

## Nouvelles avancées dans la caractérisation de la structure du liège

CHANUT Julie<sup>1,2</sup>, CROUVISIER-URION Kevin<sup>1,2</sup>, LAGORCE Aurélie<sup>1,2</sup>,  
WINCKLER Pascale<sup>1,4</sup>, FERRET Eric<sup>1</sup>, GOUGEON Régis D.<sup>1,3</sup>,  
BELLAT Jean-Pierre<sup>2</sup>, KARBOWIAK Thomas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Bourgogne Franche-Comté, Agrosup Dijon, UMR PAM A 02.102, 1 Esplanade  
Erasme, 21000, Dijon, France

<sup>2</sup>Univ. Bourgogne Franche-Comté, ICB-UMR 6303 CNRS, 9 avenue Alain Savary, B.P.  
47870, 21078, Dijon, France

<sup>3</sup>Univ. Bourgogne Franche-Comté, Inst Univ Vigne & Vin, 1 Rue Claude Ladrey, 21078,  
Dijon, France

<sup>4</sup>Dimacell imaging facility, Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-  
Comté, 21000, Dijon, France

[julie.chanut@agrosupdijon.fr](mailto:julie.chanut@agrosupdijon.fr)

**Mots clefs :** Liège ; Structure cellulaire ; Tomographie ; Porosité ; Lenticelles ; Différenciation cellulaire.

### Contexte & Objectifs

En 1665, Robert Hooke a été le premier à observer les cellules du liège et leur forme hexagonale caractéristique, en utilisant l'un des tous premiers microscopes optiques (Hooke 1665). Le liège est décrit comme un matériau alvéolaire composé de cellules fermées, vides et mortes. Au cours du temps, l'utilisation de techniques d'imagerie plus sophistiquées a permis d'étudier plus finement la structure du liège (Lagorce-Tachon et al. 2015, Lagorce-Tachon et al. 2018), et en particulier les différences entre les cellules du phellème et celles des lenticelles. L'objectif de cette étude est d'aborder cet aspect au moyen de techniques d'imagerie à plusieurs échelles. Tout d'abord, à l'échelle macroscopique, la tomographie aux rayons X a été utilisée pour caractériser la structure et la porosité de bouchons de liège naturel. Les différences structurelles entre les cellules composant le phellème et celles qui bordent les lenticelles ont ensuite été mises en évidence grâce à l'utilisation de la microscopie biphotonique. Enfin, à l'échelle nanométrique, des observations par microscopie électronique à transmission ont été réalisées pour observer la structure des plasmodesmes qui traversent les parois cellulaires.

### Matériel & Méthode

*Bouchons de liège.* Les bouchons de liège naturel ont été fournis par Bouchons Trescases S.A. (France). Toutes les expériences ont été réalisées sur des bouchons de liège dits haut de gamme (24 mm x 49 mm) n'ayant subi ni lavage ni traitement de surface. Des bouchons de liège dits d'entrée de gamme (24 mm x 49 mm) ont également été utilisés pour la tomographie aux rayons X.

*Tomographie aux rayons X.* Les échantillons de liège ont été analysés sur un micro-CT Phoenix Nanotom (General Electric). Les images ont été acquises avec un temps d'exposition de 500 ms (45 kV ; 445  $\mu$ A) sur une rotation de 360° avec une résolution de 12  $\mu$ m / pixel. La reconstruction 3D a été réalisée sur Octopus Reconstruction 8.9.2 (XRE) puis l'analyse sur Avizo (Thermo Fischer Scientific). Comme le liège est composé d'atomes ayant un facteur d'absorption des rayons X similaire, la partie plus dense de la matière à l'intérieur du matériau absorbe une grande quantité de rayons X et apparaît en blanc sur la reconstruction. En revanche, les pores apparaissent en noir. Deux seuillages ont alors été appliqués pour isoler les lenticelles et la matière densifiée.

