

Les structures du grain d'amidon

Serge Pérez et Manfred Burghammer

- Résumé** Les développements récents des techniques de microdiffraction sur des sources de rayons X de synchrotron de la troisième génération permettent de caractériser les différents niveaux d'organisation structurale de systèmes biomacromoléculaires complexes. Ces outils de caractérisation, à l'échelle nanométrique, viennent en complément des autres techniques telles que la diffusion des rayons aux petits angles. Le nanofaisceau de rayons X de la ligne de lumière ID13 à l'ESRF permet désormais d'étudier des éléments de systèmes macromoléculaires complexes à des résolutions spatiales inférieures à 100 nm. Une caractéristique commune à ces systèmes est la gamme d'échelles à laquelle ils sont ordonnés, allant du nanomètre au micromètre. L'exemple du grain d'amidon offre une illustration des applications de ces développements méthodologiques.
- Mots-clés** **Amidon, amylopectine, amylose, double hélice, céréales, tubercules, diffusion des rayons X aux petits angles, diffraction.**
- Abstract** **Study of the starch granule structure by SAXS**
Recent developments in the X-ray synchrotron radiation microdiffraction provide unique ways to characterize the different levels of structural organizations of complex biomacromolecular systems. They complement the suite of characterizations provided by small angle X-ray scattering (SAXS) experimentations. The X-ray nanobeam of the ID13 beamline at the ESRF offers such opportunities. This article exemplifies throughout the example of the starch granule how the complexity of a very complex macromolecular assembly of biomolecules can be deciphered.
- Keywords** **Starch, amylopectine, amylose, double-helix, corn, tuber, small angle X-ray scattering, diffraction.**

L'amidon : substance réserve et propriétés d'usage

Produit dans les plantes par la photosynthèse du dioxyde de carbone, l'amidon est un polysaccharide de réserve. Il est présent en quantités importantes dans les céréales (riz, maïs, blé...), les légumineuses (haricots, pois...) et les tubercules (pomme de terre, manioc, patate douce, igname...). Dans les cellules végétales, l'amidon est synthétisé dans des organites spécialisés dans le stockage des nutriments glucidiques : les chloroplastes et les amyloplast. Il s'y présente sous forme de grains microscopiques (0,1-200 μm). Les granules d'amidon sont très bien adaptés à un tel stockage à long terme du fait de leur compacité, de leur siccité* relative et de leur haute stabilité. Cette source d'énergie essentielle n'est cependant devenue accessible aux êtres humains qu'une fois qu'ils eurent maîtrisé le feu, car les granules d'amidon brut sont si compacts qu'ils se digèrent difficilement. Pour accroître leur digestibilité, il faut cuire l'amidon : une fois chauffé, il devient soluble dans l'eau (empois d'amidon) et assimilable par les enzymes du métabolisme. On appelle *gélatinisation* la transformation de l'amidon brut dans l'eau chaude : les granules gonflent et éclatent en formant une pâte. Lors du refroidissement ou d'un stockage prolongé, la viscosité de la pâte d'amidon augmente du fait d'un phénomène appelé *rétrogradation* qui correspond à un phénomène de recristallisation de l'empois d'amidon. La gélatinisation et la rétrogradation affectent le comportement des composés contenant de l'amidon.

Si l'amidon est à la base de nombreux aliments, il est aussi largement utilisé dans des domaines non alimentaires comme la papeterie, la pharmacie, ou en tant que composant de matériaux biodégradables.

L'année 1833 marque le début de son étude scientifique par la découverte du chimiste français Anselme Payen qui, après avoir découvert la diastase, première enzyme dégradant l'amidon, identifia la nature glucidique de ce dernier. Cependant, bien des aspects n'ont pas encore été élucidés, tels que la biosynthèse du grain d'amidon ou sa structure détaillée en termes d'organisation hiérarchique d'éléments constitutifs [1].

