

Réalisation d'une cellule d'imagerie multimodale

Abdlatif Ben Moussa¹, Jean-Marie Bonny¹

Résumé : *Sur le centre Inra de Clermont-Ferrand, l'unité QuaPA (Qualité des produits animaux) a conçu et réalisé une cellule d'imagerie multimodale qui caractérise les myofibrilles, le gras et le collagène dans les tissus musculaires par imagerie de fluorescence, en utilisant les mesures par imagerie RMN et par macroscopie sur coupes histologiques comme références.*

Ce dispositif est adapté à l'observation en respectant les contraintes de chaque technique de mesure ; à savoir, la nécessité de couper l'échantillon à l'endroit exact où les images RMN ont été acquises pour l'imagerie de fluorescence, et de redécouper cette coupe en sous-parties dont le champ d'exploration est compatible pour l'étude histologique. De plus, la cellule multimodale dispose d'un ensemble de repères détectables par chaque méthode d'imagerie.

Nous présentons des images multimodales acquises utilisant cette cellule d'observation.

Mots clés : IRM, imagerie par résonance magnétique, macroscopie, histologie, fluorescence, muscle, qualité

Introduction

La tendreté de la viande est une qualité sensorielle et organoleptique recherchée par le consommateur (Grunert K.G., 1997). Cette qualité est en partie liée à la teneur en tissu conjonctif dans le muscle, muscle qui devient de la viande après l'abattage. Le tissu conjonctif est principalement composé de collagène. Les muscles connus pour être pauvres en collagène sont utilisés comme viande à griller (steak), les muscles connus pour être riches en collagène (muscles de l'avant de la carcasse) sont orientés par la filière industrielle vers des processus d'attendrissage physique (hachage) ou vers des préparations à cuisson longue, pour être commercialisé comme viande à braiser (pot au feu, bourguignon).

À court terme, l'objectif est de caractériser les myofibrilles, le gras et le collagène, par imagerie de fluorescence, en utilisant la mesure par imagerie IRM couplée avec les techniques d'imagerie macroscopique comme référence.

À long terme, l'objectif est de développer un système utilisant la propriété d'auto-fluorescence du collagène pour évaluer la quantité et la distribution du collagène dans le muscle. Ce système permettra de trier et d'orienter automatiquement les muscles vers une destination de viande à griller pour les plus pauvres en collagène, ou vers des procédés technologiques pour les plus riches en collagène.

Pour parvenir à ces objectifs, 3 équipes de l'unité QuaPA ont travaillé en synergie, pour trouver la meilleure combinaison d'images acquises par imagerie de fluorescence et pour

¹ INRA-UR370-QuaPA, Qualité des produits animaux, structures tissulaires et interactions moléculaires –
F-63122 Saint-Genès-Champanelle ☎ 04 73 62 41 74 ✉ abmoussa@clermont.inra.fr

distinguer les 3 différents composés du muscle afin de connaître leur distribution, en se référant aux images IRM et histologiques.

Pour cela, nous avons conçu et réalisé une cellule de mesure par imagerie multimodale afin de conditionner les muscles à étudier et de préserver la fidélité des conditions de mesure dans chacune des 3 modalités mises en œuvre.

1. Matériel et méthodes

L'unité QuaPA a mis en commun les compétences de ses 3 équipes :

- l'équipe STIM (Structures tissulaires et interactions moléculaires) qui utilise l'outil IRM pour obtenir des images paramétriques des différents composés ;
- l'équipe M2H (Microscopie-Histologie-Histochimie) qui identifie les composés selon différentes techniques de coloration sur des coupes histologiques ;
- l'équipe BIOP (Biophysique) qui souhaite valider son banc de mesure par imagerie de fluorescence frontale.

Les techniques IRM et celles employées sur les coupes histologiques sont complémentaires et permettent en les combinant d'étalonner le banc d'imagerie par fluorescence. Après traitement, le banc d'imagerie par fluorescence fournira rapidement des résultats exploitables liés à la structure et aux propriétés de l'échantillon de muscle observé.

