

Méthode de mesure de l'anisotropie de fluorescence des tissus animaux structurés : application à la viande

Frédéric Peyrin¹, Claire Luc, Sylvie Clerjon

Résumé : L'unité de recherches qualité des produits animaux (unité QuaPA) mène des travaux de recherche afin de mettre en évidence l'anisotropie des structures biologiques d'intérêt. Pour cela, nous appliquons les méthodes instrumentales adaptées. Des études ont été faites sur la maturation de la viande grâce à la connaissance de ses propriétés d'auto fluorescence. Pour caractériser l'anisotropie de ces structures, nous utilisons en particulier la polarimétrie de fluorescence dont l'intérêt principal est de permettre une mesure sensible, rapide et non destructive. Nous mettons en œuvre un spectrofluorimètre polarisant. Afin de maîtriser la qualité des résultats obtenus, nous avons développé une attention particulière sur le calibrage de l'appareil afin d'éliminer les biais instrumentaux. Ceci a donné lieu à l'écriture d'un mode opératoire de calibrage utilisé avant chaque expérimentation. Cet article détaille la chaîne instrumentale, les grandeurs d'influences et les actions correctives permettant d'obtenir l'anisotropie de fluorescence des structures observées.

Mots clés : viande, anisotropie, fluorescence, polarimétrie, instrumentation

1. Contexte

La spectroscopie de fluorescence est une technique largement répandue dans les domaines de la biologie, la chimie, les sciences médicales et physiques, permettant d'obtenir des informations sur les molécules fluorescentes et leur environnement. Mais son application à des échantillons concentrés, visqueux ou solides implique que la fluorescence soit observée en illumination frontale (différente de la configuration de mesure classique dite à angle droit).

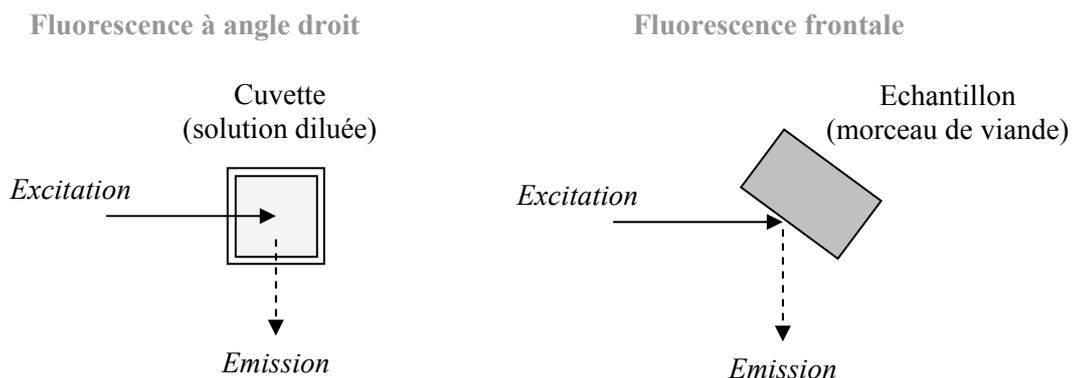


Figure 1 : Spectroscopies de fluorescence (d'après Dufour et al 2001)

¹ Inra UR370 Qualité des Produits Animaux – QuaPa- 63122 Saint Genès Champanelle.

☎ 04 73 62 42 59 ✉ peyrin@clermont.inra.fr

La mise en œuvre de la fluorescence frontale dans le domaine de la science des aliments apparaît comme un outil pertinent et prometteur, car il offre la possibilité d'une mesure sensible, rapide et non destructive (Dufour *et al* 2001, Swatland 2003, Cheikhousman *et al* 2005).

2. But de l'étude

Dans les travaux présentés ici, nous nous intéressons plus particulièrement à la technique de polarisation de fluorescence, moyen puissant pour évaluer l'ordre des milieux organisés. Cette méthode, très bien décrite dans la littérature dans le cas des échantillons liquides, est cependant moins référencée dans le cas d'échantillons solides, et donc en fluorescence frontale (science des aliments Gibson *et al* 1989, science des polymères Nobbs *et al* 1974, domaine médical Mohanty *et al* 2001).

