMENTAIRE PAR μ XRF

• Principe

La μ -XRF en balayage est une technique non destructive qui permet d'obtenir des cartographies élémentaires d'échantillons. Cette technique est basée sur la réémission de rayons X par les éléments constitutifs de l'échantillon sous l'excitation d'un faisceau de photons. Chaque élément renvoie des rayons X avec une énergie

caractéristique. Ces signaux sont captés par un détecteur qui les transforme en un spectre où chaque pic apparaît à une énergie précise qui correspond à une transition entre les niveaux d'énergie d'un élément (**Figure 4**). Le rayonnement synchrotron permet d'augmenter le rapport signal/bruit par rapport à une source de rayons X de laboratoire (5 ordres de grandeurs plus intense au minimum), rendant la méthode extrêmement sensible et la résolution spatiale très bonne [11]. Ainsi, la limite de détection est de l'ordre de 0,1 µg/g et la résolution spatiale peut descendre à quelques centaines de nm.

Un autre avantage de cette technique est d'accéder à la distribution élémentaire de certains éléments plus légers que l'élément d'intérêt (soit dans le cas du Fe, une énergie incidente de 7,2 keV donnant accès à des informations concernant Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, Ag, K, Ca, Ti et Mn sur la ligne de lumière ID21 avec une cabane expérimentale sous vide, **Figure 4**). On peut ainsi retracer la matrice végétale et la distribution de l'élément d'intérêt (Fe) à l'échelle cellulaire. Pour une information à l'échelle sub-cellulaire il faut se diriger vers des lignes proposant de la nanoXRF, c'est-à-dire possédant un faisceau de l'ordre de quelques dizaines de nm.

Les spectres ainsi acquis peuvent être analysés grâce à des logiciels dédiés tels que PyMca [12]. Dans certains cas, la résolution spectrale des détecteurs n'est pas suffisante pour attribuer un élément à un pic, on trouve alors parfois un pic comprenant l'information liée à deux éléments. C'est typiquement le cas du K et du Ca : la raie K β du K et la raie K α du Ca étant très proche en énergie, le pic à 3,6 keV est donc la somme de ces deux signaux (**Figure 4**). L'utilisation de logiciel de retraitement de données permet de modéliser ces différentes options et

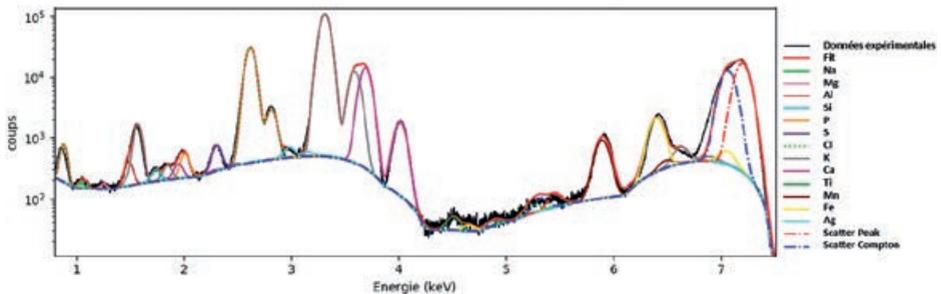


Figure 4 : Exemple de spectre de fluorescence X d'un échantillon végétal acquis sur l'échantillon contenant à la fois du Fe-EDTA et des nanoparticules d'Ag.

d'aboutir à la déconvolution des pics du spectre sur chaque pixel sondé. Certaines corrections sont apportées à ce niveau-là comme par exemple la prise en compte de l'intensité du faisceau incident (I_0) ou encore le temps d'acquisition par pixel. A partir de ce spectre retraité, on peut tracer des cartographies élémentaires : un élément d'intérêt est choisi, puis, sur chaque pixel de l'image, le nombre de coups lié à cet élément est traduit en une échelle d'intensité de couleurs.

