



HAL
open science

Etude de la structure des tissus musculaires par polarimétrie de fluorescence

Claire Luc

► **To cite this version:**

Claire Luc. Etude de la structure des tissus musculaires par polarimétrie de fluorescence. Biologie animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT : 2007CLF21805 . tel-00718591

HAL Id: tel-00718591

<https://theses.hal.science/tel-00718591>

Submitted on 17 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N ° D'ORDRE : D.U. 1805

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL - U.F.R. SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES - N ° : 552

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Blaise Pascal

DISCIPLINE : PHYSIQUE

par **Claire LUC**

Etude de la structure des tissus musculaires par polarimétrie de fluorescence

Directeur de thèse : J. Culioli

Soutenue publiquement le 14 Décembre 2007 devant la commission d'examen composée de

<i>Président :</i>	J. Leymarie	Professeur - Université Blaise Pascal
<i>Rapporteurs :</i>	J.-C Brochon	Directeur de recherche - ENS Cachan
	A. Kohler	Directeur de recherche - Matforsk AS Norvège
<i>Examineurs :</i>	S. Clerjon	Ingénieur de recherche - INRA Theix
	J. Culioli	Directeur de recherche - INRA Theix
	C. Genot	Directrice de recherche - INRA Nantes

Unité Qualité des Produits Animaux

INRA, Centre de Clermont-Fd / Theix - 63122 Saint Genès Champanelle

N ° D'ORDRE : D.U. 1805

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL - U.F.R. SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES - N ° : 552

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Blaise Pascal

DISCIPLINE : PHYSIQUE

par **Claire LUC**

Etude de la structure des tissus musculaires par polarimétrie de fluorescence

Directeur de thèse : J. Culioli

Soutenue publiquement le 14 Décembre 2007 devant la commission d'examen composée de

<i>Président :</i>	J. Leymarie	Professeur - Université Blaise Pascal
<i>Rapporteurs :</i>	J.-C Brochon	Directeur de recherche - ENS Cachan
	A. Kohler	Directeur de recherche - Matforsk AS Norvège
<i>Examineurs :</i>	S. Clerjon	Ingénieur de recherche - INRA Theix
	J. Culioli	Directeur de recherche - INRA Theix
	C. Genot	Directrice de recherche - INRA Nantes

Unité Qualité des Produits Animaux

INRA, Centre de Clermont-Fd / Theix - 63122 Saint Genès Champanelle

Remerciements

J'écris avec plaisir et sincérité ces quelques lignes qui me permettront de remercier je l'espère les personnes qui ont contribué de près ou de loin, scientifiquement et humainement, à la réalisation de ce travail et qui m'ont entourée tout au long de ces trois années.

Je souhaite remercier Joseph Culioli pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour son esprit critique et ses compétences scientifiques. Je remercie Messieurs Jean-Claude Brochon et Achim Kohler pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi que Claude Genot et Joel Leymarie pour avoir bien voulu faire partie du jury.

Je tiens ensuite à remercier Sylvie Clerjon, sans qui ce travail n'aurait pu être effectué. Je lui suis infiniment reconnaissante pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié ce sujet de recherche, et pour son encadrement, sa compétence et sa disponibilité à mon égard...et la patience également dont je suppose qu'elle a dû faire preuve !

J'adresse également tous mes remerciements à Jacques Lepetit, qui m'a accueillie au sein de son équipe et m'a initiée à la biologie. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité et sa patience pour répondre à mes questions sur la biologie du muscle, et aussi sur le traitement statistique des données.

Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans la présence à mes côtés de Frédéric Peyrin. Je le remercie pour sa disponibilité, sa compétence dans les domaines de l'instrumentation optique et de l'analyse d'image entre autres, sa positive attitude, son écoute et pour sa maîtrise de soi face à une thésarde parfois têtue !

Merci également à Bernard Dominguez et Raphael Favier qui m'ont intégrée sans condition dans l'équipe Biophysique et ont toujours répondu présent à mes appels à l'aide dans le laboratoire. Je les remercie aussi tout particulièrement pour les bonnes choses qu'ils ont souvent apportées à déguster.

J'exprime également ma reconnaissance à Jean-Louis Damez, pour ses conseils avisés et sa pertinence scientifique dans les moments de doute au cours de ce travail.

Merci infiniment à David Cormier et Frédéric Mercier pour leur aide précieuse, leur compétence et leur rapidité dans la prise en charge de tous les éléments de micromécanique et de régulation thermique. Un merci tout particulier à David pour sa gentillesse dans les dépannages informatiques et ses conseils sur l'entretien des plantes vertes.

Je remercie très sincèrement les membres extérieurs de mon comité de thèse : Inès Birlouez-Aragon, Valérie Kaftandjian, Joel Leymarie et Gilles Peix pour le temps qu'ils m'ont accordé dans leur emploi du temps sans aucun doute chargé et pour leurs avis pertinents qui ont mené le fil de cette thèse.

Je tiens à remercier Said Abouelkaram, Ludivine Chanier, Erwan Engel, Philippe Gatellier, Roland Labas, Benoist Lehallier, Ahmed Ouali et Thierry Said qui m'ont ponctuellement aidée au cours de ces trois ans, en m'accordant de leur temps pour répondre à des questions de leur domaine de compétence et/ou me faire bénéficier des installations de leurs équipes. Je n'oublie pas de remercier également Jean Marie Bonny pour m'avoir intégrée dans son équipe et permis de terminer ce travail dans de bonnes conditions.

J'exprime, par ailleurs, tous mes remerciements à Christian Laurière et Maria Bachmann pour la très agréable et utile parenthèse que constitue l'exercice du NCT.

J'ai voudrais remercier toute l'équipe du CNDRI de l'INSA de Lyon qui m'avait accueillie avec tant de chaleur durant mon stage de DEA : je n'oublierai jamais votre bonne humeur, vos encouragements pour poursuivre vers une thèse, vos conseils et votre amitié

et enfin les petites excentricités, telles la choucroute à 9 heures du matin et le poisson pendu au plafond le 1er avril, qui font de ce laboratoire un endroit si vivant et si unique.

J'exprime toute ma sympathie à l'ensemble des thésards, stagiaires et personnes que j'ai cotoyés quotidiennement et avec qui j'ai lié amitié, en particulier durant les pauses café. Un grand merci à mes "cousins" thésards, dont la présence a été d'un réel soutien : Jeff, merci d'avoir ri à mes blagues qui font pitié et d'avoir été un bon public à mes histoires souvent sans intérêt ; Guilhem, merci d'avoir marché à mes taquineries quotidiennes ! ; Steph, merci d'avoir été ma binome en conseil de gestion et d'avoir écouté avec patience mes ralleries. J'ai également une pensée pour les stagiaires que j'ai eu l'occasion de fréquenter au cours de ces trois ans : merci à mes camarades de bureau (ou presque) Solenn et Joannie dont la présence, le sourire et l'intérêt partagé pour des magazines de la plus haute intelligence ainsi que les soldes ont été d'un véritable soutien ; merci à Claire pour avoir accepté de prendre soin du chat que je lui ai gentiment mis sur le dos ; merci à PH pour m'avoir considérée comme sa grande sœur ; et merci également à Cyril, Benoist, Annabelle et Fabien pour tous les moments partagés. Je n'oublie pas de remercier les garçons qui ont eu la gentillesse de m'apprendre à jouer au tarot et la courtoisie de ne jamais me crier dessus quand je jouais mal. J'adresse une mention spéciale à Jean Michel : merci de m'avoir si bien volé mon roi de pique!...et aussi pour ton aide en informatique lors du sprint final de rédaction de ce mémoire. J'ai également une pensée pour les thésards plus "agés" que moi tels Tania, Claude, Sophie... qui forts de leur expérience m'ont volontier conseillée. Merci aussi à mes ex-collègues de l'ASICT de m'avoir accueillie dans l'association et permis de jouer un rôle avec eux. Et enfin, spéciale dédicace à mes autres compagnons de galère David et Eric avec qui j'ai été honorée de partager l'aventure "extérieure" au CUST (je ne parle pas des visionnages de Evil Dead 1,2 et 3!).

Enfin, je remercie de tout mon cœur mes parents et mon Florent. Merci à mes parents pour m'avoir toujours encouragée dans mes études et sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici. Merci à Florent pour m'avoir accompagnée avec patience et compréhension durant mes années d'études un peu longues mais qui je l'espère vaudront le coup pour notre avenir.

Table des matières

Remerciements	i
Table des figures	ix
Table des tableaux	xv
Table des notations	xvii
Introduction générale	3
1 Etude bibliographique	7
I L'émission de fluorescence	9
I.1 Introduction	9
I.2 Transitions radiatives et non radiatives dans une molécule	10
I.3 Caractéristiques de l'émission de fluorescence	13
I.4 Conclusion	15
II L'anisotropie de fluorescence	17
II.1 Photosélection des molécules en lumière polarisée	17
II.2 Définition de l'anisotropie de fluorescence	19
II.3 Relation entre l'anisotropie de fluorescence et les caractéristiques du fluo- rophore	20
II.4 Facteurs influençant l'anisotropie de fluorescence	23
II.5 Conclusion	24

III	La structure et la fluorescence intrinsèque des tissus musculaires	27
III.1	La structure des tissus musculaires squelettiques	27
III.2	Les propriétés physiques des tissus musculaires	32
III.3	La fluorescence intrinsèque des tissus musculaires	35
III.4	Les propriétés spectrales du tryptophane	40
III.5	Conclusion	43
IV	L'anisotropie de fluorescence des tissus musculaires	45
IV.1	La mesure de l'anisotropie de fluorescence appliquée à divers domaines . . .	45
IV.2	L'anisotropie optique des tissus musculaires...	49
IV.3	Conclusion	58
V	Problématique et objectifs	59
2	Dispositifs expérimentaux	63
I	Instrumentation pour la spectroscopie de fluorescence	65
I.1	Présentation du spectrofluorimètre	66
I.2	Modifications apportées au spectrofluorimètre	69
I.3	Éléments à maîtriser pour une mesure fiable	75
I.4	Protocole de mesure avec le spectrofluorimètre	89
II	Instrumentation pour la microscopie de fluorescence	91
II.1	Présentation du microscope de fluorescence	92
II.2	Ajustements pour l'utilisation du microscope de fluorescence	97
II.3	Protocole de mesure avec le microscope de fluorescence	98
3	Résultats et discussion	101
I	Modélisation de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires	103
I.1	Introduction	103
I.2	Théorie de la fluorescence des fibres musculaires	104
I.3	Discussion et conclusion	113

II Mise en évidence expérimentale de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires	117
II.1 Plan de l'expérience	117
II.2 Résultats	118
II.3 Conclusion	129
III Evolution de la structure des fibres musculaires avec la maturation	131
III.1 Plan des expériences 1 et 2	132
III.2 Résultats	133
III.3 Conclusion	144
IV Modifications de la structure des fibres musculaires en fonction de la longueur des sarcomères	145
IV.1 Plan de l'expérience	145
IV.2 Résultats	147
IV.3 Conclusion	154
V Quantification du degré de déstructuration des fibres musculaires avec le broyage	155
V.1 Intérêt de l'expérience	155
V.2 Plan de l'expérience	157
V.3 Résultats	159
V.4 Conclusion	165
VI Quantification du degré de déstructuration du tissu conjonctif avec le chauffage	167
VI.1 Plan des expériences 1 et 2	167
VI.2 Résultats	170
VI.3 Conclusion	182

Conclusion générale	185
Valorisation des compétences	191
Le nouveau chapitre de la thèse	191
1 Cadre général et enjeux de la thèse	192
2 Déroulement, gestion et coût du projet	196
3 Identification des diverses compétences mises en œuvre	203
4 Résultats, impact de la thèse et retombées notamment en termes de pistes professionnelles identifiées	207
5 Conclusion personnelle	208
Références bibliographiques	211
Liste des communications	227
Annexes	229
A Pourquoi l'intensité totale de fluorescence est égale à $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$?	231
B Cas des moments de transition d'absorption et d'émission non parallèles	233
C Modes opératoires de mesure avec le spectrofluorimètre	235
D Conditions d'acquisition du spectrofluorimètre	259
E Mode opératoire de mesure avec le microscope	261
F Analyse des moindres carrés	267
G Principe de mesure de la contrainte à 20%	271
H Programme pour l'analyse des images des broyats	273
I Analyse des broyats par la société HISTALIM	279

Table des figures

1	Schéma représentant l'expérience de Stokes	10
2	Diagramme de Jablonski simplifié des niveaux d'énergie	11
3	Représentation des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence et de phosphorescence	12
4	Représentation ondulatoire de la lumière.	17
5	Représentation des moments de transition d'absorption de la molécule d'indole	18
6	Schéma de la mesure de l'anisotropie de fluorescence	19
7	Schéma représentant une molécule et les projections résultantes de la polarisation de l'émission sur les axes	21
8	Distribution des états excités pour un fluorophore immobile	21
9	Organisation du muscle squelettique.	28
10	Striations transverses d'une fibre musculaire	29
11	Photo en microscopie électronique d'une coupe longitudinale de fibres musculaires	29
12	Image d'un sarcomère avec diagramme schématique montrant les princi- paux éléments de structure	29
13	Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans l'épimysium	31
14	Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans un faisceau de périnysium isolé.	31
15	Diagramme schématique du périnysium	31
16	Schémas des principes des fluorescences à angle droit et frontale.	36

17	Spectre d'excitation corrigé et spectre d'excitation de polarisation de l'indole dans le propylène glycol à -58°C	41
18	Extrait de la publication de Valeur et Weber montrant la résolution du spectre d'excitation de l'indole	42
19	Intensité de fluorescence de films polymères en fonction de leur angle γ par rapport à un axe de référence	48
20	Anisotropie de fluorescence pour des tissus cancéreux et sains, en fonction de l'épaisseur de tissu	48
21	Montage pour la mesure de la polarisation de fluorescence	49
22	Spectres de transmittance et de réflectance en lumière polarisée d'échantillons de viande de dinde avec différentes conditions de mesure	51
23	Intensité de la lumière diffusée en fonction du temps <i>post mortem</i> et de la longueur d'onde, avec différentes conditions de mesure	51
24	Signaux de réflectance normalisés de la peau humaine en fonction de la direction considérée par rapport au tissu	53
25	Comparaison de différentes méthodes polarimétriques appliquées au tendon d'Achille humain	55
26	Distributions normalisées de l'intensité de la génération de seconde harmonique en fonction de l'orientation de la polarisation à l'orientation de différents tissus	57
27	Images de la génération de seconde harmonique de tendons de queue de rat après traitement thermique à 58°C	58
28	Spectrofluorimètre SLM Aminco 8000C.	65
29	Schéma d'un spectrofluorimètre	66
30	Exemple de courbes d'efficacité de transmission d'un réseau pour des lumières polarisées perpendiculairement et parallèlement au plan d'incidence.	69
31	Transmission de la lumière à travers un polariseur.	70
32	Polariseur Glan-Thompson et trajets optiques de la lumière dans les prismes.	70
33	Schéma des différentes géométries de mesure de la fluorescence.	72

34	Vue éclatée de la partie mobile du porte-échantillon avec un échantillon biologique et vue assemblée de la partie statique du porte-échantillon supportant le moteur.	74
35	Vue assemblée du porte-échantillon avec les parties statique et mobile, contenant un échantillon biologique.	74
36	Schéma des différents éléments de la chaîne de mesure et des grandeurs d'influence.	76
37	Spectre d'émission avec une excitation à 270 nm.	78
38	Anisotropie de fluorescence apparente d'un échantillon de fibres musculaires en fonction de l'angle d'incidence du faisceau d'excitation sur la fenêtre du porte-échantillon.	80
39	Schéma montrant la mesure de l'anisotropie de fluorescence en mode angle droit pour des excitations verticale et horizontale.	81
40	Spectres d'émission de fluorescence frontale normalisés d'une suspension de fibres musculaires peu concentrée.	86
41	Facteur G en fonction de la longueur d'onde obtenu avec différentes solutions en fluorescence à angle-droit et frontale	88
42	Microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i.	92
43	Schéma de principe d'un microscope à épi-fluorescence.	93
44	Influence de l'ouverture numérique sur l'anisotropie de fluorescence de solutions mesurée avec le microscope, en comparaison avec les résultats du spectrofluorimètre.	98
45	Définition de la géométrie de l'expérience.	105
46	Schéma représentant le système biaxial.	107
47	Schéma représentant le système biaxial prenant en compte la distribution angulaire des fluorophores.	109
48	Distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{\parallel} et I_{\perp} et de l'anisotropie de fluorescence modélisées d'après les équations 29 et 30 en faisant varier les paramètres σ_1 , σ_2 , C_1/C_2 et β	110

49	Schéma représentant le système biaxial prenant en compte les deux moments d'absorption du tryptophane.	112
50	Distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{\parallel} et I_{\perp} et de l'anisotropie de fluorescence modélisées d'après les équations 34 et 35 en fixant les paramètres $\sigma_1=25^\circ$, $\sigma_2=25^\circ$, $C_1/C_2=1,2$ et $\beta=0^\circ$ et faisant varier le paramètre μ	114
51	Les échantillons ont été prélevés à des emplacements choisis aléatoirement du muscle <i>Semi membranosus</i>	118
52	Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour un échantillon issu de muscle <i>Semi membranosus</i>	119
53	Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour un échantillon issu de muscle broyé.	121
54	Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour trois échantillons.	125
55	Evolution <i>post mortem</i> de la contrainte maximale à 20 % de compression du muscle <i>Semi membranosus</i>	133
56	Evolution <i>post mortem</i> des différents paramètres d'ajustement C_1 , C_2 et μ des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 d'un muscle <i>Semi membranosus</i> : pour la partie rouge et pour la partie blanche du muscle.	136
57	Evolution <i>post mortem</i> de l'anisotropie de fluorescence maximale d'un muscle <i>Semi membranosus</i> pour la partie rouge et pour la partie blanche du muscle.	137
58	Comparaison des spectres d'émission de fluorescence moyens d'un muscle <i>Semi membranosus</i> pour la partie rouge et pour la partie blanche du muscle.	138
59	Evolution <i>post mortem</i> de la contrainte maximale à 20 % de compression d'un muscle <i>Triceps brachii caput longum</i>	140

60	Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour un échantillon issu de muscle <i>Triceps brachii caput longum</i>	141
61	Evolution <i>post mortem</i> des différents paramètres d'ajustement C_1 , C_2 et μ des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 d'un muscle <i>Triceps brachii caput longum</i>	143
62	Evolution <i>post mortem</i> de l'anisotropie de fluorescence maximale d'un muscle <i>Triceps brachii caput longum</i>	144
63	Exemples d'images microscopiques obtenues en transmission avec l'objectif $\times 40$ pour des fibres musculaires dont l'état est contracté, normal et étiré.	148
64	Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour un échantillon issu de muscle <i>Sternomandibularis</i>	150
65	Modification des différents paramètres d'ajustement C_1 et C_2 des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 du muscle <i>Sternomandibularis</i> en fonction du degré de contraction du muscle.	152
66	Distributions angulaires moyennes de l'anisotropie de fluorescence pour les échantillons de muscle <i>Sternomandibularis</i> contractés, normaux et étirés.	153
67	Congélation ultra-rapide des échantillons dans un bain d'isopentane refroidi par l'azote liquide.	158
68	Acquisition de douze images par balayage de la coupe.	159
69	Exemple d'image microscopique brute et traitée pour chaque type de broyat.	160
70	Surface totale moyenne des fibres musculaires intactes détectées sur les coupes pour chaque type de broyat, calculée d'après la moyenne des surfaces des fibres visibles sur les images et exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de l'image.	161
71	Distribution angulaire moyenne de l'anisotropie de fluorescence pour chaque type de broyat.	162
72	Anisotropie de fluorescence moyenne pour chaque type de broyat.	163

73	Chauffage des échantillons dans un bain d'eau à température régulée par un bain marie.	169
74	Deux exemples de distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au spectrofluorimètre avant et après chauffage à 80 ° C.	171
75	Exemples de distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de fibres isolées de tissu conjonctif obtenues au microscope avant et après 20 minutes de chauffage à 80 ° C.	171
76	Représentation des aires A_0 et A_1 utilisées pour le calcul de la circularité.	172
77	Circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C.	173
78	Anisotropie de fluorescence maximale moyenne du tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C.	175
79	Circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de fibres isolées de tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C.	176
80	Exemples d'évolution des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 70 ° C et 60 ° C.	178
81	Evolution de la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 60 ° C avec le spectrofluorimètre et avec le microscope.	179
82	Evolution de la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 70 ° C avec le spectrofluorimètre et avec le microscope.	179
83	Evolution de l'anisotropie de fluorescence maximale moyenne du tissu conjonctif obtenue au cours du chauffage à 60 ° C et à 70 ° C.	180
84	Comparaison des spectres d'émission de fluorescence moyens du tissu conjonctif intact, chauffé 60 minutes à 60 ° C et 40 minutes à 70 ° C.	181
85	Organigramme de l'Unité QuaPA.	194
86	Récapitulatif de la gestion des tâches au cours de la thèse	201

Liste des tableaux

1	Filtres utilisés pour réduire la lumière parasite lors de la mesure de la fluorescence des fibres musculaires et du tissu conjonctif	79
2	Caractéristiques des solutions utilisées pour la mesure du facteur G	85
3	Caractéristiques des quatre objectifs du microscope.	95
4	Caractéristiques des cubes filtres du microscope.	96
5	Valeur des paramètres C_1 , C_2 et μ obtenus par l'ajustement des équations 36 et 37 avec les données expérimentales de trois échantillons.	128
6	Contrainte à 20% mesurée pour les 14 échantillons de muscle <i>Semi membranousus</i> au premier jour <i>post mortem</i>	134
7	Caractéristiques principales des divers types de fibres musculaires.	137
8	Longueurs moyennes des sarcomères des parties contractée, normale et étirée des deux muscles <i>Sternomandibularis</i>	149
9	Taille des fibres musculaires intactes détectées sur les coupes pour chaque type de broyat.	161
10	Evaluation du coût du projet	202

Table des notations

Symboles grecs

β	Angle entre les moments de transition d'excitation et d'émission d'un fluorophore	<i>rad</i>
γ	Angle entre l'axe principal d'un échantillon et la direction de la polarisation de la lumière excitatrice	<i>rad</i>
ϵ	Nombre de photons absorbés	
η	Viscosité d'un milieu	<i>P</i>
θ, θ_E	Angle entre le moment de transition d'émission d'un fluorophore et l'axe vertical	<i>rad</i>
θ_A	Angle entre le moment de transition d'absorption d'un fluorophore et l'axe vertical	<i>rad</i>
λ	Longueur d'onde	<i>m</i>
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission de fluorescence	<i>m</i>
λ_{exc}	Longueur d'onde d'excitation de fluorescence	<i>m</i>
λ_R	Longueur d'onde du pic Raman	<i>m</i>
μ	Contribution relative du moment de transition 1L_b par rapport au moment de transition 1L_a du tryptophane	
\bar{v}	Volume spécifique d'une molécule	<i>m³.kg⁻¹</i>
ν_A	Fréquence de la lumière absorbée	<i>Hz</i>
ν_F	Fréquence de la lumière émise par fluorescence	<i>Hz</i>
ν_P	Fréquence de la lumière émise par phosphorescence	<i>Hz</i>
σ_i	Largeur à mi-hauteur de la distribution P_i	
τ	Durée de vie de l'état excité d'une molécule	<i>s</i>

τ_c	Temps de corrélation de rotation d'une molécule	<i>s</i>
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence	
χ^2	Somme quadratique pondérée des résidus dans la méthode des moindres carrés	
ψ	Angle entre le moment de transition d'émission d'un fluorophore et l'axe d'observation	<i>rad</i>
Θ	Angle entre les plans (Oz, M_a) et (Oz, M_e) , Oz définissant l'axe vertical du système	<i>rad</i>

Symboles latins

A	Axe optique d'un cristal	
$A(\lambda_{exc})$	Absorbance à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}	
\vec{A}	Axe de l'analyseur	
c	Vitesse de la lumière dans le vide	<i>m.s⁻¹</i>
C_1	Facteur proportionnel à la concentration des fluorophores le long du vecteur \vec{m}_1	
C_2	Facteur proportionnel à la concentration des fluorophores le long du vecteur \vec{m}_2	
\vec{E}	Champ électrique d'une onde électromagnétique	
$F(\lambda_{em})$	Spectre d'émission de fluorescence	
\vec{H}	Champ magnétique d'une onde électromagnétique	
I_0	Intensité de la lumière source	
I_F	Intensité de fluorescence stationnaire	
I_{HH}	Intensité de fluorescence brute avec polariseur horizontal et analyseur horizontal	
I_{HV}	Intensité de fluorescence brute avec polariseur horizontal et analyseur vertical	
I_{VH}	Intensité de fluorescence brute avec polariseur vertical et analyseur horizontal	

I_{VV}	Intensité de fluorescence brute avec polariseur vertical et analyseur vertical	
I_{\parallel}	Intensité de fluorescence avec polariseur et analyseur parallèles	
I_{\perp}	Intensité de fluorescence avec polariseur et analyseur croisés	
j	Nombre entier	
k, K	Facteur de proportionnalité	
k_r	Constante de vitesse de la désexcitation radiative	s^{-1}
k_{nr}	Constante de vitesse globale de la désexcitation non radiative	s^{-1}
f_a	Fraction de l'état excité 1L_a	
f_b	Fraction de l'état excité 1L_b	
f_i	Fraction de l'élément i	
$f(\theta) d\theta$	Distribution angulaire des molécules excitées	
G	Facteur de correction instrumentale du spectrofluorimètre	
h	Constante de Planck	$J.s$
H	Degré d'hydratation	
1L_a	Premier état vibrationnel singlet	
1L_b	Deuxième état vibrationnel singlet	
M	Masse moléculaire	$kg.mol^{-1}$
\vec{M}_a	Moment de transition en absorption du fluorophore	
\vec{M}_e	Moment de transition en émission du fluorophore	
\vec{m}_1	Direction orientée longitudinalement à l'axe principal des fibres de l'échantillon	
\vec{m}_2	Direction orientée transversalement à l'axe principal des fibres de l'échantillon	
P	Taux de polarisation de la fluorescence	
P_1	Probabilité angulaire de la distribution des fluorophores autour de la direction \vec{m}_1	
P_2	Probabilité angulaire de la distribution des fluorophores autour de la direction \vec{m}_2	
\vec{P}	Axe du polariseur	

R	Constante universelle des gaz parfaits	$J.K^{-1}.mol^{-1}$
r	Anisotropie de fluorescence	
r_0	Anisotropie de fluorescence fondamentale	
r_{0a}	Anisotropie de fluorescence de l'état excité 1L_a	
r_{0b}	Anisotropie de fluorescence de l'état excité 1L_b	
$s(x)$	Ecart-type statistique sur la grandeur x	
$s_l(x)$	Estimateur de l'écart-type intermédiaire de fidélité sur la grandeur x	
$s(\bar{x})$	Ecart-type statistique sur la valeur moyenne de x	
S_H	Sensibilité de la voie d'émission du spectrofluorimètre pour les composantes de la lumière de polarisation horizontale	
S_V	Sensibilité de la voie d'émission du spectrofluorimètre pour les composantes de la lumière de polarisation verticale	
S_0	Etat vibrationnel fondamental	
S_1	Premier état vibrationnel singlet	
S_2	Deuxième état vibrationnel singlet	
T	Température	K
T_1	Premier état vibrationnel triplet	
$u(x)$	Incertitude de mesure statistique sur la grandeur x	
V	Volume hydrodynamique d'une molécule	$m^3.kg^{-1}$

Abbréviations

ATP	Adénosine Triphosphate
BPM	Biochimie et Protéines du Muscle
CCD	Dispositif à transfert de charges (de l'anglais Charged Coupled Device)
CEPIA	Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture
FPIA	Dosage immunologique par polarisation de fluorescence (de l'anglais Fluorescence Polarisation ImmunoAssay)
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran

INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
NA	Ouverture numérique (de l'anglais Numerical Aperture)
NADH	Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ND	Non Déterminé
pH	Potentiel hydrogène
QuaPA	Qualité des Produits Animaux
SHG	Génération de seconde harmonique (de l'anglais Second Harmonic Generation)
TPEAF	Fluorescence avec excitation à deux photons (de l'anglais Two-Photon Excitation AutoFluorescence)
TPM	Tube PhotoMultiplificateur

Introduction générale

La lumière constitue un moyen privilégié de caractérisation de la matière. Elle permet de sonder un milieu de façon non invasive en exploitant ses propriétés optiques : absorption, réfraction, diffusion et fluorescence. Des techniques intégrant les technologies optiques sont ainsi élaborées pour des domaines très variés. Elles permettent, à partir de la réponse spectrale d'un milieu à une excitation lumineuse, de déterminer certaines de ses caractéristiques physiques telles que sa composition, sa turbidité, etc.

Les propriétés optiques des milieux ne sont pas toujours isotropes, c'est-à-dire qu'elles varient selon la direction considérée, et il est souvent très enrichissant de caractériser ainsi l'anisotropie des propriétés optiques. Dans ce cadre, la lumière polarisée présente un intérêt puisqu'elle permet d'accroître le nombre d'informations concernant le milieu étudié. En effet, l'intérêt de la polarisation de la lumière est de fournir un élément physique supplémentaire, la direction, aux autres propriétés physiques que sont l'intensité et la longueur d'onde. La mesure de la réponse polarimétrique d'un milieu constitue alors un outil puissant pour caractériser son organisation. Cette application trouve un intérêt plus particulier dans l'étude des systèmes complexes, tels que les assemblages de molécules orientées constitués par un grand nombre de milieux solides : cristaux, membranes, polymères, etc.

La biologie et le biomédical sont des domaines qui utilisent de plus en plus les techniques mettant en œuvre l'interaction de la lumière avec les milieux biologiques complexes. Les méthodes utilisant la fluorescence sont en particulier largement répandues, que ce soit à l'échelle de la cellule ou à l'échelle des tissus. La fluorescence autorise en effet la caractérisation des tissus biologiques de façon sélective, en identifiant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des molécules concernées. L'utilisation de la lumière polarisée permet en outre de préciser l'organisation de ces tissus.

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire propose d'étudier l'anisotropie des propriétés de fluorescence des tissus musculaires, en relation avec leur organisation structurale. Ce projet s'inscrit dans le contexte des programmes scientifiques du département CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture) de l'Institut

National de la Recherche Agronomique (INRA), et plus particulièrement de son unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) du Centre de Clermont-Fd / Theix, dont la maîtrise des caractéristiques qualitatives de la viande constitue un des principaux thèmes de recherche. Les caractéristiques qualitatives de la viande, principalement la tendreté, sont sous la dépendance directe des propriétés structurales du tissu musculaire et de leur évolution lors de la transformation du muscle en viande. Il est donc primordial pour la filière "viandes et produits carnés", afin de contrôler et améliorer ses productions, de connaître leur déterminisme structural.

Les tissus musculaires possèdent une structure très complexe organisée en plusieurs niveaux d'échelle allant du moléculaire au niveau macroscopique. Ces différents niveaux sont directement liés à la fonction physiologique des muscles de génération et de transmission de forces. Leur organisation confère aux tissus musculaires une anisotropie de leurs propriétés physiques qu'elles soient de nature mécanique, électromagnétique ou thermique. Concrètement, les variations de cette anisotropie traduisent alors l'évolution des structures des tissus qui intervient soit au cours du développement des organismes soit lors des transformations que subissent ces tissus dans les processus qui conduisent à l'élaboration des aliments. La connaissance des propriétés physiques des tissus musculaires présente ainsi un intérêt pour mieux comprendre leur organisation structurale et en mesurer les évolutions dues aux différentes transformations *post mortem* comme la maturation et la cuisson.

Le développement, dans le domaine de l'optique, de nouvelles techniques d'évaluation des propriétés structurales des milieux organisés, par exemple dans le secteur des recherches biomédicales, ouvre la voie vers ces méthodes de mesure innovantes, basées entre autres sur la spectroscopie de fluorescence. En s'appuyant sur ces travaux, l'objectif de cette thèse est de mettre au point et d'appliquer une méthode basée sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence des tissus musculaire résolue angulairement afin de mieux comprendre l'évolution de leur organisation structurale *post mortem* et de tracer des pistes en vue de l'élaboration de capteurs non destructifs de la qualité des aliments.

Ce document est divisé en 3 parties distinctes :

La première partie consiste en une revue bibliographique présentant dans un premier temps les principes physiques à la base de la fluorescence et de son anisotropie. Dans un deuxième temps est présentée la structure des tissus musculaires, leurs caractéristiques physiques en relation avec la tendreté de la viande et leurs propriétés de fluorescence. Dans un troisième temps est réalisée une revue des techniques de mesure de l'anisotropie des propriétés optiques de matériaux dédiées à divers domaines de recherche, mais qui se veut non exhaustive étant donné l'étendue des travaux menés de façon connexe sur ce sujet.

La deuxième partie détaille les dispositifs expérimentaux en partie développés et utilisés au cours de ce travail, à savoir un spectrofluorimètre conventionnel et un microscope de fluorescence. Une attention particulière est accordée à l'explication des conditions et des limites d'utilisation de ces instruments et à la description des modifications et mises au point effectuées afin d'adapter ces instruments pour le type de mesures nécessaire à ce travail.

Enfin, la troisième partie expose les résultats théoriques et expérimentaux obtenus. A travers plusieurs plans d'expérience ayant trait aux évolutions *post mortem* subies par les tissus musculaires (maturation, contraction au froid et broyage pour les fibres musculaires, ainsi que chauffage pour les tissus conjonctifs), la sensibilité de la mesure de l'anisotropie de fluorescence aux transformations structurales reliées à ces modifications est rapportée.

La conclusion présente le potentiel d'application de la polarimétrie de fluorescence pour la caractérisation des produits carnés, mais présente également son caractère générique qui lui permettrait de s'appliquer aussi à d'autres aliments et produits issus de l'agriculture. Elle identifie ainsi les champs de recherche à explorer pour progresser dans le domaine de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques.

Première partie

Etude bibliographique

Chapitre I

L'émission de fluorescence

I.1 Introduction

Avant d'expliquer le phénomène de fluorescence en s'appuyant sur l'expérience que réalisa en 1852 Georges Stokes, qui fut le premier à introduire le terme de *fluorescence*, il convient de faire un bref historique de sa découverte à travers les travaux des différents chercheurs qui y ont contribué.