Les composants macromoléculaires

Des études de fractionnement ont montré que l'amidon est composé de deux types de macromolécules, l'amylose et l'amylopectine, qui, bien que toutes deux constituées d'unités glucidiques, sont organisées sous forme de chaînes polymères selon des structures très différentes (*figure 1*). L'amylose est un polymère essentiellement linéaire constitué d'unités glucose associées par des liaisons α -(1-4). L'amylopectine se présente sous forme d'une structure très dense formée par l'association de courtes chaînes de résidus D-glucose liés en α -(1-4) et connectées les unes aux autres par des ramifications α -(1-6), ces dernières représentant 5 à 6 % de l'ensemble des liaisons. Selon l'origine botanique, la masse moléculaire de l'amylopectine peut atteindre 10^7 - 10^8 g/mol (*i.e.* une centaine de milliers de

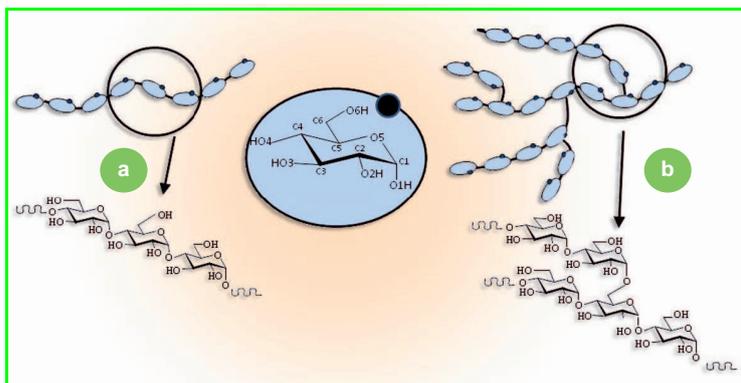


Figure 1 - Motifs structuraux de base de l'amylose (a) et de l'amylopectine (b). Le point noir symbolise la position de l'atome d'oxygène intracyclique d'une unité glucose.

résidus glucose), ce qui en fait la plus volumineuse des macromolécules biologiques connues à ce jour.

Bien que de morphologies et des tailles très différentes, les grains d'amidon possèdent une caractéristique commune : observés par microscopie en lumière polarisée, ils présentent une « croix de Malte » caractéristique (figure 2). Ceci traduit l'existence d'un certain ordre interne qui résulte de la présence de domaines cristallins disposés à l'intérieur du grain ; leur axe principal est perpendiculaire aux surfaces de croissance. Cette croix disparaît progressivement quand les granules sont chauffés dans l'eau en excès, traduisant une

perturbation de cet ordre. Les propriétés physiques de l'amidon – stabilité et transformation de phase, ou passage de l'état granulaire à l'état de gel – sont directement liées à cet ordre macromoléculaire.

Ultrastructure du grain d'amidon

L'ultrastructure du grain d'amidon a été étudiée le plus souvent après hydrolyse enzymatique ou marquage chimique. Une organisation de type « oignon » formée de couches concentriques décrites comme étant « amorphes » ou « semi-cristallines » a été mise en évidence par microscopie électronique de grains d'amidon partiellement hydrolysés. Ces couches qui ont une épaisseur variant de 100 à 400-800 nm correspondraient aux anneaux de croissance du grain. Les anneaux « semi-cristallins » ont eux-mêmes une organisation lamellaire interne qui résulterait d'une superposition de couches amorphes et cristallines formant des lamelles parallèles aux anneaux de croissance et d'une épaisseur de plusieurs centaines d'ångströms. La distance de répétition des lamelles a été évaluée par diffraction des rayons X aux petits angles à 9-10 nm. Cette épaisseur, qui est la somme des épaisseurs d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline, semble être une caractéristique universelle des grains d'amidon, quelle que soit leur origine botanique (figure 3).