1.1 Les 3 modalités d'imageries

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire IRM est une technique de mesure quantitative, non invasive et non destructive, l'échantillon ne subit ni décomposition, ni altération durant l'analyse. L'IRM est un moyen pour visualiser de manière sélective le gras, le réseau conjonctif, l'eau exsudée entre les faisceaux de fibres musculaires (myofibres), à l'échelle macroscopique ($\approx 500 \mu\text{m}$).

L'équipement utilisé est un supraconducteur horizontal "Biospec" de 4,7 Teslas, piloté par une console "Avance 200" du fabricant Bruker. L'acquisition des images se fait par l'association du système de gradient d'imagerie BGA-12 et de la sonde volumique de type "birdcage" qui résonne à la fréquence du proton ^1H . La première séquence d'acquisition d'images est la séquence dite "CSS-IR" (Chemical shift selective-inversion recovery) pour la détection spécifique du tissu adipeux (Laurent W. *et al*, 2000) et la seconde séquence est une séquence "pondérée en susceptibilité" (Bonny J.M. *et al*, 2001) pour mettre en évidence le tissu conjonctif complet (collagène, élastine et gras).

L'imagerie macroscopique par histologie est une méthode fiable qui offre une grande résolution, cependant, elle est destructive. Elle fournit des images sur la répartition des composés, à l'échelle macroscopique (Labas R. *et al*, 2001).

Après la cryofixation et la confection des coupes, on procède à la coloration. Le tissu conjonctif est mis en évidence avec le rouge Sirius, les myofibres sont identifiées avec l'hématoxyline éosine et les lipides ressortent en rouge avec la coloration "red oil".

L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra analogique noir et blanc JAI CV-M300 fixée sur un banc de reproduction, couplée à un objectif macroscopique Micro-Nikon 60 mm f/2,8 D (Nikon, Japon). L'ensemble est relié à une carte d'acquisition pilotée par un micro-ordinateur. La quantification des surfaces occupées par le collagène ou par les lipides est réalisée avec le logiciel Visilog (Noesis).

L'imagerie de fluorescence frontale est une technique légère qui montre les spectres des différents composés du muscle, mesurés sous différentes conditions d'excitation et observés à des longueurs d'onde d'émission supérieures aux longueur d'onde d'excitation. Le but est d'obtenir 3 images à l'échelle macroscopique qui résultent d'une excitation à une longueur d'onde correspondant à l'excitation de chacun des trois composés que l'on souhaite visualiser.

Les couples longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission optimaux de caractérisation des trois principaux composés sont respectivement de 290/332 nm pour les myofibrilles, 322/440 nm pour le gras et 380/440 nm pour le tissu conjonctif (Skjervold *et al*, 2003). Le dispositif utilisé est un système d'imagerie multi spectral développé dans l'unité QuaPA (Abouelkaram S. *et al*, 2006). Ce banc optique utilise une caméra numérique sensible aux rayonnements U.V. (Sony XCD-SX900UV), une source polychromatique (lampe Xénon à arc) et 2 monochromateurs pour sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et les longueurs d'onde d'émission diffusée par l'échantillon irradié.

Cette technique a l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de donner une réponse rapide, malgré l'incertitude et la précision de la mesure.

1.2 Contraintes techniques

Les contraintes sont principalement liées à chaque méthode de mesure et aux dimensions des échantillons. Puisque l'IRM ne modifie pas l'échantillon et restitue des images dans le volume, cette méthode est la première phase de mesure. Ensuite, la méthode la moins destructive entre la fluorescence et la macroscopie sur coupes histologiques est la fluorescence, donc par élimination, la seconde phase de mesure est l'imagerie par fluorescence et la dernière phase de mesure est la macroscopie sur coupes histologiques.

La première phase, consiste à observer simultanément par IRM deux coupes à l'intérieur de deux muscles selon un axe de vision et un sens préalablement repérés. Après découpage des muscles suivant les deux coupes, la phase suivante est de caractériser par imagerie de fluorescence les mêmes faces analysées par IRM. Finalement, les 4 tranches étudiées sont divisées en 4 cubes, préparés pour la phase d'imagerie macroscopique sur coupes histologiques.