L'observation de la fluorescence a été rapportée pour la première fois par le physicien et botaniste espagnol Nicolas Monardes en 1565 qui constata qu'une infusion de copeaux de bois d'un arbre mexicain émettait une lumière bleuâtre. En 1640, l'alchimiste Licetus publia l'observation suivante à propos de pierres de "phosphore de Bologne", premier matériau luminescent synthétisé : "...convenablement calcinées, et illuminées soit par les rayons du soleil, soit par l'éclat d'une flamme, elles conçoivent de par elles-mêmes une lumière sans chaleur...". C'est la première fois que fut décrite une émission de lumière qui n'était pas d'origine thermique. Au cours du 19^e siècle, Robert Boyle, David Brewster et Edmond Becquerel observèrent également ces phénomènes d'émission. En 1845, John Herschel examina la lumière émise par une solution de sulfate de quinine qui reste encore aujourd'hui l'un des exemples les plus utilisés et les plus beaux de fluorescence. De nombreuses découvertes importantes furent également faites durant la première moitié du 20^e siècle dont on ne citera ici que quelques investigateurs : Francis Perrin, Alexander Jablonski, Theodor Förster, Gregorio Weber et Weigert parmi d'autres. [49], [118] et [119]

Revenons maintenant à l'expérience fondamentale réalisée par Stokes et illustrée par la figure 1. Stokes éclaira une solution de quinine avec la lumière du soleil filtrée à travers un vitrail d'église de couleur bleue. Ce filtre élémentaire laissant passer principalement la lumière de longueur d'onde inférieure à 400 nm, la solution de quinine absorba ainsi de la lumière du domaine de l'Ultra-Violet. Il regarda alors la solution à travers un verre de vin jaune, ce dernier ne transmettant que les longueurs d'onde supérieures à 400 nm, et ne laissant ainsi pas la lumière excitatrice arriver jusqu'à l'œil. Il observa alors qu'une lumière bleuâtre était émise et prouva ainsi que cette émission avait pour origine l'absorption des radiations Ultra-Violettes. [49], [62], [118], [119].

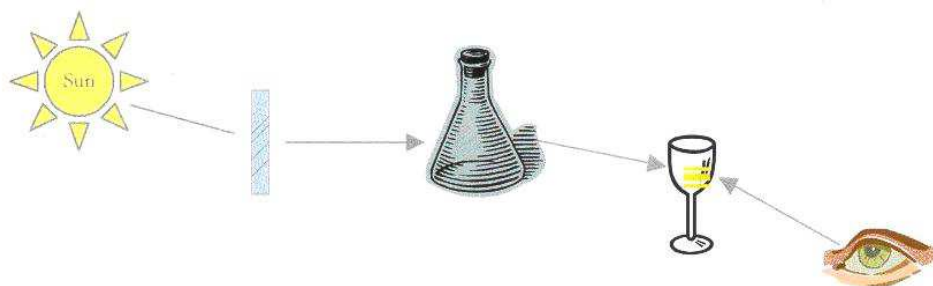


FIG. 1 : Schéma représentant l'expérience de Stokes ([62]).

Une molécule fluorescente se définit ainsi de façon générale comme une molécule qui absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée et émet ensuite, après un laps de temps (de l'ordre de la nanoseconde), une lumière à une longueur d'onde plus grande. [19].

I.2 Transitions radiatives et non radiatives dans une molécule

Les phénomènes d'absorption et d'émission peuvent être expliqués en s'appuyant sur le diagramme de Jablonski (figure 2). Les états électroniques singulets fondamentaux, premier et deuxième sont respectivement notés S_0 , S_1 et S_2 . À chacun de ces états d'énergie électroniques sont associés des niveaux d'énergie notés 0,1,2, etc. La molécule peut absorber un photon dont l'énergie est égale à la différence d'énergie entre l'état fondamental et les états excités. Cette énergie est notée $h\nu_A$, où h est la constante de Planck (6.62×10^{-34} J.s) et ν_A est la fréquence de la lumière absorbée. Le processus d'absorption est sur ce dia-

gramme représenté par des flèches verticales partant du niveau 0 de l'état fondamental¹ vers un état d'énergie excité. Il est important de préciser que ce processus d'absorption a lieu en un temps très rapide (de l'ordre de 10^{-15} s) par rapport aux autres processus, ne permettant pas un déplacement significatif du noyau durant cet intervalle (principe de Franck-Condon). On peut remarquer également qu'à température ambiante, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour provoquer cette transition. [19], [49], [62], [118] et [119]

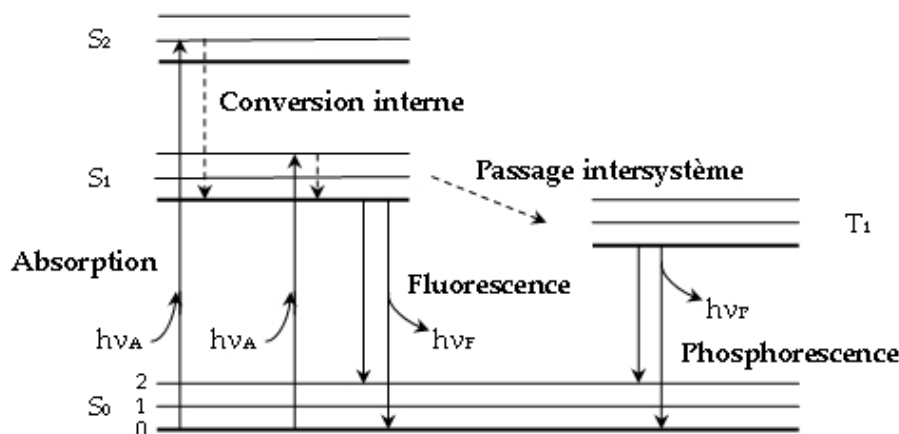


FIG. 2 : Diagramme de Jablonski simplifié des niveaux d'énergie (d'après [62]).

L'absorption de la lumière est suivie d'un processus de désexcitation.

La conversion interne est une transition non radiative permettant à la molécule, généralement excitée dans un niveau élevé de S_1 ou S_2 , de se relaxer vers le niveau le plus bas de S_1 dans un temps de l'ordre de 10^{-12} s. Puis, indépendamment du niveau d'énergie atteint initialement après excitation, la relaxation accompagnée de l'émission de photons appelée fluorescence aura alors lieu la plupart du temps depuis le niveau le plus bas du premier état excité (S_1) vers l'état fondamental (S_0). En conséquence, les caractéristiques de l'émission de fluorescence, à l'exception de la polarisation, ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation. Une autre conséquence illustrée par la figure 3 est que le spectre d'émission de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus grandes (correspondant à des énergies plus basses) que le spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie due à la relaxation vibrationnelle dans l'état excité. Cet écart entre les deux spectres est

¹D'après la loi de Boltzmann, à température ambiante, la plupart des molécules sont dans ce niveau

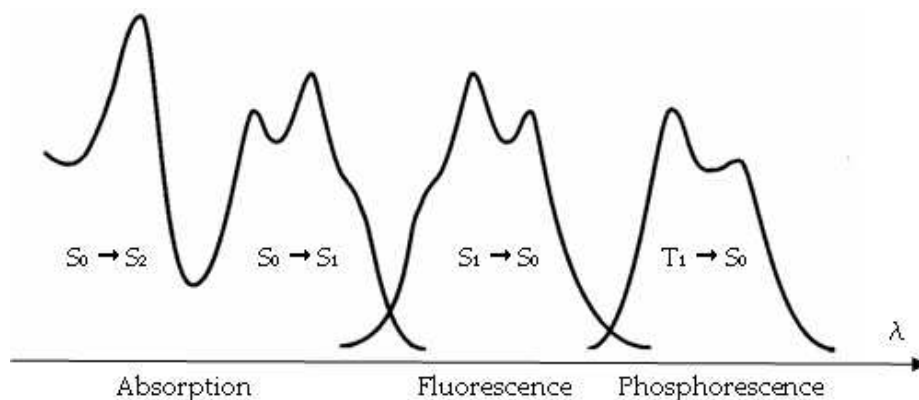


FIG. 3 : Représentation des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence et de phosphorescence (d'après [118]).

connu sous le nom de déplacement de Stokes. On peut souligner que l'émission d'un photon de fluorescence est un processus aussi rapide que l'absorption d'un photon (environ 10^{-15} s). Toutefois, avant d'émettre un photon, la molécule reste pendant un certain temps dans l'état excité S_1 qui est appelé durée de vie. Typiquement, ce temps peut varier de quelques centièmes à quelques centaines de nanosecondes selon la molécule. Cette durée de vie moyenne de l'état excité est directement responsable de la décroissance progressive de l'intensité de fluorescence caractéristique de la molécule après une brève excitation. La cinétique de décroissance de l'intensité de fluorescence est généralement exponentielle mais il existe des cinétiques plus complexes. [19], [49], [62], [118] et [119]

La figure 2 montre également une autre voie de désexcitation possible depuis l'état S_1 qui est le passage intersystème. Ce dernier est une transition non radiative qui permet à la molécule de passer dans le niveau de même énergie du premier état triplet (T_1). Après relaxation vibrationnelle la désexcitation radiative de l'état T_1 vers l'état S_0 , appelée phosphorescence, est alors possible. La durée de vie de l'état triplet pouvant être longue, la phosphorescence peut avoir lieu à des échelles de temps plus longues que la fluorescence allant jusqu'à la minute et plus. [19], [49], [62], [118] et [119]

Il existe d'autres modes de transferts qui ne sont pas représentés sur la figure 2 comme les transferts d'énergie intermoléculaires.

I.3 Caractéristiques de l'émission de fluorescence

L'émission de fluorescence, dont le processus a été expliqué à l'aide du diagramme de Jablonski, est porteuse d'une information exprimée par différents paramètres caractéristiques : le rendement quantique, les spectres d'excitation et d'émission, la durée de vie de l'état excité et la polarisation. Les 3 premiers paramètres sont présentés de façon générale et non exhaustive tandis que le dernier, décrit en terme d'anisotropie, est présenté de manière détaillée dans le chapitre suivant étant donné son importance vis à vis du sujet de cette thèse.

I.3.1 Durée de vie et rendement quantique

La durée de vie et le rendement quantique de fluorescence sont deux caractéristiques importantes d'un fluorophore. Ce paragraphe a pour objet de définir succinctement ces paramètres.

La durée de vie de l'état excité se définit comme le temps moyen durant lequel la molécule reste à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Si l'on définit k_r , la constante de vitesse pour la désexcitation radiative vers S_0 avec émission de fluorescence et k_{nr} , la constante de vitesse globale de désexcitation non radiative vers S_0 prenant en compte la conversion interne et le passage intersystème, la durée de vie de l'état excité τ s'écrit :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

Cette durée de vie n'est qu'une valeur moyenne du temps durant lequel la molécule reste à l'état excité. En réalité, l'émission de fluorescence est un procédé aléatoire et seules quelques molécules émettent un photon de fluorescence après ce temps. Par définition, si la désexcitation décroît selon une loi exponentielle simple, 63% des molécules auront effectué cette transition avant ce temps. [19], [45], [62], [118] et [119]

Le rendement quantique de fluorescence, noté Φ_F , est la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence. En d'autres termes, il représente le rapport du nombre de photons émis et du nombre de photons

absorbés et peut s'écrire à l'aide des constantes de vitesse :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

Par exemple, pour une solution de tryptophane à 25 ° C (pH 7,2), le rendement quantique est de $0,14 \pm 0,02$. Le rendement quantique permet ainsi d'exprimer l'intensité de fluorescence stationnaire I_F , qui est le nombre de photons émis par unité de temps et de volume, donnée par :

$$I_F \propto \epsilon I_0 \Phi_F \quad (3)$$

ϵ représentant le nombre de photons absorbés. L'intensité de fluorescence est donc directement proportionnelle à la concentration de fluorophores, excepté dans le cas de solutions dont l'absorbance est supérieure à 0,05 pour lesquelles cette relation n'est plus linéaire. [19], [45], [62], [118] et [119]

Il est utile de remarquer que le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie de l'état excité peuvent être influencés par des processus non radiatifs. En effet, si au moment de la désexcitation le fluorophore entre en collision avec une molécule du solvant et transfère son énergie à une autre molécule acceptrice ou entre en interaction avec un inhibiteur, il n'y a alors pas d'émission de photon de fluorescence. Ces collisions sont d'autant plus efficaces lorsque la température est élevée, ce qui favorise l'agitation thermique. L'intensité de fluorescence est ainsi généralement plus élevée à relativement basse température. C'est pourquoi la mesure de l'intensité de fluorescence est sensible aux variations de température et qu'elle doit donc être généralement effectuée dans des conditions de température contrôlées. [19], [45], [62], [118] et [119]

I.3.2 Spectres d'excitation et d'émission

Jusqu'ici, tous les photons émis quelle que soit leur énergie ont été considérés. Les spectres d'excitation et d'émission, que l'on enregistre à l'aide d'un spectrofluorimètre, permettent de prendre en considération leur distribution en énergie [118] et [119].

Le spectre d'émission de fluorescence représente les variations de l'intensité de fluorescence avec la longueur d'onde d'émission λ_{em} , pour une longueur d'onde d'excitation λ_{exc}

donnée. Ce spectre d'émission, noté $F(\lambda_{em})$ est lié au rendement quantique de fluorescence par la relation :

$$\int_0^{\infty} F(\lambda_{em}) d\lambda_{em} = \Phi_F \quad (4)$$

Dans l'équation 3, l'intensité de fluorescence stationnaire I_F est exprimée en fonction du nombre de photons absorbés. Il est maintenant plus commode de l'écrire en fonction de l'intensité absorbée I_A :

$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = k F(\lambda_{em}) I_A(\lambda_{exc}) \quad (5)$$

L'intensité absorbée I_A pouvant être exprimée d'après la loi de Beer-Lambert, cette expression peut prendre la forme :

$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = 2,3 k F(\lambda_{em}) I_0(\lambda_{exc}) A(\lambda_{exc}) \quad (6)$$

$A(\lambda_{exc})$ représentant l'absorbance à la longueur d'onde λ_{exc} et k étant un facteur de proportionnalité qui dépend de paramètres instrumentaux. Il est important de noter que la valeur numérique de l'intensité de fluorescence I_F est par conséquent donnée sur une échelle arbitraire. La comparaison de spectres d'émission de fluorescence provenant d'instruments différents nécessite une normalisation. [118] et [119]

Le spectre d'excitation représente les variations de l'intensité de fluorescence avec la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} , pour une longueur d'onde d'observation λ_{em} donnée. En se reportant à l'équation 6, ces variations traduisent en fait l'évolution du produit $I_0(\lambda_{exc}) A(\lambda_{exc})$. [118] et [119]

I.4 Conclusion

L'émission de fluorescence est une voie de désexcitation possible pour une molécule. Cette transition est de type radiatif et a lieu entre deux états d'énergie différents. Elle est caractérisée notamment par son spectre d'émission qui est défini par la quantité de photons émis en fonction de la longueur d'onde.

Chapitre II

L'anisotropie de fluorescence

Lorsque la lumière d'excitation est polarisée, l'émission de fluorescence de certains échantillons est également polarisée. L'aspect quantitatif de la polarisation de l'émission est décrit en terme d'anisotropie. L'origine de ce phénomène provient de l'existence de moments de transition d'absorption et d'émission selon des directions privilégiées dans les fluorophores, ce qui permet la photosélection. [62]

II.1 Photosélection des molécules en lumière polarisée

Il est utile de rappeler à l'aide de la figure 4 que la lumière est représentée selon la théorie ondulatoire comme une onde électromagnétique constituée d'un champ électrique \vec{E} et d'un champ magnétique \vec{H} .

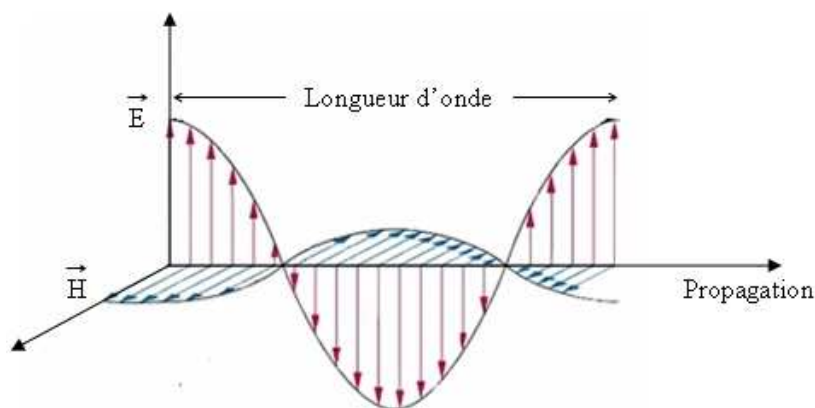


FIG. 4 : Représentation ondulatoire de la lumière.

Ces deux ondes sont perpendiculaires entre elles et se propagent de proche en proche conformément à la théorie de Maxwell. Elles se déplacent dans le vide à la vitesse c selon une direction perpendiculaire au plan qu'elles définissent. La longueur d'onde qui les caractérise est définie comme la plus petite distance séparant deux points se trouvant dans le même état vibratoire à un instant donné. Dans le cas de la lumière naturelle, ces champs n'ont pas d'orientation préférentielle tandis que pour une lumière polarisée, le champ électrique oscille dans une direction donnée. [118] et [119]

La plupart des fluorophores absorbent la lumière selon une ou plusieurs directions préférentielles dépendantes de l'état électronique appelées moments de transition d'absorption. La figure 5 montre par exemple les moments de transition d'absorption de la molécule d'indole, pour les transitions de l'état singulet fondamental S_0 vers les états excités S_1 et S_2 . En accord avec le processus de conversion interne décrit dans le paragraphe I.2, le moment de transition d'émission est en revanche le même quel que soit l'état électronique excité dans lequel a été portée la molécule, puisque la relaxation donnant lieu à l'émission d'un photon de fluorescence se fait toujours depuis le premier état excité S_1 . La conséquence de cette propriété d'absorption est que lorsqu'un échantillon est éclairé avec une lumière linéairement polarisée, ce sont les fluorophores dont les moments de transition d'absorption sont orientés le long du vecteur électrique \vec{E} de la lumière incidente qui seront préférentiellement excités. C'est ce phénomène qui est appelé photosélection. Ainsi, la distribution des fluorophores excités n'est pas orientée aléatoirement : elle est anisotrope et la fluorescence émise l'est aussi. [62], [118] et [119]

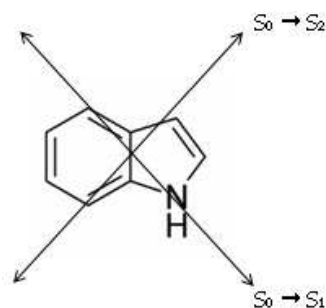


FIG. 5 : Représentation des moments de transition d'absorption de la molécule d'indole (d'après [118]).

II.2 Définition de l'anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence est une grandeur caractérisant l'état de polarisation de la fluorescence. Sa mesure est illustrée par la figure 6. Le vecteur électrique \vec{E} de la lumière incidente est orienté selon l'axe z et la fluorescence est observée le long de l'axe y . Les composantes de l'intensité de fluorescence parallèle et perpendiculaire au vecteur électrique \vec{E} , notées I_{\parallel} et I_{\perp} , sont utilisées pour calculer l'anisotropie de fluorescence r :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7)$$

La différence ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) est normalisée par l'intensité de fluorescence totale de l'échantillon ($I_{\parallel} + 2I_{\perp}$)¹. L'anisotropie r est ainsi une grandeur sans dimension indépendante de l'intensité de fluorescence totale de l'échantillon. Si l'on suppose que la lumière observée à l'émission est complètement dépolarisée, alors $I_{\parallel} = I_{\perp}$ et $r = 0$. Si au contraire la lumière observée à l'émission est complètement polarisée, alors $I_{\perp} = 0$ et $r = 1$. Le paragraphe II.3 démontre pourquoi une telle situation ne se présente jamais lorsque l'on observe la fluorescence d'un échantillon homogène et isotrope. Elle est en revanche possible dans le cas d'échantillons orientés ou si la lumière observée est en fait la lumière diffusée par une solution diluée de diffuseurs. Une autre grandeur évoquée dans la littérature est le taux de polarisation P où le dénominateur normalisant la différence des intensités est cette fois l'intensité de fluorescence dans la direction d'observation ($I_{\parallel} + I_{\perp}$). [62], [118] et [119]

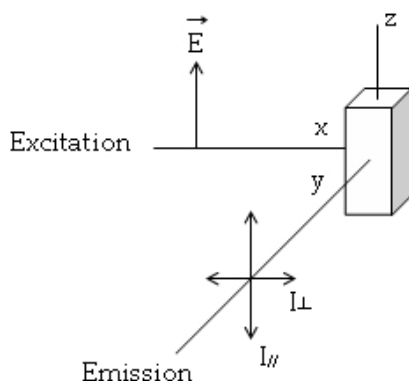


FIG. 6 : Schéma de la mesure de l'anisotropie de fluorescence (d'après [118]).

¹L'annexe A démontre pourquoi l'intensité totale est égale à $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$.

Dans le cas d'un échantillon constitué de plusieurs fluorophores, ayant chacun leur propre anisotropie d'émission r_i , alors l'anisotropie de fluorescence de l'échantillon est la somme pondérée des anisotropies individuelles :

$$r = \sum_i f_i r_i \quad (8)$$

f_i étant la fraction de l'intensité de fluorescence de chacun des fluorophores [62], [118] et [119].

II.3 Relation entre l'anisotropie de fluorescence et les caractéristiques du fluorophore

Considérons d'abord simplement, comme décrit par la figure 7 page 21, une molécule immobile orientée avec un angle θ par rapport à l'axe z et un angle ψ par rapport à l'axe y et dont les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles. L'émission de fluorescence de cette molécule est polarisée le long du moment de transition. L'intensité de la lumière vue dans l'axe d'observation y selon une direction parallèle (I_{\parallel}) ou perpendiculaire (I_{\perp}) est proportionnelle au carré de la projection du champ électrique de la lumière émise sur la direction considérée. En accord avec la figure 7, sur laquelle la lumière d'excitation arrive le long de l'axe x et est polarisée verticalement, ces projections du champ électrique de la fluorescence selon les directions parallèle et perpendiculaire à la direction de polarisation de l'excitation, dépendent respectivement de $\cos^2 \theta$ et de $\sin^2 \theta \sin^2 \psi$. [62], [118] et [119]

Considérons maintenant le cas réel d'une solution contenant des fluorophores orientés de façon aléatoire. Les intensités I_{\parallel} et I_{\perp} observées dépendent alors de l'orientation moyenne de toutes les molécules excitées par le faisceau incident décomposée sur chaque direction considérée. Elles sont proportionnelles respectivement aux valeurs moyennes $\langle \cos^2 \theta \rangle$ et $\langle \sin^2 \theta \rangle$. La dépendance par rapport à l'angle azimuthal ψ est éliminée en prenant en compte le fait que les fluorophores sont symétriquement distribués autour de l'axe z , la valeur moyenne $\langle \sin^2 \psi \rangle$ étant alors égale à $\frac{1}{2}$. L'expression finale de l'anisotropie de

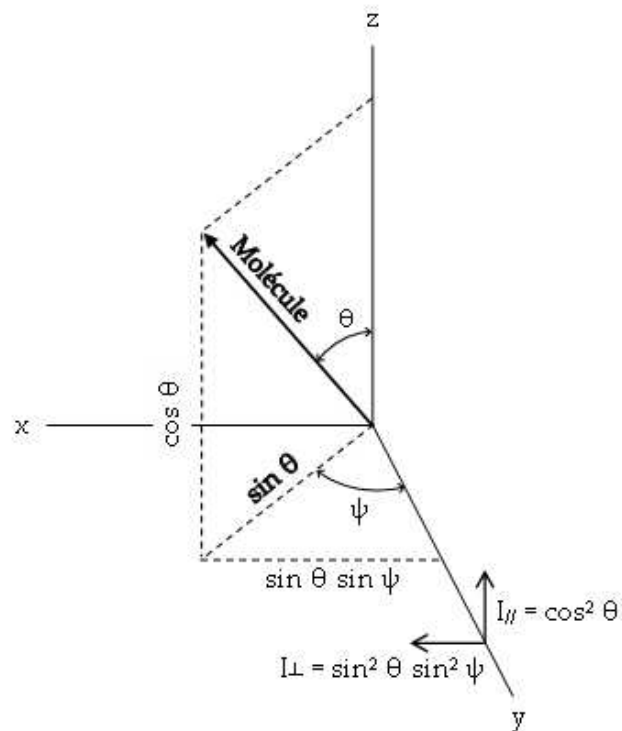


FIG. 7 : Schéma représentant une molécule et les projections résultantes de la polarisation de l'émission sur les axes (d'après [62]).

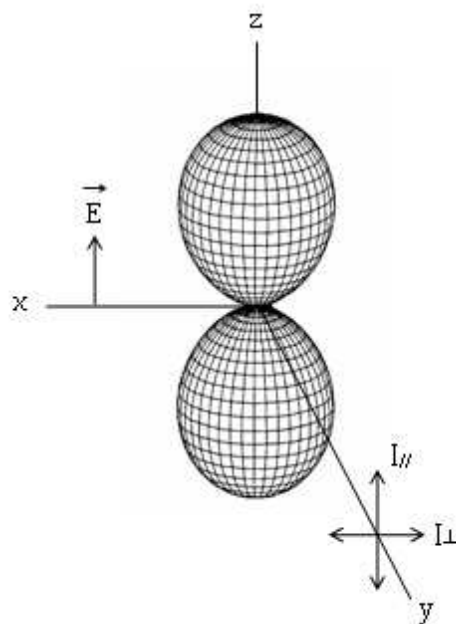


FIG. 8 : Distribution des états excités pour un fluorophore immobile (d'après [62]).

fluorescence devient :

$$r = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (9)$$

L'anisotropie de fluorescence dépend donc de la valeur moyenne de $\cos^2 \theta$, où θ est l'angle entre le moment de transition d'émission et l'axe z , jusqu'ici confondu avec le moment de transition d'absorption. Le terme r_0 utilisé ici se rapporte à l'anisotropie observée en l'absence de tout procédé de dépolarisation, tel que la rotation des molécules, appelée dans la littérature anisotropie fondamentale. [62], [118] et [119]

La valeur $\langle \cos^2 \theta \rangle$ est due au phénomène de photosélection (cf. paragraphe II.1 page 17). En effet, les molécules dont le moment de transition d'absorption est parallèle avec le vecteur électrique de l'excitation ont la plus forte probabilité d'absorption. Les autres molécules peuvent également absorber la lumière, mais avec une probabilité moindre. La probabilité d'absorption est en fait proportionnelle à $\cos^2 \theta$, où θ est l'angle du moment de transition d'absorption par rapport à l'axe z . Si l'on note $f(\theta) d\theta$ la distribution des molécules excitées, alors $\langle \cos^2 \theta \rangle$ peut s'écrire sous la forme :

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2 \theta f(\theta) d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta) d\theta} \quad (10)$$

Lorsque la répartition des molécules est aléatoire, la distribution des fluorophores excités suite à l'absorption d'une lumière polarisée verticalement est² $f(\theta) d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta d\theta$. La distribution des états excités obtenue est présentée sur la figure 8 page 21. Elle est symétriquement répartie autour de l'axe z et conduit à une valeur maximale théorique de l'anisotropie de fluorescence fondamentale $r_0 = 0,4$ sachant que dans ce cas là $\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{3}{5}$. [62], [118] et [119]

Jusqu'ici, l'angle β entre les moments de transition d'absorption et d'émission a été considéré comme nul. Toutefois, lorsque l'excitation fait passer la molécule dans un état excité supérieur au premier état excité, le moment de transition d'absorption est différent du moment de transition d'émission. L'angle β peut donc être différent de zéro

²Sachant que le nombre de molécules dont les moments de transition sont orientés entre un angle de θ et $\theta + d\theta$ est proportionnel à $\sin \theta d\theta$, quantité proportionnelle à l'élément de surface élémentaire d'une sphère entre ces mêmes angles.

pour certaines molécules et varie avec la longueur d'onde d'excitation. L'anisotropie de fluorescence s'écrit alors sous la forme³ :

$$r_0 = \frac{2}{5} \frac{3\langle \cos^2 \beta \rangle - 1}{2} \quad (11)$$

Par conséquent, la valeur théorique de l'anisotropie varie de 0,4 à -0,2, lorsque les moments de transition d'excitation et d'émission sont respectivement parallèles ($\beta = 0^\circ$), et perpendiculaires ($\beta = 90^\circ$) [62], [118] et [119].

II.4 Facteurs influençant l'anisotropie de fluorescence

Le paragraphe II.3 montre que l'existence d'un angle β entre les moments de transition en excitation et en émission conduit à une diminution de l'anisotropie de fluorescence. D'autres facteurs, qui ne seront pas présentés ici de manière exhaustive, peuvent également être la cause d'une dépolarisation de la fluorescence.

Le mouvement Brownien de rotation des fluorophores est une cause dominante de dépolarisation de la fluorescence. En effet, si les molécules excitées peuvent tourner pendant la durée de vie de l'état excité, alors l'orientation des moments de transition en émission sera modifiée, ne correspondant plus à l'orientation privilégiée des molécules excitées par la photosélection. L'importance de cette dépolarisation est fonction des mouvements moléculaires et elle apporte ainsi des informations par exemple sur la taille des molécules et la viscosité de leur environnement. L'équation de Perrin ([84]) quantifie cette dépolarisation dans le cas simple de molécules sphériques :

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (12)$$

où τ est la durée de vie de l'état excité et τ_c est le temps de corrélation de rotation. Par conséquent, si les mouvements des fluorophores sont lents par rapport à la durée de vie ($\tau_c \gg \tau$) alors l'anisotropie mesurée (r) est peu différente de l'anisotropie fondamentale (r_0). Si au contraire, les mouvements de rotation des fluorophores sont rapides vis-à-vis de la durée de vie ($\tau_c \ll \tau$) alors r tend vers zéro. Le temps de corrélation de rotation des

³Démonstration en annexe B.

fluorophores est décrit par :

$$\tau_c = \frac{\eta V}{RT} \quad (13)$$

où η est la viscosité du milieu, V le volume hydrodynamique de la molécule exprimé en $cm^3.kg^{-1}$, R la constante universelle des gaz parfaits exprimée en $erg.K^{-1}.mol^{-1}$ et T la température absolue. Dans le cas des protéines globulaires, le volume V est exprimé en fonction du volume spécifique de la protéine (\bar{v}), du degré d'hydratation (H) et de la masse moléculaire (M) par $V = M(\bar{v} + H)$. Par exemple, dans le cas d'une protéine sphérique anhydre de poids moléculaire 50 kDa, $\bar{v}=0,73$ ml/g et $\eta=0,94$ cP, le temps de corrélation de rotation calculé à 25 ° C est proche de 14 ns. [62], [118] et [119]

Les vibrations de torsion et les transferts d'énergie d'excitation à une molécule orientée différemment sont d'autres causes de dépolarisation, [62], [118] et [119].

II.5 Conclusion

L'illumination d'un échantillon avec une lumière polarisée donne lieu à la photosélection des molécules. La mesure de la polarisation de la fluorescence, caractérisée en terme d'anisotropie, permet d'obtenir une information sur la distribution angulaire des moments de transition d'émission. Il existe des causes, intrinsèques (angle entre les dipôles d'absorption et d'émission) et extrinsèques (mouvement Brownien par exemple) à la molécule, de dépolarisation de la fluorescence. Leur étude permet ainsi d'obtenir des informations sur l'environnement local des fluorophores.

La mesure de la polarisation de la fluorescence s'applique ainsi dans des domaines très variés, dont nous donnerons quelques exemples dans le chapitre IV de l'étude bibliographique. Il est important de soulever ici le fait que lorsque cette mesure est effectuée sur des échantillons d'ordre aléatoire, l'anisotropie de fluorescence permet d'obtenir uniquement des informations sur l'environnement proche des fluorophores. Pour des système organisés, la mesure de la polarisation de la fluorescence est un outil puissant qui permet également d'étudier leur fluidité et leur arrangement. Dans ce cas, elle permet de déterminer les directions des moments de transition des fluorophores, lorsque ceux-ci sont orientés. On

notera de plus que si la répartition des fluorophores est anisotrope, alors les valeurs de l'anisotropie de fluorescence peuvent être supérieures à la valeur de l'anisotropie maximale de 0,4 déterminée pour des fluorophores répartis aléatoirement (cf. paragraphe II.3, page 20). L'anisotropie de fluorescence peut ainsi atteindre en théorie une valeur de 1 lorsque les fluorophores d'un échantillon sont parfaitement orientés dans une direction.

Dans le cadre de cette thèse, notre intérêt s'est porté vers ce type d'application, puisque les tissus musculaires sont des structures ordonnées, comme le montre le chapitre suivant. La mesure de l'anisotropie de fluorescence de fluorophores intrinsèques est donc susceptible de nous apporter non seulement des informations sur l'environnement physico-chimique local des fluorophores, mais également sur leur degré d'organisation.

Chapitre III

La structure et la fluorescence intrinsèque des tissus musculaires

Le tissu musculaire assure une fonction majeure pour l'organisme : la contraction. Il est classé d'après sa structure et sa fonction selon trois catégories. On distingue ainsi les muscles dits squelettiques striés, cardiaques et lisses. L'objet de cette partie est la description de la structure des muscles de type squelettique sur lesquels ce travail de thèse a porté, puisque ce sont ceux qui sont transformés en viande.

III.1 La structure des tissus musculaires squelettiques

Les muscles squelettiques assurent le maintien et la motricité de l'organisme et sont sous le contrôle du système nerveux volontaire. Ils constituent un système ordonné (cf. figure 9, page 28) composé de fibres musculaires entourées à plusieurs niveaux de tissus conjonctifs [38], [86] et [122].