À partir de données de microdiffraction de rayons X enregistrées sur grains uniques, il a été proposé que ces

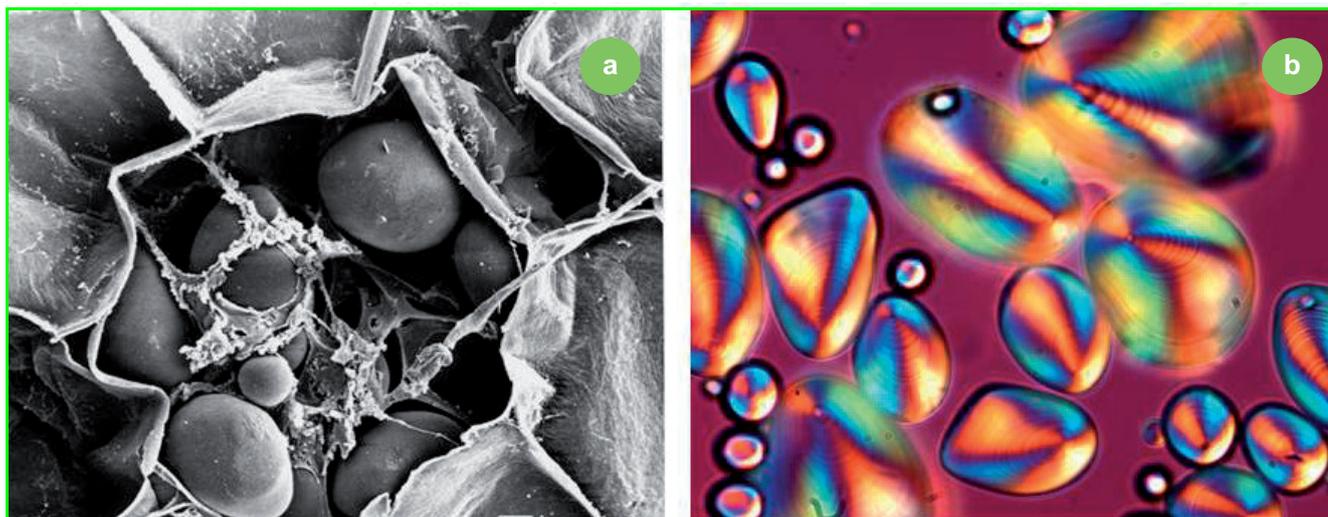


Figure 2 - Grains d'amidon de pomme de terre observés par microscopie électronique à balayage (a) et en lumière polarisée (b).

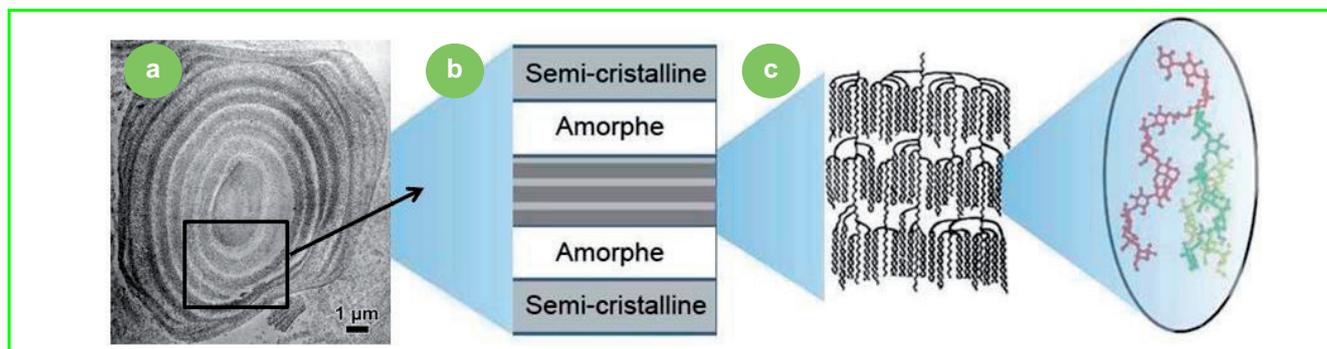


Figure 3 - Anneaux de croissance formés par une alternance de régions amorphes et semi-cristallines. Image de microscopie électronique à transmission d'une coupe de grain d'amidon de maïs (a) ; schéma de l'organisation en « oignon » constituée de strates concentriques alternativement amorphes et semi-cristallines (b), et de la structure lamellaire interne, représentant une organisation en grappe de l'amylopectine et d'un enchevêtrement possible entre une chaîne d'amylose (rouge) et des composantes en double hélice de l'amylopectine (c).

domaines semi-cristallins forment un réseau de super-hélices (de chiralité gauche).