Le nombre de voxels correspondant à ces deux seuils distincts a ensuite été déterminé pour calculer le volume occupé par les pores et par la matière densifiée. Il a également été possible de représenter les voxels associés à chaque seuillage dans le bouchon de liège plein et d'observer leur interconnexion. Un bouchon de chaque qualité a été analysé.

*Spectroscopie photoélectronique X.* De la poudre de liège issue des cellules du phellème et des lenticelles a été prélevée en surface avec un scalpel. Cette poudre a été tamisée pour obtenir une granulométrie  $< 50 \mu\text{m}$  afin de déterminer sa composition chimique par analyse XPS sur un appareil PHI Versaprobe 5000. Un rayonnement de 50 W Al K $\alpha$  (1486,7 eV) a été utilisé comme source de rayons X. Les mesures ont été effectuées à température ambiante dans un compartiment à ultravide sur un spot d'un diamètre de  $\sim 200 \mu\text{m}$ . Des balayages intégrés à haute résolution ont été acquis (58 eV, 45°). Les spectres XPS ont été normalisés en fonction des liaisons C-C/C-H (carbone 1s à 284,6 eV). Le pourcentage de carbone, d'oxygène et d'azote a été quantifié sur 4 échantillons.

*Microscopie électronique à transmission.* Les échantillons de liège ont été congelés sous haute pression (congélateur Leica HPM 100). Ils ont ensuite subi des congélations successives de -90°C à -30°C (à 3 °C.h<sup>-1</sup>), puis rincés avec de l'acétone à -30 °C, et progressivement imbibés avec des mélanges d'acétone/résine époxy Epon jusqu'à 20 °C. La polymérisation a été effectuée à 60 °C. Les blocs d'échantillons de liège enrobés d'Epon ont été découpés en fines sections, et placés sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone/collodion. Les grilles ont été colorées avec de l'Uranyle pendant 8 min et avec du citrate de plomb pendant 2 min. Les sections ont été observées sur un microscope électronique à transmission Hitachi H7500 fonctionnant à 80 kV et équipé d'une caméra AMT. 5 échantillons ont été congelés, et 3 observations ont été effectuées sur ces échantillons à plusieurs niveaux.

*Microscopie biphotonique.* La microscopie biphotonique a été réalisée pour obtenir des représentations 3D de la structure cellulaire du liège. Les images ont été obtenues avec un microscope à balayage Nikon A1-MP équipé d'un objectif Plan APO IR 60x (NA, 1,27 ; Water Immersion, Nikon). Un laser IR (Caméléon, Coherent) a été utilisé pour fournir une excitation à 800 nm. L'émission d'auto-fluorescence du liège a été capturée sur quatre canaux de détection : FF01-492/SP (400-492 nm), FF03525/50 (500-550 nm), FF01-575/25 (563-588 nm) et FF01-629/56 (601-657 nm) (Semrock). Avant l'observation, le liège a été immergé dans de l'eau distillée à 25 °C pendant 1 mois. La représentation 3D a été obtenue par superposition d'images scannées le long de la profondeur des échantillons (140  $\mu\text{m}$ ) avec un pas d'acquisition de 0,5  $\mu\text{m}$ . Les observations ont été effectuées le long du plan perpendiculaire aux directions radiale et axiale du liège.

## Résultats et Discussion

### *Echelle macroscopique.*

La quantité de lenticelles représente le principal critère définissant la qualité du liège (Pereira 2007). Pour évaluer la porosité interne correspondant aux lenticelles, des observations par tomographie aux rayons X ont été réalisées sur des bouchons de liège de deux qualités différentes (entrée de gamme et haut de gamme) (Fig. 1a). Dans un premier temps, le volume poreux des lenticelles a été déterminé en utilisant un seuillage sur les pixels noirs sur chaque tranche du bouchon. Une représentation 3D du réseau macroporeux des lenticelles a ensuite été reconstruite pour les bouchons d'entrée de gamme et haut de gamme.

Dans les deux cas, les lenticelles ne sont pas interconnectées (Fig. 1b et 1c). Une différence significative de volume poreux est aussi notable avec un volume autour de 2% (v/v) pour des bouchons de qualité supérieure et de 6% (v/v) pour les bouchons d'entrée de gamme.