En IRM, la taille des échantillons de muscle est donnée par le champ de vision de la sonde RMN et de la charge (liée au couplage), soit au maximum $8 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$. Pour l'imagerie de fluorescence, les échantillons de $5 \times 4,5 \times 2 \text{ cm}^3$ au maximum, sont conditionnés dans un support ouvert sur le dessus, en plastique de forme rectangulaire. Pour l'imagerie par histologie, la dimension des coupes admissibles est de $2 \times 2 \text{ cm}^2$.

La solution proposée est d'étudier simultanément 2 morceaux de muscles de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$, placés dans un compartiment et isolés l'un de l'autre, par cycle de mesure.

La cellule sera donc composée de 2 compartiments de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ pour répondre à cette contrainte. De plus, puisque l'environnement RMN présente des champs magnétiques intenses, la cellule ne sera composée que de matière amagnétique, comme les plastiques.

1.3 Étude conceptuelle et technique

Le but est de concevoir un système d'investigation par imagerie multimodale qui tienne compte des contraintes énumérées précédemment. Il s'agit d'un dispositif technique adapté aux 3 méthodes de mesure (IRM, fluorescence, histologie), qui conserve les propriétés des

échantillons à l'issue des mesures et qui respecte les contraintes de chaque phase de mesure. La cellule multimodale doit assurer la reproductibilité de l'orientation et des distances entre les deux prélèvements, ainsi que la fidélité des conditions de mesure, afin que les cartographies issues des 3 méthodes de mesure soient comparables. On souhaite arriver à des échantillons de surface $2 \times 2 \text{ cm}^2$ pour l'histologie, à partir de 2 échantillons de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ conditionné, permis par l'IRM.

L'idée est de réaliser un dispositif qui a l'aspect d'un bloc élémentaire, pouvant être divisible en plusieurs éléments, en autant d'éléments que de sous échantillons. Concrètement, un montage mécanique qui est solidarisé à l'aide de visseries, pour l'observation en IRM, qui se découpe en 6 parties, comme l'échantillon. La **figure 1** illustre une vue éclatée du dispositif.

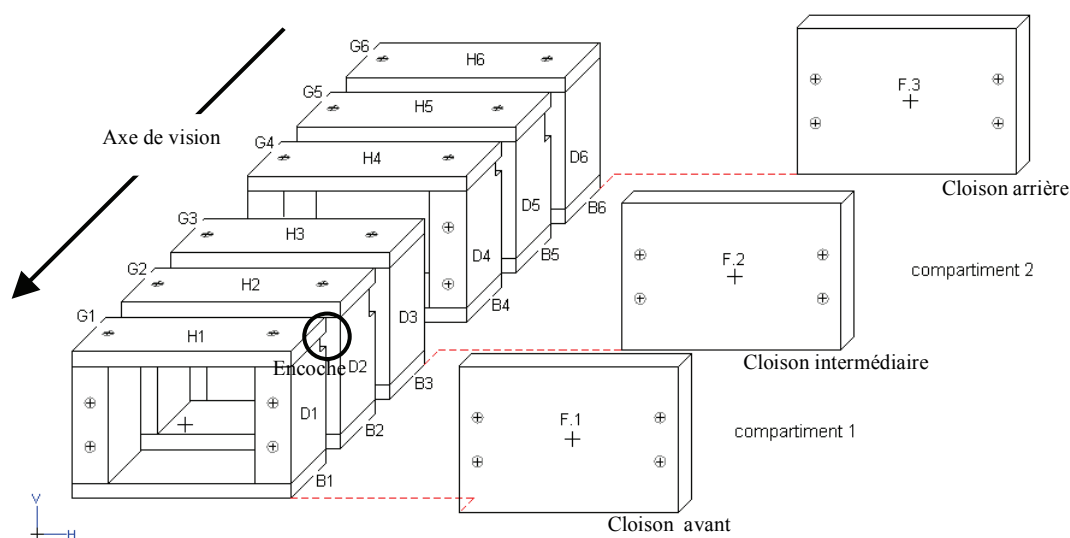


Figure 1 : vue éclatée de la cellule d'imagerie multimodale

Chaque élément du montage est référencé par une lettre suivie d'un chiffre, afin de faciliter le montage. La lettre désigne la face, et le chiffre l'ordre dans son rang.