• Application

Les cartographies élémentaires obtenues sur les trois types d'échantillons sont regroupées dans la **Figure 5**. Pour représenter les structures végétales des échantillons, nous avons sélectionné le potassium (K, figurant en vert). D'autres éléments tels que le Ca, le P ou bien le S auraient également pu être choisis. Néanmoins, le K est l'un des éléments les plus abondants et un des moins interférés (dans sa raie K α). Cet élément permet ainsi de distinguer les parois végétales montrant des cellules d'environ 20 à 30 μm . Dans la cartographie témoin (**Figure 5**, cadre noir), on peut également observer la distribution en Fe qui est un micronutriment indispensable au bon fonctionnement des végétaux. On le retrouve en majorité dans les parois avec un niveau de fluorescence moyen de 150 coups/s environ. Plus surprenant, une cartographie sur la raie (L) de l'Ag laisse apparaître un signal non négligeable. Deux explications sont possibles : la première c'est que ce signal soit bien réel et provienne d'une contamination croisée lors de l'exposition. La deuxième hypothèse est une mauvaise déconvolution des pics de fluorescence. La raie L de l'Ag, qui était la seule accessible techniquement lors de cette expérience, est comprise entre les raies du K et du Cl, deux éléments abondants dans les plantes. La deuxième hypothèse peut être validée en comparant la distribution élémentaire des deux éléments qui sont, de fait, similaires. De même, grâce à l'outil « scatter plot », on peut mettre en évidence la corrélation entre le K et l'Ag (**Figure 6**). En effet, on voit que la distribution des points en rouge (riche en « Ag ») suit exactement la même distribution que les autres pixels de l'image. Lorsque l'on s'intéresse au fit du spectre XRF extrait de ces points « riches », on ne voit pas de pic lié à la présence d'Ag. Ainsi, on peut donc en conclure que l'échantillon témoin ne contient pas d'Ag. Ce raisonnement met en avant l'importance de connaître, a priori, les échantillons analysés et de ne pas considérer aveuglément quelque résultat que ce soit.

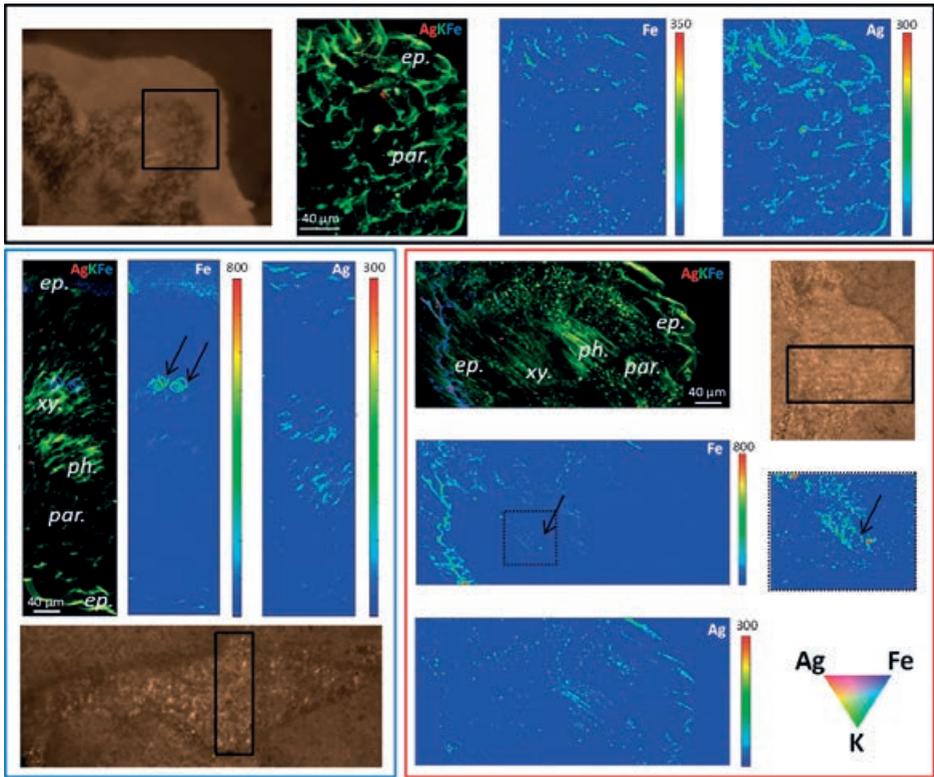


Figure 5 : Distribution élémentaire (potassium en vert, argent en rouge et fer en bleu dans les cartographies trois couleurs, cartographies monoélémentaires correspondantes en température en fonction de l'intensité de fluorescence en coups/s) de trois échantillons avec la photo en microscope optique de la zone analysée. **Cadre noir :** échantillon témoin, uniquement eau ultrapure. **Cadre bleu :** exposition à 50 µg/g MF Fe-EDTA. Attention, les résultats des cartographies d'Ag sont biaisés (notamment pour les conditions témoin et Fe-EDTA) comme cela est expliqué dans le texte. **Cadre rouge :** exposition à 50 µg/g MF Fe-EDTA + 50 µg/g MF nanoparticules d'Ag. **Flèche :** tube criblé (vaisseau transporteur de la sève), *ep.* épiderme, *par.* parenchyme, *ph.* phloème, *xy.* xylème.