Polymorphisme cristallin

Les amidons natifs peuvent être classés en trois groupes selon leur diagramme de diffraction des rayons X. Une forme dite de type A correspond aux amidons de céréales [2] ; celle de type B caractérise les amidons de tubercules ou riches en amylose [3]. Les amidons de légumineuses donnent un diagramme de type C, qui correspond à un mélange des deux types cristallins A et B. Les taux d'hydratation jouent un rôle important dans la cristallinité du grain d'amidon (qui varie de 15 à 45 %), l'absorption en eau dépendant de l'origine botanique, du génotype et du degré d'organisation des grains. Les amidons de type A absorbent moins d'eau que ceux de type B. On observe une augmentation de l'intensité des pics de diffraction des rayons X avec l'augmentation de la teneur en eau des grains. Ces résultats peuvent s'interpréter par un alignement des cristallites qui résulterait de l'expansion de la phase amorphe inter-cristalline [4].

Une structure en double hélice

Bien que ces structures cristallines jouent un rôle important dans ses applications, la cristallinité des grains d'amidon natifs est trop faible pour que leurs structures tridimensionnelles puissent être directement déterminées. C'est la raison pour laquelle des cristaux modèles de plusieurs micromètres ont été préparés à partir de chaînes courtes d'amylose, leur structure étant transposée à celle des cristallites présents dans les grains natifs. Ces cristaux de dimensions micrométriques (10-15 μm de longueur, 3 μm d'épaisseur) et diffractant jusqu'à une résolution de 1,3 \AA ont été étudiés sur la ligne de microdiffraction ID13 de l'ESRF (figure 4).

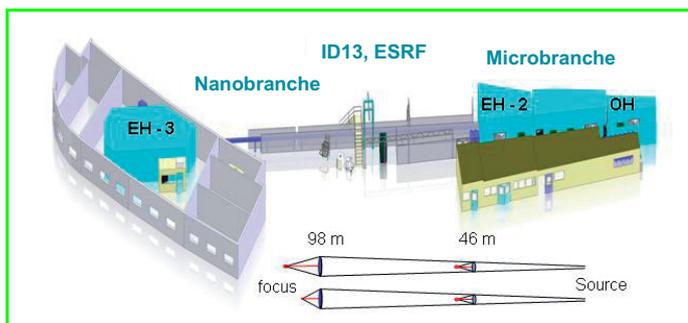


Figure 4 - La ligne de microfocuse ID13 à l'ESRF permet des études de diffraction en balayage grâce à des faisceaux de rayons X monochromatiques très focalisés.

Une première station expérimentale, située à 46 m de la source de lumière, est utilisée pour les études structurales au niveau micrométrique. Les études à l'échelle nanométrique sont réalisées au sein d'une deuxième station expérimentale située à 100 m de la source de lumière. Le fonctionnement de ces stations se fait en alternance, les tailles de faisceaux utilisées variant de 0,1 à 10 μm .

La résolution de la structure cristalline a permis de confirmer le modèle structural obtenu par analyse d'un diagramme de diffraction de fibre et par diffraction électronique sur des cristallites préparés *de novo* [5]. Les motifs structuraux sont constitués de doubles hélices, de chiralité gauche, qui s'orientent de manière parallèle au sein du cristal. La localisation précise des molécules d'eau permet

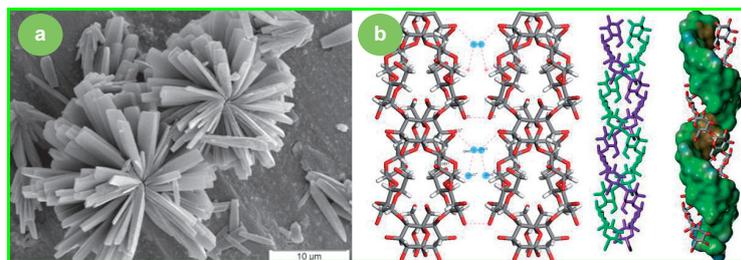


Figure 5 - a) Microcristaux d'amylose recrystallisée de type A (cliché CERMAV, microscopie électronique à balayage) ; b) structure de la double hélice. Représentation partielle du contenu de la maille cristalline.