III.1.1 Les fibres musculaires

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux de fibres musculaires, qui en sont les unités cellulaires de base. Ces cellules ont la particularité d'être polynucléées et elles sont relativement longues (jusqu'à quelques centimètres) par rapport à leur diamètre (un peu moins d'un dixième de millimètre). Chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane cytoplasmique appelée sarcolemme à l'intérieur de laquelle des myofibrilles, elles même

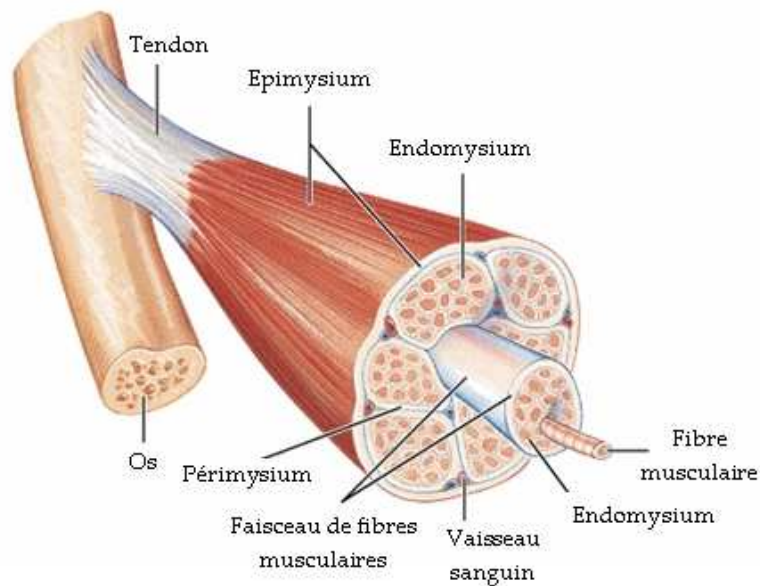


FIG. 9 : Organisation du muscle squelettique.

entourées d'un fluide appelé sarcoplasme, occupent environ 80% du volume cellulaire. Les fibres musculaires observées en microscopie optique (cf. figure 10, page 29) révèlent des striations transverses caractéristiques provenant de la structure de ces myofibrilles. [65], [86], [97], [102] et [122]

Les myofibrilles, dont le diamètre est d'environ $1 \mu\text{m}$, sont les unités fonctionnelles du muscle. Elles sont constituées de plusieurs centaines de filaments protéiques parallèles dont l'arrangement leur confère une allure striée. Cette structure organisée est composée de sarcomères (cf. figures 11 et 12, page 29), représentés par deux bandes claires appelées bandes I, entourant une bande sombre appelée bande A et délimitées par deux disques appelés disques Z. Au centre, la bande H correspond à la présence seule de filaments épais de myosine. La bande I est constituée uniquement de filaments fins d'actine accrochés aux disques Z et connectés aux filaments épais. Enfin, la bande A est formée de l'association des deux types de filaments. La ligne M correspond à une région d'association des filaments épais dans deux directions opposées. Les disques Z sont les structures qui assurent la connection des filaments fins d'actine d'un sarcomère à l'autre. A ce niveau, les filaments intermédiaires, orientés transversalement, forment un réseau autour des myofibrilles. [65], [86], [97], [102] et [122]

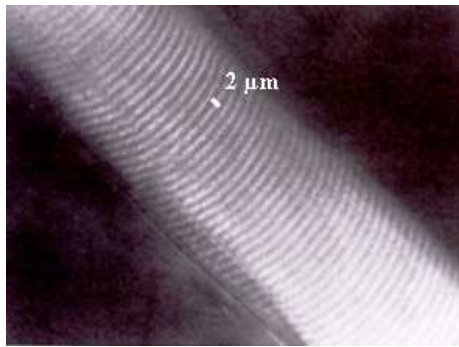


FIG. 10 : Striations transverses d'une fibre musculaire ([110]).

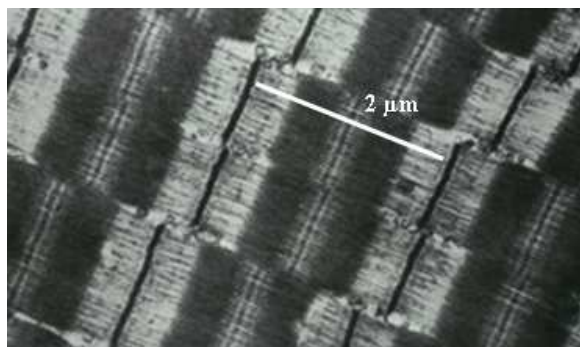


FIG. 11 : Photo en microscopie électronique d'une coupe longitudinale de fibres musculaires ([102]).

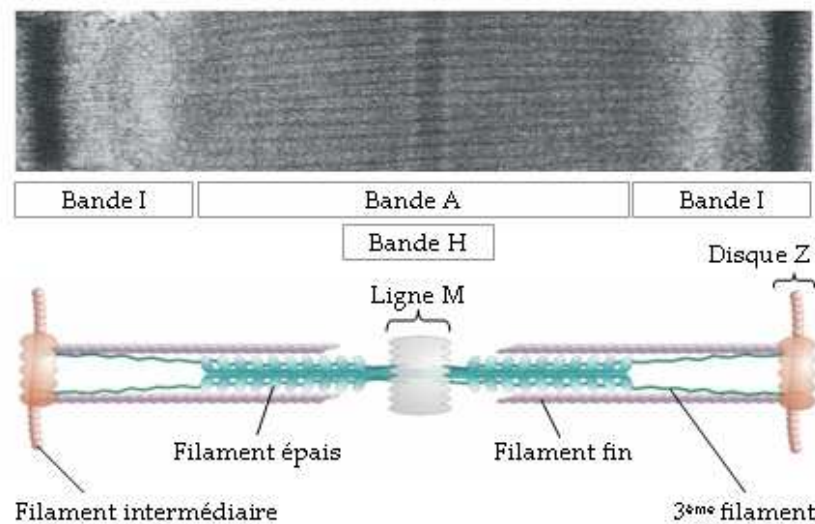


FIG. 12 : Image d'un sarcomère avec diagramme schématique montrant les principaux éléments de structure (d'après [59]).

L'actine et la myosine sont, en terme quantitatif, les principales protéines myofibrillaires dont l'interaction permet la contraction musculaire. Cette interaction est régulée par d'autres protéines myofibrillaires (par exemple la troponine et la tropomyosine) et l'intégrité de la structure est assurée par les protéines du cytosquelette (principalement la titine et la nébuline). [65], [86], [97], [102] et [122]

III.1.2 Les tissus conjonctifs

Il existe trois niveaux d'organisation pour les tissus conjonctifs (cf. figure 9 page 28). L'endomysium correspond au niveau le plus fin (épaisseur de $0,2 \mu\text{m}$) et entoure chaque fibre musculaire. Puis, des couches plus épaisses de pérимыsium (10 à $200 \mu\text{m}$) délimitent les faisceaux de fibres musculaires. Enfin, l'épais épимыsium (jusqu'à plusieurs millimètres d'épaisseur chez le bovin), également appelé aponevrose, enveloppe la totalité du muscle et se prolonge jusqu'aux tendons reliés aux os. [65], [75] et [102]

L'endomysium, le pérимыsium et l'épимыsium contiennent deux types de fibres protéiques : le collagène et en moindre quantité l'élastine. [65], [75] et [102]

La structure du collagène présente différents niveaux d'organisation. L'unité de base du collagène est constituée de chaînes polypeptidiques dont la séquence contient en grande quantité de la glycine, de la proline et de l'hydroxyproline. A un niveau secondaire, ces chaînes polypeptidiques s'arrangent sous la forme d'hélices α qui vont elles mêmes s'assembler par trois sous forme d'une triple hélice appelée molécule de tropocollagène. Des fibrilles de collagène sont ensuite formées par un arrangement parallèle de longues molécules de tropocollagène liées par des liaisons covalentes formées à partir de résidus de lysine. Les fibres de collagène sont finalement composées de faisceaux parallèles de ces fibrilles. Au cours du vieillissement des animaux, il s'établit des liaisons de réticulation entre les molécules de collagène et entre les fibrilles qui vont augmenter la résistance mécanique des fibres de collagène. Il existe 19 types de collagène, tous basés sur une structure en triple hélice. Ils diffèrent par la nature des chaînes polypeptidiques qui les constituent. Dans le muscle il y a essentiellement les types I, III, IV, V et VI. Les types XII et XIV ont été détectés dans le pérимыsium de bovin [71]. Les types XV et XIX ont été détectés dans

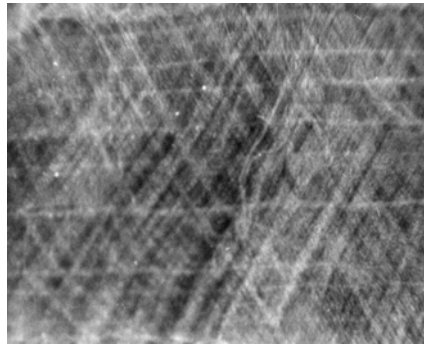


FIG. 13 : Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans l'épimysium. Les contours des fibres musculaires apparaissent ici comme des lignes horizontales ([75]).

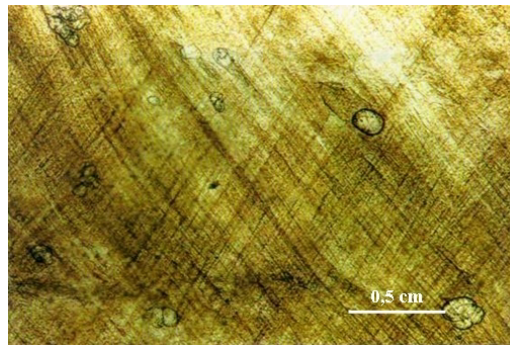


FIG. 14 : Photographie en microscopie optique montrant l'arrangement des fibres de collagène dans un faisceau de périnysium isolé.

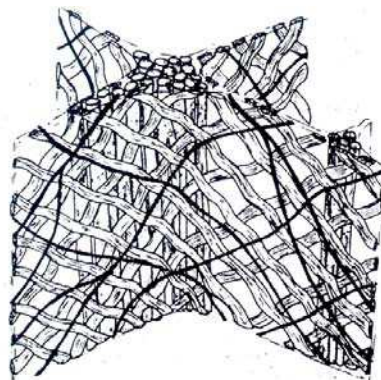


FIG. 15 : Diagramme schématique du périnysium montrant l'organisation en treillis plissé des fibres de collagène, les fibres fines d'élastine (noir) parallèles aux fibres de collagène et les fibres épaisses d'élastine alignées longitudinalement aux fibres musculaires dans les régions de jonction ([89]).

la membrane basale de l'endomysium [80]. Les types I, III, V et VI sont distribués dans l'endomysium et le pérимysium alors que le type IV se trouve exclusivement dans l'endomysium. L'épimysium est principalement constitué de collagène de type I. Les figures 13 et 14 page 31 montrent l'aspect des fibres de collagène présentes dans l'épimysium et le pérимysium qui forment une structure ordonnée en treillis. Lorsque le muscle est à l'état de repos les fibres de collagène forment un angle de 55° environ par rapport à l'axe principal des fibres musculaires. [65], [75] et [102]

L'élastine présente une composition en acides aminés voisine de celle du collagène mais une structure et des propriétés bien différentes. Les fibres d'élastine se présentent sous forme de faisceaux de fibrilles organisées de façon aléatoire et leur conférant une structure amorphe. L'arrangement des fibres d'élastine diffère selon leur origine et on différencie ainsi deux types de fibres dans le tissu conjonctif : les fibres fines disposées parallèlement aux fibres de collagène et les fibres épaisses disposées parallèlement aux fibres musculaires. Les fibres d'élastine, qui présentent des propriétés d'élasticité importantes, contrairement au collagène qui est quasiment inélastique, contiennent deux liaisons de réticulation qui les distinguent des fibres de collagène : la desmosine et l'isodesmosine. [65], [75] et [102]

III.2 Les propriétés physiques des tissus musculaires

La viande est le résultat de la transformation *post mortem* du muscle squelettique. Ses caractéristiques de texture et notamment sa tendreté dépendent directement des propriétés mécaniques des deux structures que nous venons d'évoquer, les fibres musculaires et le tissu conjonctif, et de leurs interactions. Parmi les paramètres qui influencent fortement la tendreté, on peut citer :

- la maturation ;
- l'organisation et les liaisons chimiques des tissus conjonctifs ;
- la longueur de sarcomère.

Ces paramètres vont être développés dans l'étude bibliographique car ils font l'objet des expérimentations menées au cours de cette thèse.

III.2.1 La maturation

Après l'abattage de l'animal, la transformation du muscle en viande s'effectue au cours de deux grandes phases :

- La phase d'installation de la rigidité cadavérique, appelée *rigor mortis*, pendant laquelle le muscle conserve une activité métabolique.
- La phase de maturation durant laquelle le muscle subit des modifications physiques et biochimiques qui réduisent sa résistance mécanique.

La phase d'installation de la rigidité cadavérique est nommée *ante rigor*. Durant cette phase, le muscle de l'animal ne fonctionne plus que sur ses réserves. Il conserve une activité métabolique, mais uniquement de type anaérobie puisque l'arrêt de la circulation sanguine le prive d'apport en oxygène. La régénération de l'adénosine triphosphate (ATP), molécule qui permet la contraction du muscle, est alors effectuée grâce aux réserves de glycogène du muscle. Lorsque celles-ci sont épuisées, le muscle perd sa capacité de contraction et son élasticité et l'actine et la myosine se combinent de façon irréversible en une chaîne rigide d'actomyosine. La glycolyse est la dégradation enzymatique du glycogène. Cette réaction engendre la libération d'acide lactique qui s'accumule et acidifie progressivement le muscle, se traduisant par une diminution du pH jusqu'à une valeur ultime (généralement 5,4 à 5,6). Lorsque le muscle atteint la *rigor mortis*, il est dur et son pouvoir de rétention en eau est diminué, ce qui donnerait après cuisson une viande peu tendre et peu juteuse. Dans le cas des bovins, la phase *ante rigor* dure entre 8 et 12 heures à la température de stockage normale des carcasses. [65] et [102]

Suite à l'installation de la *rigor mortis*, la phase de maturation du muscle en viande dite *post rigor* permet un attendrissage progressif provenant de la dégradation des protéines de structure des myofibrilles. La dégradation des protéines résulte d'un ensemble de processus de natures physico-chimique et enzymatique. Le muscle devient alors de plus en plus fragilisé, améliorant la tendreté obtenue après cuisson. La durée de cette phase est variable (de 1 jour à 3 semaines, dans le cas des bovins). Il convient de remarquer qu'il est généralement considéré que les tissus conjonctifs ne subissent pas de dénaturation significative durant les deux premières semaines de la maturation. [65], [75] et [102]

III.2.2 La longueur des sarcomères

La relation entre la longueur de sarcomère et la qualité de la viande est maintenant bien connue. Un muscle relaxé produit en effet une viande plus tendre et plus juteuse qu'un muscle contracté. La température à laquelle sont placées les carcasses juste après abattage joue un rôle capital dans ce phénomène. En effet, si la température est réduite trop rapidement durant la phase *ante rigor*, le réticulum sarcoplasmique qui ne peut assurer sa fonction de stockage du calcium le libère dans le sarcoplasme. Si de l'ATP est présent, le muscle se contracte fortement. Un refroidissement rapide du muscle induit ainsi une contraction irréversible du muscle (aussi appelée en anglais *cold shortening*) qui peut atteindre 50 %. Cette contraction diminue de façon significative sa tendreté. En effet, après chauffage les fibres musculaires d'une viande contractée sont très résistantes. Une viande contractée est 3 à 4 fois plus dure qu'une viande normale. Afin d'éviter ce phénomène, il convient de refroidir le muscle dans des conditions bien spécifiques. Le muscle ne doit pas atteindre une température inférieure ou égale à 10 ° C tant qu'il y a de l'ATP. En pratique dans le cas de l'ovin et du bovin, cette température ne doit pas être atteinte au cours des 10 premières heures suivant l'abattage. [102]

III.2.3 Le réseau de tissu conjonctif

Des liaisons covalentes dites de réticulation s'établissent entre les molécules de collagène et entre les fibrilles et évoluent avec l'âge. Elles deviennent progressivement stables à la chaleur. Une des liaisons importante est la pyridinoline. Elle lie trois molécules de collagène. Le degré de réticulation du collagène, influençant sa stabilité thermique, est une des caractéristiques du tissu conjonctif importante pour la tendreté de la viande. Les consommateurs privilégient ainsi les viandes à faible teneur en collagène et provenant d'animaux jeunes, chez lesquels ce collagène est plus faiblement réticulé. La teneur et le degré de réticulation du collagène varient sous l'effet de différents facteurs intrinsèques à l'animal tels que l'âge, le sexe, la race et la génétique. Il a ainsi par exemple été montré que quelle que soit l'espèce considérée, la solubilité du collagène diminue régulièrement avec l'âge, en relation avec l'augmentation du nombre de liaisons de réticulations entre les molécules de tropocollagène. [75], [102]

Outre les facteurs intrinsèques à l'animal, les processus technologiques (cuisson, attendrissage mécanique, marinage) que subit la viande après abattage influent également sur les propriétés du tissu conjonctif. En particulier, la cuisson va modifier profondément les propriétés des fibres de collagène. Lorsque le collagène est chauffé il se dénature et se contracte aux environs de 58-65 ° C pour se transformer en gélatine insoluble. Les fibres de collagène, qui initialement avaient une structure très organisée quasi cristalline et qui étaient inextensibles, prennent la structure d'un réseau aléatoire et deviennent élastiques. Ce réseau est constitué de longues chaînes flexibles maintenues entre elles par des liaisons. Ce phénomène est dû à la rupture des liaisons intramoléculaires (ponts hydrogène). Si le traitement thermique est intense et long, les liaisons intermoléculaires (liaisons de réticulation) sont également rompues. C'est la nature des liaisons de réticulation présentes dans la viande avant chauffage qui va déterminer la force de contraction, l'amplitude de contraction, la solubilisation du collagène ainsi que les propriétés mécaniques finales des tissus conjonctifs après chauffage. La résistance des fibres de collagène diminue au cours du chauffage alors que la structure myofibrillaire devient plus dure. Dransfield ([26]) a montré que la contribution du tissu conjonctif à la résistance mécanique de la viande après cuisson est d'autant plus faible que le collagène est moins réticulé (et donc plus soluble) et que la température de cuisson est élevée. Entre 60 et 70 ° C, une grande partie du collagène est dénaturée [74] alors que l'élastine est stable jusqu'à 100 ° C [89].

III.3 La fluorescence intrinsèque des tissus musculaires

La spectroscopie de fluorescence est une technique qui permet d'étudier les fluorophores présents dans un milieu et leur environnement. C'est un outil de choix pour évaluer la qualité des aliments, comme par exemple la viande, car rapide, sensible et autorisant les mesures en ligne. Jusqu'à récemment, la grande majorité des expériences de fluorescence était réalisée avec une géométrie de mesure à angle droit, convenant à des échantillons dilués dont l'absorbance est inférieure à 0,1. Cette méthode ne convenant pas à l'étude de produits opaques, comme peuvent l'être les produits alimentaires, la spectroscopie de fluorescence frontale (cf. figure 16, page 36) a été développée [83]. Dans le domaine de la science des aliments, il convient de signaler les travaux de Genot et al. ([39] et [40]) qui

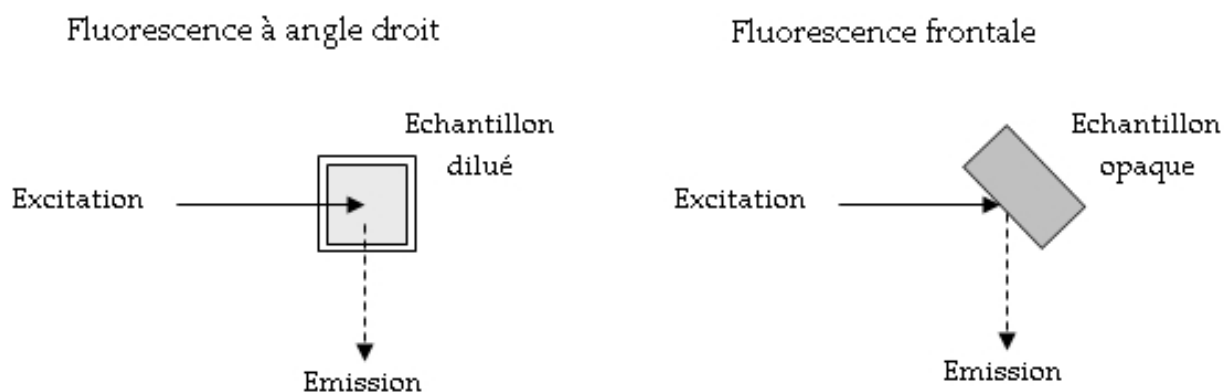


FIG. 16 : Schémas des principes des fluorescences à angle droit et frontale.

ont mis au point un dispositif de fluorescence frontale, inspiré de celui conçu par Eisinger et Flores ([34]), permettant de mesurer la fluorescence d'échantillons concentrés comme le gluten de blé. Plus récemment, les travaux menés par Dufour et al. ([27], [29] et [30]) et Karoui et al. ([54]) sur le lait, le fromage et le poisson utilisent également cette géométrie de mesure, de même que Andersen et Wold ([3]) sur le poisson.

Dans le domaine des recherches sur la fluorescence de la viande, c'est principalement le collagène des tissus conjonctifs et adipeux qui a été étudié. Mais quelques articles s'intéressent aussi à la fluorescence des protéines des fibres musculaires. Nous allons nous attarder à présenter ici les principaux contributeurs à ce domaine.

L'utilisation de la spectroscopie de fluorescence pour analyser la viande a été rapportée pour la première fois dans un brevet datant de 1986 ([53]) présentant une méthode pour le contrôle qualité de la viande et du poisson. Les spectres d'émission des composés étudiés, avec comme longueur d'onde d'excitation 340 nm, mettent en évidence des pics à 390 nm, 455 nm et 475 nm identifiés comme provenant de la fluorescence des os, cartilages, tissus conjonctifs et gras.

Depuis 1987, Swatland a présenté un grand nombre de travaux concernant la fluorescence de la viande, que nous ne présenterons pas ici de façon exhaustive. Ses études ont été essentiellement consacrées à la mesure de la fluorescence du collagène et de l'élastine

dans les tissus conjonctifs de la viande, en utilisant comme longueur d'onde d'excitation 365 nm. Initialement, Swatland identifie des longueurs d'onde d'émission (440 nm et 510 nm) intéressantes pour séparer les types de collagène I et III ([103]). Puis, il relie les caractéristiques des signaux de fluorescence du tissu conjonctif (quantité et distribution spatiale) avec les paramètres liés à la qualité de la viande comme la teneur en cartilage dans la viande de boeuf hachée ([104]), la force nécessaire à la pénétration et à la traction de la viande de dinde ([111]), la difficulté à mâcher ([113]), la dureté et la jutosité de la viande bovine ([105]). Il met ainsi également au point des sondes de mesure en ligne des caractéristiques de la viande combinant la mesure de la fluorescence des tissus conjonctifs avec d'autres mesures optiques telles que la réflectance ([109] et [112]) et la diffusion de la lumière ([108]).

La contribution de Wold, Egelanddal et collègues au domaine de la fluorescence de la viande est également importante. Dans leurs travaux, ils relient les spectres d'émission du collagène avec les propriétés de résistance ([32]) et la quantité de tissu conjonctif ([130] et [31]) et également la tendreté de la viande ([33]). Les longueurs d'ondes d'intérêt pour l'excitation qu'ils rapportent sont 332 nm pour l'étude du gras et du tissu conjonctif et 380 nm pour l'étude du tissu conjonctif seul. Ils utilisent en revanche plusieurs longueurs d'onde d'émission entre autres autour de 470 nm. D'après Wold ([129]) l'élastine et le collagène de type V présentent la fluorescence la plus importante avec des pics d'émission autour de 400 nm pour une excitation à 322 nm, et des pics à 440 nm et 475 nm pour une excitation à 380 nm. De plus, les auteurs estiment également l'oxydation des lipides de la viande ([131] et [132]) grâce à l'étude des spectres de fluorescence attribués à des produits d'oxydation.

D'autres chercheurs étudient également la spectroscopie de fluorescence des aliments. Il convient de citer, de façon non exhaustive, certains travaux. Brondum et al. ([11]) évaluent le pouvoir de rétention en eau de la viande d'après les pics de fluorescence attribués au NADH¹ ($\lambda_{exc}=366$ nm et $\lambda_{em}=460$ nm) et au collagène ($\lambda_{exc}=375$ nm et $\lambda_{em}=440$ nm).

¹Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide qui joue un rôle crucial dans la production de l'Adénosine Triphosphate (ATP) et est le principal transporteur d'énergie dans les cellules.

Moller et al. ([78]) mesurent l'évolution du jambon de Parme avec les procédés en utilisant les spectres de fluorescence à deux dimensions (excitation \times émission). Il est important de souligner que ce dernier article met en œuvre une approche multivariable de la fluorescence. L'application de la méthode de décomposition PARAFAC a permis aux auteurs de mettre en évidence la présence de cinq fluorophores différents, dont le tryptophane est le principal, et les autres étant identifiés comme probablement provenant du salage, des produits d'oxydation et du collagène ou du NADH. Une publication récente de Christensen ([14]), associée à sa thèse ([13]), développe la chimiométrie et l'analyse multivariable et multivoie de la spectroscopie de fluorescence des aliments.

Last but not least, des chercheurs de l'ENITA et du Cémagref de Clermont-Ferrand ont également étudié les spectres de fluorescence frontale de la viande avec pour fluorophore d'intérêt le tryptophane dont la longueur d'onde d'excitation est proche de 290 nm. Allais et al. ([1] et [2]) corrélaient ainsi la texture des émulsions de viande et des saucisses avec les caractéristiques de l'émission de fluorescence de cet acide aminé. Un article de Dufour et Frenchia ([28]), est tout particulièrement une présentation générale de la spectroscopie de fluorescence frontale en tant que méthode de caractérisation de la viande.

Un récent article ([96]) réunissant plusieurs des chercheurs cités précédemment fait état des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de choix permettant de distinguer les différents composants de structure de la viande. Dans le cas du tissu conjonctif, le couple de fluorescence préconisé pour solliciter le collagène et l'élastine est 380/440 nm en excitation et en émission. Une excitation à 332 nm n'est pas souhaitable car elle engendre également la fluorescence du gras. Dans le cas des protéines des fibres musculaires, la longueur d'onde d'excitation choisie est 290 nm, permettant d'exciter les résidus de tryptophane dont la fluorescence est bien connue. Les auteurs notent que le spectre d'émission du tryptophane présente un pic autour de 332 nm. Il est important de préciser que les caractéristiques d'émission de fluorescence du tryptophane dépendent fortement de l'environnement local de la molécule et que le maximum d'émission est donc sujet à des variations [62]. Le paragraphe III.4, page 40 est consacré à cet acide aminé dont les propriétés spectrales de fluorescence sont complexes.

Les recherches provenant du domaine de la science des aliments ont donc permis d'identifier les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la fluorescence des tissus conjonctif et des fibres musculaires : 380/440 nm et 290/332 nm respectivement.

Dans le cas des fibres musculaires, le fluorophore sollicité avec ce dernier couple de longueurs d'onde est connu, il s'agit du tryptophane. Il convient de remarquer que la tyrosine est également un acide aminé fluorescent présent dans de nombreuses protéines. La tyrosine est excitée dans le même domaine de longueur d'onde que le tryptophane, mais son émission de fluorescence apparaît vers 300 nm. Pour des longueurs d'onde supérieures, c'est la fluorescence du tryptophane qui prédomine largement, celui-ci étant ainsi considéré comme le fluorophore intrinsèque majeur des protéines ([62]).

Dans le cas des tissus conjonctifs, l'identification des composés qui fluorescent au sein des molécules de collagène et d'élastine n'est pas entièrement réalisée. Il est clair, d'après la plupart des auteurs cités précédemment que les différentes liaisons de réticulation sont des contributeurs de la fluorescence des tissus conjonctifs. Ainsi, les liaisons de réticulation du collagène intégrant la pyridinoline² fluorescent au couple d'excitation et d'émission 295(330)/395 nm. De même, le couple de fluorescence de la pentosidine est 335/385 nm. La proline et l'hydroxyproline présentent un pic d'émission vers 440 nm associé à trois longueurs d'onde d'excitation : 280, 335 et 385 nm [95]. Les liaisons de réticulation de l'élastine intègrent la desmosine et isodesmosine ([17], [35] et [99]) dont le couple de fluorescence est environ 385/460 nm.

Il convient de remarquer que l'analyse des composés fluorescents du collagène et de l'élastine est un sujet d'intérêt dans des domaines de recherche tels que la biochimie et le biomédical. Ainsi, une revue consacrée à la spectroscopie optique des tissus humains ([88]) fait l'état des fluorophores intrinsèques que l'on y trouve. On peut également citer les articles de Deyl et al. ([24]) et Stamatatos et al. ([98]) qui rapportent différents couples de fluorescence issus du collagène et de l'élastine attribués à la pentosidine et la pyridinoline, mais également, par exemple à des composés issus de la glycolisation (370/440(460) nm) et à des liaisons de réticulation de l'élastine (390-420/500 nm).

²On distingue l'hydroxylysylpyridinoline (HP) et la lysylpyridinoline (LP)

III.4 Les propriétés spectrales du tryptophane

Nous venons de soulever le fait que le tryptophane est l'acide aminé ayant la fluorescence la plus intense au sein des protéines. Ladokhin ([58]) va même jusqu'à expliquer qu'il est si largement utilisé que le terme "fluorescence naturelle des protéines" est presque toujours associé à la fluorescence du tryptophane. Ainsi, nous ne détaillerons pas les propriétés des deux autres acides aminés fluorescents des protéines que sont la tyrosine et la phénylalanine (respectivement $\lambda_{em}=303$ nm et $\lambda_{em}=282$ nm dans l'eau), de même que l'autre classe naturelle de fluorophores que constituent les cofacteurs (le plus prédominant étant le NADH).

Nous avons déjà précisé que les propriétés d'émission du tryptophane sont complexes, notamment car il est particulièrement sensible à son environnement local. De ce fait, il constitue un indicateur des réactions d'association et des effets de dénaturation. Un autre facteur de complication dans l'interprétation de la fluorescence du tryptophane est qu'il manifeste des propriétés spectrales complexes dues à la présence de deux états excités S_0 et S_1 , plus fréquemment nommés dans la littérature concernée 1L_a et 1L_b . Ces transitions électroniques présentent des spectres d'absorption, d'émission et d'anisotropie distincts [62]. Cette dernière caractéristique étant particulièrement importante dans le cas de notre étude, il convient de la détailler.

L'indole est une structure organique aromatique hétérocyclique présente dans le tryptophane. C'est le siège de la fluorescence du tryptophane. Sa structure a déjà été présentée par la figure 5, page 18. Ses deux transitions qui se chevauchent ont des énergies similaires, dépendant de leur environnement. Ainsi, selon les conditions, chacune d'entre elle peut constituer l'état excité de plus basse énergie, à partir duquel l'émission de fluorescence a lieu. De plus, les transitions 1L_a et 1L_b ont des directions différentes dans la molécule de telle façon que chaque état excité a un moment dipolaire propre, répondant ainsi différemment à la polarité du solvant. Il a été montré qu'elles sont orientées respectivement à -38° et 56° par rapport à l'axe moléculaire principal de la molécule, c'est-à-dire qu'il est généralement admis qu'elles sont perpendiculaires.

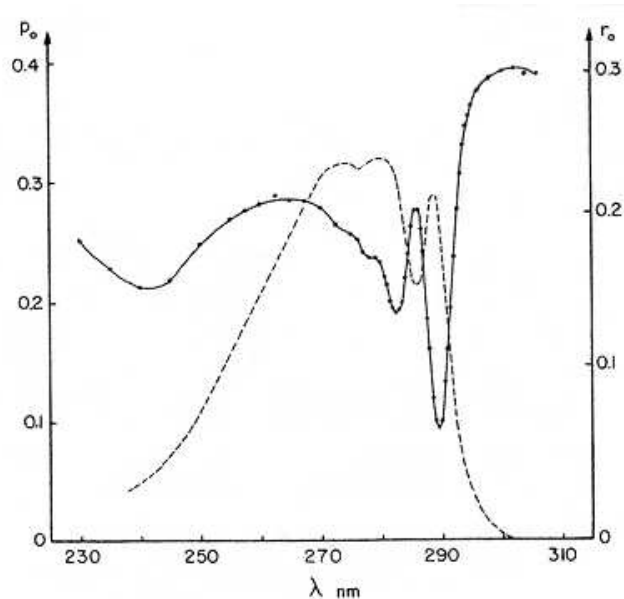


FIG. 17 : Spectre d'excitation corrigé (traits pointillés) et spectre d'excitation de polarisation (trait plein) de l'indole dans le propylène glycol à -58°C ([120]).

Une façon de résoudre le chevauchement de ces deux transitions électroniques est d'utiliser le spectre d'excitation de fluorescence et le spectre d'excitation de polarisation, comme le proposent Valeur et Weber dans leur publication datant de 1977 ([120]) devenue une référence classique. Comme le montre la figure 17, le spectre d'excitation de polarisation de l'indole n'est pas constant. Il convient de noter que la mesure est réalisée à -58°C afin de limiter la rotation diffusionnelle durant la durée de vie de l'état excité. Dans le région du spectre de 305 à 310 nm, seul le niveau 1L_a est excité. On peut donc en déduire que la valeur de l'anisotropie de cet état est $r_{0a} = 0,3$. D'autre part, on sait que l'anisotropie d'émission à une longueur d'onde d'excitation λ résulte de l'addition des contributions des deux états excités 1L_a et 1L_b avec leur contributions relatives respectives $f_a(\lambda)$ et $f_b(\lambda)$. D'après la loi d'additivité de l'anisotropie³, l'anisotropie d'émission $r_0(\lambda)$ est donnée par $r_0(\lambda) = f_a(\lambda)r_{0a} + f_b(\lambda)r_{0b}$ avec $f_a(\lambda) + f_b(\lambda) = 1$. Les contributions des états excités 1L_a et 1L_b peuvent finalement être déterminées, dans les conditions de l'expérience, en utilisant le fait que $r_{0a} = 0,3$. La démonstration complète de Valeur et Weber est montrée sur la figure 18, page 42 où les contributions des bandes 1L_a et 1L_b au spectre d'excitation sont représentées.