Notre projet est d'appliquer cette technique de mesure de l'anisotropie de fluorescence au muscle, tissu biologique orienté, afin de mieux comprendre l'évolution de son organisation structurale *post-mortem*, et de tracer des pistes en vue de l'élaboration de capteurs non destructifs de la qualité de la viande. Un autre aspect est que nous souhaitons étudier la distribution angulaire de cette polarisation de fluorescence du tissu musculaire, c'est-à-dire mesurer l'anisotropie de fluorescence en faisant varier l'angle entre l'axe macroscopique principal des fibres musculaires et l'orientation de la polarisation excitatrice.

Le but de l'étude métrologique décrite dans cet article est donc de mettre en place une méthodologie instrumentale précise et reproductible de mesure de l'anisotropie de fluorescence de la viande en fonction de son orientation, à partir d'un spectrofluorimètre SLM 8000C.

3. Définition de l'anisotropie de fluorescence et principe de mesure (Lakowicz, 1999)

Une molécule fluorescente est une molécule qui, après avoir absorbé de la lumière à une longueur d'onde d'excitation donnée (λ_{exc}), émet de la lumière à une longueur d'onde supérieure (λ_{em}) après un laps de temps de l'ordre de la nanoseconde. Lorsque la lumière excitatrice est polarisée, la fluorescence émise par un certain nombre de molécules l'est également. L'amplitude de cette polarisation est décrite en terme d'anisotropie (r).

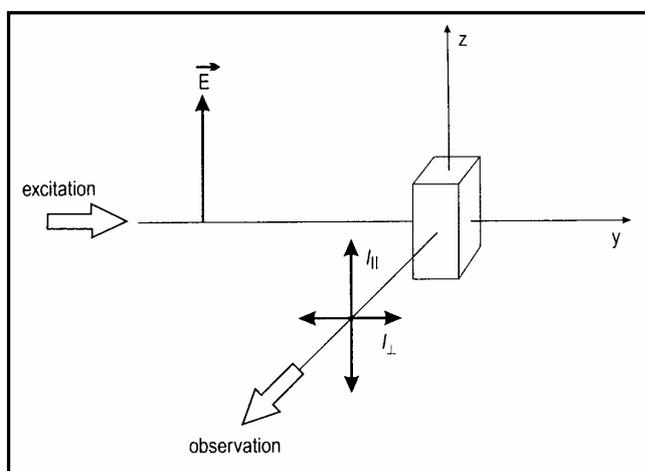


Figure 2 : Mesure de l'anisotropie de fluorescence (Valeur B., 2004)

L'anisotropie de fluorescence se définit comme suit :

L'échantillon étant excité avec une lumière polarisée verticalement (champ électrique parallèle à l'axe z), on observe l'intensité de fluorescence des composantes verticale $I_{//}$ (analyseur parallèle au polariseur) et horizontale I_{\perp} (analyseur perpendiculaire au polariseur). L'anisotropie de fluorescence est caractérisée par la différence entre ces deux composantes, rapportée à l'intensité totale de fluorescence ($I_{//} + 2I_{\perp}$) :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

En pratique, cette mesure, effectuée avec un spectrofluorimètre équipé de polariseurs, n'est pas directe. En effet, l'efficacité des composants du bras de détection de l'instrument tels que le monochromateur, le tube photomultiplicateur (PMT) n'est pas la même suivant la polarisation incidente. La mesure des intensités de fluorescence sur les voies verticale et horizontale est donc biaisée : on ne mesure pas directement les composantes $I_{//}$ et I_{\perp} , mais les intensités que l'on notera I_{VV} et I_{VH} ².

Pour prendre en compte ce biais dans la mesure et remonter à la valeur de $I_{//}$ et I_{\perp} , il est nécessaire d'introduire un facteur de correction G. Si l'on excite l'échantillon avec une lumière polarisée horizontalement, les intensités de fluorescence horizontale et verticale de la composante d'émission doivent être égales. En mesurant I_{HH} et I_{HV} , on déduit finalement le rapport $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$, exprimant la différence entre les deux voies.

On peut alors retrouver le rapport des intensités de fluorescence verticale et horizontale non biaisées :

$$\frac{I_{//}}{I_{\perp}} = \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \times \frac{1}{G} \quad (2)$$

Cette méthode de correction est évoquée dans de nombreuses publications et elle est décrite par Jameson *et al* (2003) comme un principe reconnu. Nous avons donc décidé d'utiliser également cette méthode de correction.