Dans les cartographies correspondant aux feuilles exposées à 50 µg/g Fe-EDTA (**Figure 5**, cadre bleu), on distingue les épidermes supérieur et inférieur. On voit notamment une accumulation de Fe en surface supérieure due au dépôt (fluorescence montant environ à 400 coups/s). On peut également voir deux îlots faits de cellules plus petites (10 à 15 µm) qui correspondent respectivement au xylème pour la conduction de la sève brute et au phloème pour la conduction de la

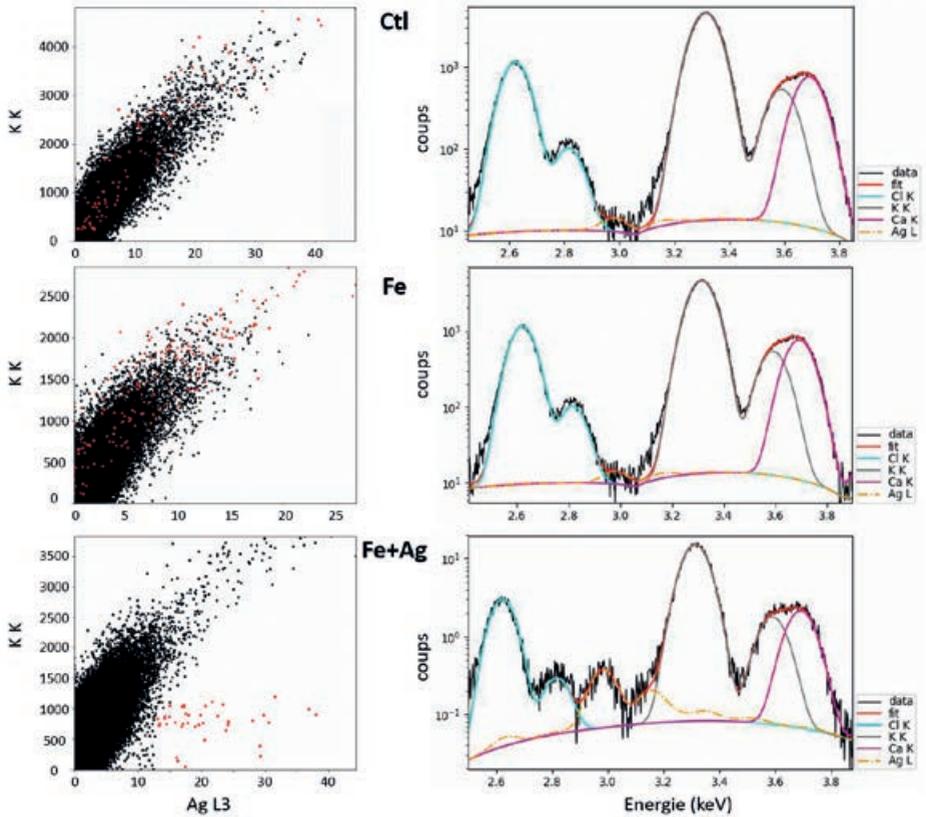


Figure 6 : Investigation du biais sur les cartographies de l'Ag, pour chacune des trois conditions d'exposition (témoin, uniquement eau ultrapure, 50 µg/g MF Fe-EDTA ou 50 µg/g MF Fe-EDTA + 50 µg/g MF nanoparticules d'Ag), graphe représentant la distribution des pixels en fonction de leur intensité de fluorescence (en nombre de coups) en K et en Ag, en rouge sélection de points ayant les plus fortes intensités en Ag sur les cartographies élémentaires et spectre µXRF + fit correspondants, ciblés sur l'énergie de l'Ag.

sève élaborée. On constate que le Fe se situe préférentiellement dans les vaisseaux annelés dans le xylème. La distribution de l'Ag, comme dans le cas précédent, correspond en réalité à celles du K. L'étude du « scatter plot » K/Ag et du spectre XRF sur les points à forte intensité sur la cartographie de l'Ag confirme l'absence d'Ag (**Figure 6**). Cette cartographie suggère donc que le Fe, sous forme de Fe-EDTA, déposé sur la surface supérieure de la feuille a été efficacement absorbé par l'épiderme et transféré au niveau des vaisseaux. L'affinité du Fe avec la lignine

(constituant des anneaux) a déjà été mise en évidence dans d'autres études (utilisant d'autres techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire ou NMR en anglais et spectrométrie photoélectronique X ou XPS en anglais, [13]).