³cf. § II.2, page 20

The oscillators of absorption for 1L_a and 1L_b are perpendicular to each other (Yamamoto and Tanaka, 1972) and if the transition moments in absorption and emission for 1L_a were strictly colinear, the emission from the 1L_a level would be characterized by the values

$$\begin{aligned} r_{0a} &= 0.4 \\ r_{0b} &= -0.2 \end{aligned}$$

since in general (Perrin, 1929)

$$r_0 = \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{5} \quad (4)$$

where θ is the angle between the transition moments in absorption and emission. However, if it is admitted that the constancy of $r_0(\lambda)$ observed at 305–310 nm reflects exclusive excitation of the 1L_a level, so that in this region $f_a(\lambda) = 1$, $f_b(\lambda) = 0$, we must have

$$r_{0a} = 0.3$$

The cause of depolarization that reduces r_{0a} from 0.4 to 0.3 could reside in torsional vibrations (Jablonski, 1965) or in some other form of perturbation of the initial direction, e.g. exciplex formation. Let θ_a be the angle between the transition moments in absorption and emission of 1L_a . Then,

$$r_{0a} = \frac{3 \overline{\cos^2 \theta_a} - 1}{5}$$

If θ_a is considered to be an angle in space, then

$$\frac{3 \overline{\cos^2 \theta_b} - 1}{2} = \frac{(3 \overline{\cos^2 \theta_a} - 1)(3 \overline{\cos^2 \theta_{ab}} - 1)}{2} \quad (5)$$

where θ_{ab} is the angle between 1L_a and 1L_b in absorption and θ_b the angle between the absorption direction of 1L_b and the emission direction of 1L_a . From Eq. 5, since $\theta_{ab} = \pi/2$

$$\frac{3 \overline{\cos^2 \theta_b} - 1}{2} = -\frac{1}{2} \frac{3 \overline{\cos^2 \theta_a} - 1}{2}$$

or

$$r_{0b} = -\frac{1}{2} r_{0a}$$

hence

$$r_{0b} = -0.15$$

The same value is obtained when Jablonski's formulas (1965) are used.

If the perturbations keep the transition moments in the plane of the molecule, we have

$$2 \overline{\cos^2 \theta_b} - 1 = (2 \overline{\cos^2 \theta_a} - 1)(2 \overline{\cos^2 \theta_{ab}} - 1) \quad (6)$$

hence

$$\overline{\cos^2 \theta_b} = 1 - \overline{\cos^2 \theta_a}$$

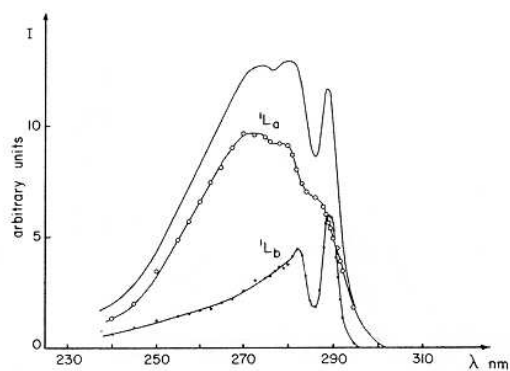


Figure 3. Resolution of the excitation spectrum of indole with $r_{0a} = 0.3$, $r_{0b} = -0.15$.

and

$$\frac{3 \overline{\cos^2 \theta_b} - 1}{5} = \frac{1 - (3 \overline{\cos^2 \theta_a} - 1)}{5}$$

or

$$r_{0b} = \frac{1}{5} - r_{0a}$$

Therefore, in this case, we have $r_{0b} = -0.10$.

In the calculations below, $r_{0b} = -0.15$ has been assumed, giving

$$f_a(\lambda) = \frac{\langle r_0(\lambda) \rangle - r_{0b}}{r_{0a} - r_{0b}} = \frac{\langle r_0(\lambda) \rangle + 0.15}{0.45} \quad (7)$$

$$f_b(\lambda) = \frac{r_{0a} - \langle r_0(\lambda) \rangle}{r_{0a} - r_{0b}} = \frac{0.3 - \langle r_0(\lambda) \rangle}{0.45} \quad (8)$$

Finally, the contributions $I_a(\lambda)$ and $I_b(\lambda)$ of the 1L_a and 1L_b bands to the excitation spectrum $I(\lambda)$ are

$$\begin{aligned} I_a(\lambda) &= f_a(\lambda) I(\lambda) \\ I_b(\lambda) &= f_b(\lambda) I(\lambda) \end{aligned}$$

Figure 3 shows the resolution of the excitation spectrum. The 1L_b band lies below the broader 1L_a band, as it was to be expected, since Yamamoto and Tanaka (1972) have suggested that the oscillator strength of the 1L_b band is much weaker than that of the 1L_a band.

FIG. 18 : Extrait de la publication de Valeur et Weber ([120]) montrant la résolution du spectre d'excitation de l'indole.

Il est important de retenir que l'anisotropie d'émission du tryptophane dépend de la contribution des deux états 1L_a et 1L_b à la transition d'absorption et que ces contributions peuvent *a priori* varier en fonction des conditions environnementales comme le type de solvant dans lequel se trouve le tryptophane et la température.

III.5 Conclusion

Le tissu musculaire est une structure ordonnée dont les principaux constituants, les fibres musculaires et les tissus conjonctifs, sont intrinsèquement fluorescents. La fluorescence des fibres musculaires met en œuvre généralement le tryptophane dont le couple de fluorescence est connu, mais les propriétés de polarisation complexes, à cause de ses deux moments de transition d'absorption. En revanche, les tissus conjonctifs affichent différents couples de fluorescence. Ils sont le plus souvent identifiés comme provenant probablement des liaisons de réticulation du collagène et de l'élastine.

Chapitre IV

L'anisotropie de fluorescence des tissus musculaires

IV.1 La mesure de l'anisotropie de fluorescence appliquée à divers domaines

La théorie de la polarisation de la fluorescence a été exposée par Francis Perrin en 1926 ([84]). La mesure du degré de polarisation de la fluorescence présenta ensuite un intérêt dans de multiples domaines, dont nous ne dresserons pas ici une liste exhaustive, mais fournirons plus simplement quelques exemples, utiles notamment pour notre étude. A noter que Lakowicz passe en revue dans ses ouvrages ([61] et [62]) la plupart de ces applications.

Un aspect essentiel de cette méthode est qu'elle fournit une information sur la mobilité rotationnelle des molécules. Partant du fait que si une molécule considérée se lie à une autre, sa mobilité en sera modifiée, la polarisation de fluorescence permet alors d'étudier et quantifier les interactions moléculaires. La première application de ce principe fut ainsi développée par Weber ([124], [125] et [126]) et utilisée par Laurence dès 1952 ([64]) afin de contrôler la liaison de petites molécules à des protéines (ou FPIA). D'autres méthodes s'appuyant sur une procédure similaire sont également utilisées aujourd'hui, pour étudier par exemple les liaisons anticorps-antigènes. Par ailleurs, l'anisotropie de fluorescence est une technique qui a été considérablement utilisée pour étudier la fluidité et l'ordre des sys-

tèmes organisés comme par exemple les membranes et micelles biologiques, les bicouches lipidiques et les cristaux liquides. Les protéines appartenant aux membranes cellulaires et aux fibres musculaires (le § IV.2, page 49 s'attardera plus en détail sur ce dernier point) ont été étudiées de cette manière. Par ailleurs, une publication fréquemment citée présentant cette méthode et appliquée au domaine de la science des aliments est celle de Marangoni ([72]).

La polarisation de fluorescence est ainsi un outil d'intérêt pour l'étude des systèmes organisés car elle apporte des informations sur l'organisation spatiale des molécules considérées. La science des polymères est particulièrement utilisatrice de cette méthode. Les publications produites dans ce domaine ont été d'une grande utilité au cours de cette thèse car elles détaillent avec précision les méthodologies de mesure utilisées et les modèles développés afin d'établir une relation entre l'anisotropie de fluorescence et l'orientation des fluorophores au sein des matrices polymères solides.

Afin d'éviter de passer en revue individuellement ces publications, les plus citées étant [12], [15], [22], [36], [63] et [82], on pourra résumer qu'elles présentent diverses configurations de mesure des intensités de fluorescence en lumière polarisées I_{\parallel} et I_{\perp} . Ces géométries proposées sont pertinentes vis à vis des informations structurales devant être déterminées grâce à la modélisation. La distribution d'orientation des fluorophores, généralement extrinsèques, y est présentée en termes de $\langle \cos^2\theta \rangle$ (voire $\langle \cos^4\theta \rangle$) et $\langle \cos^2\psi \rangle$ où les angles θ et ψ définissent l'orientation du fluorophore par rapport aux coordonnées du système. Ces modèles permettent de caractériser le degré d'orientation de films polymères étirés selon un ou deux axes.

Il convient toutefois de remarquer les équations proposées par Nobbs et al. ([82]) pour ajuster les variations observées des intensités de fluorescence, en fonction de l'angle de l'échantillon γ par rapport à la direction de la polarisation incidente :

$$I_{\parallel}(\gamma) = B_0 + B_1 \cos 2\gamma + B_2 \cos 4\gamma \quad (14)$$

$$I_{\perp}(\gamma) = B_3 + B_4 \cos 2\gamma + B_5 \cos 4\gamma \quad (15)$$

Les six coefficients B_0 à B_5 dépendent de la structure de l'échantillon. Ces deux équations modélisent le comportement d'un échantillon, ici un film polymère fluorescent, affichant une symétrie uniaxiale. La figure 19, page 48, illustre l'application de ce modèle avec des

données expérimentales pour caractériser le taux d'étirement de films polymères ayant subit différents procédés d'étirement.

Le domaine du biomédical met également en œuvre la polarisation de fluorescence de façon particulièrement intéressante. La mesure de la dépolarisation de la fluorescence permet en effet de distinguer les tissus biologiques humains cancéreux des tissus sains dont les distributions des fluorophores, diffuseurs et absorbeurs varient. Les différentes publications ([42], [43], [77] et [91]) décrivant ces applications détaillent avec soin les protocoles de mesures suivis et les modèles mathématiques utilisés pour l'analyse des données. Cette application de la polarisation de fluorescence est d'autant plus intéressante que son matériau d'intérêt est le tissu biologique humain, ayant donc une structure et des propriétés optiques comparables aux tissus musculaires bovins et ovins faisant l'objet de notre étude. Les résultats présentés, tels que les variations de l'anisotropie de fluorescence en fonction de l'épaisseur de tissus (cf. figure 20, page 48), constituent donc une source d'informations précieuse pour nous.

La plupart des applications de la polarisation de fluorescence évoquées jusqu'ici relèvent du domaine macroscopique. Or, la microscopie de fluorescence en lumière polarisée est également une technique utilisable dans le but de caractériser l'organisation structurale de matériaux. A titre d'exemple, le contrôle de la qualité du bois, qui nécessite de mesurer l'orientation des microfibrilles de cellulose, peut être réalisé grâce à cet outil. Les travaux de Jang ([52]) et de Sedighi-Gilani et al. ([93]) présentant cette application ont retenu notre attention car les auteurs mettent en oeuvre la microscopie de fluorescence en lumière polarisée en faisant varier l'angle des échantillons, méthode analogue à celle que nous avons réalisée dans cette étude. Il en est de même pour l'article de Corry et al. ([18]) qui passe en revue de façon pratique comment la mesure de l'intensité de fluorescence en microscopie peut être utilisée pour déterminer l'orientation de fluorophores liés à une matrice solide.

Il convient de noter une nouvelle fois que cette partie ne prétend pas décrire de façon exhaustive toutes les applications de la polarisation de fluorescence, qui se trouvent en

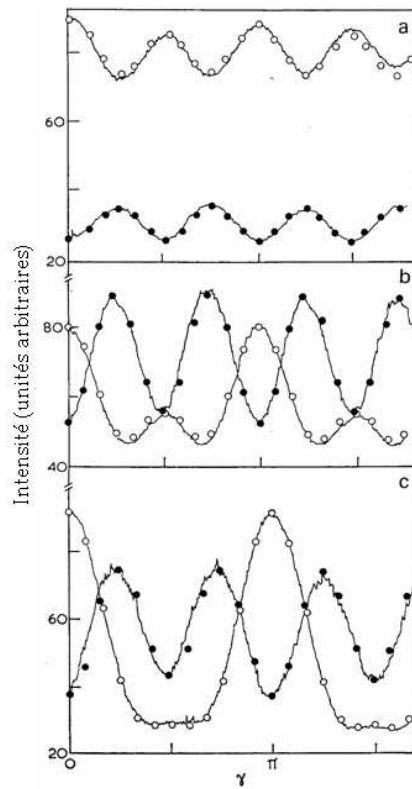


FIG. 19 : Intensité de fluorescence de films polymères, non étiré (a), étiré d'un rapport 1,38 (b) et d'un rapport 2,19 (c), en fonction de leur angle γ par rapport à un axe de référence. Les points sont calculés à partir des ajustements des données expérimentales avec les équations 14 et 15, respectivement avec polariseur et analyseur (o) parallèles et (●) croisés (d'après [82]).

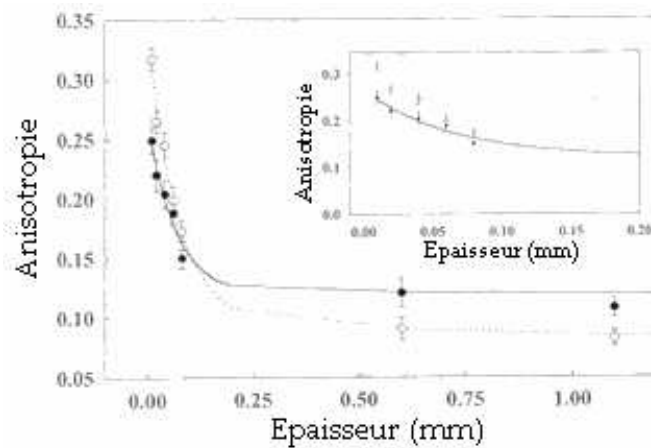


FIG. 20 : Anisotropie de fluorescence ($\lambda_{exc}=340$ nm et $\lambda_{em}=440$ nm) pour des tissus cancéreux (o) et sains (●), en fonction de l'épaisseur de tissu (d'après [77]).

grand nombre, mais fait plutôt état des travaux que nous avons pu considérer, de par le protocole de mesure ou d'analyse présenté par exemple, comme connexes à notre étude.

IV.2 L'anisotropie optique des tissus musculaires...

IV.2.1 ...Dans le domaine de la viande

A notre connaissance, peu d'auteurs ont rapporté des travaux appliquant à la viande des techniques basées sur la mesure de la polarisation de la fluorescence. Seule la publication de Yao et al. ([134]), utilise le taux de polarisation¹ de la fluorescence de succédanés de viande fabriqués par un procédé d'extrusion comme indicateur du degré de formation de leurs fibres. Grâce au montage présenté sur la figure 21 les auteurs mettent en évidence une augmentation du taux de polarisation au fur et à mesure de l'extrusion, corrélée avec la formation des fibres. Les échantillons sont toujours positionnés de telle manière que l'orientation des fibres est alignée avec la direction de la polarisation incidente. Les longueurs d'onde de fluorescence utilisées en excitation et en émission sont respectivement 375 nm et 540 nm. Les auteurs concluent que cette méthode basée sur la polarisation de fluorescence est en bon agrément avec l'inspection visuelle des échantillons et est plus performante que l'analyse texturale.

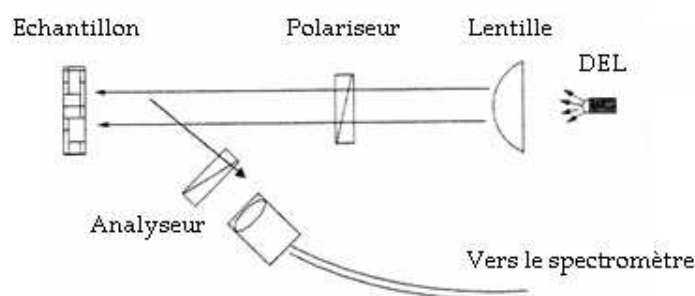


FIG. 21 : Montage pour la mesure de la polarisation de fluorescence (d'après [134]).

Par ailleurs, les propriétés de transmission et de réflexion de la viande en lumière polarisée ont été étudiées et corrélées avec le pH et les pertes en eau lors de la cuisson

¹Définition § II.2, page 19.

par Swatland et al. ([115]). Dans cet article, les auteurs montrent non seulement que ces propriétés sont différentes pour des configurations parallèle et croisée entre polariseur et analyseur, mais également qu'elles varient selon la direction considérée par rapport aux fibres musculaires (longitudinalement et transversalement), comme le montre la figure 22, page 51. Cette anisotropie des propriétés optiques de la viande avait déjà été mise en évidence par Marquez et al. ([73]) qui rapportent les changements des coefficients d'absorption et de diffusion de la viande en fonction de la direction de propagation parallèle ou perpendiculaire aux fibres. Dans ce cas, la polarisation de la lumière n'a pas été prise en considération. De façon analogue, c'est-à-dire sans utiliser une lumière polarisée, mais en faisant varier la direction de mesure, Swatland a également remarqué des différences dans l'intensité de fluorescence du tissu conjonctif de la viande ([114]) et la quantité de lumière diffusée par la viande ([106]). Dans cette dernière étude, Swatland utilise trois orientations de mesure comme le montre la figure 23, page 51 : longitudinale, transversale et coaxiale. Il fait apparaître une nouvelle fois que les propriétés optiques de la viande ne sont pas isotropes.

IV.2.2 ...Dans le domaine de la biologie structurale

Même si la polarisation de fluorescence a été peu utilisée pour étudier la structure de la viande intacte, un grand nombre de travaux rapportent en revanche sa mise en œuvre sur des fibres musculaires isolées avec pour but la mise en évidence de l'orientation des protéines. Cette problématique trouve pour application principale l'étude du comportement des structures sarcomériques durant la contraction musculaire, et la compréhension des phénomènes biochimiques qui y sont liés. Les publications de Aronson et Morales ([4]) et Dos Remedios et al. ([25]) font état d'un tel type d'étude. Alors que ces auteurs utilisèrent directement la fluorescence intrinsèque du tryptophane, excitée autour de 300 nm avec une émission autour de 335 nm, les travaux plus récents utilisent largement des fluorophores extrinsèques. Ces derniers, par opposition aux fluorophores intrinsèques (naturellement présents dans le milieu), sont des molécules additionnées aux échantillons qui ne fluorescent pas ou peu intrinsèquement. Le marquage avec ces molécules d'intérêt, généralement appelées sondes, permet ainsi d'étudier les molécules concernées. Afin d'extraire comme souhaité les mécanismes moléculaires de la contraction musculaire s'appuyant sur

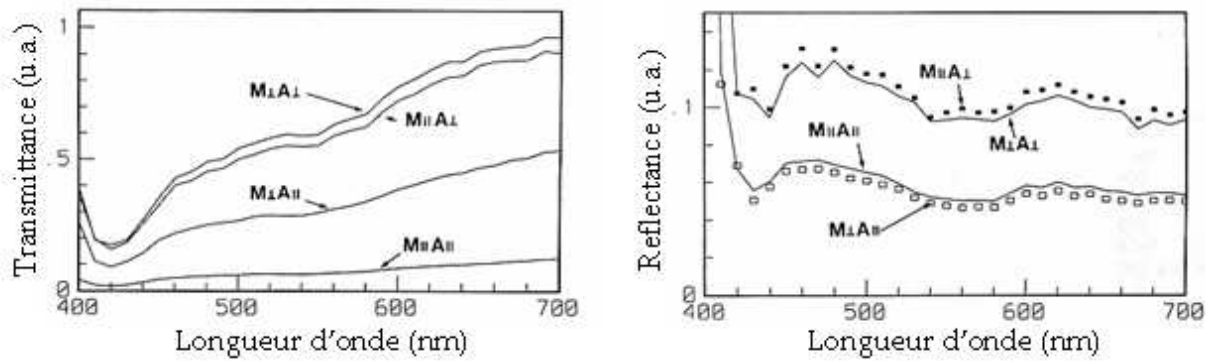


FIG. 22 : Spectres de transmittance et de réflectance en lumière polarisée d'échantillons de viande de dinde avec différentes conditions de mesure. ($M_{\parallel}A_{\parallel}$) polariseur aligné avec les fibres musculaires et analyseur parallèle au polariseur ; ($M_{\parallel}A_{\perp}$) polariseur aligné avec les fibres musculaires et analyseur perpendiculaire au polariseur ; ($M_{\perp}A_{\parallel}$) polariseur perpendiculaire aux fibres musculaires et analyseur parallèle au polariseur ; ($M_{\perp}A_{\perp}$) polariseur perpendiculaire aux fibres musculaires et analyseur perpendiculaire au polariseur (d'après [115]).

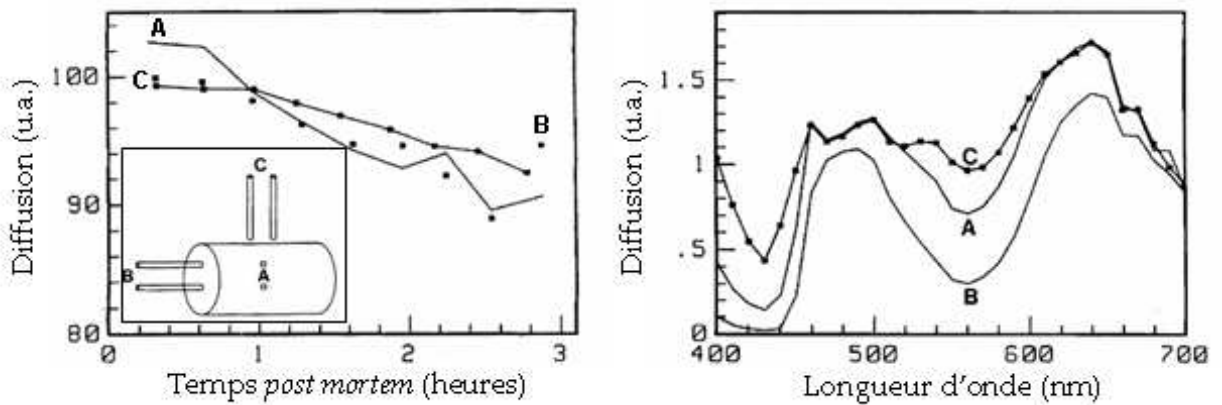


FIG. 23 : Intensité de la lumière diffusée en fonction du temps *post mortem* et de la longueur d'onde, avec différentes conditions de mesure représentées dans la figure en cartouche. Les guides d'illumination et de détection de la lumière sont placés transversalement (A), coaxialement (B) ou longitudinalement (C) aux fibres musculaires (d'après [114]).

les changements d'orientation de l'actine et de la myosine, des modèles doivent être développés, prenant en compte l'orientation et les changements d'orientation des sondes de fluorescence utilisées qui se fixent sur des sites protéiques spécifiques. On peut citer par exemple les publications de Dale et al. ([21]), Borejdo et al. ([10]), Van der Heide et al. ([121]) et Blackman et al. ([9]) qui sont intéressantes pour notre étude car elles établissent des hypothèses sur le mouvement et l'orientation des protéines musculaires et mettent en oeuvre des modèles mathématiques comparables à ceux développés pour la science des polymères.

IV.2.3 ...Dans le domaine biomédical

L'étude des structures collagéniques du tissu musculaire a été révélée surtout par la recherche biomédicale. Cette dernière nécessite en effet la connaissance des propriétés de propagation de la lumière dans les tissus biologiques pour un certain nombre d'applications optiques en médecine. Comme le soulignent Kienle et al. ([55]), les premiers modèles théoriques de la propagation de la lumière supposaient que les tissus biologiques étaient isotropes. Ce n'est que depuis récemment que les propriétés d'anisotropie des tissus, dues à l'alignement de leurs structures, ont été de plus en plus étudiées.

Marquez et al. ([73]), déjà cités au début de ce paragraphe, ont donc mis en oeuvre des expériences de réflectance résolue spatialement pour montrer que les propriétés optiques des tissus dépendent de la direction de mesure. Cela fut également rapporté par Nickell et al. ([81]) qui mirent en évidence que quand la peau est illuminée à l'aide d'une source de lumière ponctuelle, les mesures de la réflectance résolues spatialement, c'est-à-dire en fonction de l'angle par rapport au tissu, représentent des ellipses orientées perpendiculairement aux fibres de collagène à des faibles distances de la source mais orientées parallèlement à ces mêmes fibres pour des distances plus grandes. Ainsi, pour des distances supérieures à 5 mm, une plus grande quantité de lumière arrive jusqu'au détecteur si le parcours de cette dernière se fait le long des fibres de tissu, plutôt que transversalement. Cette constatation, présentée sur la figure 24, page 53, a été modélisée en prenant en compte la diffusion par les fibres de collagène.

Kostyuk et al. ([56] et [57]) ont ensuite mis en application avec succès cette technique

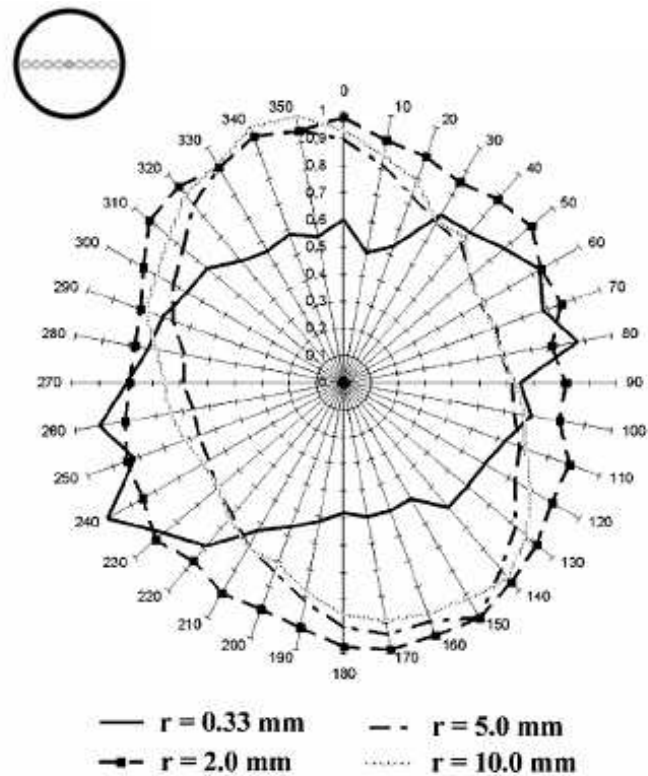


FIG. 24 : Signaux de réflectance normalisés de la peau humaine en fonction de la direction considérée par rapport au tissu. La géométrie du capteur est présentée en médaillon : plusieurs détecteurs sont alignés autour de la source de lumière. La mesure de la réflectance est représentée pour quatre distances source-détecteurs différentes (d'après [81]).

afin d'obtenir des informations sur l'alignement des fibres dans le tendon équin et pour contrôler de façon non destructive le développement de fibres de collagène selon une direction préférentielle dans des gels de collagène chargés de fibroblastes² et soumis à une contrainte mécanique uniaxiale.

Des modèles ([46], [55] et [57]) ajustant ce type de données optiques ont ensuite été nécessaires et utilisés par exemple par Binzoni et al. ([8]) pour mettre en évidence l'anisotropie du muscle squelettique humain dans le domaine proche infra-rouge.

De plus, le comportement des signaux de réflectance résolue spatialement avec une lumière polarisée a été récemment étudié par Sviridov et al. ([101]) sur des échantillons de peau et d'os. Leurs conclusions sont semblables à celles obtenues par Nickell et al. ([81]) : les ellipses décrites spatialement par les profils d'intensité de la lumière polarisée diffusée ont leur grand axe perpendiculaire ou parallèle à l'orientation des fibres de collagène en fonction de la distance à la source considérée.

Par ailleurs, différentes techniques polarimétriques ont été appliquées aux tissus biologiques humains par Yasui et al. ([135] et [136]). Dans une première publication ([136]), ils comparent l'efficacité des mesures de la lumière réfléchie, de la lumière transmise, de la fluorescence avec excitation à deux photons³, dite TPEAF, et de la génération de seconde harmonique⁴, dite SHG, pour déterminer l'orientation des fibres de collagène dans les tissus. Les résultats (cf. figure 25, page 55) indiquent que :

- La polarimétrie de la lumière réfléchie ne permet pas de caractériser l'orientation du collagène car les distributions obtenues sont quasi-circulaires.
- La polarimétrie de la lumière transmise montre des distributions en croix qui sont reliées à l'orientation des fibres de collagène mais ne permettent pas de distinguer les orientations longitudinale et transversale.

²Cellules du tissu conjonctif qui sécrètent les composés de la matrice extracellulaire et les protéines du tissu conjonctif.

³En spectroscopie de fluorescence conventionnelle, un fluorophore est excité grâce à l'absorption d'un photon. Dans des conditions spécifiques, cette excitation peut également se produire à partir de l'absorption simultanée de deux photons d'énergie inférieure via un état virtuel de courte durée.

⁴Processus d'optique non-linéaire dans lequel des photons interagissant avec un matériau non-linéaire sont combinés pour former de nouveaux photons avec le double de l'énergie et donc avec le double de la fréquence.

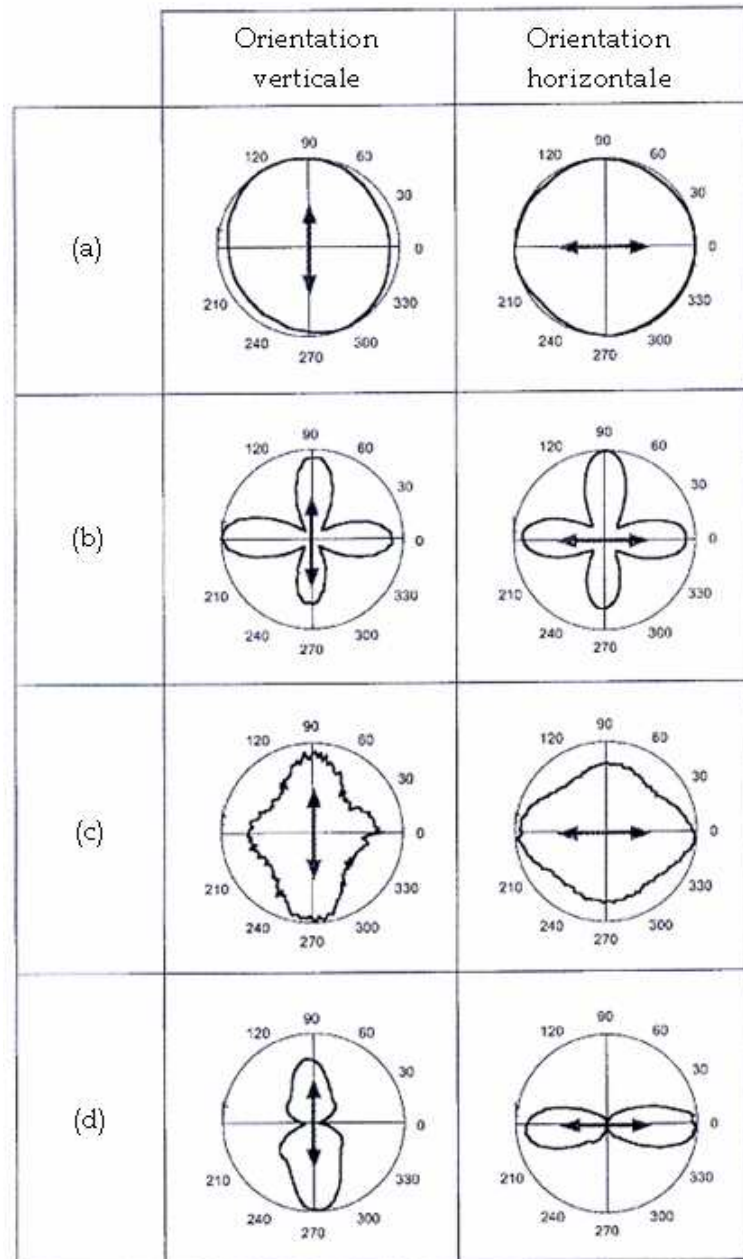


FIG. 25 : Comparaison de différentes méthodes polarimétriques appliquées au tendon d'Achille humain. Dans ces distributions angulaires, l'angle représente l'orientation de la polarisation (polariseur et analyseur parallèles) et l'amplitude représente l'intensité normalisée obtenue par réflexion de la lumière (a), transmission de la lumière (b), auto-fluorescence avec excitation à deux photons (c) et génération de seconde harmonique (d). Les flèches indiquent la direction réelle des fibres de collagène (d'après [136]).

- La polarimétrie de la fluorescence avec excitation à deux photons révèle un profil en ellipse dont l'axe principal est cohérent avec l'orientation du collagène. Les fluorophores responsables de l'émission avec un maximum à 425 nm ne sont pas identifiés. Les auteurs supposent qu'il s'agit d'acides aminés modifiés et d'agrégats de pyridinoline provenant du collagène et de l'élastine. Ils concluent ainsi que la polarimétrie de la fluorescence avec excitation à deux photons ne constitue pas une méthode fournissant directement une information sur l'orientation du collagène, mais fournissant une information indirecte sur l'environnement local du collagène et de l'élastine.
- La polarimétrie de la génération de seconde harmonique permet d'obtenir une distribution en forme de huit dont l'axe indique l'orientation des fibres de collagène. Cette forme est caractéristique d'une orientation uniaxiale des fibres.

Ainsi, Yasui et al. ([136]) concluent que la mesure de la génération de seconde harmonique en lumière polarisée est la méthode la plus sensible et que sa distribution dans l'espace permet de caractériser l'orientation et le degré d'organisation du collagène. Yasui et al. ([135]) ont ensuite utilisé cette méthode pour comparer l'orientation du collagène dans différents tissus biologiques (cf. figure 26, page 57) et caractériser en deux dimensions l'orientation du collagène dans le derme humain dans une seconde publication ([135]).

On peut remarquer que Williams et al. ([128]) discutent des principes fondamentaux gouvernant la génération de seconde harmonique. Ils appliquent cette méthode pour l'imagerie du collagène dans le tendon et expliquent que la génération de seconde harmonique provient, non pas de tout le volume des fibrilles de collagène, mais seulement de l'enveloppe extérieure.