² Ces notations correspondent à : V pour Vertical et H pour Horizontal, le 1^{er} et le 2^{ème} indices correspondent respectivement à l'orientation du polariseur d'excitation et d'émission.

4. Mise au point de la mesure d'anisotropie de fluorescence

4.1 Instrumentation initiale

Pour réaliser la mesure de l'anisotropie de fluorescence de la viande nous disposons d'un spectrofluorimètre SLM Aminco 8000 C présenté sur la **figure 3**.

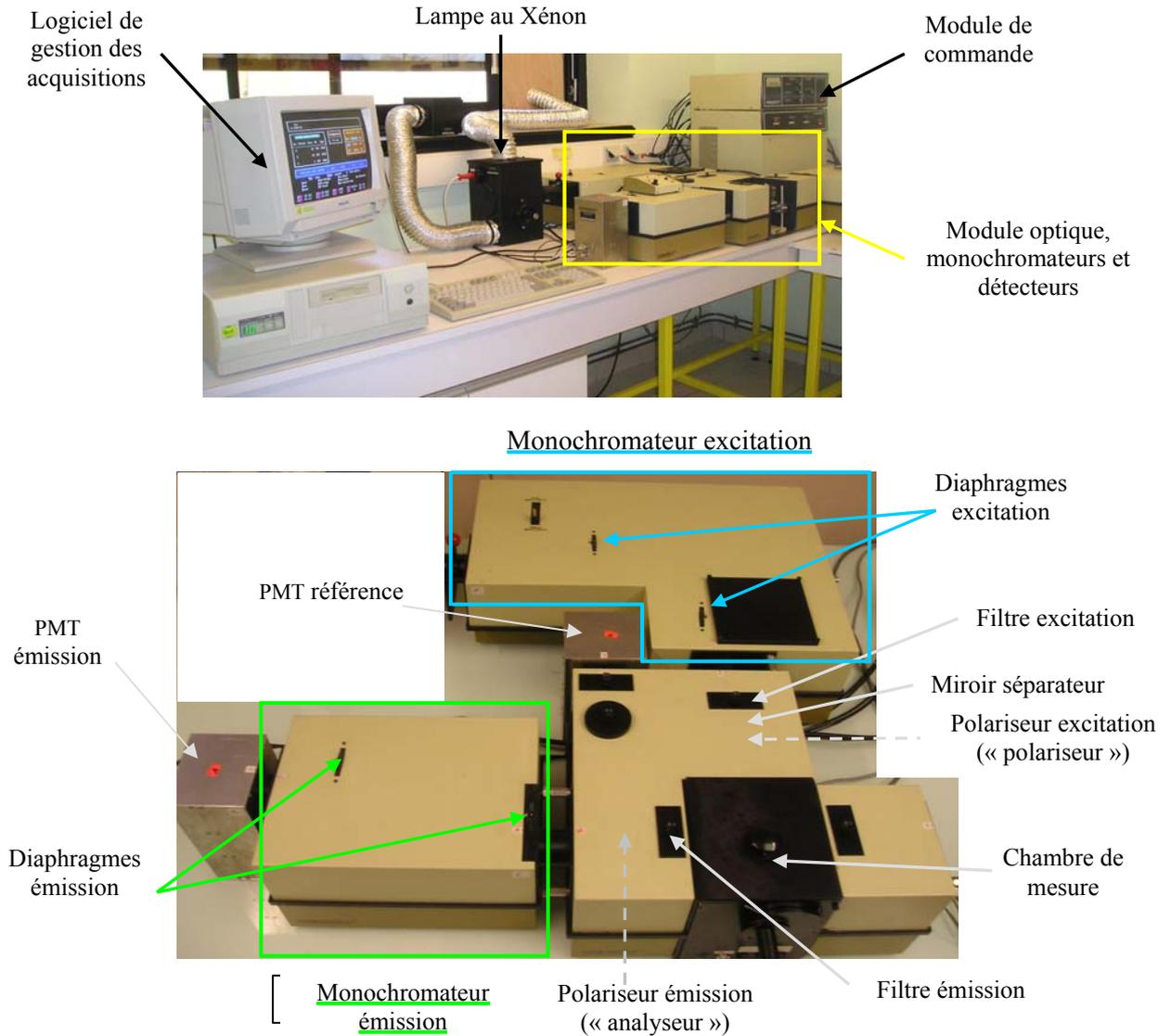


Figure 3 : Vue globale du spectrofluorimètre SLM 8000C (en haut)
Détail des différents composants du module optique et des monochromateurs (en bas)