Enfin, dans la dernière condition testée (50 µg/g Fe-EDTA + 50 µg/g nanoparticules d'Ag pendant 1 semaine, **Figure 5**, cadre rouge), le Fe apparaît concentré dans les parois cellulaires de l'épiderme exposé. On le retrouve également dans les vaisseaux annelés du xylème même si la différence de contraste rend leur visualisation moins évidente sur la cartographie globale. Néanmoins, en effectuant un zoom sur la zone du xylème, on retrouve effectivement cette accumulation de Fe avec des niveaux d'intensité similaires à ceux détectés dans la condition précédente (exposition au Fe seul). Ici, on met donc aussi en évidence l'importance d'une étude approfondie des images (étudier les contrastes d'intensité, outils statistiques, ré-analyse des spectres pour des régions données,...) pour réussir à en tirer le maximum d'informations. La distribution de l'Ag, après comparaison avec celle du K, laisse cette fois apparaître des différences, notamment le dépôt d'agrégats d'Ag dans l'épiderme. Le « scatter plot » montre un enrichissement effectif en Ag des pixels à forte intensité (**Figure 6**). Cela est également confirmé par la présence d'un pic clair attribué à l'Ag dans le spectre XRF (**Figure 6**). Il semble donc que la présence de nanoparticules d'Ag entraîne une accumulation supplémentaire de Fe dans les cellules de l'épiderme. Encore une fois, nos conditions expérimentales n'étaient pas optimales pour la détection de l'Ag, pour atteindre une meilleure sensibilité il faudrait analyser l'échantillon avec une énergie juste au-dessus du seuil d'excitation de l'Ag (*i.e.* 3,8 keV). En pratique, un changement d'énergie du Fe à l'Ag implique une modification des optiques de la ligne et un réalignement du faisceau soit environ une « perte » de temps de 4 à 5h.

Une hypothèse pour expliquer cette différence d'internalisation est la possibilité que le Fe soit adsorbé à la surface des nanoparticules ; ces dernières étant génératrice de stress oxydatif, elles pourraient traverser plus facilement la cuticule et les parois cellulaires tout en entraînant le Fe adsorbé à leur surface. A première vue, on peut effectivement voir des zones d'accumulation communes pour ces deux éléments sur les cartographies élémentaires. Grâce à l'outil NNMA (non negative matrix approximation), les colocalisations entre éléments peuvent être mises en évidence et nous avons ainsi pu vérifier notre hypothèse. Nous avons effectué l'analyse sur les 14 éléments analysés (**Figure 4**). Sans surprise, la première composante est majoritairement constituée du potassium qui est un macronutriment retraçant la