### *Echelle microscopique.*

Le liège possède une auto-fluorescence naturelle qui permet de facilement observer les parois cellulaires par microscopie biphotonique. La lignine et la subérine, sont deux fluorophores naturels, qui présentent une gamme d'émission de 440 à 540 nm et de 460 à 500 nm. Les observations réalisées ont permis de mettre en évidence que les cellules à la limite phellème/lenticelle possèdent une paroi plus épaisse avec une épaisseur caractéristique d'environ 10  $\mu\text{m}$ , contre 1  $\mu\text{m}$  pour la paroi des cellules du phellème (Fig. 2). De plus, cette différenciation cellulaire est limitée à une seule couche cellulaire. En outre, l'émission de fluorescence est différente entre ces parois cellulaires densifiées bordant les lenticelles et celles du phellème. L'imagerie a été couplée à une analyse de la composition chimique de la paroi cellulaire par XPS a révélé une différence significative entre le phellème et les lenticelles. Les parois cellulaires bordant les lenticelles présentent une teneur en carbone plus élevée (rapport C/O de  $4,28 \pm 0,16$ ) par rapport à celles du phellème (rapport C/O de  $3,79 \pm 0,09$ ) indiquant un changement de composition chimique dû à la différenciation des cellules.

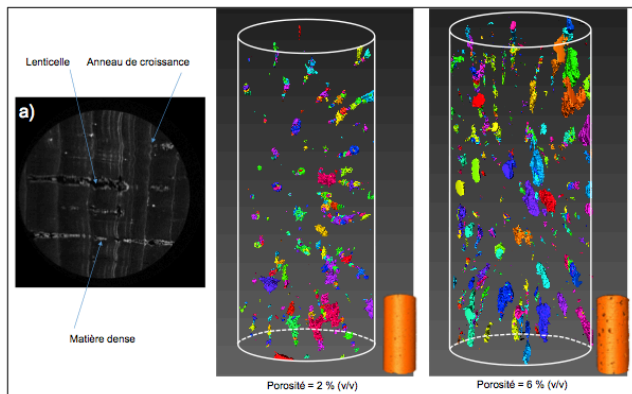


Fig. 1 : (a) Observation par tomographie aux rayons X d'une coupe transversale d'un bouchon de liège, et volume poreux des lenticelles de bouchons de liège (b) haut de gamme et (c) entrée de gamme.

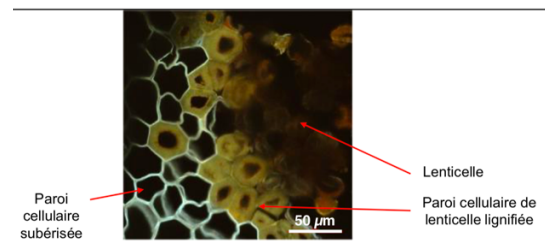


Fig. 2 : Représentation 2D du phellème incluant une lenticelle et mettant en évidence une densification de la paroi des cellules bordant les lenticelles

### *Échelle nanométrique.*

Les premières observations par MET de la paroi cellulaire du phellème permettent de constater que les plasmodesmes traversent les quatre couches qui constituent la paroi cellulaire du phellème : la lamelle centrale (ML), la paroi primaire (PW), la paroi secondaire (SW) et la paroi tertiaire (TW) (Fig.3). De plus, la structure et la composition chimique de ces couches constitutives semblent différentes, compte tenu des contrastes obtenus. En ce qui concerne la forme et la structure des plasmodesmes, ils sont pour la plupart non ramifiés, avec un diamètre d'environ  $50 \pm 10$  nm, et non répartis uniformément le long de la paroi de la cellule. De plus, ils apparaissent obstrués à leurs extrémités par la paroi tertiaire. Dans certains cas, en plus de la paroi tertiaire, un dépôt de résidus cytoplasmiques denses a été observé qui apparaît plus épais à l'extrémité des plasmodesmes et des desmotubules. Un tel dépôt de matière aux extrémités des plasmodesmes est un mécanisme bien connu pour les cellules végétales après un facteur de stress, car il régule la diffusion des métabolites entre les cellules vivantes ou est lié à la mort cellulaire programmée. Dans ce cas, la perte du cytoplasme entraîne la subérisation rapide du phellème suivie de l'obstruction des plasmodesmes dans le cas du liège.