Les références F1 et F3 représentent les cloisons avant et arrière, F2 la cloison intermédiaire, D0 à D6 les 6 montants du côté droit, G0 à G6 les 6 montants du côté gauche, H0 à H6 les 6 faces du haut et B0 à B6 les 6 faces du bas. Ainsi, le compartiment "1" se trouve entre les pièces F1 et F2, tandis que le compartiment "2" se trouve entre F2 et F3. L'ensemble composé des éléments G, D, H, B portant l'indice "1" est appelé un cadre, le dispositif est donc composé de 6 cadres.

Des encoches de tailles différentes suffisent pour pouvoir repérer les éléments dans l'espace (3D), en macroscopie et histologie, comme en imagerie de fluorescence, et même en imagerie IRM, puisque l'eau exsudée des muscles, en comblant ces espaces libres, apparaît sur les images en hyper signal. Cependant, il est nécessaire de se fixer par convention l'axe de vision des tranches à étudier, pour cela, des flèches sont dessinées dans le sens F3 vers F1 afin d'éviter toutes erreurs de positionnement.

1.4 Réalisation et essais

Les différentes pièces sont réalisées dans nos ateliers. La matière première pour la fabrication est le polyoxyméthylène (POM), familièrement appelé le "delrin". Le POM est

amagnétique et grâce à sa structure et à sa haute cristallinité, il offre une bonne résistance aux agents chimiques, une excellente stabilité dimensionnelle, une bonne isolation électrique et une large plage de température d'utilisation.

Comme l'illustre la **figure 2**, le parallélépipède rectangle de 60 x 48 mm qui représente un cadre, s'inscrit dans un cercle correspondant au diamètre interne de la sonde volumique RMN (72 mm de diamètre). La largeur des cadres est de 13,3 mm, qui correspond à une tranche. Le maintien de l'ensemble des cadres est réalisé à l'aide de 4 tiges filetées en nylon (M3). À cause du diamètre de ces tiges, il a été nécessaire d'utiliser des montants de 10 mm d'épaisseur. Les montants et les arêtes sont assemblés à l'aide de vis à tête fraisée en nylon.

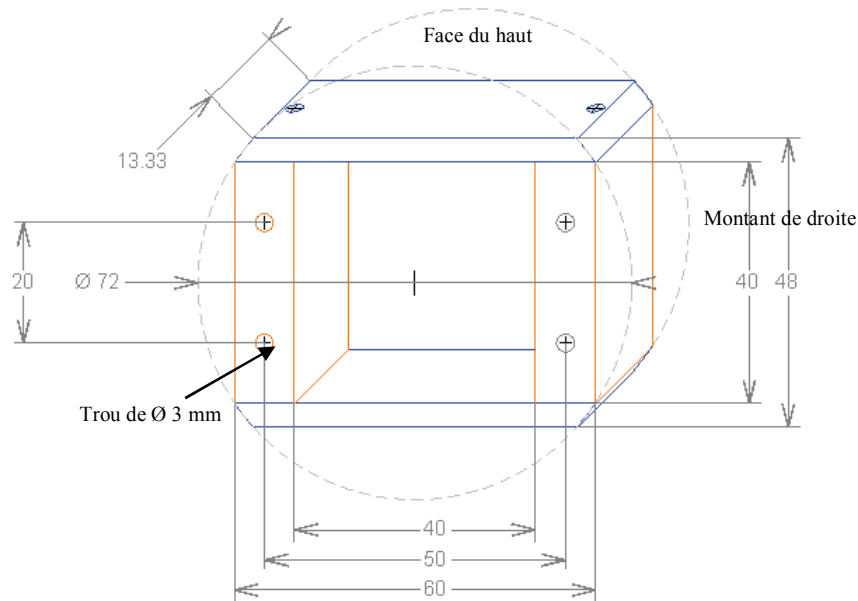


Figure 2 : cadre de la cellule d'imagerie multimodale

Pour séparer et isoler les 2 muscles à étudier, nous avons réalisé 3 cloisons de 60 x 40 mm et de 5 mm d'épaisseur (**figure 3**). Nous avons percé des trous pour glisser les 4 tiges filetées en nylon afin d'unifier les 6 cadres et les 3 cloisons, à l'aide de 8 écrous serrés de part et d'autre de la cellule.