En suivant le trajet optique de la lumière, les principaux éléments d'un spectrofluorimètre typique sont :

- une source de lumière : ici, lampe au Xénon ;
- un élément permettant d'avoir une lumière d'excitation de longueur d'onde discrète : un monochromateur ou un filtre. Nous disposons dans notre cas d'un monochromateur, auquel

nous pouvons ajouter un filtrage passe-bande afin d'améliorer la qualité du signal (diminuer le bruit de fond) ;

- un élément permettant de sélectionner le plan de polarisation de la lumière d'excitation : le polariseur ;
- une partie du faisceau est prélevée grâce à un prisme séparateur pour alimenter le canal de référence qui permet de prendre en compte les variations d'intensité de la source ;
- l'échantillon reçoit l'autre partie du faisceau d'excitation selon un angle d'incidence α choisi. L'émission est alors observée à un angle de 90° par rapport à l'excitation à travers un polariseur (l'analyseur), un monochromateur et un filtrage passe-haut ;
- un détecteur est utilisé pour quantifier la lumière émise : le plus utilisé est le tube photomultiplicateur (PMT).

4.2 Eléments à maîtriser pour une mesure fiable et reproductible

La **figure 4** représente la chaîne de mesure et ses grandeurs d'influence :

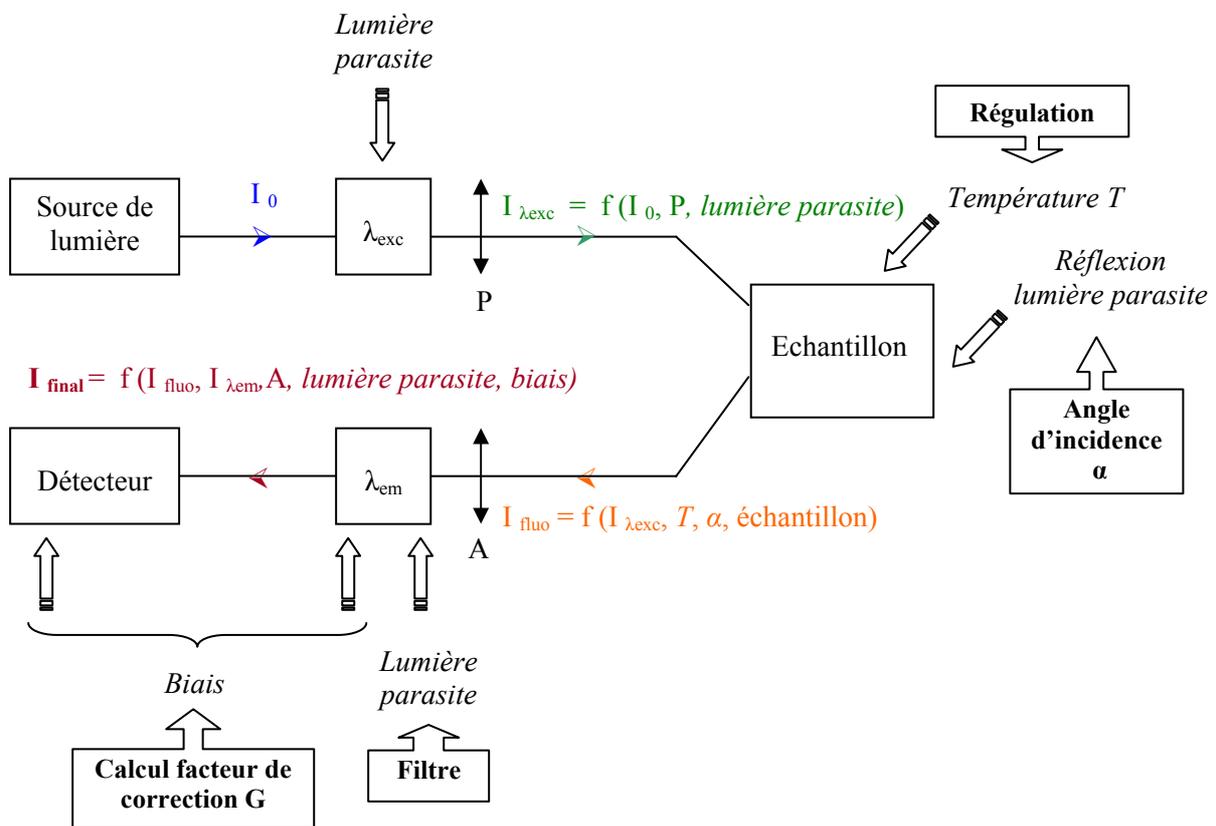


Figure 4 : Schéma de l'instrumentation permettant d'obtenir une information relative à l'échantillon avec
 - dans des rectangles : les différents éléments de la chaîne de mesure,
 - en couleur : les « mesurandes »,
 - en italique : les grandeurs d'influence,
 - dans des rectangles fléchés : les moyens de maîtrise des grandeurs d'influence.

La **figure 4** met en évidence les grandeurs d'influence sur la chaîne instrumentale. Il est indispensable de les maîtriser afin d'obtenir les intensités de fluorescence. On distingue parmi ces grandeurs d'influence :

- la température de l'échantillon : d'une part elle fait varier directement l'intensité de fluorescence, il faut donc s'assurer de sa stabilité, et d'autre part il est nécessaire de maintenir pendant la mesure les échantillons biologiques à une température proche de celle de leur stockage (8°C) ;
- la lumière parasite, qui diminue le rapport signal/bruit des spectres de fluorescence ;
- le biais créé par l'instrumentation en fonction de la polarisation.

Les parties qui suivent présentent ainsi les moyens que nous avons mis en place afin de réduire ou corriger l'effet de ces grandeurs.

4.3 Régulation thermique des échantillons

La régulation thermique de l'échantillon comprend :

- la climatisation de l'air ambiant de la pièce ;