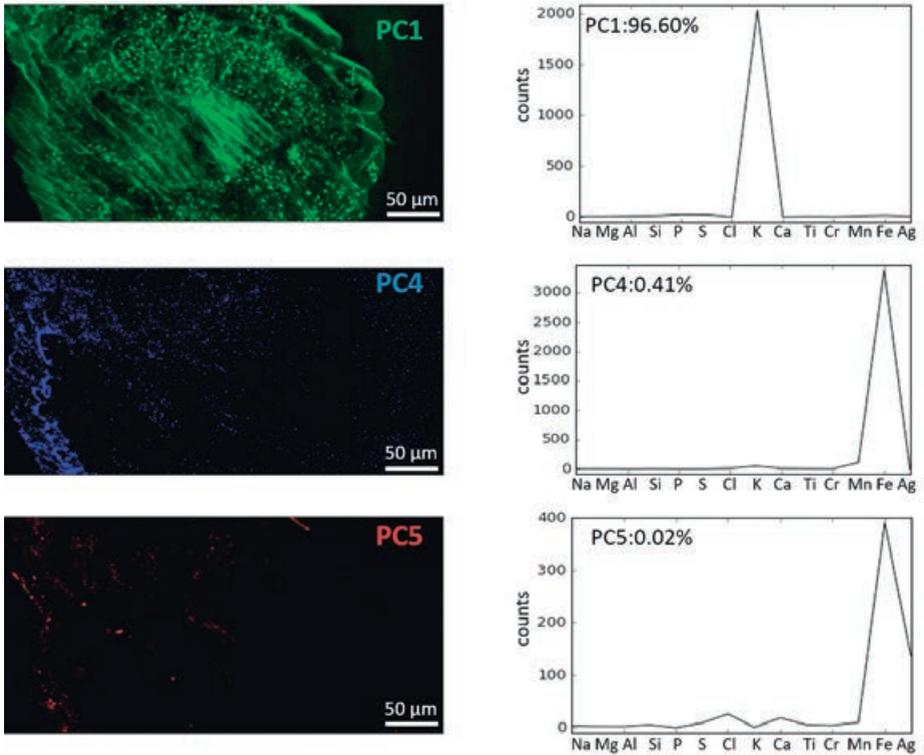


Figure 7 : Analyse en composantes principales de la cartographie de feuille exposée à 50 µg/g MF Fe-EDTA + 50 µg/g MF nanoparticules d'Ag avec la contribution associée de chacun des éléments sélectionnés pour l'analyse.

matrice végétale, elle explique plus de 96% de l'image (**Figure 7**). Les composantes 2 et 3 (environ 3%) font également ressortir des éléments endogéniques (Cl, Ca et Mn). La composante 4 (0,41%) montre la distribution du Fe en surface de la feuille correspondant au dépôt ainsi que l'accumulation dans la couche de l'épiderme. Enfin, la composante 5 permet effectivement de mettre en évidence cette association Ag-Fe à la fois en surface et à l'intérieur des tissus. Cette composante n'explique que 0,02% de la variance dans l'analyse. Néanmoins, en comparant, la PC4 et la PC5, on voit que le Fe est majoritairement présent seul sous forme de signal diffus (environ 3000 coups dans la PC4 contre 400 dans la PC5). A l'inverse, lorsqu'il est associé à l'Ag, on le retrouve plutôt sous la forme d'agrégats de taille micrométrique ce qui suggère une association à des nanoparticules qui seraient toujours présentes sous cette forme (pas de dissolution).

SPECIATION ELEMENTAIRE PAR μ XAS

• Principe

La μ XAS permet d'accéder à la spéciation d'un élément cible en sondant ses proches voisins atomiques, qui constituent les ligands de cet élément. Elle renseigne également sur le degré d'oxydation de l'élément.

Cette technique utilise un faisceau X monochromatique pour exciter un élément. Quand l'énergie du photon est suffisante pour exciter un électron d'un niveau profond de l'atome absorbant tout en restant inférieure à l'énergie d'ionisation, des transitions électroniques se produisent vers les premières orbitales complètement ou partiellement vides. Ceci correspond à la région du **pré-seuil** dans le spectre XAS (**Figure 8A**). Quand le rayonnement X incident correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers le continuum, le coefficient d'absorption augmente brutalement, c'est le **seuil d'absorption** (**Figure 8A**).

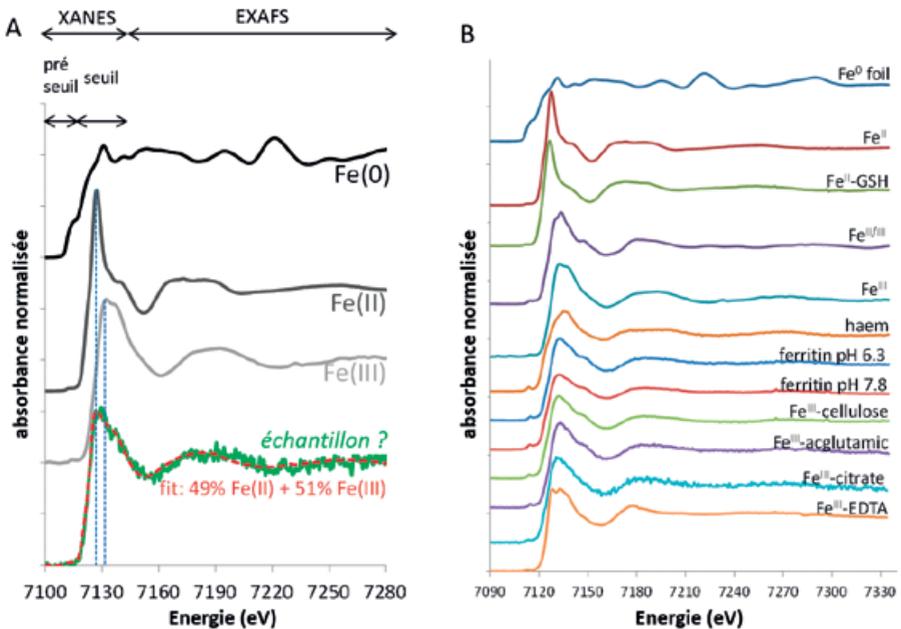


Figure 8 : Spéciation élémentaire par μ XAS. A. Composition de spectres μ XAS sur l'exemple du Fe (en pointillés: énergie du seuil d'absorption). B. bibliothèque de spectres XAS réalisée pour les analyses de Fe dans les échantillons végétaux.