De même, Lin et al. ([70]) et Sun et al. ([100]) utilisent la microscopie de la génération de seconde harmonique pour étudier les mécanismes de la dénaturation du collagène avec le chauffage. Le type d'image obtenu par Lin et al. ([70]) est présenté sur la figure 27, page 58. Sun et al. ([100]) mettent en évidence, en suivant la diminution en intensité de la génération de seconde harmonique, que la dénaturation se fait de façon progressive à des températures supérieures à 54 °C et en fonction de la durée de chauffage. Les images révèlent que les fibrilles de collagène ne se dénaturent pas simultanément. Des bandes alternant le collagène fibreux intact et le collagène dénaturé forment ainsi un signal que les auteurs qualifient de "tigré", perpendiculaire aux fibres de collagène. De

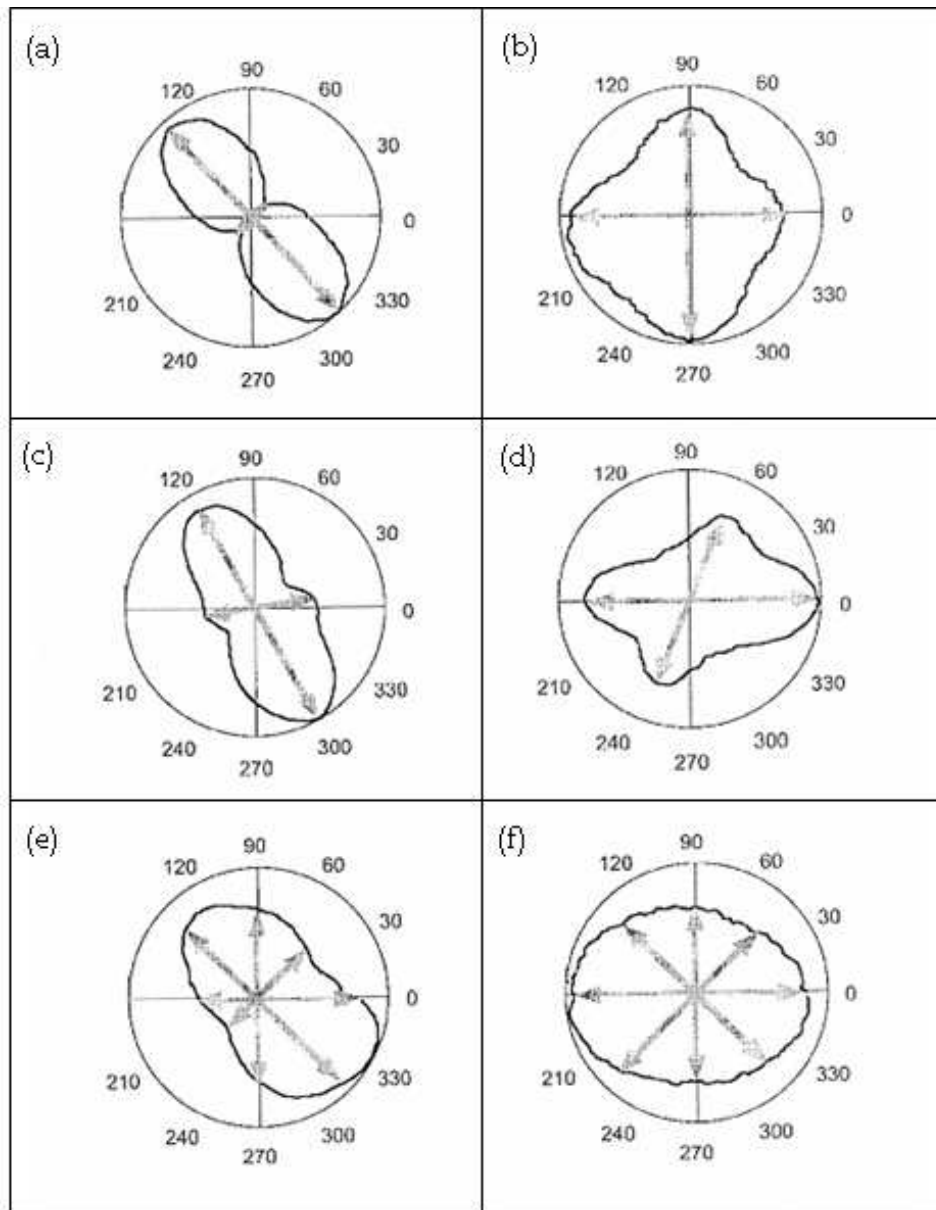


FIG. 26 : Distributions normalisées de l'intensité de la génération de seconde harmonique en fonction de l'orientation de la polarisation (polariseur et analyseur parallèles) par rapport à l'orientation de différents tissus : derme humain (a), dentine humaine (b), talus humain (c) et (d), peau de poulet (e) et éponge de collagène (f). Les flèches grises indiquent la direction espérée des fibres de collagène (d'après [136]).

plus, la décroissance de l'intensité du signal suggère qu'une dénaturation globale des fibrilles de collagène se fait de façon concurrente aux dénaturations locales. Par ailleurs, Lin et al. ([70]) démontrent que l'intensité de la génération de seconde harmonique est corrélée linéairement avec le raccourcissement que subit le collagène.

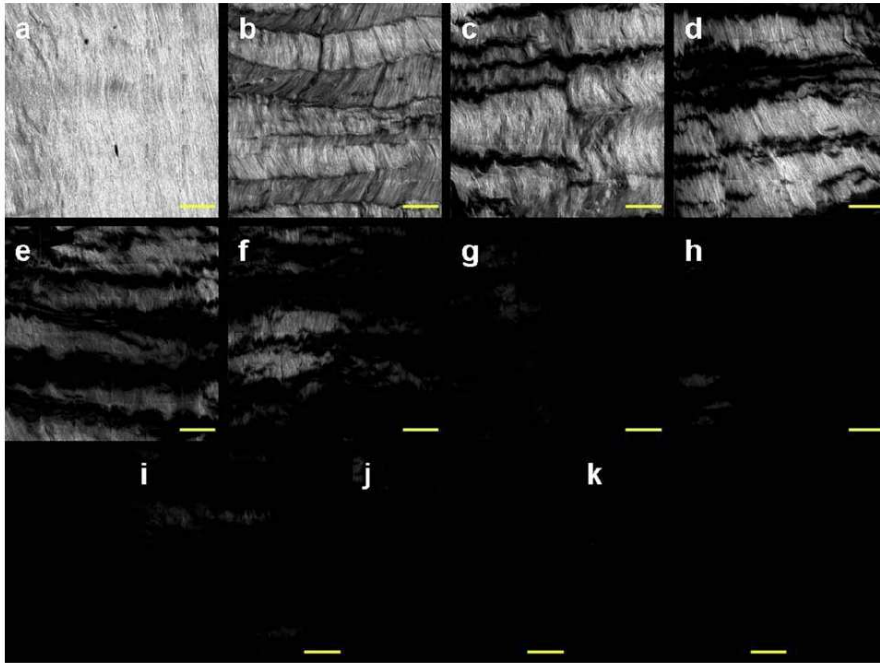


FIG. 27 : Images de la génération de seconde harmonique de tendons de queue de rat après traitement thermique à 58°C pendant 0 min (a), 1,5 min (b), 3 min (c), 4,5 min (d), 6 min (e), 7,5 min (f), 9 min (g), 10,5 min (h), 12 min (i), 13,5 min (j) et 15 min (k). Les barres représentent 100 μm (d'après [70]).

IV.3 Conclusion

L'étude de l'anisotropie de la fluorescence d'échantillons opaques structurés nécessite la mise en œuvre de méthodes spécifiques comme la spectroscopie et la microscopie frontales. Peu de publications relevant du domaine de la science des aliments utilisent la polarisation de fluorescence, contrairement à d'autres domaines. Les propriétés de structure des tissus musculaires ont été mises en évidence grâce à des méthodes de mesure optiques, polarimétriques ou non, résolues spatialement.

Chapitre V

Problématique et objectifs

L'analyse de la bibliographie met en lumière plusieurs points.

D'une part, l'étude de la structure des tissus du muscle, fibres musculaires et tissus conjonctifs, est une problématique concernant plusieurs domaines. Outre les recherches fondamentales visant à comprendre la biologie du muscle, le domaine du biomédical s'attache à la structure du muscle pour des applications à buts diagnostique et thérapeutique. La science des aliments, qui est le domaine qui concerne cette étude, a pour objectif de mieux comprendre l'évolution de l'organisation structurale des tissus musculaires avec les procédés de transformation *post mortem*. De façon pratique, elle a besoin d'élaborer des capteurs non destructifs de la qualité de la viande. De nombreuses méthodes optiques, pour la plupart récentes, ont donc été développées, afin d'étudier les propriétés de la structure des tissus musculaires. Ces techniques ont mis ainsi en évidence l'anisotropie des propriétés optiques des tissus musculaires, que leur confère leur organisation structurale : les intensités de diffusion, réflexion et transmission de la lumière au sein des tissus dépendent de la direction considérée. Les propriétés de polarisation de la lumière mises en jeu dans ces techniques sont alors généralement utilisées.

D'autre part, la spectroscopie de fluorescence est un outil de choix utilisé dans la science des aliments car il permet des mesures rapides, sensibles, sélectives et non destructives de caractérisation des produits. Les propriétés de fluorescence des tissus musculaires ont ainsi été l'objet des travaux de nombreux chercheurs, qui ont mis en évidence

les structures responsables de la fluorescence intrinsèque. Le tryptophane est ainsi l'acide aminé dont la fluorescence est la plus forte au sein des protéines musculaires, mais également peut-être la plus complexe étant donné ses propriétés spectrales. Dans les tissus conjonctifs, se sont principalement les liaisons de réticulation du collagène et de l'élastine qui ont été identifiées comme responsables de la fluorescence intrinsèque.

L'objectif de cette étude était d'exploiter ces deux approches en utilisant la polarimétrie de fluorescence pour étudier la structure des tissus musculaires ovins et bovins aux niveaux macroscopique et microscopique, dans le cadre des procédés de transformations *post mortem*. Plus précisément, le but de cette étude était de développer une méthode permettant de suivre l'évolution des structures microscopiques et mésoscopiques au cours des traitements technologiques du muscle. L'évaluation de l'anisotropie de fluorescence, mettant en œuvre la mesure de la polarisation de la fluorescence, a été appliquée avec succès dans les domaines de la science des polymères, de la science du bois et également du biomédical, pour obtenir des informations sur le degré d'organisation et/ou les modifications des propriétés de structure des échantillons considérés. Elle constitue ainsi une méthode potentiellement applicable aux tissus musculaires du domaine de la science des aliments.

Compte tenu des différentes approches présentées tout au long de l'étude bibliographique, l'étude de la structure des tissus musculaires a dû se faire en révélant non seulement l'anisotropie de fluorescence "intrinsèque" des tissus musculaires, due aux propriétés d'absorption et d'émission des fluorophores comme le tryptophane, mais elle a également dû rapporter l'anisotropie optique "de structure" provenant de l'alignement préférentiel des structures tissulaires et mise en évidence grâce à des mesures résolues angulairement. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées dans cette étude pour solliciter la fluorescence intrinsèque des tissus musculaires n'ont pas été réétudiées et en accord avec la publication de Skjervold et al. ([96]) les couples de fluorescence utilisés ont été 290/~332 nm pour les fibres musculaires et 380/~440 nm pour les tissus conjonctifs. En revanche, la mise au point de dispositifs expérimentaux dédiés à la mesure de l'anisotropie de fluorescence résolue angulairement a été une étape indispensable. Ainsi, une problématique importante est d'adapter le spectrofluorimètre conventionnel dont dispose

le laboratoire à une mesure juste et rapide de l'anisotropie de fluorescence macroscopique des échantillons. Parallèlement, les mesures microscopiques ont mis en œuvre un microscope de fluorescence polarisant initialement conçu pour ce type d'expérimentations.

Deuxième partie

Dispositifs expérimentaux

Chapitre I

Instrumentation pour la spectroscopie de fluorescence

La mise en œuvre de la spectroscopie de fluorescence en lumière polarisée nécessite une bonne compréhension de l'instrumentation et une attention considérable doit être portée aux éléments expérimentaux [62]. Dans un premier temps sont présentés les principaux composants d'un spectrofluorimètre conventionnel, tel que celui dont nous disposons initialement pour cette étude (cf. figure 28). Puis, il convient d'expliquer les modifications que nous avons apportées à cet instrument pour l'adapter aux mesures de polarisation de fluorescence d'échantillons opaques, en insistant sur les précautions prises pour constituer une chaîne de mesure fiable. Enfin, le protocole expérimental pour réaliser une mesure d'anisotropie de fluorescence est explicité.

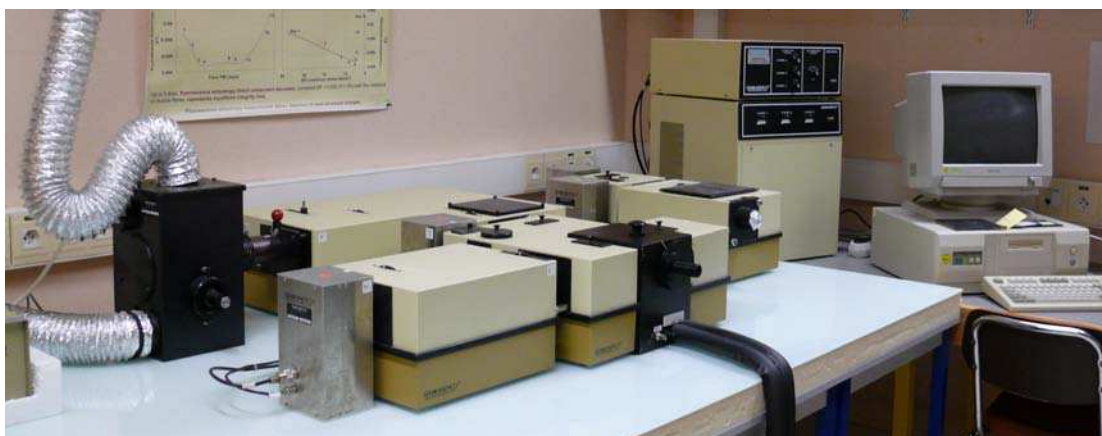


FIG. 28 : Spectrofluorimètre SLM Aminco 8000C.

I.1 Présentation du spectrofluorimètre

I.1.1 Principe général de fonctionnement

La figure 29 montre le schéma d'un spectrofluorimètre conventionnel dont le principe de fonctionnement va être détaillé.

Une lumière polychromatique, émise par la source de lumière, est dirigée vers le monochromateur d'excitation qui sélectionne la longueur d'onde d'excitation focalisée sur l'échantillon. La fluorescence émise est ensuite collectée à angle droit par rapport au faisceau incident à travers le monochromateur d'émission et reçue par le détecteur. Le module optique contient un porte-échantillon, des obturateurs, des filtres, des séparateurs de faisceau et des polariseurs.

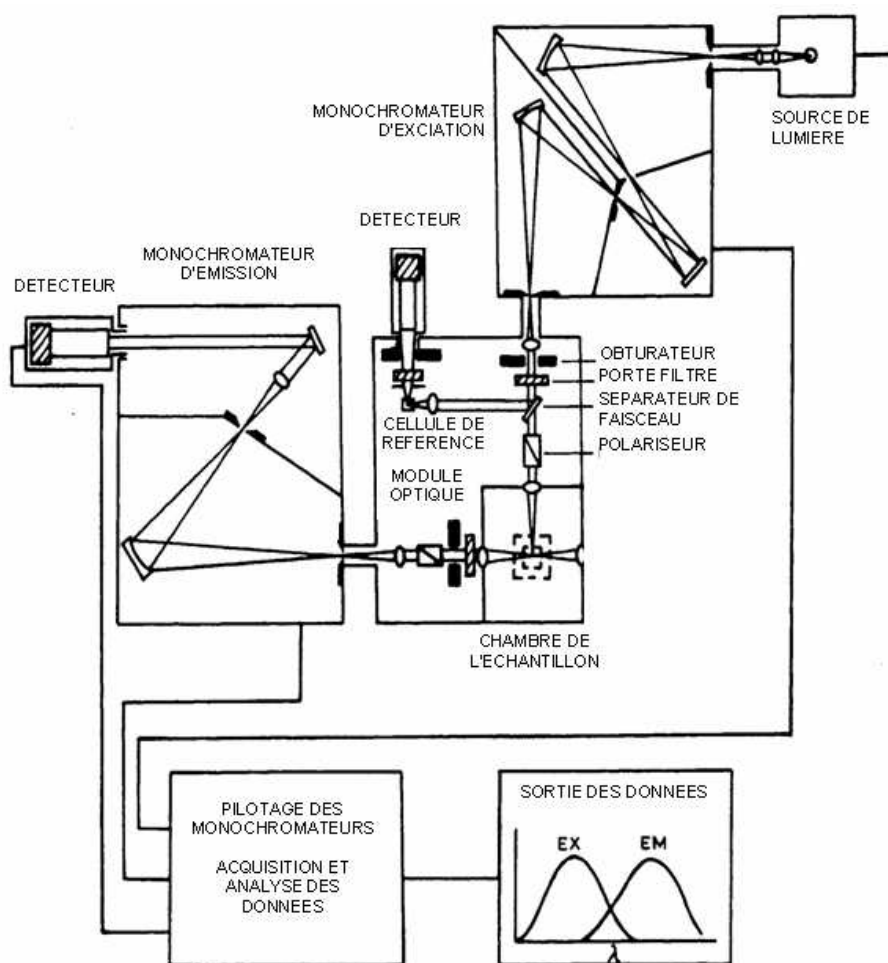


FIG. 29 : Schéma d'un spectrofluorimètre (d'après [62]).

séparateur de faisceau, constitué d'une lame de quartz réfléchissant un faible pourcentage du faisceau d'excitation vers un compteur de quanta. Ce dernier se compose d'une cellule contenant une solution dont le rendement quantique d'absorption est indépendant de la longueur d'onde d'excitation. L'intensité de la lumière collectée par le détecteur de référence est donc proportionnelle à l'intensité du faisceau d'excitation, quelle que soit sa longueur d'onde, permettant ainsi de prendre en compte les fluctuations temporelles de l'intensité de la lampe. Le module de commande permet le pilotage automatique en longueur d'onde des monochromateurs qui sont motorisés, et l'acquisition des données. Un spectre d'émission représente les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission, la longueur d'onde d'excitation étant fixée, tandis qu'un spectre d'excitation correspond aux variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour une longueur d'onde d'émission fixée. La valeur numérique de l'intensité de fluorescence n'a pas de sens étant donné le rôle joué par les facteurs instrumentaux et cette intensité doit donc être exprimée en unités arbitraires. [62]

Un spectrofluorimètre est donc l'instrument qui est utilisé dans le but de mesurer l'intensité de fluorescence d'un échantillon (la quantité relative de photons de fluorescence) en fonction de la longueur d'onde. Cependant, pour obtenir ces données, le spectrofluorimètre doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Une source de lumière délivrant une quantité de photons constante quelle que soit la longueur d'onde.
- Des monochromateurs transmettant les photons avec la même efficacité de transmission quelle que soit la longueur d'onde.
- Des détecteurs détectant les photons avec la même efficacité quelle que soit la longueur d'onde.

Malheureusement, les caractéristiques de ce spectrofluorimètre idéal ne sont pas vérifiées expérimentalement car de tels composants n'existent pas. Ainsi, la dépendance en longueur d'onde des propriétés des sources de lumière, des monochromateurs et des détecteurs entraîne une déformation des spectres de fluorescence mesurés. Les monochromateurs présentent d'autres imperfections pouvant introduire de la lumière parasite dans le signal de fluorescence arrivant jusqu'au détecteur. Enfin, la réalisation de mesures en lumière pola-

risée apporte également des difficultés supplémentaires car l'efficacité de transmission des monochromateurs dépend également de la polarisation de la lumière. [62]

Afin de prendre en compte les difficultés inhérentes aux caractéristiques de ces composants du spectrofluorimètre, la partie suivante détaille leur principe de fonctionnement et leurs spécificités.

I.1.2 Description des principaux composants

I.1.2.1 La source de lumière

La source de lumière la plus généralement utilisée est une lampe au Xénon, qui émet un spectre continu de 250 nm jusqu'à l'infrarouge. Cette plage de longueur d'onde est appropriée pour la plupart des mesures de fluorescence effectuées sur les échantillons biologiques. L'intensité d'émission de ce type de source de lumière varie en revanche avec la longueur d'onde, ce qui introduit des modifications sur les spectres d'excitation. [62]

I.1.2.2 Les monochromateurs

Les monochromateurs sont les composants les plus communément utilisés pour extraire les longueurs d'onde souhaitées de la lumière de la lampe à l'excitation et de l'échantillon à l'émission. Leur principe de fonctionnement repose sur la dispersion, généralement accomplie par des réseaux de diffraction, de la lumière polychromatique selon les différentes longueurs d'onde. Cette dispersion est habituellement exprimée en nanomètre par millimètre. La largeur de la région spectrale sélectionnée par un monochromateur dépend finalement de la largeur de la fente de sortie du monochromateur. [62]

L'efficacité de transmission d'un monochromateur dépend de sa géométrie, de la longueur d'onde et de la polarisation de la lumière, comme le montre l'exemple de la figure 30, page 69 . Il en découle que l'intensité de fluorescence mesurée dépend de la polarisation de cette émission de fluorescence, et que les spectres d'émission peuvent être déformés. Cette propriété est d'autant plus importante à prendre en considération dans notre étude puisque l'on souhaite mesurer l'anisotropie de fluorescence, comme le détaille le paragraphe I.3.2 page 80. [62]

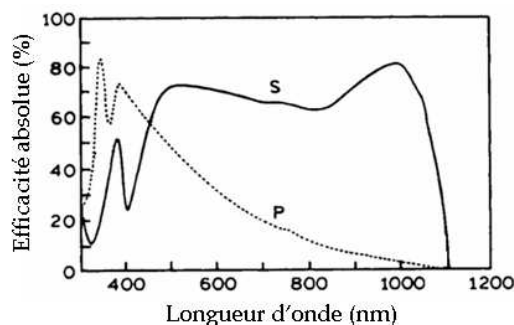


FIG. 30 : Exemple de courbes d'efficacité de transmission d'un réseau pour des lumières polarisées perpendiculairement (S) et parallèlement (P) au plan d'incidence ([62]).

I.1.2.3 Les détecteurs

La plupart des spectrofluorimètres utilisent des tubes photomultiplicateurs (TPM). Ce type de détecteur délivre un courant proportionnel à l'intensité lumineuse. Les photons sont reçus individuellement par la photocathode (potentiel négatif) qui génère par effet photoélectrique des électrons. Ces photoélectrons sont ensuite accélérés vers une série de dynodes (potentiel négatif supérieur à celui de la photocathode) et vont produire par interaction une émission secondaire d'électrons. A leur arrivée sur l'anode (potentiel positif), les électrons donnent naissance à une impulsion électrique. On peut remarquer que l'efficacité quantique de la photocathode est très variable selon le type de matériau utilisé et n'est pas constante avec la longueur d'onde. On peut noter également que les dispositifs à transfert de charges (dits CCD de l'anglais Charged Coupled Devices) sont de plus en plus utilisés. [62]

I.2 Modifications apportées au spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre dont nous disposions était un SLM Aminco 8000C. Il était équipé d'une lampe au Xénon, d'un monochromateur d'excitation à double réseau, d'un module optique équipé d'un porte cuve, d'un monochromateur d'émission simple réseau et de deux tubes photomultiplicateurs (voies principale et de référence). Avec pour objectif d'adapter cet instrument à la mesure d'anisotropie de fluorescence sur des tissus biologiques, les principales modifications apportées ont été l'ajout de polariseurs et la réalisation d'un porte-échantillon rotatif adapté à la fluorescence frontale.

I.2.1 Les polariseurs

Un polariseur est un composant qui transmet la lumière dont le champ électrique est parallèle à son axe principal, et bloque la lumière dont le champ électrique en est perpendiculaire (cf. figure 31). Il permet ainsi de sélectionner un plan de polarisation de la lumière.

Les polariseurs les plus utilisés sont généralement de type Glan-Thompson (cf. figure 32). Ils sont constitués de deux prismes de calcite biréfringents, c'est-à-dire dont l'indice de réfraction dépend à la fois de la direction de propagation et de l'état de polarisation. L'angle des deux cristaux a été calculé de telle manière que les rayons lumineux dont la polarisation est parallèle à l'axe optique soient transmis, alors que les rayons lumineux vibrant dans un plan de polarisation orthogonal sont totalement réfléchis et absorbés par un matériau enveloppant le calcite. Cet ensemble est monté dans un cylindre. Ce type de polariseur présente l'avantage d'avoir un fort coefficient d'extinction (environ 10^6) et une bonne efficacité de transmission dans l'Ultra Violet et le visible. [62]

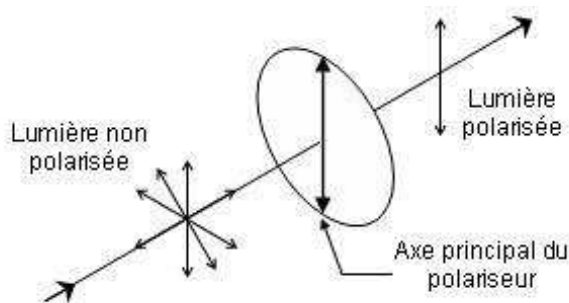


FIG. 31 : Transmission de la lumière à travers un polariseur (d'après [62]).

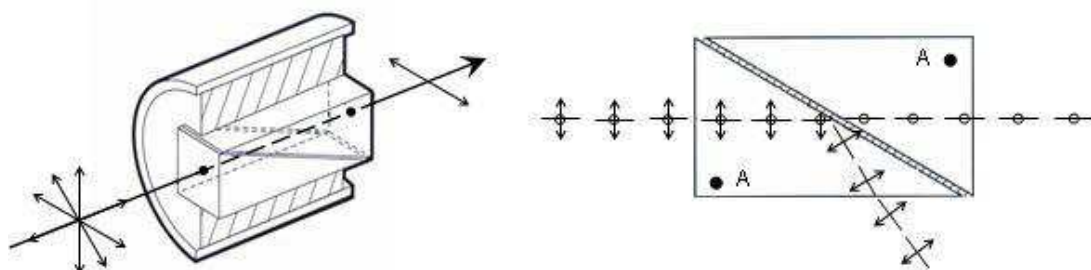


FIG. 32 : Polariseur Glan-Thompson (gauche) et trajets optiques de la lumière dans les prismes (droite). A = axe optique du cristal (d'après [62]).

Initialement, le spectrofluorimètre SLM Aminco 8000C n'était pas équipé de polariseur, mais disposait de porte-polariseurs motorisés pour la rotation. Deux polariseurs Glan-Thompson UV (Melles Griot) ont été acquis et ont été fixés dans les porte polariseurs. Ce dispositif permet de maîtriser l'orientation de leur axe principal.

L'alignement initial des polariseurs a été vérifié et ajusté selon le protocole proposé par Lakowicz ([62]). On utilise une suspension diluée de silice colloïdale dans l'eau (Ludox, Sigma). La lumière diffusée par cette solution est polarisée à 100 %. Le polariseur situé à l'excitation est d'abord placé avec son axe principal orienté approximativement verticalement, sachant que la lumière diffusée par la suspension est polarisée verticalement. L'alignement du polariseur situé à l'émission est ajusté pour observer une intensité minimale¹, correspondant à une orientation horizontale de son axe. De la même manière, l'alignement du polariseur situé à l'excitation peut-être effectué en plaçant le polariseur situé à l'émission en position verticale : le minimum et le maximum d'intensité sont observés pour des positions respectivement horizontale et verticale du polariseur situé à l'excitation. La lumière diffusée par la suspension étant 100% polarisée, son anisotropie est égale à 1. Lakowicz ([62]) indique qu'en pratique, l'alignement des polariseurs est correct lorsque l'anisotropie mesurée est supérieure à 0,97. Il convient de noter ici que cet alignement devrait en toute rigueur être établi sans le monochromateur d'émission, celui-ci étant sensible à la polarisation et donc susceptible de fausser cet alignement. Cependant, notre dispositif expérimental ne permettant pas de le retirer, l'alignement a été réalisé avec le monochromateur d'émission. Toutefois, après avoir suivi cette procédure d'alignement, la valeur de l'anisotropie obtenue a été de 0,98, ce qui a permis de valider cette démarche.

I.2.2 Le porte-échantillon

Le signal de fluorescence dépend de la densité optique et de la géométrie de l'échantillon. La configuration de mesure la plus commune dite à « angle droit » est présentée sur la figure 33, page 72. Le faisceau lumineux traverse la cuve contenant la solution de

¹Il est en effet généralement conseillé de rechercher un minimum d'intensité, plutôt qu'un maximum d'intensité (correspondant ici à une orientation verticale) qui est moins facilement repérable.

fluorophores et l'émission de fluorescence, qui se propage dans toutes les directions, est recueillie selon une direction perpendiculaire. Cependant, comme déjà précisé lors de l'étude bibliographique², cette méthode de mesure n'est applicable qu'aux milieux transparents. Pour des matériaux opaques et solides il est nécessaire d'utiliser une géométrie de mesure de fluorescence frontale. C'est la fluorescence émise en surface qui est alors détectée.

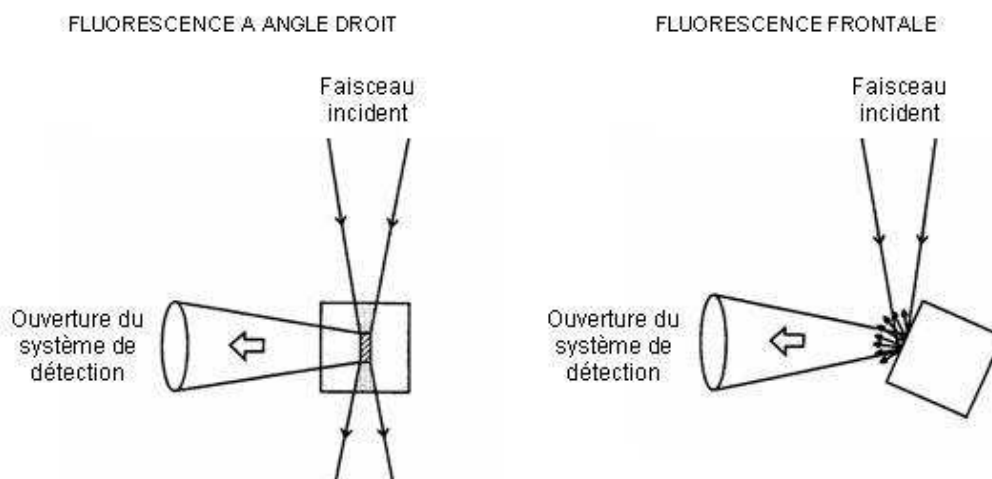


FIG. 33 : Schéma des différentes géométries de mesure de la fluorescence (d'après [118]).

Initialement, le spectrofluorimètre SLM Aminco 8000C était seulement équipé d'un porte cuve destiné à la fluorescence à angle droit. Afin d'étudier l'anisotropie de fluorescence de tissus biologiques, un porte-échantillon adapté à la mesure frontale a donc dû être conçu. L'application prévue impliquait que le porte-échantillon réalisé vérifie les spécifications suivantes :

- Système de rotation motorisé et commandé automatiquement afin de permettre la modification de l'angle azimutal de l'échantillon défini comme l'angle entre l'axe des fibres de l'échantillon et un axe de référence, qui dans notre cas a été choisi vertical.
- Conditionnement en température, afin de maintenir les échantillons biologiques en bon état de conservation et à température constante.
- Système permettant de modifier l'angle d'incidence du faisceau lumineux par rapport au plan de l'échantillon.

²Cf. paragraphe III.3 de la première partie, page 35.

Afin de répondre au besoin d'un système de rotation motorisé et commandé automatiquement, la solution adoptée a impliqué l'utilisation d'un moteur déjà présent dans le spectrofluorimètre. En effet, utiliser un composant issu de l'instrument présente l'avantage que sa commande est déjà intégrée au logiciel du spectrofluorimètre. De plus, les codes de programmation du logiciel n'étant pas connus, y implémenter des commandes correspondant à un nouveau composant était difficilement envisageable.

Une seconde voie de détection étant disponible au sein de l'instrument, mais pas nécessaire à l'application souhaitée, le moteur de commande de la rotation du porte polariseur présent sur cette voie a été désolidarisé de son emplacement et placé dans la chambre de l'échantillon. Un porte-échantillon a été conçu autour de cet élément afin de satisfaire à toutes les spécifications requises. Les échantillons ont été montés dans la partie mobile, représentée en vue éclatée sur la figure 34, page 74, entre un support et un couvercle avec une fenêtre circulaire en quartz de 15 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur, ayant de bonnes propriétés de transmission dans le domaine de l'Ultra Violet. Ce bloc a été ensuite fixé par aimantation sur l'axe de rotation du moteur, lui même placé sur un support statique, comme montré sur la figure 35, page 74.

L'intensité de fluorescence variant avec la température, une régulation thermique a été mise en place afin de maintenir les échantillons biologiques à température constante. La température a été choisie à 4 ° C afin de conserver les échantillons à une température proche de celle du stockage en chambre froide. La régulation comprenait plusieurs niveaux :

- Au niveau de la pièce de travail grâce à une climatisation de l'air ambiant.
- Au niveau de la chambre de mesure par l'intermédiaire d'un système de radiateurs à circulation d'eau froide et d'une isolation avec du liège.
- Au niveau du porte-échantillon lui même où la partie mobile est placée en contact avec un circuit de circulation d'eau froide fixé sur la partie statique. Le circuit est visible en gris clair sur les figures 34 et 35, page 74.

Dans des conditions où la pièce est maintenue à une température ambiante de 20 ° C et où la température de l'eau du circuit de refroidissement est de 1 à 2 ° C, l'échantillon est refroidit à (4 +/- 1) ° C après une période de stabilisation de 10 à 15 minutes après la mise en place de la partie mobile du porte-échantillon sur son ensemble.

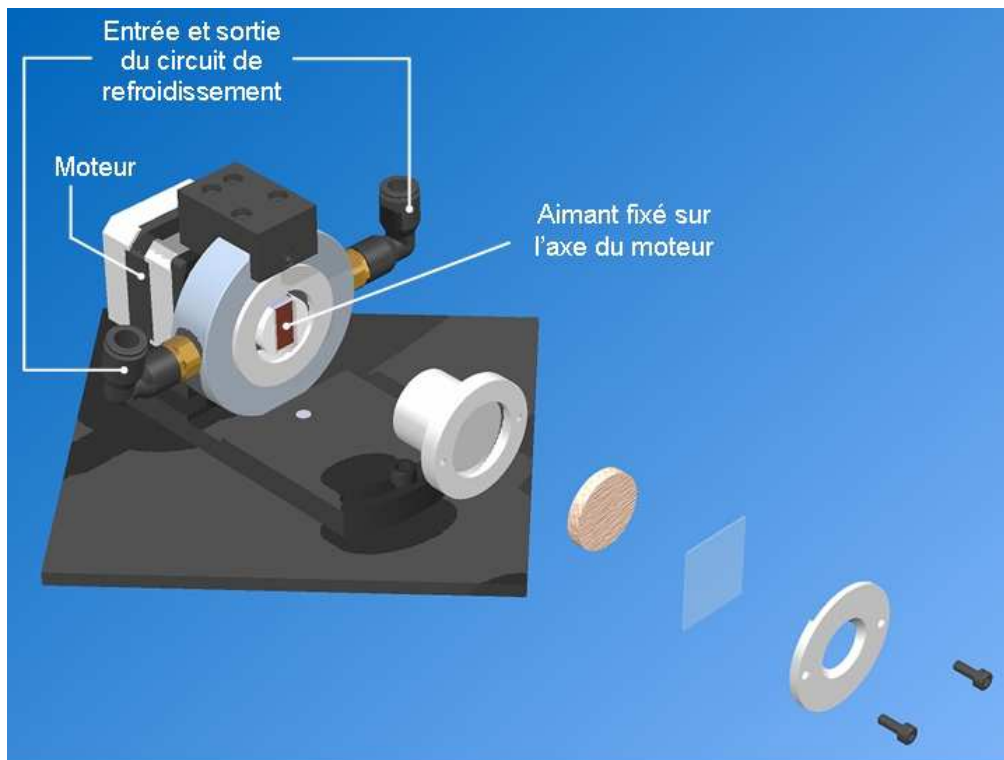


FIG. 34 : Vue éclatée de la partie mobile du porte-échantillon avec un échantillon biologique et vue assemblée de la partie statique du porte-échantillon supportant le moteur.