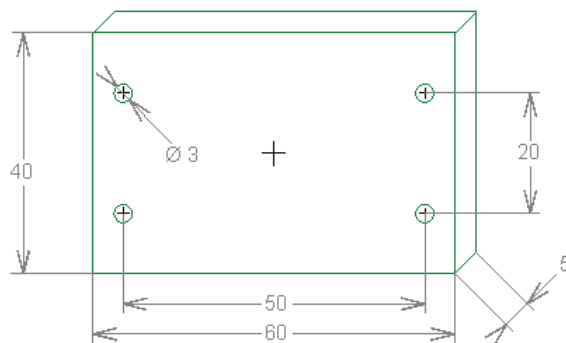


Figure 3 : cloison de la cellule d'imagerie multimodale

Pour faciliter la découpe des muscles, il a été nécessaire de réaliser un dispositif supplémentaire qui maintient en pression l'ensemble des cadres et des cloisons, comme un

étau, avec une partie fixe (mord fixe) et une autre mobile (mord mobile) qui peut être verrouillée en translation. Ainsi, les tranches peuvent être découpées à l'aide d'une lame très fine, en se guidant avec les montants, après avoir retiré les 4 tiges filetées. Finalement, on est assuré d'avoir les mêmes faces à analyser. La **figure 4** illustre ce plateau de découpage et ses fonctionnalités.

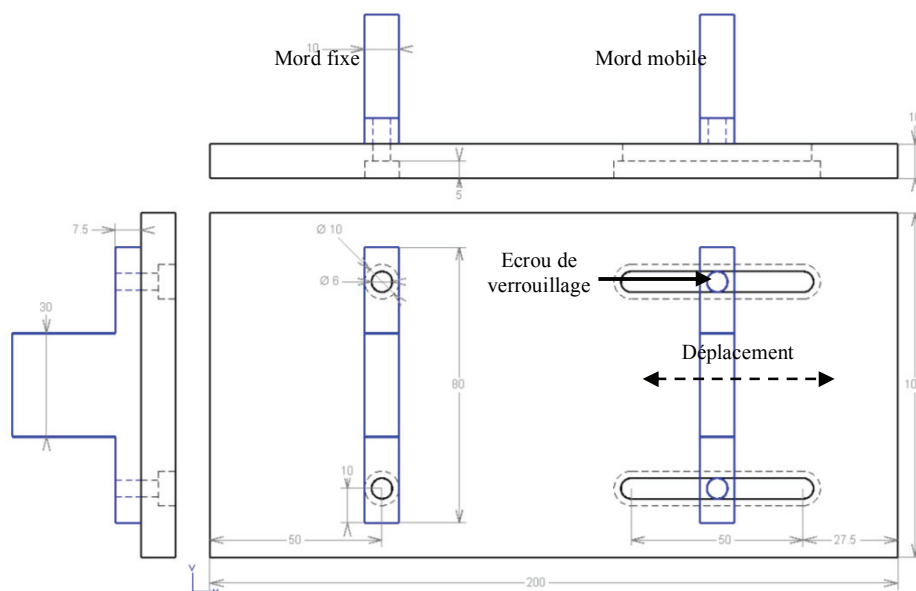


Figure 4 : plateau de découpage des muscles

On numérote les éléments avec un jeu de marque alphanumérique à frapper. Une fois la cellule montée, on a arrondi les angles de la cellule avec de la toile émeri sur une surface plane pour ajuster ses dimensions afin qu'elle puisse rentrer et se positionner dans la sonde volumique RMN.