L'électron est alors diffusé par l'environnement de l'atome absorbeur. On parle de diffusion multiple si l'électron est diffusé par plusieurs atomes voisins et de diffusion simple s'il n'est diffusé que par un seul atome. Quand l'énergie du faisceau incident est à peine supérieure à celle du seuil (jusqu'à 50-100 eV au-dessus du seuil), les diffusions multiples sont dominantes, c'est la partie **XANES** (X-ray Absorption Near Edge Structure) du spectre (**Figure 8A**). A des énergies plus élevées (jusqu'à 1000 eV au-dessus du seuil), la diffusion simple devient dominante, c'est la partie **EXAFS** (Extended X-ray Absorption Fine Structure) du spectre [10]. Dans la zone XANES, les oscillations renseignent sur les liaisons chimiques engagées par l'atome absorbeur, sa géométrie de coordination et son degré d'oxydation. Par exemple, les niveaux de cœur sont stabilisés par l'augmentation du degré d'oxydation de l'atome. La position du seuil se déplace donc vers les hautes énergies quand le degré d'oxydation augmente [15] (**Figure 8A**). Dans la zone EXAFS, les oscillations renseignent sur le voisinage de l'atome d'intérêt (nombre d'atomes voisins, identification et distance). Un atome isolé aurait une courbe monotone.

Cette technique peut être utilisée comme analyse globale d'un échantillon homogène. Elle peut également être utilisée en mode microanalyse. En pratique, une fois les cartes de distribution élémentaire obtenues par μ XRF, le faisceau est repositionné sur un point sélectionné sur la carte, et un balayage en énergie autour de l'énergie d'excitation de l'élément d'intérêt (pour le Fe de 7,10 keV à 7,28 keV environ) permet d'enregistrer le spectre XANES. En règle générale, pour obtenir un spectre de qualité exploitable, cela nécessite des concentrations plus élevées d'un facteur 10 environ que celles requises pour la μ XRF.

Plusieurs étapes permettent l'analyse des spectres XANES expérimentaux. Tout d'abord, la série de spectres obtenus sur une même zone est moyennée après s'être assuré de leur similitude. En général, 5 à 10 spectres sont enregistrés sur la même zone, leur nombre dépend de la statistique de la mesure et donc de la concentration en Fe de la zone sondée. Ce spectre moyen est ensuite normalisé grâce à un logiciel (par exemple Athena, basé sur le code Iffefit [16]). Cette première étape permet d'obtenir des spectres dans lesquels le saut d'absorbance entre la zone du pré-seuil et la zone après seuil est de 1. Les spectres sont alors comparables entre eux. Ces spectres sont ensuite confrontés à ceux d'une bibliothèque de références constituée en début d'expérience avec des composés purs que l'on s'attend à rencontrer dans l'échantillon (**Figure 8B**). Le logiciel Athena permettra ensuite de reconstruire les spectres expérimentaux par combinaisons linéaires de

deux ou trois composés de référence, et d'en déduire ainsi les pourcentages des différentes espèces d'un même élément.

• Application

Après acquisition des cartographies de distribution élémentaire, la spéciation du Fe a été étudiée sur différents points concentrés en Fe. Plusieurs spectres ont été acquis au sein d'une même zone (eux-mêmes composés de plusieurs spectres individuels provenant de points très proches pour améliorer la qualité du spectre résultant). Ces spectres ont ensuite été regroupés sous l'appellation « ep » pour ceux issus de l'épiderme, « par » issus du parenchyme et « xyl » issus des vaisseaux du xylème. On rappelle que la forme appliquée en surface des feuilles (Fe-EDTA) est du Fe(III). Les spectres montrent la co-existence de deux formes de Fe dans la feuille : Fe(II) et Fe(III) à la fois dans l'épiderme et dans le xylème dans différentes proportions (**Figure 9A**). A l'inverse dans le parenchyme, le Fe est toujours détecté sous sa forme Fe(III) que ce soit lors de l'exposition au Fe-EDTA seul ou lors de l'association Fe-EDTA + nanoparticules d'Ag. Il ne semble pas y avoir de différences majeures dans la spéciation du Fe en absence ou en présence de nanoparticules. Au niveau physiologique, la présence de Fe(III) dans le parenchyme est en accord avec le fait que le Fe est apporté à la surface des feuilles sous la forme Fe(III)-EDTA. Au niveau de l'épiderme, la réduction du Fe(III) en Fe(II) peut s'expliquer par les conditions environnementales et en particulier par les UV. Enfin, dans les vaisseaux,