de décrire avec précision le réseau très dense de liaisons hydrogène qui explique la densité élevée de la maille cristalline, et ce en relation avec la forte thermostabilité. C'est la première fois que la structure d'un biopolymère est résolue de cette manière et à cette résolution spatiale (figure 5).

Ces résultats représentent une avancée méthodologique importante. Ils apportent aussi de nouvelles informations sur l'orientation des extrémités réductrices des chaînes lors de la croissance cristalline, la densité de la maille cristalline, l'hydratation et le réseau de liaisons hydrogène. Ils confirment les modèles de structure en double hélices qui avaient été établis de manière indirecte pour les amidons de type A par des méthodes de simulation numérique. Ces résultats confortent également les constructions de complexes macromoléculaires qui avaient été proposées, en particulier au niveau de lamelles nanoscopiques qui peuvent être constituées de plusieurs centaines de structures en double hélices.

Des organisations structurales sur cinq ordres de grandeur

Les connaissances précises établies à l'échelle de 5 à 10 nm ne concernent pas les orientations relatives que peuvent prendre ces composantes cristallines au sein d'un grain d'amidon. Des développements récents d'une méthode de microdiffraction de rayons X à balayage permettent désormais d'établir une véritable cartographie de la nature et de l'orientation relative des domaines cristallins [6-8]. Les cartographies les plus précises indiquent l'orientation des structures en double hélice, qui ne pointent pas vers un seul endroit, mais semblent plutôt s'orienter vers la surface d'un ellipsoïde interne. L'orientation des doubles hélices est radiale, c'est-à-dire, perpendiculaire à la surface du grain, ce qui est en accord avec les conclusions tirées des données, beaucoup moins précises, des études de biréfringence. Aucune discontinuité d'orientation n'apparaît à une résolution de 10 microns, ce qui traduit un changement graduel d'orientation des éléments diffractants (figure 6). Ces études ont également permis de mettre en évidence la coexistence, au sein d'un même grain d'amidon de pois ridé, des deux allomorphes A et B et de préciser leur localisation respectivement périphérique et centrale dans le grain. À un niveau supérieur d'organisation structurale, des études menées par microscopie électronique ont conduit à émettre l'hypothèse de « blocs élémentaires » dénommés « blocklets » [9].

Alors que ce type de cartographie peut être désormais obtenu à l'aide d'un faisceau de 0,5 micron de diamètre, les progrès techniques et le contrôle de la taille du faisceau permettront bientôt de mener des explorations structurales à une résolution de 0,1 micron (figure 7).

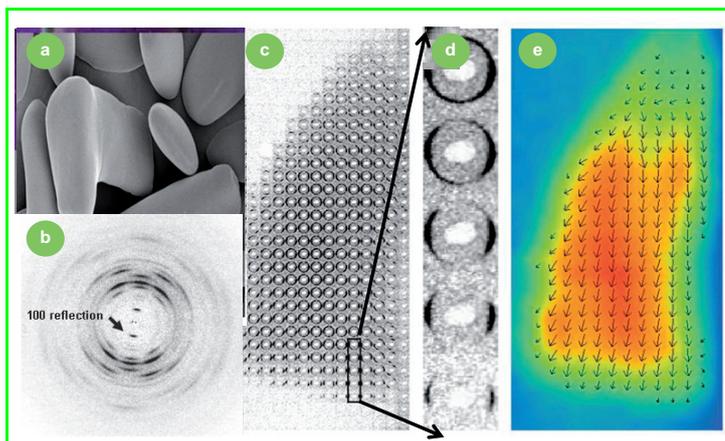


Figure 6 - Étude par microdiffraction de rayons X à balayage d'un grain d'amidon de *Phajus grandifolius* de dimensions : 50 x 200 μm [10].