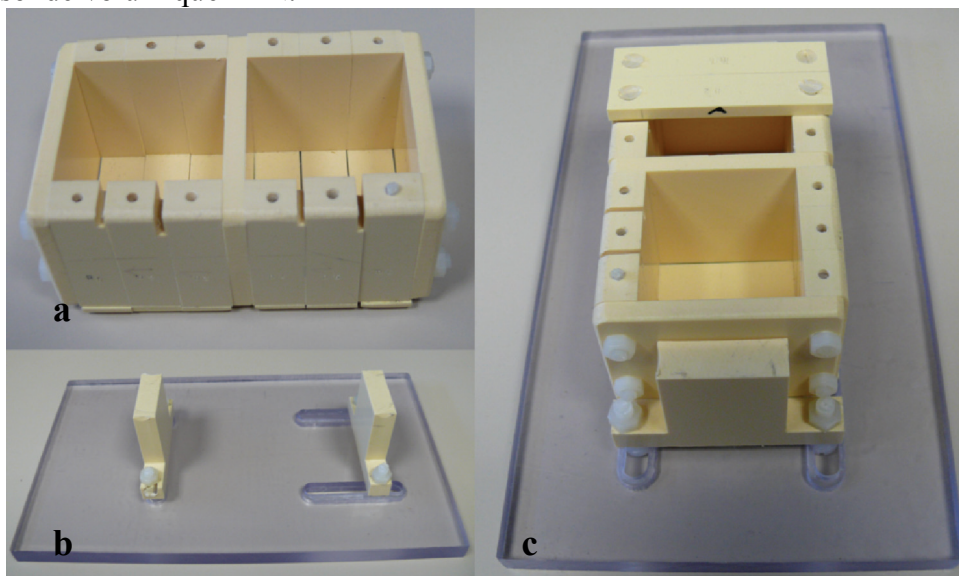


Figure 5 -photo © A .Ben Moussa/Inra : vue intérieure de la cellule multimodale (a), le plateau de découpage (b) et la cellule intercalée dans le plateau (c)

La **figure 5** illustre la réalisation de la cellule d'imagerie multimodale et son plateau de découpage. Pour valider la cellule d'imagerie multimodale et pour définir un protocole

d'utilisation, nous avons exécuté les différentes étapes avec un muscle. *A priori*, les exigences du cahier des charges sont respectées, mais l'erreur introduite par la découpe des tranches entre les modalités n'est pas quantifiable. Le traitement de ces images (recalage) nous donnera une estimation de cette erreur.

1.5 Procédure de mise en œuvre

La procédure d'utilisation s'exécute dans l'ordre des mesures et de la façon suivante:

Phase 1. Imagerie par IRM

Les faces du haut de la cellule (H1 à H6) sont ôtées pour introduire les 2 échantillons de muscle de $4 \times 4 \times 4 \text{ cm}^3$ dans leur compartiment respectif. Ensuite, la cellule est refermée et placée dans la sonde RMN, pour une durée d'acquisition de 10 heures, sur 2 coupes virtuelles de chaque échantillon en respectant l'axe de vision et son sens.

Phase 2. Imagerie par fluorescence

Après avoir intercalé le dispositif entre les mords du plateau de découpage, l'utilisateur procède au découpage des muscles avec une lame très fine et en se servant des montants comme guides pour que la coupe soit droite et nette. Ainsi, les 2 échantillons de muscle sont découpés dans le même plan que les coupes virtuelles IRM et sont prédisposés dans leurs cadres. Les faces correspondantes aux coupes précédemment étudiées en IRM sont alors positionnées sur le banc d'imagerie par auto fluorescence pour réaliser les acquisitions d'images.

Phase 3. Imagerie par histologie

La taille des tranches n'étant pas compatible avec la méthode histologique, chacune d'elles est partagée en 4 parts égales de 2 cm de côté et toujours dans ces mêmes cadres. On réalise les colorations et les acquisitions d'images sur chaque morceau.