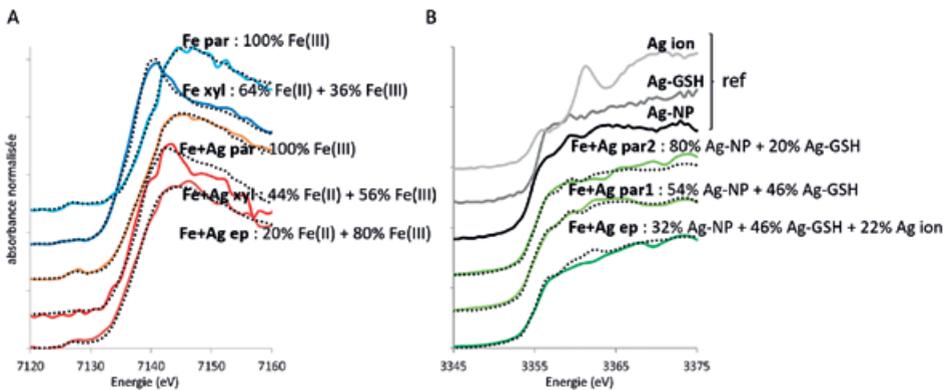


Figure 9 : Spéciation élémentaire par μ XANES du Fe (A) et de l'Ag (B) dans les échantillons de salade. *ep.* épiderme, *GSH.* groupement thiol, *NP.* nanoparticule, *par.* parenchyme, *xyl.* xylème.

d'après la littérature sur les dicotylédones, les deux types de Fe peuvent cohabiter : Fe(II) libre ou Fe(III) lié à un ligand (citrate). La cartographie semble montrer une fixation du Fe par la lignine au niveau du xylème qui implique le passage par la forme Fe(II) [13]. Ces éléments expliquent la détection des deux formes de Fe à cet endroit. Il ne semble donc pas y avoir d'impact de la présence de nanoparticules sur la spéciation du Fe. Néanmoins, la forme utilisable par les cellules est la forme Fe(II), il serait donc intéressant de voir l'évolution de la spéciation du Fe apporté sous forme EDTA au cours du temps dans les tissus.

Pour compléter ces données, nous avons changé les réglages de la ligne pour acquérir quelques spectres μ XAS au seuil de l'Ag (**Figure 9B**) (3,8 keV). L'analyse des résultats montre qu'effectivement une partie plus ou moins importante de l'Ag (de 32 à 80%) est toujours présente dans les tissus sous forme d'Ag élémentaire. L'autre partie a été dissoute et dans quelques cas est retrouvée complexée à des molécules thiol (-SH). Ces molécules sont constitutives par exemple du glutathion qui est une molécule sécrétée pour la détoxification des métaux.

Ainsi la co-localisation du Fe et de l'Ag sous forme d'agglomérats microniques ainsi que la présence d'Ag sous forme particulaire dans les tissus semblent confirmer la possibilité d'entrée de Fe potentiellement adsorbée à la surface des nanoparticules d'Ag mais sans changement majeur de la spéciation finale du Fe.

CONCLUSIONS

A travers deux exemples de techniques spectroscopiques choisies (μ XRF et μ XAS), nous avons pu mettre en évidence l'intérêt de ces approches pour les thématiques de biologie et en particulier de biologie végétale. Elles nous ont permis d'avoir accès des informations de distribution élémentaire en 2D avec un très bon seuil de détection et une résolution spatiale micrométrique. En plus de cette distribution, nous avons également pu obtenir des données quant à la spéciation chimique de notre élément d'intérêt. Ces informations combinées permettent ainsi d'aller plus loin dans notre compréhension des phénomènes biologiques en jeu. Dans de très nombreuses installations synchrotrons à travers le monde, on peut réaliser ces analyses en conditions cryogéniques ce qui permet de s'assurer de la conservation de l'échantillon au plus proche de son état originel.