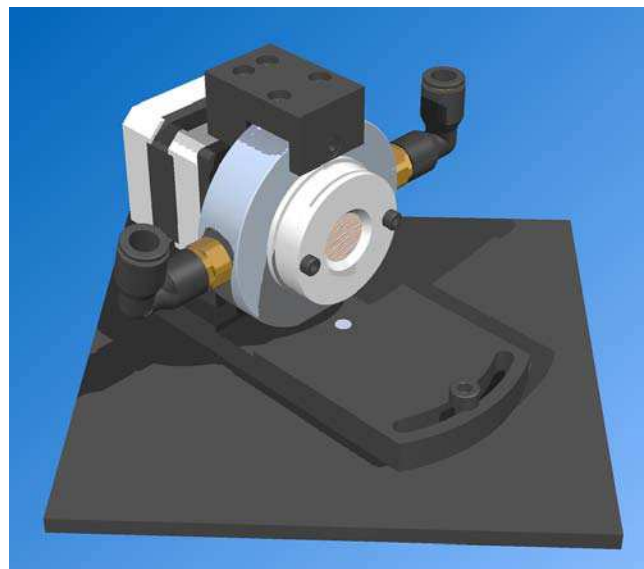


FIG. 35 : Vue assemblée du porte-échantillon avec les parties statique et mobile, contenant un échantillon biologique.

Un autre paramètre expérimental étudié lors de la conception du porte-échantillon a été l'épaisseur de l'échantillon. En effet, la diffusion des photons de la lumière excitatrice et de fluorescence dans les tissus induit des dépolarisations qui ont pour effet la variation de l'anisotropie de fluorescence avec l'épaisseur de l'échantillon. On peut dire de façon générale que plus un échantillon est épais, plus il y aura de dépolarisation de la lumière due à la diffusion, conduisant ainsi à une valeur plus faible de l'anisotropie de fluorescence. Il a été montré par Mohanty et al. ([77]) avec du tissu mammaire que l'anisotropie de fluorescence diminue rapidement dans le 1^{er} millimètre du tissu. Pour des épaisseurs plus grandes, la diminution de l'anisotropie de fluorescence est moins importante (cf. figure 20, page 48). Dans la cas de notre étude, les ressources techniques dont nous disposions ne nous ont pas permis de découper dans les tissus des échantillons d'épaisseur inférieure à 1 mm. Nous avons donc étudié l'influence de l'épaisseur de l'échantillon sur la valeur de l'anisotropie de fluorescence pour des épaisseurs allant de 1 à 5 mm. Les résultats expérimentaux ont montré que l'anisotropie de fluorescence n'était pas sensible à des changements d'épaisseur dans cette gamme, en accord avec Mohanty et al. ([77]). L'épaisseur de l'échantillon n'a pas été définie comme un paramètre critique pour nos expériences de fluorescence. En revanche, on peut noter que des mesures de l'anisotropie de diffusion ($\lambda_{exc}=\lambda_{em}$) effectuées à titre prospectif sur ces mêmes échantillons ont en revanche montré une variabilité relativement plus importante dans les résultats obtenus pour les différentes épaisseurs. Finalement, la géométrie que nous avons retenue pour les échantillons est un disque de 25,4 mm de diamètre et d'épaisseur 4 ± 1 mm. Lors des expérimentations, les échantillons ont donc été découpés aux dimensions adaptées à des emplacements choisis aléatoirement dans le muscle ou la trame de collagène et de telle façon que l'axe principal des fibres soit parallèle à la surface de l'échantillon.

I.3 Éléments à maîtriser pour une mesure fiable

Le spectrofluorimètre a donc été adapté à la mesure d'anisotropie de fluorescence en mode frontal grâce à l'intégration de polariseurs et d'un porte-échantillon adapté. Ces modifications peuvent être la source d'erreurs de mesure dont l'expérimentateur doit être avisé afin de prendre les précautions nécessaires pour obtenir une mesure fiable.

Weber ([127]) a commenté les sources d'erreurs systématiques présentes lors des mesures de fluorescence en lumière polarisée. Il les a classées comme suit :

- Erreurs provenant d'un mauvais alignement des composants.
- Erreurs provenant de la lumière parasite.
- Erreurs provenant de la taille de la source de lumière.

Jameson et Croney ([50]) ont noté que, pour cette dernière source d'erreur, l'ouverture numérique des lentilles utilisées était un facteur important à prendre en compte si l'on souhaite faire des mesures précises de la polarisation de fluorescence. A noter que dans le cas d'un spectrofluorimètre conventionnel, tel un SLM, la déviation de la polarisation mesurée n'est que de quelques pourcents.

La figure 36 représente ainsi de façon schématique la chaîne de mesure et les grandeurs d'influence que nous allons considérer.

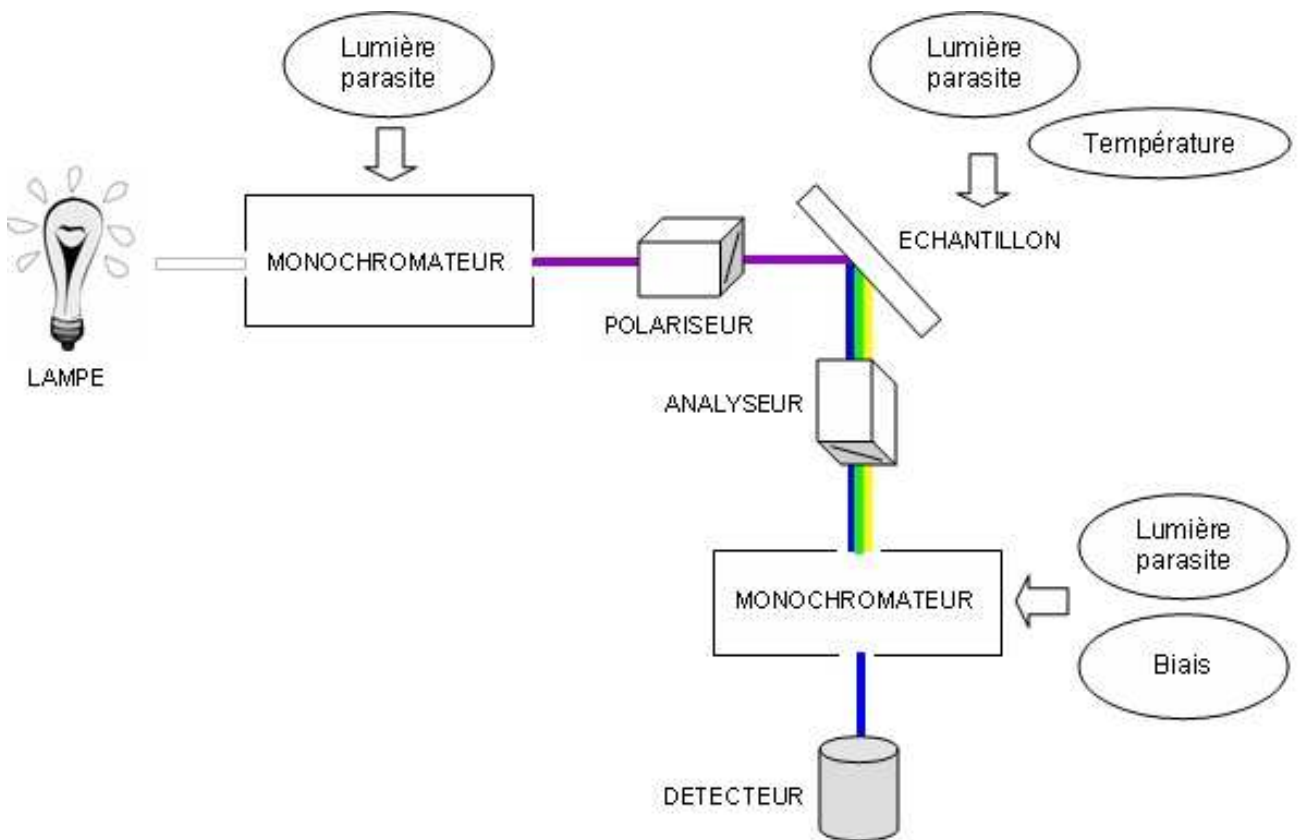


FIG. 36 : Schéma des différents éléments de la chaîne de mesure et des grandeurs d'influence.

Afin d'obtenir les intensités de fluorescence, il était en effet indispensable de maîtriser :

- La lumière parasite, qui doit être réduite au minimum.
- Le biais créé par l'instrumentation en fonction de la polarisation, qui se corrige par le calcul d'un facteur de correction appelé facteur G.

Les parties qui suivent présentent les moyens mis en place lors de cette thèse afin de réduire ou corriger l'effet de ces grandeurs d'influence. Il convient de noter que la figure 36 fait référence à la température comme grandeur d'influence de la chaîne de mesure, et que son cas a déjà été traité (cf. paragraphe I.2.2).

I.3.1 Réduction de la lumière parasite

Définition et origine de la lumière parasite

La lumière parasite est un phénomène critique pour la mesure de fluorescence et dont doit avoir connaissance un expérimentateur averti. La lumière parasite a été définie par Jameson et al. ([51]) comme toute lumière transmise par le monochromateur à une longueur d'onde différente de celle choisie. Lorsqu'elle provient du monochromateur d'excitation, la lumière parasite qui arrive sur un échantillon turbide peut être diffusée par celui-ci et être renvoyée vers le détecteur, interférant ainsi avec la mesure de l'intensité de fluorescence.

La lumière parasite est due à des défauts inhérents aux monochromateurs. Jameson et Cronney ([50]) ont évoqué en effet la possibilité de retrouver sur les spectres d'émission des pics de lumière d'intensité relativement faible qui seraient transmis par le monochromateur et appelés fantômes de Rayleigh. On répertorie également les anomalies de Wood, découvertes par le scientifique du même nom en 1902, provenant de singularités dans les caractéristiques des réseaux de diffraction dans des régions spectrales définies. Ces anomalies dépendent de la polarisation de la lumière incidente et sont présentes lorsque la lumière est polarisée perpendiculairement aux traits du réseau. Elles apparaissent lorsqu'un ordre de diffraction est tangent au plan du réseau et proviendraient de l'excitation d'une résonance électromagnétique de surface présente sur la surface métallique, appelée résonance plasmonique [51]. Les anomalies de Wood se traduisent finalement par une brutale chute de l'intensité de lumière transmise polarisée perpendiculairement.

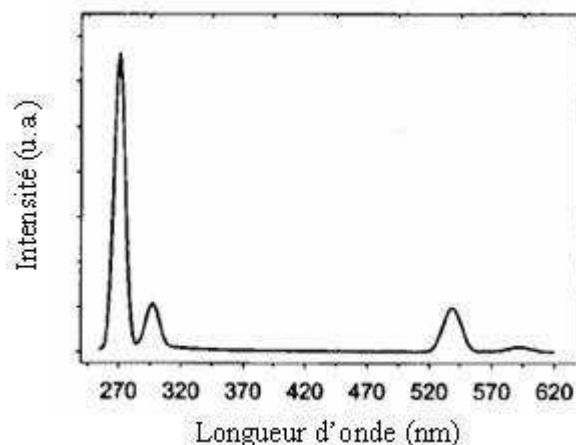


FIG. 37 : Spectre d'émission avec une excitation à 270 nm (d'après [51]).

De la même manière, une autre source de lumière indésirable peut atteindre le détecteur : la lumière diffractée à un ordre supérieur par le monochromateur. Elle provient des propriétés du réseau qui pour une longueur d'onde λ souhaitée, laissera en fait passer la lumière pour toutes les longueurs d'onde égales à $j\lambda$, j étant un entier. La figure 37 illustre ce phénomène. Pour une excitation à 270 nm, on retrouve sur le spectre d'émission deux pics à 270 et 540 nm correspondant respectivement à la diffusion Rayleigh de l'excitation et du second ordre. Les deux autres pics présents sur le spectre de la figure 37 sont dus à la diffusion Raman du solvant au premier et au second ordre. Sur un spectre d'émission, la diffusion Raman est identifiable grâce au fait que sa position dépend de la longueur d'onde d'excitation. Jameson et al. ([51]) indiquent une expression permettant de calculer approximativement la longueur d'onde λ_R du pic Raman de l'eau :

$$\frac{1}{\lambda_R} = \frac{1}{\lambda_{exc}} - 0,00034 \quad (16)$$

La définition de la lumière parasite donnée par Jameson et al. ([51]) peut toutefois être complétée en précisant que la lumière parasite est constituée par toute lumière, autre que la fluorescence, arrivant jusqu'au détecteur et qui serait assimilée à de la fluorescence. Cette nouvelle formulation inclut ainsi dans la lumière parasite, la lumière constituée directement par la faisceau d'excitation qui, arrivant sur un échantillon turbide peut d'une part être diffusée par celui-ci et d'autre part être réfléchié par le quartz du porte-échantillon. Si cette lumière est renvoyée vers le détecteur et que sa longueur d'onde se trouve dans la gamme de longueur d'onde d'émission de fluorescence mesurée, elle

interférera alors avec la mesure de l'intensité de fluorescence. Cette situation peut plus particulièrement se présenter lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence de l'échantillon sont relativement proches.

Dispositions prises pour réduire la lumière parasite

La lumière parasite a d'abord été réduite grâce à l'insertion de filtres optiques :

- Un filtre passe-bande sur le chemin de la lumière d'excitation dont la longueur d'onde est centrée sur la longueur d'onde d'excitation souhaitée.
- Un filtre passe-haut sur le chemin de la lumière d'émission dont la longueur d'onde de coupure est légèrement inférieure à la longueur d'onde d'émission de fluorescence.

Le tableau 1 détaille les filtres que nous avons acquis et intégrés à la chaîne de mesure afin de mesurer la fluorescence des composants du muscle.

	A l'excitation Filtre interférentiel (passe-bande)	A l'émission Filtre coloré (passe-haut)
Fibres musculaires	Longueur d'onde centrale à 289 nm Largeur à mi-hauteur de 10 nm Melles Griot 03FIM022	Coupure à 50% à 324 nm WG320
Tissu conjonctif	Longueur d'onde centrale à 380 nm Largeur à mi-hauteur de 10 nm Melles Griot 03FIU014	Coupure à 50% à 435 nm GG435

TAB. 1 : Filtres utilisés pour réduire la lumière parasite lors de la mesure de la fluorescence des fibres musculaires ($\lambda_{exc} = 290$ nm, $\lambda_{em} \approx 335$ nm) et du tissu conjonctif ($\lambda_{exc} = 380$ nm, $\lambda_{em} \approx 450$ nm).

Un autre moyen de réduire la lumière parasite était de prendre en compte l'angle d'incidence du faisceau d'excitation sur l'échantillon. En effet, l'observation de la fluorescence se fait à un angle de 90° par rapport à la lumière incidente. Ainsi, orienter le porte échantillon avec un angle de 45° par rapport au faisceau engendre la détection d'une importante quantité de lumière provenant de la réflexion spéculaire sur le porte-échantillon. Cette lumière réfléchie est polarisée verticalement et si elle est assimilée à de la fluorescence elle induit une augmentation de la valeur de l'anisotropie de fluorescence "apparente". La

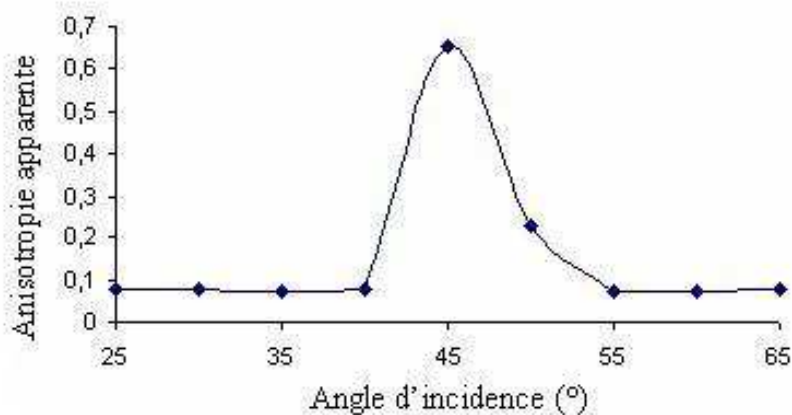


FIG. 38 : Anisotropie de fluorescence apparente d'un échantillon de fibres musculaires en fonction de l'angle d'incidence du faisceau d'excitation sur la fenêtre du porte-échantillon.

figure 38 illustre ce phénomène. Elle confirme qu'un angle de 45° n'est pas une configuration de mesure satisfaisante. L'angle d'incidence sur l'échantillon qui a été choisi pour les mesures est de 35° . comme le précise Lakowicz ([62]), cette configuration présente deux avantages : moins de lumière réfléchie atteint le détecteur, et le faisceau exciteur est distribué sur une surface plus large de l'échantillon, rendant ainsi la mesure moins sensible au positionnement du porte-échantillon.

On notera que dans une configuration de mesure où on utilise des longueurs d'onde d'excitation et d'observation égales (cas intéressant pour l'étude des propriétés de diffusion de la lumière dans les échantillons), il a été constaté expérimentalement que le choix d'un angle d'incidence de 35° n'est pas suffisant pour éliminer la lumière parasite provenant de la réflexion spéculaire. La mesure de l'anisotropie de la lumière diffusée n'est donc pas possible car elle est artificiellement biaisée.

I.3.2 Détermination du facteur de correction instrumentale G

Un autre facteur instrumental à prendre en compte pour la maîtrise de la chaîne de mesure est l'efficacité de détection de l'instrumentation qui varie avec la polarisation de l'émission de fluorescence. Ce phénomène provient principalement des caractéristiques des monochromateurs à réseau dont le rendement de transmission dépend de la polarisation (cf. figure 30, page 69). Sans correction, la chaîne de détection est anisotrope.

Principe général de la méthode de correction pour la fluorescence à angle droit

Reprenons l'équation définissant l'anisotropie de fluorescence r , présentée dans le paragraphe II.2 de la première partie, page 19 :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (17)$$

où I_{\parallel} et I_{\perp} sont les composantes de l'intensité de fluorescence respectivement polarisées parallèlement et perpendiculairement à la direction de polarisation incidente, non biaisées par le système. Dans le cas d'un échantillon dont la fluorescence n'est pas polarisée, les intensités I_{\parallel} et I_{\perp} sont en théorie égales. En pratique, les intensités mesurées sont différentes et affectées d'erreurs. On notera alors respectivement I_{VV} et I_{VH} les intensités mesurées expérimentalement. Dans cette notation, le premier indice indique l'orientation du polariseur et le deuxième indice celle de l'analyseur, V et H correspondant respectivement à vertical et horizontal. La figure 39 (à gauche) illustre ce problème avec une excitation verticale.

Lakowicz ([62]) et Valeur ([118]) proposent une méthode afin de prendre en compte et corriger le biais des mesures d'intensité. Si on note S_V et S_H les sensibilités de la

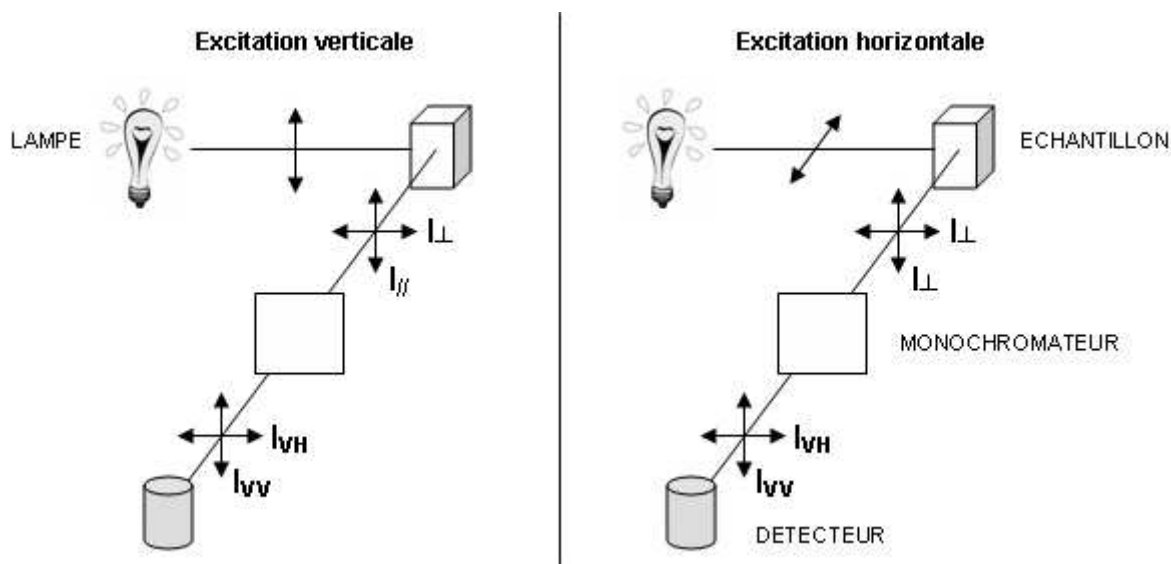


FIG. 39 : Schéma montrant la mesure de l'anisotropie de fluorescence en mode angle droit pour des excitations verticale et horizontale (d'après [62]).

voie d'émission du spectrofluorimètre pour les composantes de la lumière de polarisation verticale et horizontale, pour une excitation polarisée verticalement, les intensités de fluorescence peuvent alors s'écrire :

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad (18)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} \quad (19)$$

où k est un facteur de proportionnalité prenant en compte d'autres facteurs instrumentaux indépendants de la polarisation. Le rapport des deux équations 18 et 19 donne :

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (20)$$

L'équation 20 montre que pour déterminer le rapport des valeurs de I_{\parallel} et I_{\perp} à partir du rapport des mesures de I_{VV} et I_{VH} , il est nécessaire de déterminer la valeur du facteur G ³, qui est le rapport des sensibilités du système de détection pour les polarisations verticale et horizontale.

Cette détermination peut être effectuée en réalisant deux mesures d'intensité supplémentaires avec une lumière incidente polarisée horizontalement, comme le montre la figure 39 (à droite), page 81. Dans le cas d'une excitation horizontale, les composantes de la fluorescence horizontale et verticale sont égales à cause de la distribution des états excités. En effet, en se rapportant à la figure 8, présentée dans l'étude bibliographique page 21, si l'on considère que la lumière excitatrice qui arrive selon l'axe x a une direction de polarisation horizontale (c'est-à-dire dans le plan $x - y$), alors la distribution des états excités est "basculée" et son axe principal, qui était auparavant orienté selon l'axe z , devient l'axe y . L'observation se faisant selon ce même axe, les composantes de la fluorescence vues dans les directions parallèle et perpendiculaire sont alors en théorie égales. Valeur ([118]) évoque également le principe de Curie⁴ pour justifier cette égalité.

Les intensités de fluorescence mesurées sont alors différentes uniquement à cause du biais de la voie d'émission de l'instrument :

$$I_{HV} = kS_V I_{\perp} \quad (21)$$

$$I_{HH} = kS_H I_{\perp} \quad (22)$$

³dit G pour Grating, c'est-à-dire réseau

⁴Un effet ne peut pas être plus dissymétrique que la cause qui en est responsable

En écrivant le rapport des équations 21 et 22 on obtient :

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G \quad (23)$$

L'équation 23 permet alors d'obtenir la valeur du facteur G et de déterminer la valeur non biaisée du rapport de I_{\parallel} et I_{\perp} à partir des mesures de I_{VV} et I_{VH} en utilisant l'équation 20. L'anisotropie s'écrit finalement :

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (24)$$

Lors d'expériences en fluorescence conventionnelle pour mesurer l'anisotropie de fluorescence de fluorophores en solution, le facteur G est donc mesuré directement par la mesure de I_{HV} et I_{HH} juste avant la mesure de I_{VV} et I_{VH} . Il est important de souligner que la valeur du facteur G varie avec la longueur d'onde d'émission de façon inhérente aux biais des monochromateurs.

Adaptation de la méthode de correction pour la fluorescence frontale des tissus biologiques

La méthode de correction du biais instrumental proposée par Lakowicz ([62]) et Valeur ([118]) n'était pas directement applicable dans le cas des mesures que nous souhaitons réaliser. En effet, il était impossible de déterminer le facteur G par la mesure de I_{HV} et I_{HH} lorsque l'échantillon était en place en raison de son anisotropie. Dans une telle situation, on ne peut pas appliquer le principe de Curie et les composantes horizontale et verticale de l'intensité de fluorescence ne sont en théorie plus égales.

Nous avons donc décidé de déterminer le facteur G préalablement aux expérimentations sur les échantillons biologiques en plaçant dans le porte-échantillon une solution fluorescente choisie de façon adéquate. L'utilisation du mode frontal ne posant *a priori* pas de problème pour le respect du principe de Curie, la mesure des intensités de fluorescence I_{HV} et I_{HH} donnait des valeurs différentes uniquement à cause du biais de l'instrument. La mesure de ces deux intensités sur l'ensemble du spectre de fluorescence de la solution permettait ainsi d'établir un abaque de la valeur du facteur G sur la gamme de longueurs

d'onde concernée. Dans le cas de l'étude des tissus biologiques, il était nécessaire de déterminer la valeur du facteur G pour les longueurs d'onde que nous sommes susceptibles d'utiliser c'est-à-dire :

- autour de 330 nm pour la fluorescence des fibres musculaires.
- autour de 450 nm pour la fluorescence du tissu conjonctif.

Une étude a été réalisée afin de déterminer les solutions fluorescentes qui se prêtent le mieux à cette détermination. Pour valider les résultats obtenus en mode frontal, nous les avons comparés aux résultats obtenus avec les mêmes échantillons en mode angle droit, considéré comme référence. Les valeurs de l'anisotropie de fluorescence des solutions obtenues selon les deux configurations ont été comparées puisqu'elles devaient être égales. Nous n'avions pas d'*a priori* sur les valeurs du facteur G à obtenir pour une même longueur d'onde selon ces deux modes car elles n'étaient pas nécessairement égales à cause du changement de porte-échantillon. En revanche, les variations relatives du facteur G avec la longueur d'onde, suivant notamment les variations d'efficacité de transmission du monochromateur d'émission, devaient être semblables.

Pour établir l'abaque du facteur G autour du 330 nm, nous avons réalisé des mesures avec différentes solutions contenant du tryptophane : protéines sarcoplasmiques, L-tryptophane, sérum d'albumine bovine et suspensions de fibres musculaires broyées dans de l'eau à différentes concentrations. La longueur d'onde d'excitation de ces solutions était celle du tryptophane : 290 nm. L'intérêt d'utiliser différentes concentrations était de vérifier que la densité optique des solutions n'avait pas d'influence sur les valeurs du facteur G obtenues. Pour déterminer l'abaque du facteur G autour de 450 nm une solution de quinine a été choisie. Cette molécule fluoresce en effet dans le même domaine que le tissu conjonctif puisqu'elle émet autour de 450 nm lorsqu'elle est excitée vers 350 nm. Le tableau 2 page 85 récapitule les solutions réalisées et les résultats obtenus.

Les solutions de protéines sarcoplasmiques ont été réalisées par l'équipe Biochimie et Protéines du Muscle (BPM) de l'unité QuaPA par extraction après homogénéisation d'un muscle, puis centrifugation (cf. protocole d'extraction décrit par Sayd et al. ([92])). Pour

Type de solution	Concentration (g/l)	Densité Optique à 290 nm	Anisotropie de fluorescence	
			angle droit	frontale
Protéines sarcoplasmiques	0,025	0,0277	0,089 +/- 0,024	0,050 +/- 0,035
	0,05	0,0574	0,092 +/- 0,025	0,085 +/- 0,027
	0,1	0,1121	0,094 +/- 0,014	0,099 +/- 0,024
	0,5	0,4990	0,089 +/- 0,009	0,111 +/- 0,013
	1,0	0,9490	0,100 +/- 0,007	0,118 +/- 0,011
albumine de sérum de boeuf	0,08	0,08 *	0,098 +/- 0,021	N.D.
	1,0	1,0 *	0,112 +/- 0,011	0,124 +/- 0,008
	5,0	5,0 *	0,115 +/- 0,008	0,127 +/- 0,006
L-tryptophane	0,008	0,178	-0,006 +/- 0,006	0,004 +/- 0,012
	0,08	1,482	-0,003 +/- 0,003	0,002 +/- 0,006
Suspensions de fibres broyées	+	N.D.	0,107 +/- 0,004	0,104 +/- 0,005
	++	N.D.	0,107 +/- 0,007	0,116 +/- 0,008
Quinine	N.D.	N.D.	-0,004 +/- 0,001	0,009 +/- 0,001

TAB. 2 : Caractéristiques des solutions utilisées pour la mesure du facteur G . * indique que la valeur a été déterminée par interpolation. L'anisotropie de fluorescence est la valeur moyenne obtenue autour du pic de fluorescence. N.D. signifie Non Déterminé

obtenir une gamme de concentration, des dilutions dans de l'eau ont été effectuées à partir de la solution mère à 1 g/l. Des analyses chromatographiques sur gel réalisées par l'équipe BPM ont permis de déterminer que le poids moléculaire des protéines présentes dans cette solution initiale est réparti de 10 à 80 kDa. La densité optique a été mesurée à 290 nm avec un spectrophotomètre Beckman DU640 disponible dans cette même équipe.

Différentes solutions d'albumine de sérum de boeuf et de L-tryptophane ont été préparées. Le poids moléculaire de l'albumine de sérum de boeuf est de 70 kDa et celui du L-tryptophane est de 204 Da.

Les suspensions de fibres musculaires broyées ont été obtenues en broyant des fibres musculaires avec de l'eau distillée. Après un repos de 24 heures, les fibres les plus grosses

s'étant décantées, on a prélevé dans la phase supérieure une suspension homogène. Une suspension moins concentrée a été obtenue en procédant de la même manière mais en rajoutant pour une même quantité de fibres, une quantité d'eau plus importante.

Chacune des solutions préparées a été placée dans les porte-échantillons pour fluorescence à angle droit (cuvette en quartz) et fluorescence frontale. Les quatre spectres d'émission ont été enregistrés. D'après l'équation 23 (page 83), les spectres de I_{HV} et I_{HH} permettent de déduire la valeur du facteur G . Puis, en utilisant l'équation 24 (page 83), les spectres de I_{VV} et I_{VH} permettent de calculer l'anisotropie de fluorescence. Un exemple de résultat détaillé est présenté sur la figure 40. On constate dans un premier temps que les spectres de fluorescence I_{HV} et I_{HH} ne sont pas semblables alors qu'ils sont en théorie identiques : ceci met en évidence les imperfections du monochromateur d'émission dont l'efficacité de transmission est différente pour des polarisations horizontale et verticale. Dans un deuxième temps, on peut remarquer sur les spectres de fluorescence I_{HV} et I_{VH} un épaulement autour de 370 nm. Nous attribuons cette chute d'intensité à une anomalie de Wood du monochromateur (cf. §I.3.1, page 77) en accord avec Jameson et al. ([51]).

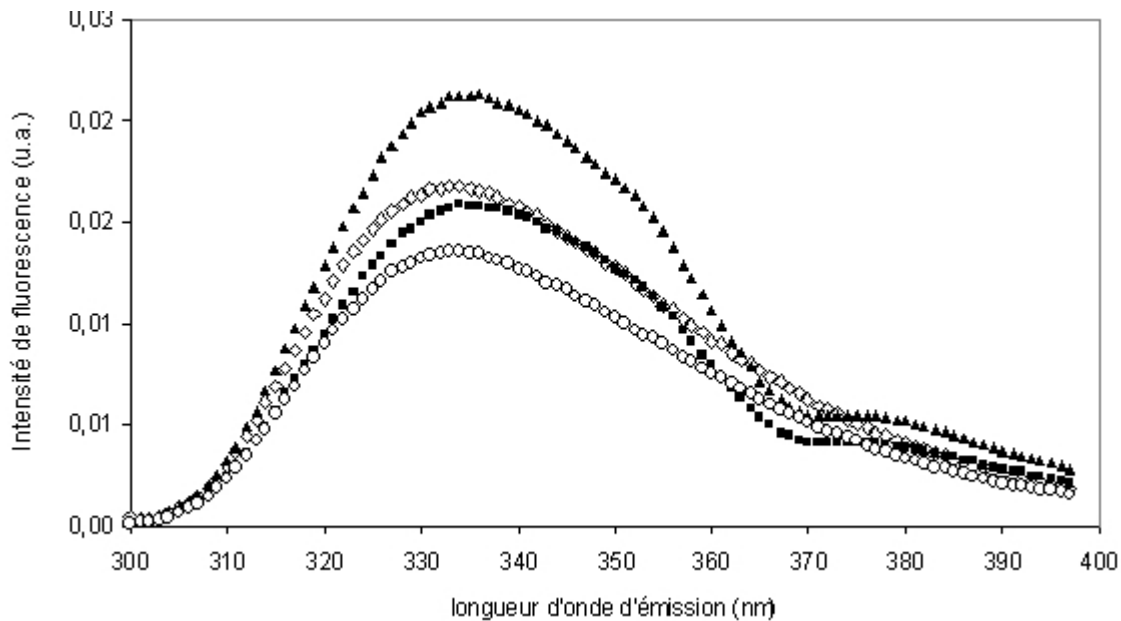


FIG. 40 : Spectres d'émission de fluorescence frontale normalisés d'une suspension de fibres musculaires peu concentrée : I_{VV} (\diamond), I_{VH} (\blacksquare), I_{HV} (\circ) et I_{HH} (\blacktriangle).