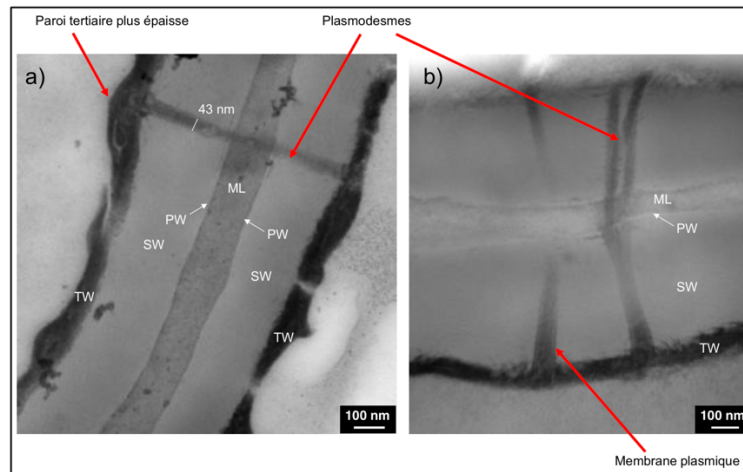


Fig. 3 : Parois des cellules du phellème observées par MET avec la mise en évidence d'un ou de plusieurs plasmodesmes traversant la paroi. (a) Une région plus épaisse peut être observée aux extrémités des plasmodesmes. (b) Observation de la membrane plasmique

### Conclusion et perspectives

La tomographie aux rayons X a tout d'abord permis l'analyse de la macroporosité des bouchons de liège et la détermination de la fraction volumique des lenticelles dans le matériau. La microscopie biphotonique a ensuite révélé des différences de structure et de composition chimique entre les cellules du phellème et celles des lenticelles, ce qui a été confirmé par analyse XPS. Les parois cellulaires plus épaisses à la limite des lenticelles sont principalement composées de lignine, qui provient de la différenciation lenticulaire du phellogène, tandis que les parois cellulaires du phellème sont principalement composées de subérine. Enfin, à l'échelle nanométrique, les caractéristiques structurales des plasmodesmes qui traversent les parois cellulaires ont été étudiées par MET. Les plasmodesmes ont subi un phénomène de subérisation et semblent être obstrués après la mort cellulaire programmée lors du développement de l'écorce du liège. Cette approche d'imagerie multi-échelle apporte de nouvelles perspectives dans la caractérisation de la structure du liège. Cela permettra le développement ultérieur de modèles structurels plus précis afin d'établir des relations avec les propriétés fonctionnelles du matériau.

### Remerciements

Ce travail a été soutenu par le conseil régional de Bourgogne-Franche-Comté et le fonds européen de développement régional (FEDER). Les auteurs souhaitent remercier Zi Wang, Pieter Verboven et Bart Nicolai de l'Université KU Leuven pour leur aide en tomographie aux rayons X, Olivier Heinz de l'ICB (Dijon) pour son aide en spectroscopie photoélectronique X ainsi que Jeannine Lherminier de l'INRA Dijon pour son aide en MET.

### Références

- Hooke R. (1665) *Micrographia or some physiological descriptions of minutes bodies made by magnifying glasses*. Londres, J. Martyn and J. Allestry.
- Lagorce-Tachon A., et al. (2015) The cork viewed from the inside. *Journal of Food Engineering* 149: 214-221.
- Lagorce-Tachon A., et al. (2018) Contribution of image processing for analyzing the cellular structure of cork. *Journal of Chemometrics* 32(1): e2988.
- Pereira H. (2007) *Cork: Biology, production and uses*. Amsterdam, Elsevier.