- le refroidissement de la chambre de mesure grâce à un système de radiateurs dans lesquels circule de l'eau ;
- le refroidissement du porte échantillon lui-même par contact avec le circuit de refroidissement ;
- l'isolation thermique de la chambre de mesure avec du liège.

Dans des conditions de refroidissement où $T_{air}=23^{\circ}C$ et $T_{eau}=6^{\circ}C$, l'échantillon est refroidit à $(8 \pm 2)^{\circ}C$ et sa température est stable 15 minutes environ après sa mise en place.

4.4 Réduction de la lumière parasite

La lumière parasite, c'est-à-dire toute lumière d'une autre longueur d'onde que celle étudiée atteignant le détecteur, est une source d'erreur importante sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Cette lumière parasite provient notamment du fait que les monochromateurs ne sont pas des composants parfaits. Ainsi, il est possible que le monochromateur d'excitation laisse passer une faible quantité de lumière à des longueurs d'onde non souhaitées (on parle souvent de Fantômes de Rayleigh) et que cette lumière soit, par exemple, réfléchié par le quartz ou diffusée par l'échantillon vers le détecteur.

Dans notre cas, la lumière réfléchié par le quartz est polarisée verticalement. Si celle-ci est détectée en même temps que la fluorescence des échantillons que nous voulons observer, la valeur de l'anisotropie de fluorescence apparente mesurée est beaucoup plus élevée. Il est donc indispensable d'éliminer au mieux la lumière parasite en augmentant le rapport signal/bruit.

Pour cela, il est d'abord possible de réduire les anomalies dues aux monochromateurs en utilisant, en plus de ceux-ci, des filtres optiques. En effet, il est conseillé, pour rendre plus propre le signal d'excitation, de placer au niveau de celles-ci un filtre passe-bande centré sur la longueur d'onde d'excitation souhaitée. On peut ensuite placer à l'émission un filtre passe-haut, permettant de ne laisser passer que les longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde d'excitation (Jameson et Croney 2003). Ainsi, afin de mesurer la fluorescence de la

viande ($\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{em} \approx 330 \text{ nm}$), nous avons donc intégré à la chaîne de mesure un filtre interférentiel standard centré à 289 nm (03FIM022 Melles Griot) et un filtre coloré passe-haut WG320.

Une fois réduites les anomalies des monochromateurs, il faut considérer les réflexions spéculaires et diffuses qui ont lieu au niveau de la lame de quartz. On peut alors agir sur l'angle d'incidence, c'est-à-dire l'angle entre le faisceau incident et la normale à la surface de l'échantillon, afin d'éloigner la réflexion spéculaire du champ d'observation de l'émission.