La figure 41, page 88 compare les valeurs du facteur G obtenues avec les différentes solutions selon les deux modes de mesure de fluorescence. On exclura de la discussion les résultats obtenus pour les solutions de protéines sarcoplasmiques faiblement concentrées (0,025 et 0,05 g/l). Les spectres sont en effet trop bruités à cause de la relativement faible intensité de fluorescence, expliquant l'écart-type important obtenu sur les valeurs de l'anisotropie de fluorescence. On peut d'abord remarquer que les variations du facteur G sont superposables en mode angle droit et frontal, mais sont légèrement décalées en ordonnée. On constate également que les valeurs du facteur G obtenues sont proches pour toutes les solutions utilisées. Les courbes montrent le même pic autour de 370 nm correspondant à la correction de l'anomalie de Wood précédemment identifiée. Par ailleurs, si l'on se rapporte à l'anisotropie de fluorescence trouvée pour les différentes solutions et qui est donnée dans le tableau 2, page 85, on peut constater que les valeurs concordent entre les deux modes de mesure, ce qui valide le protocole utilisé en fluorescence frontale. Il convient de remarquer que l'anisotropie de fluorescence des solutions de L-tryptophane est nulle, contrairement aux autres solutions, à cause du faible poids moléculaire en accord avec l'équation de Perrin (cf. équation 12 page 23). De façon générale, la concentration des solutions n'influe pas significativement sur la valeur de l'anisotropie de fluorescence, ce qui indique qu'il n'y a pas d'effet de la densité optique pour ces solutions.

Les valeurs du facteur G obtenues autour de 450 nm à l'aide de la solution de quinine se trouvent dans la continuité de celles obtenues autour de 330 nm. La courbe présente un pic autour de 510 nm qui pourrait correspondre à une seconde anomalie de Wood du monochromateur. Il convient de remarquer que nous ne disposons pas de filtre passe bande centré sur la longueur d'onde d'excitation de la quinine (350 nm). Par conséquent, l'acquisition des spectres de fluorescence de ces solutions a été effectué sans filtre à l'excitation. Toutefois, l'émission de fluorescence de la quinine se trouvant à une longueur d'onde relativement grande par rapport à l'excitation, la lumière parasite était dans ce cas moindre.

D'après les résultats de cette étude, il convient de conclure que les échantillons d'albumine de sérum de boeuf à 5 g/l et de quinine constituent des solutions fluorescentes adéquates pour construire un abaque des valeurs du facteur G en fluorescence frontale et dans les régions spectrales utiles pour ce travail de thèse. Nous les avons donc retenues.

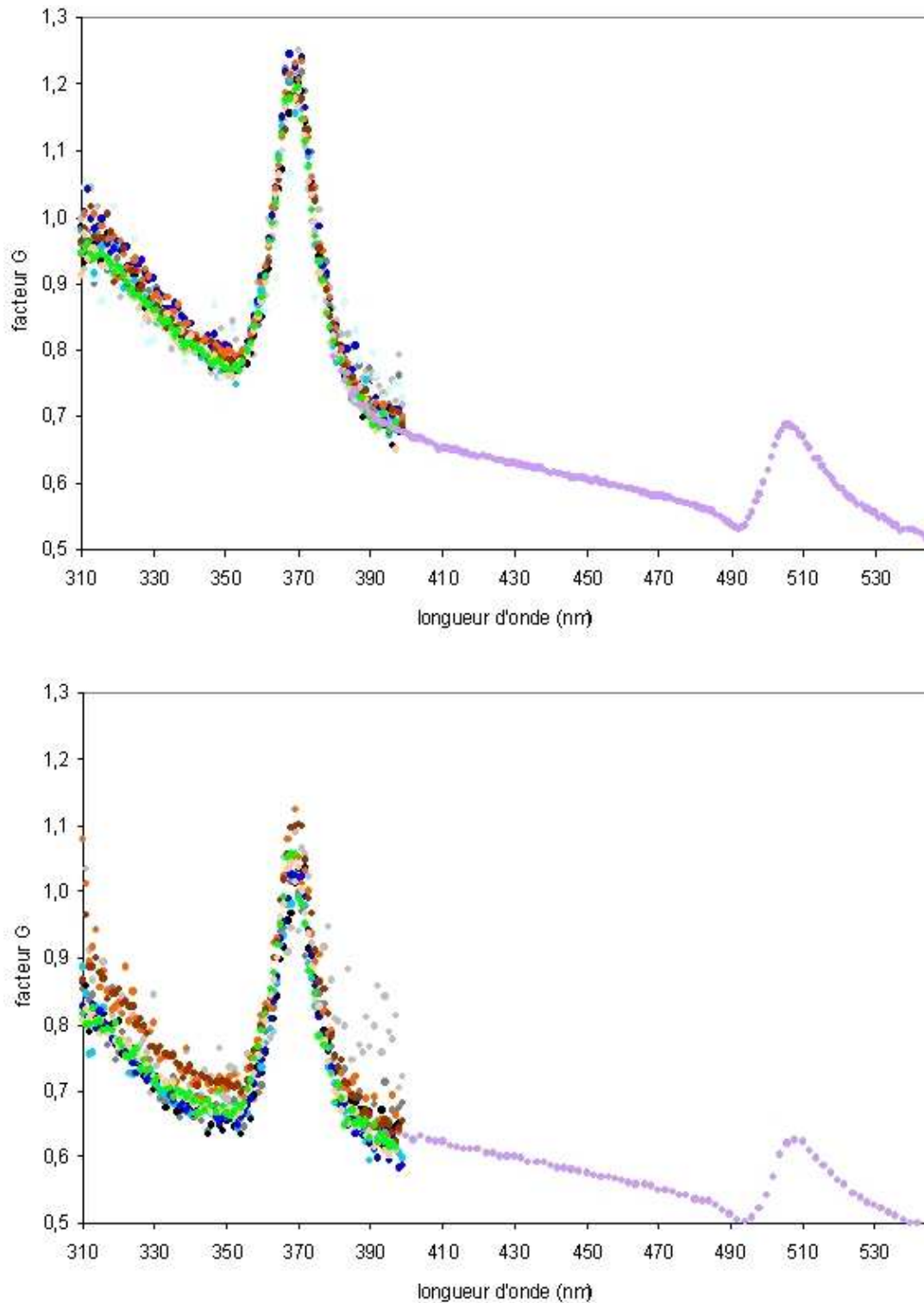


FIG. 41 : Facteur G en fonction de la longueur d'onde obtenu avec différentes solutions en fluorescence à angle-droit (en haut) et frontale (en bas) : protéines sarcoplasmiques à 0,1 g/l (●), 0,5 g/l (●) et 5 g/l (●) ; albumine de sérum de boeuf à 0,08 g/l (●), 1 g/l (●) et 5 g/l (●) ; L-tryptophane à 0,08 g/l (●) et 0,8 g/l (●) ; suspensions de fibres musculaires broyées diluée (●) et concentrée (●) ; quinine (●).

I.4 Protocole de mesure avec le spectrofluorimètre⁵

La mise en route du dispositif expérimental inclut l'allumage de la lampe au Xénon, la mise sous tension du module de commande et de l'ordinateur et la mise en marche du bain thermostaté assurant la régulation thermique des échantillons.

Après préparation et mise en place de l'échantillon dans la partie mobile du porte-échantillon, celle-ci est déposée vingt minutes dans la chambre froide à 5 ° C afin de stabiliser la température de l'échantillon. Puis, l'ensemble est positionné sur la partie statique du porte-échantillon, l'axe principal des fibres de l'échantillon étant orienté verticalement.

Après placement des filtres optiques et réglage de la longueur d'onde d'excitation du monochromateur adaptée à la mesure de la fluorescence du tissu étudié (cf. tableau 1 page 79), puis réglage de la tension et du gain des photomultiplicateurs afin d'obtenir un signal correct, un spectre d'émission de fluorescence est acquis. Sur ce spectre, la longueur d'onde d'émission correspondant à l'intensité de fluorescence maximale est relevée. Le monochromateur d'émission étant alors positionné sur la longueur d'onde d'émission maximale, un programme d'acquisition automatique est lancé, commandant la mesure des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} en fonction de l'angle azimutal de l'échantillon.

Un programme écrit sous Matlab assure finalement le traitement des données et leur correction avec la valeur du facteur G , obtenue pour la longueur d'onde d'émission de travail d'après l'abaque présenté sur la figure 41 page 88, pour calculer la valeur de l'anisotropie de fluorescence d'après l'équation 24 page 83. Pour chaque mesure effectuée, on obtient donc la distribution angulaire des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence r de 0 à 360 °. Afin de réduire le bruit de mesure dû à des éventuelles inhomogénéités de l'échantillon, ces distributions angulaires sont moyennées en profitant de la symétrie axiale de l'échantillon. Pour un échantillon dont l'axe principal est initialement orienté verticalement, les positions 0 ° et 90 ° par exemple sont en théorie respectivement symétriques aux positions 180 ° et 270 °.

⁵Le mode opératoire de mesure est présenté en intégralité dans l'annexe C et les réglages dans l'annexe D.

Chapitre II

Instrumentation pour la microscopie de fluorescence

La mise en œuvre de la microscopie de fluorescence en lumière polarisée a été réalisée de façon plus aisée que la spectroscopie de fluorescence. En effet, un microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i (cf. figure 42 page 92) a été acquis par le laboratoire pour l'application à ce travail de thèse. Ainsi, le cahier des charges de l'instrument acheté correspondait précisément aux besoins que nécessite cette application : plateau porte-échantillon rotatif manuel et présence d'un polariseur, d'un analyseur et de filtres de fluorescence adaptés. Le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i étant donc initialement adapté aux mesures d'anisotropie de fluorescence d'échantillons tels que les tissus biologiques, aucune modification de l'instrument n'a été nécessaire, contrairement au cas du spectrofluorimètre SLM Aminco 8000C. Il convient toutefois de noter que les composants optiques de ce microscope ne permettaient pas de travailler dans le domaine des longueurs d'onde inférieures à 300 nm. Ainsi, l'instrument dont nous disposons ne permettait pas d'observer la fluorescence intrinsèque des fibres musculaires. Il était en revanche adapté pour étudier d'autres tissus qui fluorescent, intrinsèquement ou extrinsèquement, à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission supérieures. Nous nous en sommes ainsi servi pour étudier l'anisotropie de fluorescence intrinsèque des fibres de collagène, en fonction de l'angle entre la direction de l'échantillon et la direction de la polarisation.



FIG. 42 : Microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i.

II.1 Présentation du microscope de fluorescence

II.1.1 Principe général de fonctionnement

L'approche la plus courante de la microscopie de fluorescence est l'épi-illumination dont le principe de fonctionnement est illustré par la figure 43 page 93 :

La lumière polychromatique est envoyée vers l'échantillon à travers un cube filtre qui illumine l'échantillon avec une longueur d'onde choisie. Le cube filtre est constitué de deux filtres et d'un séparateur de faisceau. Une fraction de la fluorescence émise est collectée à travers l'objectif et renvoyée à travers le cube filtre en direction d'un détecteur (œil ou caméra). Le miroir dichroïque et le filtre d'émission empêchent la lumière d'excitation d'atteindre le détecteur. Le travail en lumière polarisée s'effectue en intégrant un polariseur et un analyseur (polariseurs dichroïques) sur les chemins des faisceaux d'excitation et d'émission. La configuration de mesure en épi-fluorescence est de façon générale plus avantageuse que la mesure par transmission de fluorescence car elle n'est pas influencée par des facteurs comme l'épaisseur et l'opacité de l'échantillon. [69] et [90]

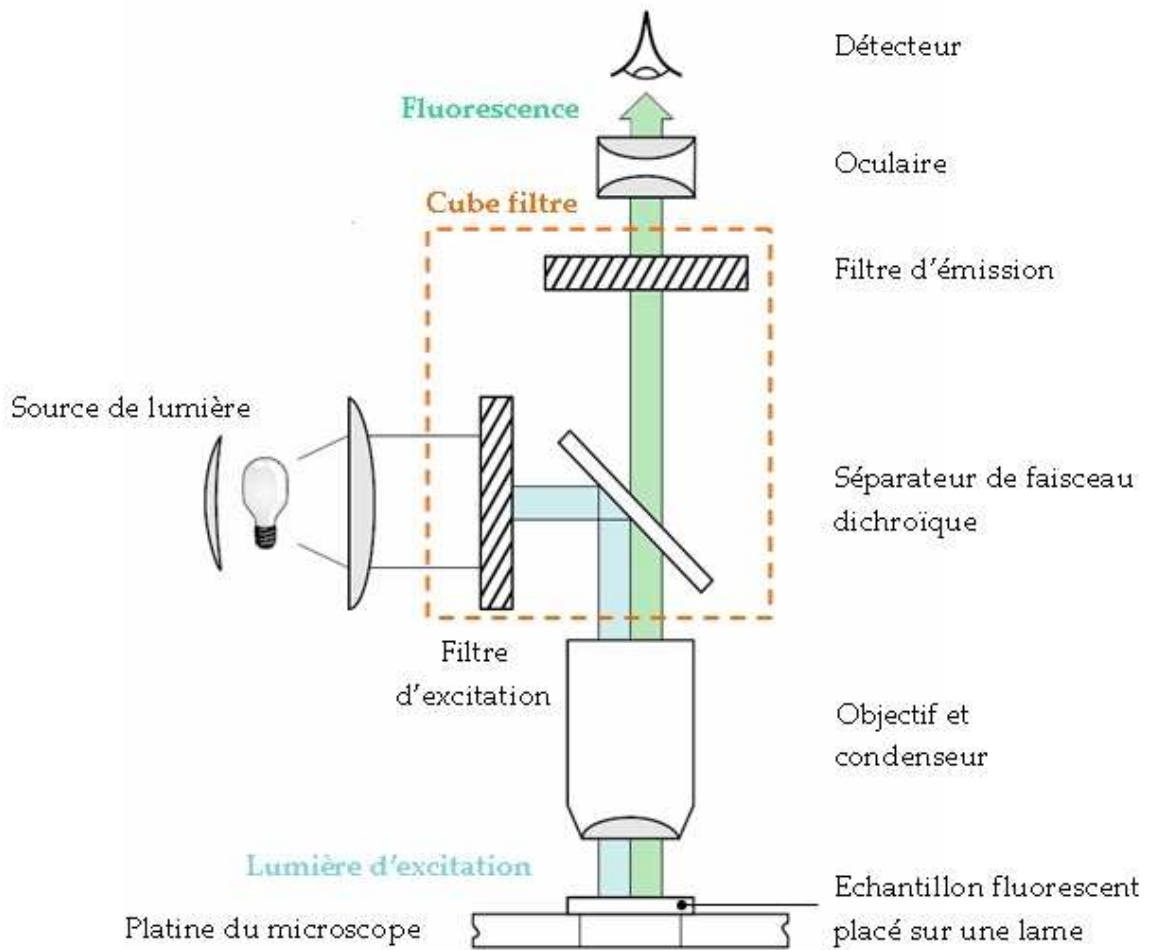


FIG. 43 : Schéma de principe d'un microscope à épi-fluorescence (d'après [90]).

II.1.2 Description des principaux composants

II.1.2.1 La source de lumière

Trois types de source de lumière pour l'excitation sont communément utilisés pour la microscopie de fluorescence : les lampes halogène quartz, à vapeur de mercure et au xénon. Les deux derniers types de sources permettent de couvrir les domaines de l'ultra violet, du visible et de l'infrarouge, le xénon ayant l'avantage de produire une intensité relativement constante le long de ce domaine, tandis que le mercure présente des pics très intenses sur son spectre, permettant d'obtenir une fluorescence beaucoup plus intense, lorsque ces pics correspondent à la longueur d'onde d'excitation des fluorophores. Le microscope de fluorescence polarisant dont nous disposions (Nikon Eclipse 50i) était ainsi équipé d'une lampe halogène et d'une lampe à vapeur de mercure de type métal halide. [69] et [90]

II.1.2.2 Les objectifs

Dans un microscope à épi-fluorescence, la lentille qui sert d'objectif joue également le rôle de condenseur. Ainsi, la lumière d'excitation arrive à travers le condenseur et la lumière fluorescente est collectée à travers l'objectif. L'ouverture numérique¹, généralement notée NA venant de l'anglais Numerical Aperture, est une caractéristique critique de l'objectif. En effet, l'intensité de la fluorescence observée est proportionnelle à la puissance quatre de l'ouverture numérique. Ainsi, un microscope de fluorescence idéal a une grande ouverture numérique. Une grande NA permet également d'avoir une meilleure résolution. [69] et [90]

Cependant, pour la microscopie de fluorescence en lumière polarisée, la grande ouverture numérique des objectifs représente un véritable problème que Axelrod ([6] et [5]) a décrit de façon complète. En effet, il explique que l'intensité de fluorescence étant dans ce cas intégrée selon un grand angle solide d'émission, elle peut de ce fait prendre en compte des fluorophores qui ne seraient pas observés avec des faibles NA, voire "regarder" en dehors de l'échantillon. Ainsi, plus l'ouverture numérique est grande, plus la polarisation de la fluorescence mesurée sera faible par rapport à la vraie polarisation. Axelrod

¹Produit du demi-angle de lumière qui sort de l'objectif et de l'indice de réfraction du milieu se trouvant entre la lentille et la lamelle.

montre que l'anisotropie de fluorescence mesurée diminue pour des grandes NA de façon différente selon la distribution angulaire des fluorophores. Ainsi, il n'est pas possible de calculer un facteur de correction qui dans tous les cas permettrait de retrouver la valeur de l'anisotropie de fluorescence qui serait observée avec une faible NA. Yan et Marriott ([133]) précisent que l'importance de cet effet de dépolarisation est presque négligeable pour des ouvertures numériques inférieures à 0,5, mais qu'en revanche, une ouverture numérique de 1,3 peut conduire à une diminution de 20% environ de la polarisation observée.

Les caractéristiques des objectifs équipant le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i sont présentées dans le tableau 3.

Objectif	1	2	3	4
Grossissement	×5	×10	×40	×100
Ouverture numérique	0,15	0,30	0,75	0,90

TAB. 3 : Caractéristiques des quatre objectifs du microscope.

II.1.2.3 Les cubes filtres

Un grand nombre de microscopes de fluorescence utilisent les cubes filtres comme moyen pour sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission souhaitées. Ces cubes consistent en de petits blocs portes filtres composés de :

- Un filtre d'excitation passe bande qui permet de sélectionner une gamme de longueurs d'onde pour l'excitation.
- Un miroir dichroïque séparateur passe haut orienté à 45° du faisceau et qui réfléchit les longueurs d'onde inférieures à la longueur d'onde de coupure et transmet les longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde de coupure. Sa longueur d'onde de coupure est ainsi choisie de façon à couper la lumière provenant de l'excitation pour ne laisser passer vers le détecteur que la lumière correspondant à la fluorescence.
- Un filtre d'émission passe bande qui permet de sélectionner une gamme de longueurs d'onde pour l'émission.

Chaque cube filtre s'ajuste sur une tourelle circulaire ou un bloc linéaire fixé sur la partie statique du microscope. Les différents cubes alors disponibles peuvent être commutés, manuellement dans le cas du microscope dont nous disposons, pour changer les conditions de mesures souhaitées. Il existe ainsi différents types de cubes filtres, dont ceux équipant le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i sont répertoriés dans le tableau 4.

Type	BF	UV-2B	FITC	TRITC
Bande passante à l'excitation		330 à 380 nm	465 à 495 nm	515 à 565 nm
Longueur d'onde de coupure du miroir dichroïque	400 nm	400 nm	505 nm	565 nm
Bande passante à l'émission	> 400 nm	> 435 nm	515 à 555 nm	550 à 660 nm

TAB. 4 : Caractéristiques des cubes filtres du microscope.

II.1.2.4 Les polariseurs

Un polariseur et un analyseur, présents sur le chemin des faisceaux d'excitation et d'émission, permettent de travailler en lumière polarisée. Le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i comportait ainsi des polariseurs en verre dichroïque. Le polariseur se trouvant à l'excitation, de type ColorPol UV 375 BC5 de la société Codixx, était plus particulièrement adapté pour transmettre dans le domaine de l'Ultra Violet, ses propriétés de polarisation étant optimisées autour de 380 nm.

II.1.2.5 Le plateau porte-échantillon

Le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i a été spécialement équipé d'un plateau porte-échantillon tournant afin de permettre la modification de l'angle entre la direction des échantillons et la direction de la polarisation incidente.

II.2 Ajustements pour l'utilisation du microscope de fluorescence

La paragraphe II.1.2.2, page 94 explique qu'un objectif ayant une grande ouverture numérique peut induire artificiellement une diminution de l'anisotropie de fluorescence, à cause d'effets de dépolarisation. Il convenait donc de s'assurer, au préalable des expérimentations, que le microscope rapportait des valeurs justes de l'anisotropie de fluorescence. Dans ce but, nous avons constitué une gamme d'échantillons de référence dont les valeurs de l'anisotropie ont été mesurées avec le spectrofluorimètre. Puis, nous avons comparé les valeurs de l'anisotropie obtenues avec le microscope avec ces valeurs de référence.

Des solutions de référence ont été préparées en réalisant une série de solutions de fluorescéine à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans un mélange d'eau et de glycerol dont les proportions variaient, en accord avec le protocole proposé par Bigelow ([7]). Le couple de fluorescence de la fluorescéine était environ $\lambda_{exc}=490$ nm, $\lambda_{em}=510$ nm. L'anisotropie de fluorescence des échantillons préparés variait conformément à la loi de Perrin² avec la concentration de glycérol, modifiant la viscosité. Avec le spectrofluorimètre, les mesures ont été effectuées en fluorescence à angle droit avec une cuve en quartz comme porte-échantillon. Puis, les mesures ont été réalisées avec les différents objectifs du microscope couvrant la gamme des ouvertures numériques disponibles (cf. tableau 3 page 95) , en utilisant le cube de fluorescence FITC.

Les résultats pour quatre échantillons constitués de mélanges eau/glycérol de 100/0, 75/25, 50/50 et 25/75 v/v sont présentés sur la figure 44 page 98. Les objectifs $\times 5$ (NA 0,15), $\times 10$ (NA 0,30) et $\times 40$ (NA 0,75) donnent des résultats corrects puisque les valeurs de l'anisotropie de fluorescence mesurées sont en accord avec les mesures du spectrofluorimètre. En revanche, l'anisotropie est sous-estimée avec l'objectif $\times 100$, résultant de sa plus grande ouverture numérique (0,90). Dans le cadre de ce travail de thèse, c'est l'objectif $\times 40$ qui a été typiquement utilisé et pour lequel aucune dégradation de la mesure de l'anisotropie de fluorescence n'a été détectée, quelle que soit la concentration de glycérol.

²Cf. § II.4 de l'étude bibliographique, page 23.

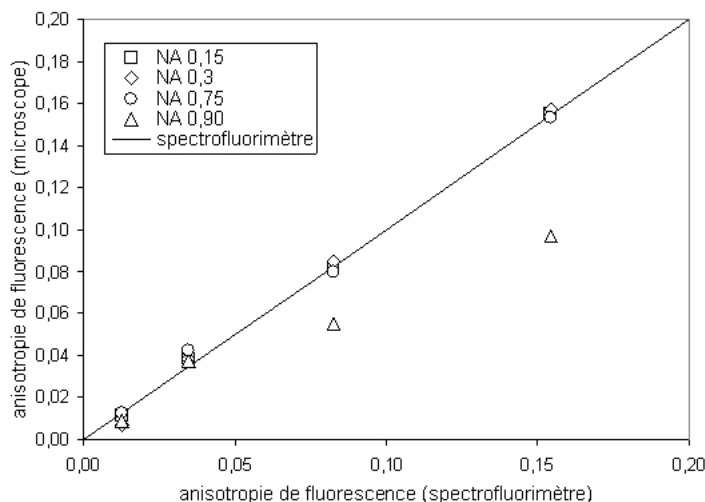


FIG. 44 : Influence de l'ouverture numérique sur l'anisotropie de fluorescence de solutions mesurée avec le microscope, en comparaison avec les résultats du spectrofluorimètre.

II.3 Protocole de mesure avec le microscope de fluorescence³

L'utilisation du microscope de fluorescence implique la mise sous tension préalable des deux sources lumineuses (lampe halogène et lampe métal halide) et de l'ordinateur qui pilote les acquisitions d'image via le logiciel Nikon ACT-1C.

La mesure polarimétrique impose un réglage des positions angulaires du polariseur et de l'analyseur avant la mise en place de l'échantillon. Ce réglage classique, réalisé avec la source de lumière halogène et avec le cube BF (cf. tableau 4, page 96), consiste en la recherche de l'extinction du fond en croisant les directions du polariseur et de l'analyseur. Dans le cadre de la mesure de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif, la préparation des échantillons se fait comme suit : les fibres de collagène sont isolées à partir d'une trame d'épimysium observée sous une loupe binoculaire, placées entre la lame et la lamelle et hydratées par de l'eau distillée. L'échantillon préparé est ensuite placé sur le plateau tournant du microscope et est positionné précisément afin que sa zone d'intérêt, par exemple la fibre de collagène, soit centrée sur le centre de rotation du plateau. La lampe utilisée est la lampe métal halide. La tourelle supportant les différents cubes filtres est

³Le mode opératoire de mesure est présenté en intégralité dans l'annexe E.

positionnée afin d'insérer, sur le trajet optique du faisceau, le cube adéquat selon le couple de fluorescence de l'échantillon. Dans le cas d'échantillons de collagène, il s'agit du cube UV. Les acquisitions consistent en des prises d'images pour des conditions d'alignement de polariseur et d'analyseur parallèles (I_{\parallel}) et croisés (I_{\perp}). Afin d'étudier l'anisotropie de fluorescence en fonction de la direction de l'échantillon, la plateforme est mise en rotation et une image est acquise tous les 10° . Suite à une étude réalisée préalablement sur des échantillons de collagène il a été observé que :

- les images acquises après rotation complète de l'échantillon sur 360° montrent une symétrie. Considérant l'angle entre l'axe principal de l'échantillon et la direction de la polarisation excitatrice, l'image acquise à 0° est équivalente à celle acquise à 180° . De la même manière, l'image acquise à 90° est équivalente à celle acquise à 270° .
- l'intensité de fluorescence décroît exponentiellement avec le temps après l'illumination de l'échantillon. Ce phénomène peut être attribué au changement de température de l'échantillon. Ainsi, il convient de laisser l'échantillon quelques minutes sous le faisceau avant de commencer l'acquisition des images afin d'atteindre une zone où la décroissance de l'intensité de fluorescence est quasi linéaire et de pouvoir *a posteriori* appliquer une correction.

Par conséquent, le nombre d'images à acquérir peut être réduit d'après la symétrie mise en évidence. En conclusion, il a été choisi de réaliser des acquisitions d'images pour les positions angulaires allant de 0 à 180° . Les images à 0 et à 180° étant en théorie équivalentes, elles permettent de calculer la correction en intensité linéaire à appliquer aux images afin de s'affranchir des variations de l'intensité de fluorescence de l'échantillon entre le début et la fin de la prise des images.

Un programme écrit sous Matlab assure le traitement des images. Grâce à un masque appliqué aux images, une zone circulaire est sélectionnée autour du centre de rotation des images et ne couvrant que la partie d'intérêt pour la mesure, c'est-à-dire par exemple la fibre de collagène. Pour chaque image, le niveau de gris moyen de cette zone est alors calculé. On obtient ainsi, par analogie avec les données issues de la spectrométrie, les représentations angulaires de I_{\parallel} et I_{\perp} à partir desquelles l'anisotropie de fluorescence est calculée (d'après l'équation 24 page 83), pour tous les angles.

Troisième partie

Résultats et discussion

Chapitre I

Modélisation de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires

I.1 Introduction

D'après l'étude bibliographique, nous savons que l'orientation des moments de transition dipolaires des fluorophores intrinsèques du muscle fournissent des informations sur l'orientation moléculaire, et donc sur l'organisation structurale du muscle. La distribution de l'orientation des fluorophores dans un système ordonné, comme le muscle, peut être caractérisée en mesurant la fluorescence de ce système en lumière polarisée, ce qui implique la modulation de l'intensité de l'émission de fluorescence avec l'angle entre la direction de la polarisation et l'orientation des moments de transition.

Nous avons vu (cf. paragraphe IV.1 de l'étude bibliographique, page 45) que des modèles permettant de relier les valeurs de l'intensité et de l'anisotropie de fluorescence à l'orientation de fluorophores, généralement extrinsèques, ont déjà été rapportés dans le domaine de la science des polymères. Toutefois, même si les modèles développés dans ces travaux ont été mis en œuvre avec succès, ils nécessitent des configurations de mesures spécifiques¹, qui ne sont pas particulièrement adaptées pour étudier la structure de matériaux biologiques opaques tels les tissus musculaires, comme nous souhaitons le faire dans

¹soit la transmission de fluorescence, soit la fluorescence frontale avec des angles particuliers pour l'excitation et l'émission

cette étude. C'est pourquoi nous avons choisi de développer un modèle mathématique, volontairement simple, adapté à la géométrie de mesure d'un spectrofluorimètre conventionnel tel que celui dont nous disposons.

Le modèle que nous avons développé permet d'analyser les données expérimentales issues des mesures sur les fibres musculaires. Il prend en compte non seulement l'organisation des protéines du muscle mais également les propriétés du tryptophane, qui est le fluorophore concerné pour ce type de tissu. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en place un modèle semblable concernant les tissus conjonctifs. En effet, contrairement aux fibres musculaires mettant en jeu la fluorescence du tryptophane, acide aminé dont les propriétés de fluorescence font l'objet d'un grand nombre de publications, les fluorophores associés à la fluorescence des tissus conjonctifs ne sont pas clairement identifiés et nous n'avons pas trouvé dans la littérature de travaux qui rapporteraient, de façon similaire au tryptophane, les propriétés des transitions électroniques des sites d'intérêts du collagène ou de l'élastine.

I.2 Théorie de la fluorescence des fibres musculaires

Afin d'expliquer clairement le modèle développé pour la fluorescence des fibres musculaires et qui prend en compte un certain nombre de paramètres, il convient de détailler sa mise en place en partant d'un système simple et en y intégrant au fur et à mesure chacun des paramètres qui font la spécificité de notre système qui est le muscle.

I.2.1 Géométrie du problème et hypothèses de départ

La géométrie du problème est montrée sur la figure 45, page 105. Le système d'axes $O - xyz$ est attaché à l'échantillon où l'axe z représente l'axe vertical du laboratoire et le plan yz est la surface de l'échantillon. Le plan d'incidence est le plan xy dans lequel sont considérées les propagations de l'excitation et de l'émission. Plus précisément, le faisceau d'excitation, polarisé verticalement, fait un angle α avec l'axe x , qui représente la direction normale à l'échantillon. La fluorescence est observée à un angle de 90° par rapport à l'excitation avec des conditions de polarisations verticale (I_{\parallel}) et horizontale (I_{\perp}).

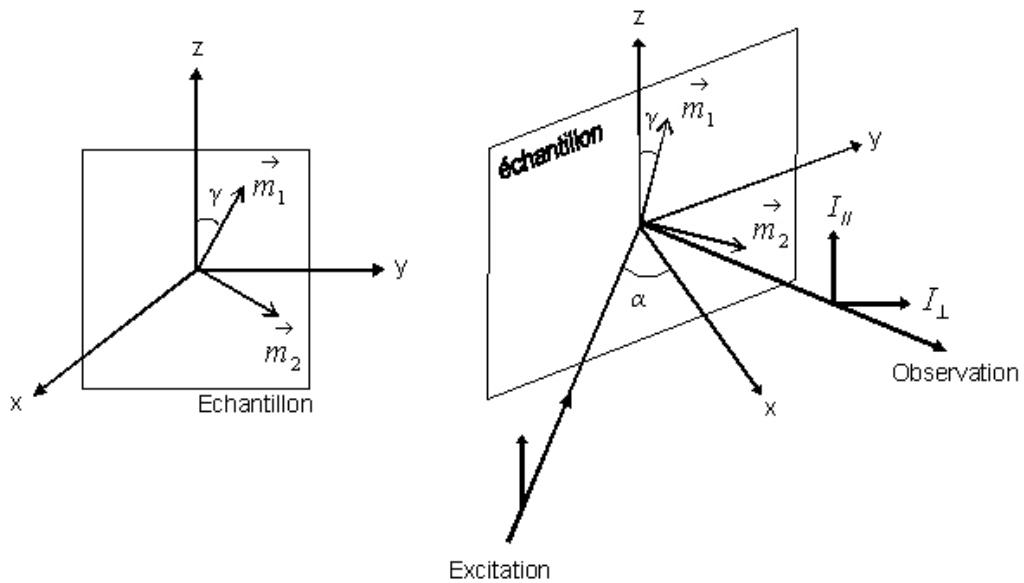


FIG. 45 : Définition de la géométrie de l'expérience.

L'analyse est décrite à l'échelle de la fibre musculaire.

En se basant sur Dale et al. ([21]), on suppose une symétrie cylindrique autour de l'axe de la fibre musculaire due à des symétries inhérentes à l'arrangement des filaments musculaires et l'orientation azimutale aléatoire des myofibrilles. Ainsi, le modèle développé ici ne considère pas la distribution de l'orientation des fluorophores autour de l'axe de la fibre, mais assimile l'échantillon à un système en deux dimensions.

En accord avec la structure des fibres musculaires décrite dans le paragraphe III.1.1 de l'étude bibliographique, page 27, les fibres musculaires peuvent être représentées à l'échelle des sarcomères, comme un système biaxial. Le modèle mis en place dans ce chapitre se base ainsi sur la structure connue de l'arrangement des protéines musculaires, qui a deux orientations principales, longitudinale et transversale à l'axe des fibres. En conséquence, le modèle considère que les moments de transition en absorption des fluorophores supportés par les fibres musculaires, c'est-à-dire des molécules de tryptophane, sont principalement orientés selon deux directions perpendiculaires, que nous représentons par les vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 . Cependant, l'arrangement de l'indole par rapport à l'axe principal des fibres musculaires restant *a priori* non connu, l'orientation des vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 par rapport

à la direction des fibres musculaires n'est pas précisée.

Afin de prendre en compte la distribution angulaire statistique des fluorophores autour des directions définies par les vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 , il convient d'introduire les densités de probabilités angulaires $P_1(\Omega)$ et $P_2(\Omega)$ autour de ces deux directions [61].

Enfin, en se basant sur Dale et al. ([21]), nous supposons que les fluorophores restent immobiles durant la durée de vie de l'état excité, en accord avec le fait que les protéines ont un mouvement restreint par rapport à la matrice les supportant.