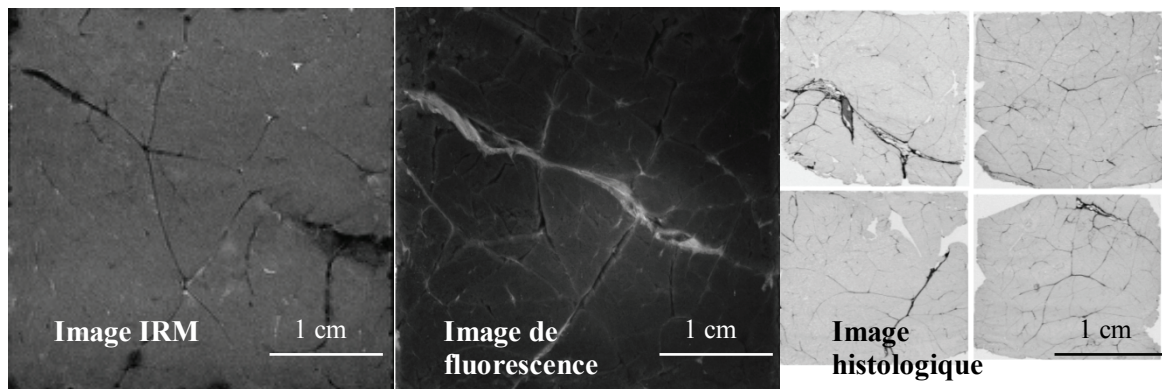


Figure 6 : images du collagène d'un muscle de type *semitendinosus*

2. Résultats et discussions

D'après les images acquises selon les 3 modalités (**figure 6**) qui montrent la répartition du collagène dans un muscle de type *semitendinosus* (riche en collagène), on observe bien une similitude entre l'image IRM et l'image de fluorescence. En revanche, la comparaison avec l'image histologique est plus difficile. Du fait que cette image soit reconstruite à partir de 4 images, on perd beaucoup d'information sur les contours, cela se traduit par des zones blanches sur l'image reconstituée. Malgré tout, on observe bien une similitude entre ces 3 techniques. Les 3 images acquises selon ces 3 modalités représentent bien la même coupe de muscle.

Les résultats issus des premiers essais démontrent que la cellule offre la précision attendue par les utilisateurs et qu'elle préserve la fidélité des conditions de mesure entre chaque modalité à condition de respecter avec rigueur le protocole d'utilisation pour garantir ses qualités, de plus, ce dispositif est simple de mise en œuvre.

Conclusion

La cellule d'imagerie réalisée respecte bien les contraintes fixées par chacune des 3 modalités, et d'après les résultats obtenus, nous avons bien des images restituées qui rendent compte de la même coupe avec une erreur négligeable.

Grâce à cette cellule d'imagerie multimodale, nous avons acquis des images provenant de chacune des modalités et elles sont comparables entre-elles, en termes de distribution du collagène, du gras et des myofibres. Ces images sont en cours de traitement et d'analyse, afin de corréliser les mesures de fluorescence avec celles de l'IRM et de l'histologie, l'objectif final étant la validation de l'imagerie de fluorescence comme outil de quantification des principaux constituants du muscle.

Bibliographie

- Abouelkaram S., Chauvet S., Strydom P., Bertrand D., and Damez J.L. (2006) Muscle study with multispectral image analysis. 52nd International Congress of Meat Science and technology (ICoMST), 669-670
- Bonny J.M., Laurent W., Labas R., Taylor R., Berge P. and Renou J.P. (2001) Magnetic resonance imaging of connective tissue: a non-destructive method for characterizing muscle structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 81 (Issue 3) 295-370
- Grunert K. G. (1997) What's in a steak? A cross-cultural study on the quality perception of beef. *Food Quality and Preference*, Volume 8 (3) 157-174
- Labas R., Maunier L., Chanier L., Collignon H., Taylor R. (2001) Etude histologique de la structure des muscles de bovins en relation avec la qualité des viandes. Approche par traitement d'images. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 14 (1) 69-78
- Laurent W., Bonny J.M. and Renou J.P. (2000) Imaging of water and fat fractions in high-field MRI with multiple slice chemical shift-selective inversion recovery. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, Série 12, 488-496
- Skjervold P.O., Taylor R.G., Wold J.P., Berge P., Abouelkaram S., Culioli J., Dufour E. (2003) Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue and myofibers in meat. *Journal of food science*, Volume 68 (Issue 4) 1161-1168