La **figure 5** présente les variations de l'anisotropie de fluorescence mesurées pour un échantillon de viande ($\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 328 \text{ nm}$) en fonction de l'angle d'incidence. Pour un angle d'incidence de 45° , la réflexion spéculaire est directement renvoyée vers le détecteur. La mesure de l'anisotropie de fluorescence est complètement faussée dans ce cas particulier. Il faut donc choisir un autre angle d'incidence : l'angle de travail de 55° répond à cette attente. A cette incidence, une faible variation de l'angle n'a pas d'effet sur la valeur de l'anisotropie apparente. De plus, cet angle est très proche de l'angle magique de Brewster, minimisant les phénomènes de dépolarisation issus des réflexions et réfraction dioptriques (Genot *et al*, 1992).

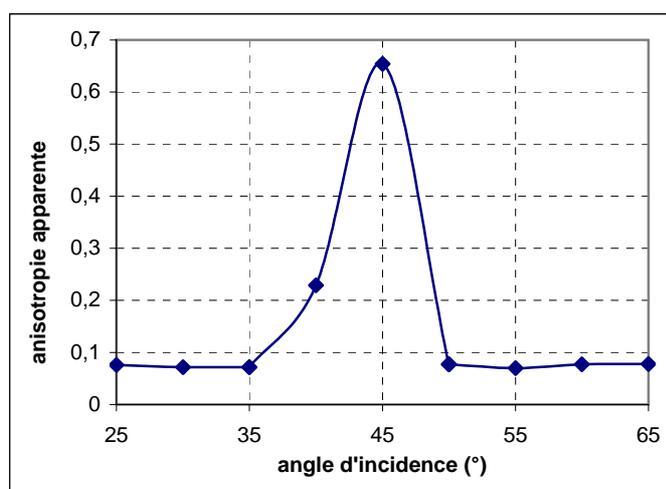


Figure 5 : Anisotropie de fluorescence apparente en fonction de l'angle d'incidence du faisceau d'excitation sur l'échantillon

4.5 Détermination de G, le facteur de correction instrumentale

Le paragraphe 3 explique la nécessité de calculer le facteur de correction G de l'instrument lorsque l'on réalise des mesures d'anisotropie de fluorescence. En principe, la fluorescence d'un échantillon excité en lumière polarisée horizontalement, est en théorie telle que $I_{HH} = I_{HV}$ si l'instrument est parfait.

La principale difficulté rencontrée est due au fait que nous réalisons des mesures sur des échantillons solides en configuration de fluorescence frontale. En effet, déterminer le facteur G de l'instrument lorsque l'on travaille en fluorescence à angle droit avec une solution diluée homogène ne pose pas, *a priori*, de difficulté majeure : il suffit de mesurer les composantes I_{HH} et I_{HV} lorsque l'échantillon est en place.

En revanche, dans le cas de l'étude présentée ici, les échantillons solides ont une anisotropie de structure. Nous avons observé que le facteur G, calculé avec de tels échantillons, varie avec l'orientation même de ces échantillons. Ceci est un non-sens puisque le facteur G est un facteur instrumental et qu'il ne dépend pas de l'échantillon. En fait, les échantillons solides présentent une anisotropie de structure et les photons excitateurs et émis subissent donc une diffusion anisotrope. Ainsi, le principe même utilisé pour la détermination du facteur G n'est

plus vérifié. Il n'est donc pas juste de déterminer le facteur G de l'instrument avec un échantillon solide tel qu'un morceau de viande.

Pour résoudre ce problème, la valeur du facteur G est établie préalablement grâce à une suspension fluorescente, préparée en broyant un morceau de viande et en diluant ce broyat dans de l'eau. Les photons se propageant dans cette suspension subissent toujours un phénomène de diffusion, mais celle-ci est maintenant isotrope. Ainsi, le principe initial ($I_{HH} = I_{HV}$) est à nouveau respecté.

Par ailleurs, le facteur G varie avec la longueur d'onde du monochromateur d'émission (Lakowicz, 1999). Dans le cas de notre application à la viande, nous avons établi un abaque du facteur G pour la plage de longueurs d'onde comprise entre 300 et 400 nm environ.