Photomontage représentant sur une image de microscopie électronique à balayage (a) le diagramme de diffraction de rayons X caractéristique de la structure tridimensionnelle de l'amidon enregistré à l'aide d'un faisceau d'un micron, en périphérie d'un grain d'amidon de tubercule. La largeur azimutale de la réflexion (1 0 0) à d : 1,58 nm indique le degré élevé de l'ordre cristallin local (b) ; l'ensemble des diagrammes de diffraction qui ont été obtenus sur un même grain des domaines cristallins (c). La cartographie des domaines cristallins a été obtenue selon une grille de 4 x 4 μm , en utilisant un faisceau de rayons X de 1 μm . La surface ainsi explorée sur un seul grain d'amidon est supérieure à 5 000 μm^2 . L'analyse de cette surface permet de déterminer la nature de la cristallinité et les variations de l'orientation des domaines cristallins au sein d'un seul grain (d). Dans la cartographie de l'orientation des domaines cristallins, le sens de la flèche indique l'orientation de ces domaines (selon leur axe de fibre) et leur distribution au sein d'un même grain (e). La longueur des flèches reflète l'orientation de l'axe de fibre de l'élément diffractant. L'expérience a été réalisée à 100 °K afin de limiter la dégradation du grain dans le faisceau de rayons X.

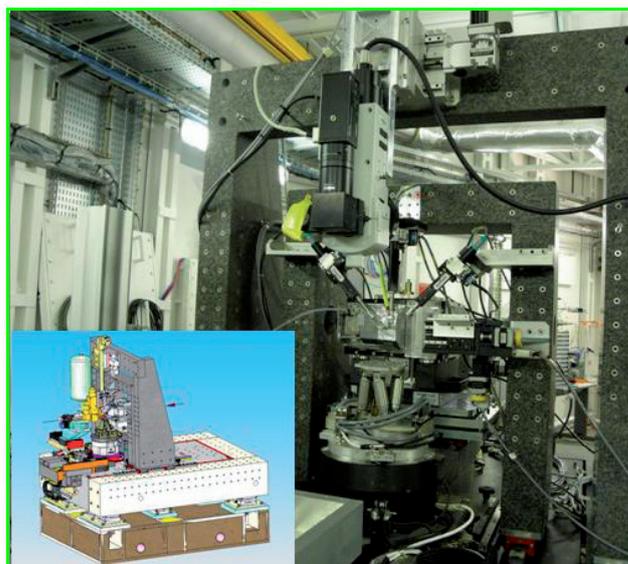


Figure 7 - Le nanogoniomètre est un diffractomètre de rayons X à balayage offrant une très grande résolution spatiale.

Installé dans la deuxième station expérimentale de la ligne ID13, le goniomètre est utilisé avec des faisceaux de rayons X de 100 à 300 nm de diamètre. Le maintien de la stabilité mécanique et le positionnement de l'échantillon requièrent une stabilité thermique au dixième de degré. Les vibrations thermiques sont minimisées par une construction de type « shell-core » du support en granit.