Ici, nous avons étudié les interactions qu'il pouvait y avoir entre un fertilisant foliaire à base de Fe et un nanopesticide à base d'Ag. Il semble que les nanoparticules interfèrent finalement peu avec le Fe et ne modifie pas ou peu la distribution et la spéciation du Fe. Dans notre cas, l'exposition a duré pendant 7 jours, il serait intéressant de renouveler les analyses après un temps d'exposition plus long pour évaluer l'évolution du système (notamment en terme de spéciation du Fe).

Cette analyse de cas nous a permis aussi de mettre en évidence, les forces des techniques spectroscopiques présentées ainsi que les points sur lesquels il faut être particulièrement attentif pour éviter les biais d'interprétation (préparation d'échantillon, analyses de données).

Les installations synchrotron développent de plus en plus les applications en biologie rendant ainsi les techniques de plus en plus accessibles aux biologistes. L'étape critique aujourd'hui reste la préparation d'échantillons. Même si l'on a fait beaucoup de progrès ces dernières années, l'amélioration continue des lignes de lumière notamment en termes de résolution spatiale, fait de cette étape un challenge (analyse à l'échelle nanométrique par exemple). Mais aucun doute, que les techniques et les protocoles de préparation vont continuer à se développer dans le futur.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ESRF pour la provision de temps de faisceau synchrotron (N° d'expérience EV32), le personnel technique de l'équipe de Géochimie d'ISTerre et « Atracción de Talentos » program (Comunidad de Madrid).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LOMBI E., HETTIARACHCHI G. M., SCHECKEL K. G. Advanced in situ Spectroscopic Techniques and Their Applications in Environmental Biogeochemistry: Introduction to the Special Section. *J. Environ. Qual.*, 2011, **40**, 659.
2. SARRET G., PILON-SMITS E., CASTILLO-MICHEL H., ISAURE M.-P., ZHAO F.J., TAPPERO R. Use of Synchrotron-Based Techniques to Elucidate Metal Uptake and Metabolism in Plants. *Advances in Agronomy*, 2013, 1–82.

3. European Commission. Definition of a nanomaterial. 04/12/2018 (2018). Available at : http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm. (Accessed: 28th December 2018)
4. GOGOS A., KNAUER K., BUCHELI T. D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 9781–9792.
5. MA C., WHITE J. C., DHANKHER O. P., XING B. Metal-Based Nanotoxicity and Detoxification Pathways in Higher Plants. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 7109–7122.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anaemia. (2019). Available at: <https://www.who.int/topics/anaemia/en/>. (Accessed: 28th December 2018)
7. VOGEL-MIKUS K., PONGRAC P., PELICON P., VAVPETIC P., POVH B., BOTHE H., REGVAR M. Micro-PIXE Analysis for Localization and Quantification of Elements in Roots of Mycorrhizal Metal-Tolerant Plants. *Soil Biology*, 2009, 227–242.
8. CASTILLO-MICHEL H. A., LARUE C., PRADAS DEL REAL A. E., COTTE M., SARRET G. Practical review on the use of synchrotron based micro- and nano- X- ray fluorescence mapping and X-ray absorption spectroscopy to investigate the interactions between plants and engineered nanomaterials. *Plant Physiol. Biochem.*, 2017, **110**, 13–32.
9. SALOMÉ M., COTTE M., BAKER R., BARRETT R., BENSENY-CASES N., BERRUYER G., VERONESI G. The ID21 scanning X-ray microscope at ESRF. *J. Phys. Conf. Ser.*, 2013, **425**, 1–4.
10. DOUCET J. & BARUCHEL J. Rayonnement synchrotron et applications. *Tech. l'ingénieur*, 2011, 1–30.
11. BUTLER O. T., CAIRNS W. R. L., COOK J. M., DAVIDSON C. M. Atomic spectrometry update. Environmental analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 177–216.
12. SOLÉ V. A., PAPILLON E., COTTE M., WALTER P., SUSINI J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochem. Acta part B*, 2007, **62**, 63–68.
13. GUILLON E., MERDY P., APLINCOURT M., DUMONCEAU J., VEZIN, H. Structural Characterization and Iron (III) Binding Ability of Dimeric and Polymeric Lignin Models. *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **239**, 39–48.
14. GROSSEMY F. Des grains cométaires en laboratoire : premiers résultats de la mission Stardust. (Université Paris-Sud XI, 2008).
15. FARGES F., BROWN G. E., REHR, J. J. Ti K -edge XANES studies of Ti coordination and disorder in oxide compounds : Comparison between theory and experiment. *Phys. Rev. B*, 1997, **56**, 1809–1819.
16. RAVEL B. & NEWVILLE M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.*, 2005, **12**, 537–541.