Une représentation de G (**figure 6**) est déduite des spectres d'émission I_{HH} et I_{HV} de la suspension placée dans le porte-échantillon frontal ($\lambda_{exc} = 290$ nm et λ_{em} varie de 300 à 400 nm) effectués dans les mêmes conditions de mesures et de filtrage qu'avec les échantillons solides.

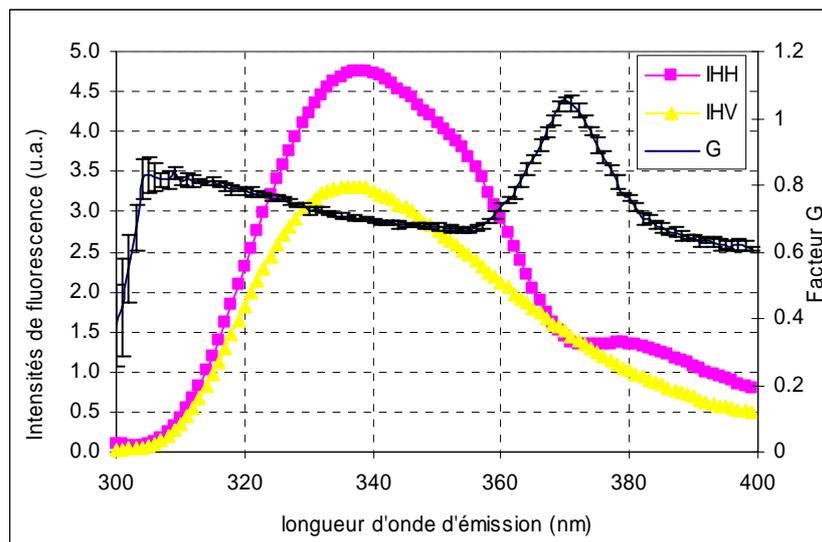


Figure 6 : Facteur G, calculé à partir des spectres de d'émission de I_{HH} et I_{HV}

Sur la **figure 6**, la valeur de G présente un pic vers 370 nm dû à l'anomalie de Wood du monochromateur d'émission. Elle se traduit par une chute de l'efficacité de transmission de la lumière polarisée horizontalement, c'est-à-dire I_{HH} . Par ailleurs, pour l'acquisition des spectres d'émission présentés ici, il n'y a pas de filtre passe-bande sur le chemin de l'excitation. On constate, comme prévu, une chute du facteur G pour des longueurs d'onde se rapprochant de la longueur d'onde d'excitation : cette chute provient d'une petite augmentation de l'intensité I_{HH} due en hypothèse à la réflexion sur le quartz d'une faible proportion de lumière provenant du faisceau d'excitation (cf. § 4.4).

Remarque : les expérimentations décrites dans ce paragraphe ont permis d'établir une méthodologie de détermination du facteur G. Cependant, afin de mettre en place un mode opératoire reproductible, la suspension de fibres musculaires dont la densité optique n'est pas connue, est aujourd'hui remplacée par une solution de BSA (Sérum d'Albumine Bovine) de concentration connue (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), dont les conditions de fluorescence sont identiques.

5. Un exemple de résultats

Les **figures 7 et 8** présentent quelques résultats de mesure d'anisotropie obtenus avec des muscles *Semi Membranosus* d'agneau en fonction de l'angle entre la polarisation de la lumière excitatrice, qui est verticale, et l'axe macroscopique principal des fibres musculaires.

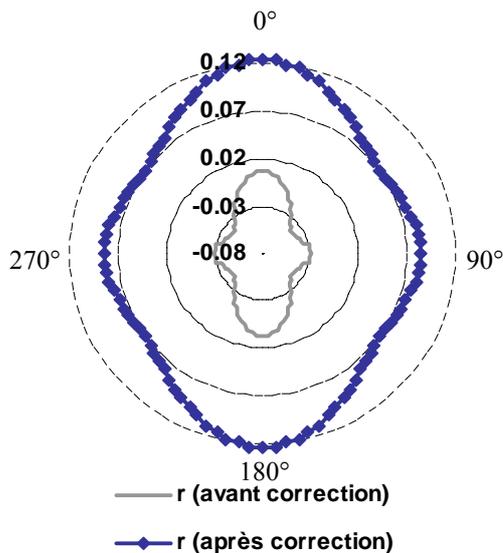


Figure 7 : Anisotropie d'un muscle SM d'agneau avant et après prise en compte du facteur instrumental G