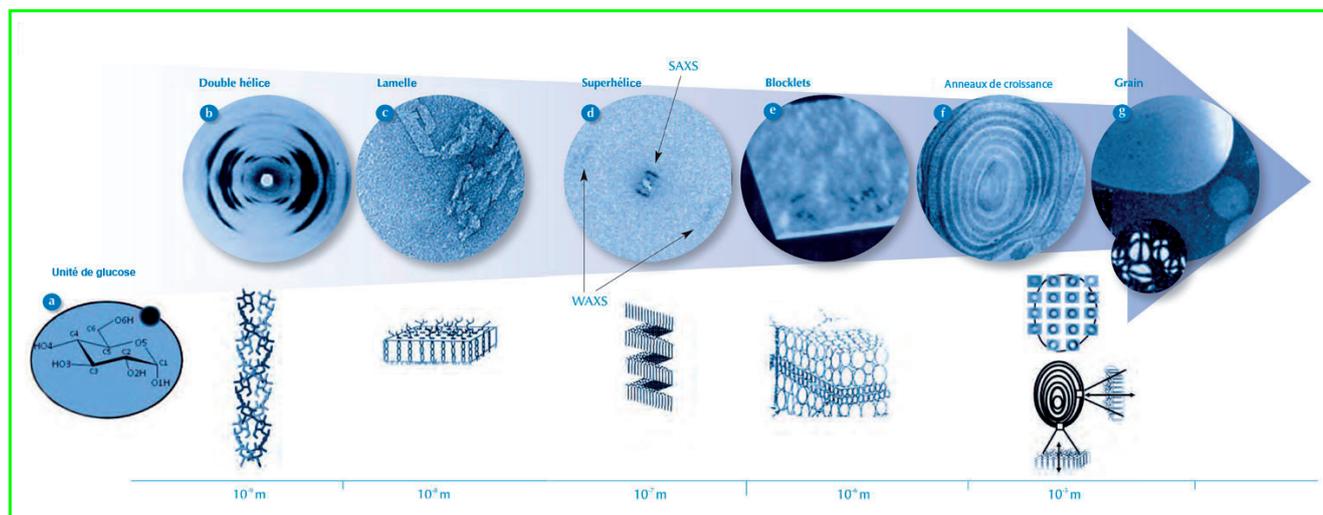


Figure 8 - Les différents niveaux d'organisation structurale couvrent cinq ordres de grandeur.

En partant de la gauche : (a) l'unité de base D-glucopyranose (0,5 nm) ; (b) double hélice à brins parallèles (5 nm) (diffraction de fibre et microdiffraction X) [2-3] ; (c) nanocristaux lamellaires (épaisseur 6 nm, surface 1 000 nm^2) (microscopie électronique) [11] ; (d) organisation supra-hélicoïdale de nanocristaux lamellaires de diamètre 18 nm, pas 10 nm (SAXS et WAXS) [8] ; (e) microgranules (20-500 nm) (microscopies électronique et à force atomique) [9] ; (f) anneaux de croissance, alternance de domaines amorphes et semi-cristallins (nm) (microscopie électronique à transmission) ; (g) orientation relative de domaines semi-cristallins (microdiffraction X), organisation sphérolitique au sein du grain et orientation radiale des lamelles cristallines (microscopie optique).

Bien avant la découverte des rayons X, le chimiste Carl Naëgeli reconnaissait en 1858 que l'étude du grain d'amidon ouvrait la voie à une nouvelle discipline : celle de la mécanique moléculaire des systèmes organisés. S'il préfigurait en cela l'émergence de la « matière molle », il serait certainement surpris de constater que plus de 150 ans plus tard, l'architecture complexe du grain d'amidon reste encore partiellement inconnue. Des données structurales ont été établies qui couvrent cinq ordres de grandeur (figure 8). Certaines d'entre elles sont fermement établies, d'autres

sont encore sujettes à caution. Une compréhension des liens hiérarchiques qui existent entre les différents niveaux d'organisations structurales est incomplète, ce qui limite d'autant les avancées dans notre compréhension des voies de biosynthèse de ces architectures de grande complexité.

Note et références

* *Siccité* : teneur en matière sèche.

- [1] Perez S., Bertoft E., The molecular structure of starch components and their contribution to the architecture of starch granule: A comprehensive review, *Starch*, 2010, 62, p. 389.

- [2] Imberty A., Chanzy H., Perez S., Buleon A., Tran V., The double-helical nature of the crystalline part of A-starch, *J. Mol. Biol.*, **1988**, *201*, p. 365.
- [3] Imberty A., Perez S., A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch, *Biopolymers*, **1988**, *27*, p. 1205.
- [4] Lemke H., Burghammer M., Flot D., Rossel M., Riekkel C., Structural processes during starch granule hydration by synchrotron radiation microdiffraction, *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, p. 1316.
- [5] Popov D., Buleon A., Burghammer M., Chanzy H., Montesanti N., Putaux J.L., Potocki-Veronese G., Riekkel C., Crystal structure of A-amylose: A revisit from synchrotron micro-diffraction analysis of single crystals, *Macromolecules*, **2009**, *42*, p. 1167.
- [6] Buleon A., Pontoire B., Riekkel C., Chanzy H., Helbert W., Vuong R., Crystalline ultrastructure of starch granules revealed by synchrotron radiation microdiffraction mapping, *Macromolecules*, **1997**, *30*, p. 3952.
- [7] Buleon A., Gerard C., Riekkel C., Vuong R., Chanzy H., Details of the crystalline ultra-structure of C-starch granules revealed by synchrotron microfocus mapping, *Macromolecules*, **1998**, *31*, p. 6605.
- [8] Waigh T.A., Donald A.M., Heidelbach F., Riekkel C., Gidley M.J., Analysis of the native structure of starch granules with small angle X-ray microfocus scattering, *Biopolymers*, **1999**, *49*, p. 91.
- [9] Gallant D., Bouchet, B., Baldwin, P.M., Microscopy of starch, evidence of a new level of granule organization, *Carbohydr. Polym.*, **1997**, *32*, p. 177.
- [10] Chanzy H., Putaux J.L., Dupeyre D., Davies R., Burghammer M., Montanari S., Riekkel C., Morphological and structural aspects of the giant starch granules from *Phajus grandifolius*, *J. Structural Biology*, **2006**, *154*, p. 100.
- [11] Angellier-Coussy H., Putaux J.L., Molina-Boisseau S., Dufresne A., Bertoft E., Perez S., The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals, *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, p. 1558.



Serge Pérez (auteur correspondant, au centre) est directeur scientifique (division des Expériences) de l'ESRF* en charge des programmes de sciences du vivant, de l'imagerie par rayons X et des sciences de la matière molle.

Manfred Burghammer (à gauche) est le scientifique responsable de la ligne de lumière ID13 à l'ESRF*.

* European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), BP 220, F-38043 Grenoble Cedex 09.
Courriels : serge.perez@esrf.fr ; burghammer@esrf.fr



FONDATION DE LA MAISON DE LA CHIMIE

Chimie et nature

25 janvier 2012

Maison de la Chimie – 28 bis rue Saint-Dominique (Paris)



Des experts scientifiques et industriels des sciences de l'atmosphère, de la terre, de l'eau et des substances naturelles débattront avec des chimistes sur l'apport de la chimie pour une meilleure compréhension de la nature, afin de la protéger, économiser ses ressources, et pour s'en inspirer au service de l'homme.

Programme

Introduction – **Bernard Bigot**

La chimie, un outil pour comprendre la nature – **M. Rohmer**

Table ronde : La chimie pour comprendre la nature, la nature pour inspirer la chimie

- La chimie atmosphérique : contexte, récents développements et applications – **E. Villenave**

- Biogéochimie et écologie des sols – **J.-F. Soussana**

- L'eau, sa purification et les micropolluants – **M. Coquery et S. Martin**

- La nature pour inspirer le chimiste : substances naturelles, phytochimie et chimie médicinale – **F. Guéritte**

- Matériaux inorganiques et hybrides bio-inspirés – **C. Sanchez**

Session 1 :

La chimie pour protéger les ressources naturelles

- Phytoremédiation des sols – **J.-L. Morel**

- De la chimie des écosystèmes et des cocktails... – **E. Blin**

- Le dioxyde de carbone, une matière première pour une révolution industrielle : le stockage d'énergie et les synthèses chimiques – **J. Amouroux**

Session 2 :

La chimie pour produire de nouvelles ressources naturelles

- Recyclage des métaux : mimer les processus naturels – **B. Goffe**

- Valorisation biologique des agro-ressources – **P. Monsan**

- Chimie du végétal, fer de lance de la chimie durable – **C. Rupp-Dahle**



À la frontière de la chimie et de la biologie : biocatalyse et catalyse bio-inspirée – **M. Fontecave**

Conclusion – **D. Dron**

Inscription gratuite avant le 14 janvier 2012 : http://actions.maisondelachimie.com/prochains_colloques.html