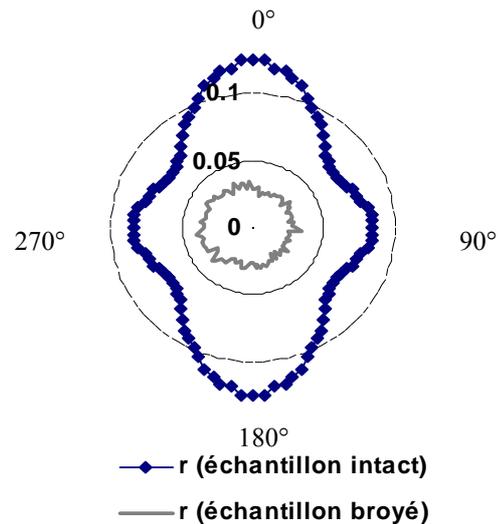


Figure 8 : Anisotropie d'un muscle SM d'agneau soit intact, soit broyé

La **figure 7** montre l'influence de la prise en compte du facteur instrumental G sur la valeur de l'anisotropie. On constate que l'anisotropie varie en fonction de l'angle entre les fibres musculaires et la polarisation incidente. En fait, la forme de ces distributions dépend du type de tissu étudié et apporte une information sur sa structure. La **figure 8** montre, par exemple, que si l'on détruit la structure macroscopique d'un échantillon en le broyant, son anisotropie présente alors une distribution isotrope. Des essais de répétabilité ont montré que la dispersion entre les mesures de l'anisotropie est inférieure à 1%.

Conclusion

La mesure d'anisotropie de fluorescence est une mesure qui n'est pas aisée à mettre en œuvre. Elle implique la maîtrise de grandeurs d'influence d'origines diverses, soit extérieures à la chaîne de mesure, comme la température de l'échantillon, soit directement liées aux conditions et singularités de fonctionnement des composants de la chaîne de mesure. Afin de garder la maîtrise des éléments que nous venons de décrire, nous avons diffusé un mode opératoire de calibrage du spectrofluorimètre que nous mettons en œuvre avant chaque expérimentation.

C'est au prix de cette maîtrise métrologique que des travaux de thèse destinés à améliorer la connaissance des structures des tissus musculaires ont pu être menés.

Remerciements : Nous tenons à remercier David Cormier et Frédéric Mercier pour la prise en charge de tous les éléments de micromécanique et de régulation thermique.

Bibliographie

- Cheikhousman R., Zude M., Bouvzresse D.J.R., Léger C.L., Rutledge D.N., Birlouez-Aragon I. (2005) *Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating*. Analytical and bioanalytical chemistry 382 (6).
- Dufour E., Frencia J-P. (2001) *Les spectres de fluorescence frontale, Une empreinte digitale de la viande*. Viandes Prod. Carnés 22(1).
- Genot C., Tonetti F., Montenay-Garestier T., Drapron R. (1992) *Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-proteins interactions of visco-elastic food products 1-Designing of front-face adaptor and validity of front-face fluorescence measurements*. Science des aliments 12: 199-212.
- Gibson S.M., Strauss G. (1989) *An assay of molecular mobility in solid corn meal by front-face fluorescence anisotropy*. Cereal Chemistry 66(4)
- Jameson, D.M., Croney J.C., Moens P.D.J. (2003) *Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes*. Methods in enzymology 360.
- Jameson D.M., Croney J.C. (2003) *Fluorescence polarization: past, present and future*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 6:167-176.
- Lakowicz J.R. (1999) *Principles of fluorescence Spectroscopy, Second Edition*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Mohanty S.K., Ghosh N., Majumdet S.K., Gupta P.K (2001) *Depolarization of autofluorescence from malignant and normal human breast tissues*. Applied Optics 40(7)
- Nobbs J.H., Bower D.I., Ward I.M., Patterson D. (1974) *A study of the orientations of fluorescent molecules incorporated in uniaxially oriented poly(ethylene terephthalate) tapes*. Polymer 15: 287-300.
- Swatland H.J. (2003) *On-line evaluation of meat*. Technomic, Lancaster.
- Valeur B. (2004) *Invitation à la fluorescence moléculaire*. Editions De Boeck Université, Bruxelles