I.2.2 Expression de l'intensité de fluorescence dans le cas général

Pour exprimer l'intensité de fluorescence mesurée en lumière polarisée, il est nécessaire dans un premier temps de prendre en compte la photosélection de l'excitation, en accord avec le paragraphe II.1 de l'étude bibliographique, page 17. La probabilité d'absorption d'un photon par une molécule est proportionnelle au carré du vecteur de polarisation \vec{P} du faisceau d'excitation projeté sur l'axe du moment de transition en absorption \vec{M}_a de cette molécule (cf. paragraphe II.3, page 20). De la même manière, la probabilité de détection d'un photon de fluorescence à travers l'analyseur est proportionnelle au carré de la projection du moment de transition en émission \vec{M}_e du fluorophore sur l'axe du vecteur de polarisation \vec{A} de l'axe d'observation.

Dans un deuxième temps, un autre facteur à prendre en compte pour exprimer l'intensité de fluorescence d'un échantillon est la population des fluorophores excités simultanément. Ainsi, dans le modèle, la fluorescence provenant de chaque molécule est traitée indépendamment et additionnée afin de trouver l'émission de fluorescence totale résultant de l'ensemble des fluorophores. Cette sommation mettant en jeu toutes les molécules émettrices est rendue possible par le fait qu'il n'y a pas de relation de phase entre les émissions élémentaires [118].

Considérant ces conditions, dans une expérience standard de fluorescence, l'intensité

de fluorescence en lumière polarisée est donnée par :

$$I(\vec{P}, \vec{A}) \propto K \langle (\vec{P} \cdot \vec{M}_a)^2 (\vec{M}_e \cdot \vec{A})^2 \rangle \quad (25)$$

où le facteur K indique que l'intensité de fluorescence dépend également d'autres paramètres tels que l'intensité de la lumière d'excitation, la concentration et l'efficacité quantique de fluorescence des fluorophores et des facteurs instrumentaux. Les délimiteurs $\langle \rangle$ indiquent qu'un moyennage est réalisé sur l'ensemble de la population des fluorophores. En introduisant la fonction de densité de probabilité angulaire $P(\Omega)$ qui décrit la distribution angulaire des fluorophores par rapport à la structure de l'échantillon, l'équation 25 devient :

$$I(\vec{P}, \vec{A}) \propto \int K (\vec{P} \cdot \vec{M}_a)^2 (\vec{M}_e \cdot \vec{A})^2 P(\Omega) d\Omega \quad (26)$$

I.2.3 Expression de l'intensité de fluorescence pour un système biaxial

Il est maintenant possible de revenir au système décrit pour une expérience avec des fibres musculaires et d'exprimer les intensités de la fluorescence polarisée pour un système biaxial composé de fluorophores orientés le long de deux axes perpendiculaires comme représenté sur la figure 46.

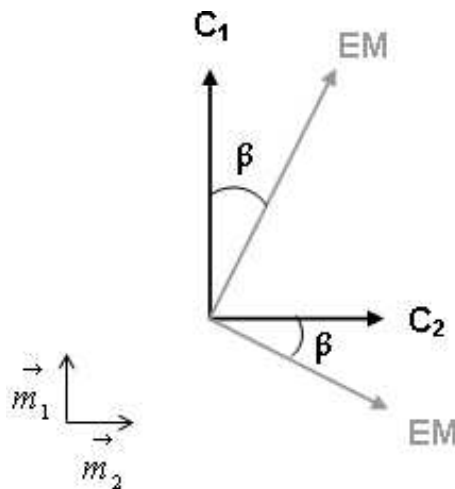


FIG. 46 : Schéma représentant le système biaxial. EM signifie émission.

En considérant les conditions de polariseur et analyseur parallèles et croisés, les intensités de fluorescence respectives I_{\parallel} et I_{\perp} s'écrivent :

$$I_{\parallel}(\gamma) \propto C_1^2 \cos^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) + C_2^2 \sin^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) \quad (27)$$

$$I_{\perp}(\gamma) \propto C_1^2 \cos^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) + C_2^2 \sin^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) \quad (28)$$

où γ est l'angle entre la direction du vecteur de polarisation \vec{P} du faisceau d'excitation et la direction du vecteur \vec{m}_1 ;

β est l'angle entre les moments de transition en absorption et en émission des fluorophores ;

C_1 et C_2 sont respectivement des facteurs proportionnels à la concentration des fluorophores le long des vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 .

Si on considère l'hypothèse selon laquelle les moments de transition en absorption et en émission sont parallèles ($\beta = 0^\circ$), alors les équations 27 et 28 peuvent être exprimées dans des formes similaires aux équations de Nobbs et al. ([82]) présentées dans le paragraphe IV.1 de l'étude bibliographique, page 45. Notons ici que si l'excitation et l'émission ont lieu d'après le même état électronique, et si les fluorophores ne peuvent se déplacer durant la durée de vie de l'état excité, alors les moments de transition en absorption et en émission sont supposés être colinéaires.

Afin de prendre en compte le fait que les fluorophores ne sont pas parfaitement orientés le long des deux axes définis par le système, les équations 27 et 28 peuvent être complétées avec les fonctions de densité de probabilité angulaire $P_1(\Omega)$ et $P_2(\Omega)$, traduisant respectivement les distributions angulaires des fluorophores autour des vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 . Le système peut être représenté alors selon la figure 47, page 109. Les expressions des intensités de fluorescence deviennent :

$$I_{\parallel}(\gamma) \propto \sum_{\Omega} C_1^2 \left(\cos^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_1(\Omega) + \sum_{\Omega} C_2^2 \left(\sin^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_2(\Omega) \quad (29)$$

$$I_{\perp}(\gamma) \propto \sum_{\Omega} C_1^2 \left(\cos^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_1(\Omega) + \sum_{\Omega} C_2^2 \left(\sin^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_2(\Omega) \quad (30)$$

où $P_1(\Omega)$ et $P_2(\Omega)$ sont des distributions que nous supposons Gaussiennes, paramétrées respectivement par les largeurs à mi-hauteurs σ_1 et σ_2 d'après l'équation :

$$P_i(\Omega) = \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\Omega}{\sigma_i} \right)^2} \quad (31)$$

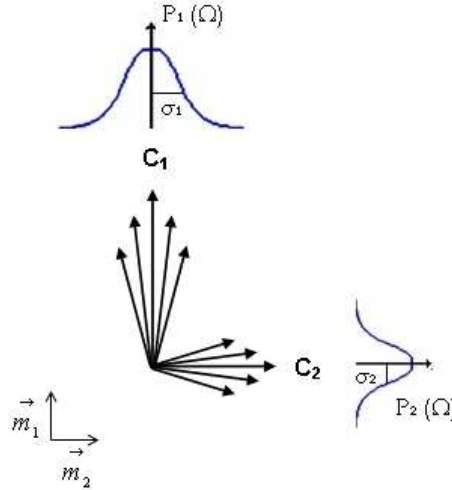


FIG. 47 : Schéma représentant le système biaxial prenant en compte la distribution angulaire des fluorophores.

La figure 48, page 110 montre des exemples de représentation des intensités de fluorescence I_{\parallel} et I_{\perp} , et de l'anisotropie de fluorescence (calculée d'après l'équation 24 donnée page 83) en fonction de l'angle γ , pour différentes valeurs des paramètres σ_1 , σ_2 , C_1 , C_2 et β . Ces courbes montrent les variations des intensités et de l'anisotropie de fluorescence lorsque l'on fait tourner un échantillon biaxial autour d'un axe normal à sa surface et en son centre.

L'intensité de fluorescence I_{\parallel} est maximale lorsque la direction du vecteur de polarisation \vec{P} du faisceau d'excitation est parallèle à la direction des dipôles d'excitation. Si on compare les cas 1 et 3, il est possible de vérifier que les maxima aux couples d'angles ($\gamma = 0^\circ$; $\gamma = 180^\circ$) et ($\gamma = 90^\circ$; $\gamma = 270^\circ$) sont respectivement proportionnels aux concentrations C_1 et C_2 . Le cas 2 montre, comme attendu, l'effet des largeurs à mi-hauteur σ_1 et σ_2 sur l'allure des distributions respectivement autour des couples d'angles ($\gamma = 0^\circ$;

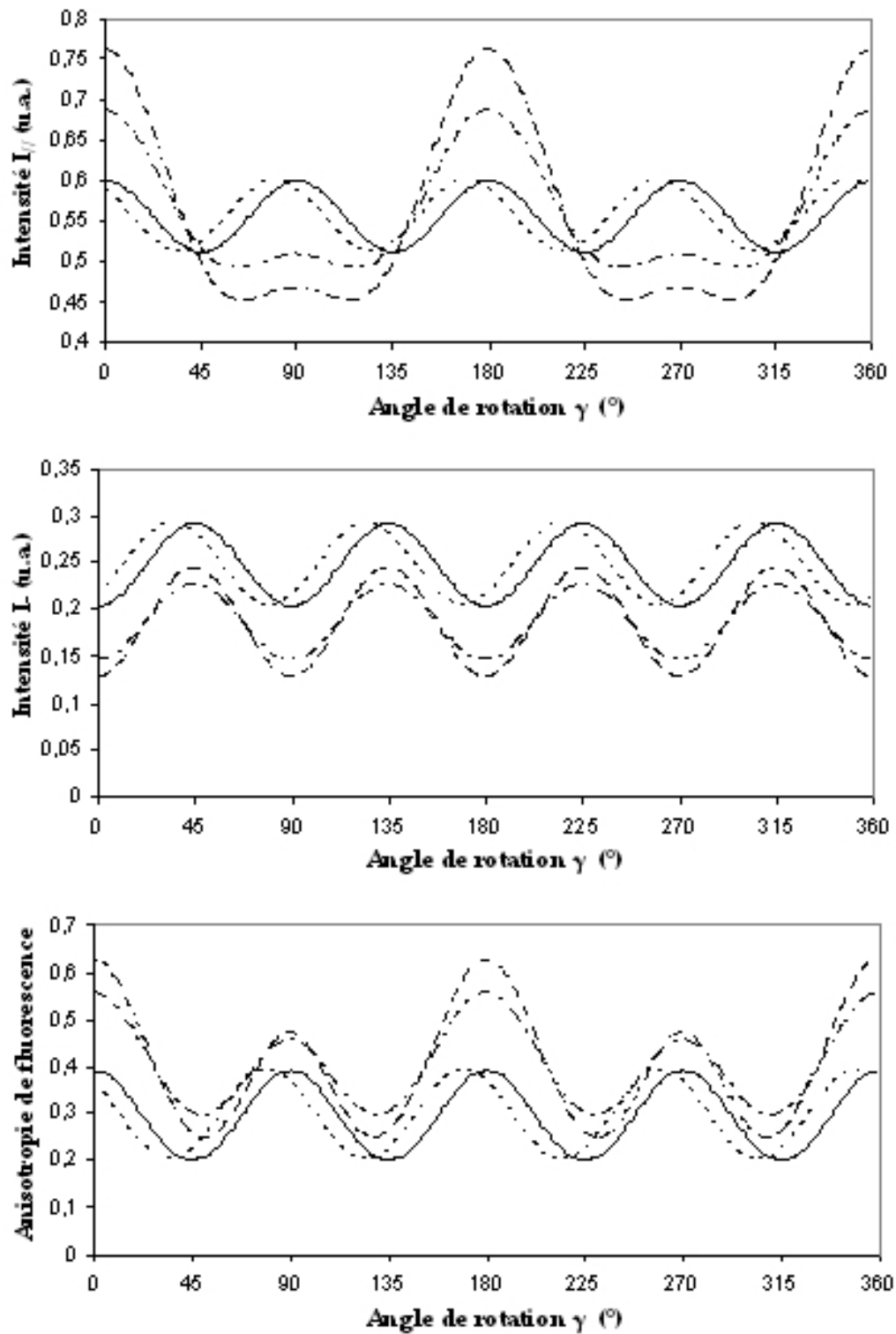


FIG. 48 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{\parallel} et I_{\perp} et de l'anisotropie de fluorescence modélisées d'après les équations 29 et 30 en faisant varier les paramètres : cas 1 : $\sigma_1=25^\circ$, $\sigma_2=25^\circ$, $C_1/C_2=1$ et $\beta=0^\circ$ (—); cas 2 : $\sigma_1=15^\circ$, $\sigma_2=35^\circ$, $C_1/C_2=1$ et $\beta=0^\circ$ (\cdots); cas 3 : $\sigma_1=25^\circ$, $\sigma_2=25^\circ$, $C_1/C_2=1,4$ et $\beta=0^\circ$ ($-\cdot-$) et cas 4 : $\sigma_1=25^\circ$, $\sigma_2=25^\circ$, $C_1/C_2=1$ et $\beta=20^\circ$ ($---$).

$\gamma = 180^\circ$) et ($\gamma = 90^\circ$; $\gamma = 270^\circ$) : plus la distribution est large, plus le pic correspondant diminue. Dans le cas 4, on considère que les moments de transition en absorption et en émission ne sont pas parallèles ($\beta \neq 0^\circ$) : l'allure de la distribution n'est pas modifiée par ce paramètre, mais la distribution est seulement décalée angulairement.

L'intensité de fluorescence I_\perp présente des maxima lorsque la direction du vecteur de polarisation \vec{P} du faisceau d'excitation est orientée à 45° par rapport aux directions principales des dipôles d'excitation. Contrairement à I_\parallel , une modification de C_1 par rapport à C_2 , ou de σ_1 par rapport à σ_2 ne change pas l'intensité relative des maxima aux couples d'angles ($\gamma = 0^\circ$; $\gamma = 180^\circ$) et ($\gamma = 90^\circ$; $\gamma = 270^\circ$) respectivement influencés par ces paramètres.

Enfin, on peut constater que les distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence sont caractérisées par des variations semblables à I_\parallel , en réponse aux différents paramètres.

I.2.4 Expression de l'intensité de fluorescence pour un système biaxial de tryptophane

Jusqu'ici, nous n'avons pas pris en compte le fait que le fluorophore excité dans cette expérience est le tryptophane. Or les propriétés spectrales particulières de cet acide aminé, qui ont été présentées dans l'étude bibliographique (cf. paragraphe III.4, page 40), sont un facteur important à prendre en compte pour modéliser la fluorescence des fibres musculaires. En effet, l'émission de fluorescence du tryptophane résulte de la contribution de deux transitions électroniques dont les moments d'absorption sont perpendiculaires. L'anisotropie de fluorescence dépend par conséquent de la contribution relative de ces deux transitions, elle même variable notamment selon la longueur d'onde d'excitation. Bien que Valeur et Weber ([120]) proposent une méthode de résolution du spectre d'excitation de l'indole, nous ne pouvons appliquer cette dernière dans le cas de notre expérience car nous n'avons pas la possibilité de collecter dans des conditions instrumentales acceptables le spectre d'excitation de polarisation des échantillons de fibres musculaires ; notamment en raison de l'opacité des échantillons qui cause des phénomènes de dépolarisations. Nous pouvons toutefois compléter le modèle développé, en introduisant des

paramètres adaptés dans les équations 27 et 28. On introduit ainsi un second moment de transition d'absorption, perpendiculaire au premier, pour chaque groupe de fluorophores orientés longitudinalement et transversalement au système, défini comme le montre la figure 49. La nouvelle composante du groupe de fluorophores orientés le long du vecteur \vec{m}_1 se retrouve donc colinéaire au groupe de fluorophores orientés le long du vecteur \vec{m}_2 . De la même manière, la nouvelle composante du groupe de fluorophores orientés le long du vecteur \vec{m}_2 se retrouve colinéaire au groupe de fluorophores orientés le long du vecteur \vec{m}_1 .

Les expressions des intensités de fluorescence deviennent :

$$I_{\parallel}(\gamma) \propto C_1^2 \left(\cos^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) + \mu \sin^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) \right) + C_2^2 \left(\sin^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) + \mu \cos^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) \right) \quad (32)$$

$$I_{\perp}(\gamma) \propto C_1^2 \left(\cos^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) + \mu \sin^2 \gamma \sin^2(\gamma + \beta) \right) + C_2^2 \left(\sin^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) + \mu \cos^2 \gamma \cos^2(\gamma + \beta) \right) \quad (33)$$

où μ représente la contribution relative du deuxième moment de transition d'absorption par rapport au premier.

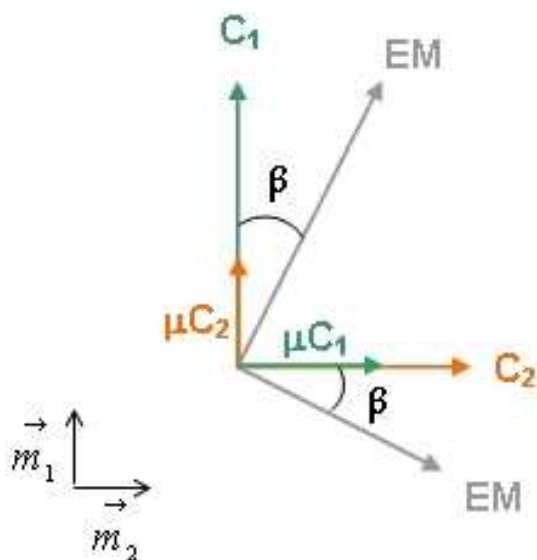


FIG. 49 : Schéma représentant le système biaxial prenant en compte les deux moments d'absorption du tryptophane.

Si l'on considère maintenant les fonctions de probabilité de dispersion angulaire $P_1(\Omega)$ et $P_2(\Omega)$, les équations 32 et 33 se réécrivent :

$$I_{\parallel}(\gamma) \propto \sum_{\Omega} C_1^2 \left(\cos^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) + \tau \sin^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_1(\Omega) \\ + \sum_{\Omega} C_2^2 \left(\sin^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) + \tau \cos^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_2(\Omega) \quad (34)$$

$$I_{\perp}(\gamma) \propto \sum_{\Omega} C_1^2 \left(\cos^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) + \tau \sin^2(\gamma + \Omega) \sin^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_1(\Omega) \\ + \sum_{\Omega} C_2^2 \left(\sin^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) + \tau \cos^2(\gamma + \Omega) \cos^2(\gamma + \Omega + \beta) \right) P_2(\Omega) \quad (35)$$

La figure 50, page 114 montre que les distributions angulaires des intensités et de l'anisotropie de fluorescence sont influencées par la présence d'un second moment de transition d'absorption. La contribution du paramètre μ a en effet une influence sur l'amplitude des différents maxima décrits par les distributions angulaires. Il est important de noter que la figure représentant l'intensité de fluorescence I_{\perp} présente maintenant deux couples de minima différents aux couples d'angles $(\gamma = 0^\circ ; \gamma = 180^\circ)$ et $(\gamma = 90^\circ ; \gamma = 270^\circ)$, contrairement à précédemment où les minima présents à ces quatre angles étaient égaux.

I.3 Discussion et conclusion

Nous venons de développer un modèle traduisant les variations angulaires des intensités de fluorescence en lumière polarisée des fibres musculaires et prenant en compte les propriétés du système considéré en regard de la fluorescence, à savoir l'orientation préférentielle des fluorophores selon deux directions et les propriétés d'absorption et d'émission du tryptophane.

Il convient toutefois de noter que l'influence de la biréfringence de l'échantillon, du coefficient d'absorption de la lumière excitatrice par l'échantillon et de la diffusion des photons ont été négligés.

Les fibres musculaires sont en effet un matériau biréfringent. Cette différence dans les

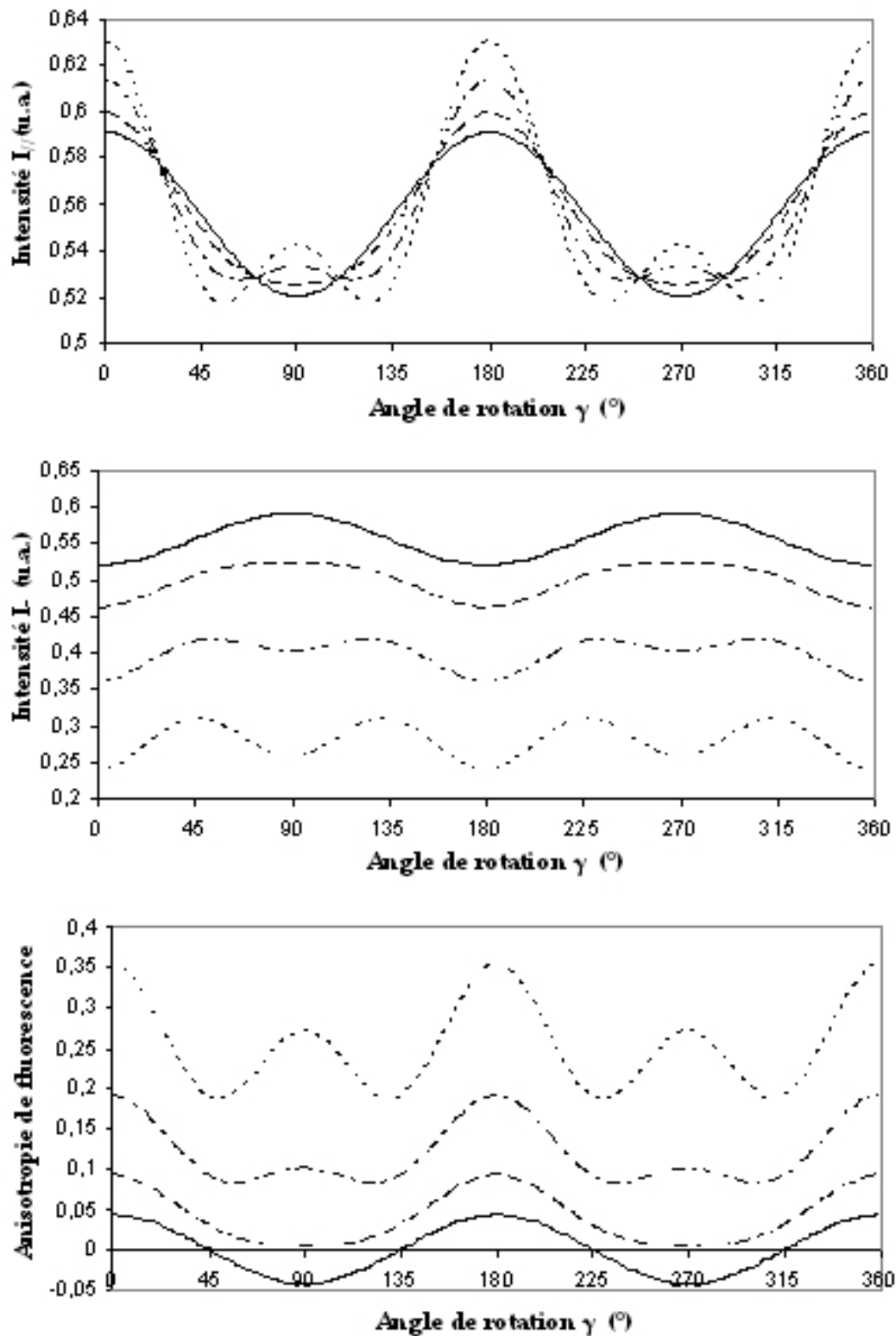


FIG. 50 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{\parallel} et I_{\perp} et de l'anisotropie de fluorescence modélisées d'après les équations 34 et 35 en fixant les paramètres $\sigma_1=25^\circ$, $\sigma_2=25^\circ$, $C_1/C_2=1,2$ et $\beta=0^\circ$ et faisant varier le paramètre μ : cas 1 : $\mu=1$ (—); cas 2 : $\mu=0,8$ (\cdots); cas 3 : $\mu=0,5$ ($-\cdot-$) et cas 4 : $\mu=0,2$ ($- - -$).

indices de réfraction le long des axes principaux de l'échantillon peut induire trois effets qu'il serait dans l'absolu nécessaire de corriger [63]. Premièrement, l'angle d'incidence de la lumière dans l'échantillon peut changer. Deuxièmement, les coefficients de réflexion et de transmission de la lumière à l'interface quartz-échantillon, qui sont également fonction de la direction de la polarisation, sont susceptibles de varier.

Le troisième et dernier effet de la biréfringence est l'introduction d'une différence de phase entre des lumières se propageant dans une même direction mais dont les polarisations sont orientées le long de deux axes différents.

D'un point de vue général, la diffusion de la lumière est quant à elle responsable de la dépolarisation des lumières d'excitation et d'émission, affectant ainsi les valeurs de l'anisotropie de fluorescence [116]. Cette diffusion a lieu lorsque la lumière traverse la lame du quartz du porte-échantillon et l'échantillon lui même et diminue donc la polarisation de la lumière et ainsi les valeurs de l'anisotropie de fluorescence. Du point de vue plus particulier des milieux anisotropes, Sinichkin et al. ([94]) montrent également que l'anisotropie optique de milieux, tels que les tissus biologiques, induit une anisotropie de la polarisation de la lumière diffusée.

Finalement, même si nous ne devons pas perdre de vue que le modèle développé dans ce chapitre ne prend pas en compte les effets de la biréfringence de l'échantillon et de la diffusion de la lumière, nous verrons dans les chapitres qui suivent qu'il rend compte de façon plutôt fidèle des résultats obtenus expérimentalement. L'ajustement des données expérimentales avec les équations 34 et 35, devrait donc permettre d'obtenir des valeurs pour les paramètres de ces équations portant des informations sur la structure de l'échantillon. Ces paramètres sont finalement au nombre de six :

- C_1 et C_2 , qui sont les facteurs proportionnels à la concentration des fluorophores visibles le long des directions définies par les vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 .
- σ_1 et σ_2 , qui sont les largeurs à mi-hauteur des fonctions de densité de probabilité angulaire $P_1(\Omega)$ et $P_2(\Omega)$ traduisant la répartition des fluorophores autour des directions définies par les vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 .
- β , l'angle entre les moments d'absorption et d'émission des fluorophores. Dans le cas du tryptophane, étant donné qu'il existe deux moments de transition en absorption

distincts, nous avons défini l'angle β comme étant l'angle entre le moment d'absorption de la transition électronique de plus basse énergie et le moment d'émission. L'angle entre le moment d'absorption de la deuxième transition électronique et le moment d'émission est donc automatiquement défini par rapport à l'angle β étant donné que les deux moments d'absorption sont perpendiculaires. Il est important de rappeler ici que l'émission de fluorescence se produit seulement depuis le premier état excité. En conséquence, l'angle β est censé être nul, étant donné que les moments d'absorption et d'émission du premier état excité sont en théorie colinéaires. D'après l'équation 11 donnée dans l'étude bibliographique (page 23), l'anisotropie de fluorescence de cette transition devrait donc avoir une valeur de 0,4. Toutefois, Valeur et Weber ([120]) rapportent que la valeur mesurée expérimentalement est plus basse et mettent en cause des vibrations de torsion. C'est pour cette raison que le paramètre β a été intégré au modèle.

- μ , qui quantifie la contribution relative du deuxième moment de transition en absorption par rapport au premier.

Les valeurs des six paramètres présents dans le modèle sont donc *a priori* inconnues. Leur détermination en appliquant le modèle aux résultats expérimentaux obtenus avec le spectrofluorimètre nous permettrait donc d'investiguer et de quantifier la structure des fibres musculaires et ses changements avec des procédés de transformations *post mortem*. Par exemple une hypothèse pourrait être que les paramètres σ_1 et σ_2 augmentent avec le temps de maturation, au cours de laquelle la déstructuration des protéines tendrait à désorganiser leur alignement au sein des fibres musculaires.

Chapitre II

Mise en évidence expérimentale de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires

Le chapitre précédent détaille la mise au point d'un modèle de la distribution angulaire de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires. Le présent chapitre propose de mettre en évidence expérimentalement ce résultat au moyen de mesures au spectrofluorimètre et de confirmer ainsi la validité du mode opératoire de mesure mis en œuvre. Il présente également une évaluation de la répétabilité des mesures. Enfin, la méthode d'ajustement du modèle théorique aux données expérimentales est discutée.

II.1 Plan de l'expérience

Principe Plusieurs échantillons ont été prélevés sur un muscle et leur anisotropie de fluorescence a été mesurée macroscopiquement avec le spectrofluorimètre. Pour chaque échantillon, la mesure a été réalisée deux fois en appliquant la totalité des conditions de répétabilité, à savoir : répétition sur une courte période de temps, même méthode de mesure, même observateur, même instrument de mesure, même lieu et mêmes conditions d'utilisation. Nous avons choisi de ne réaliser que deux mesures successives pour chaque échantillon à cause de l'évolution des échantillons avec le temps *post mortem* due à la maturation. L'hypothèse que nous avons formulée est que l'échantillon ne subit pas de



FIG. 51 : Les échantillons ont été prélevés à des emplacements choisis aléatoirement du muscle *Semi membranosus*.

modification au cours de deux mesures successives (environ 2 h 30).

Préparation des échantillons et mesures au spectrofluorimètre Huit échantillons de dimensions adaptées au porte-échantillon ont été découpés dans un muscle *Semi membranosus* (race blonde d'Aquitaine) à des emplacements choisis aléatoirement et de telle façon que l'axe principal des fibres soit parallèle à la surface de l'échantillon (cf. figure 51). Pour chaque échantillon, ont été réalisées deux mesures successives, en appliquant à chaque fois le protocole de mise en place de l'échantillon.

II.2 Résultats

II.2.1 Mise en évidence expérimentale de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires

La figure 52, page 119 présente un exemple de résultat typique obtenu avec des échantillons prélevés sur le muscle *Semi membranosus*. Les distributions angulaires sont représentées sous forme de graphes polaires dont les amplitudes représentent les valeurs des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence variant selon l'angle de rotation de l'échantillon par rapport à la direction de la polarisation incidente. L'angle 0° correspond à la position de l'échantillon pour laquelle l'orientation des fibres musculaires est vertical, et est donc parallèle à la direction de polarisation de la lumière excitatrice.

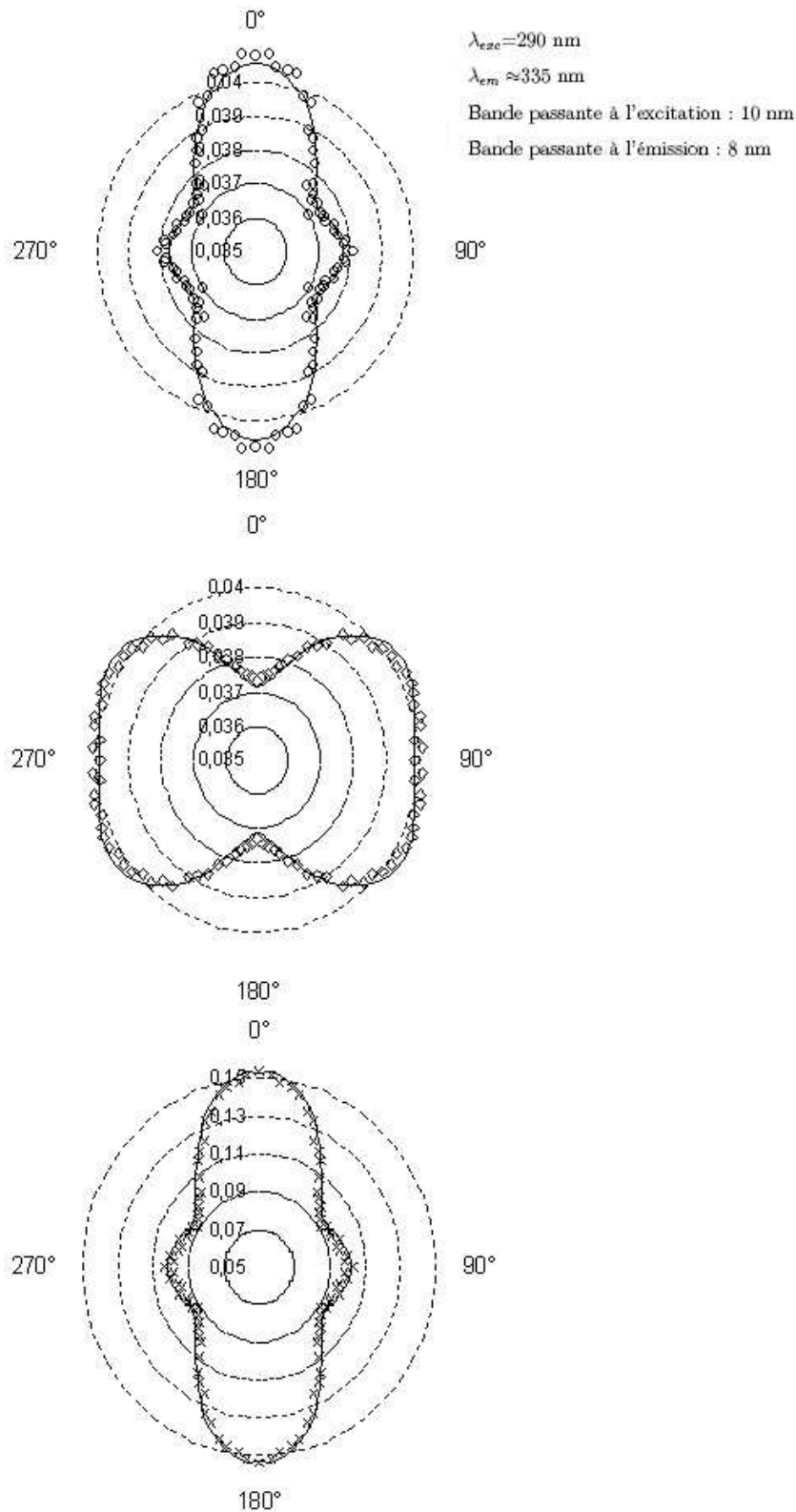


FIG. 52 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} (\circ) et I_{VH} (\diamond) et de l'anisotropie de fluorescence (\times) obtenues pour un échantillon issu de muscle *Semi membranous*. Les courbes issues des ajustements des données expérimentales de I_{VV} et I_{VH} avec les équations 32 et 33 (page 112) sont représentées par les traits pleins.

Comme attendu, on peut voir sur la figure 52 que les intensités et l'anisotropie de fluorescence dépendent significativement de l'angle de rotation de l'échantillon. Cela confirme que la matrice des fluorophores a une orientation préférentielle dans le plan de la surface de l'échantillon. Plus spécifiquement, en se rapportant au modèle développé dans le chapitre 1, les vecteurs \vec{m}_1 et \vec{m}_2 utilisés pour décrire le système coïncident respectivement avec les directions longitudinale et transversale à l'axe principal macroscopique des fibres musculaires déterminé visuellement. Par conséquent, il est désormais possible d'assimiler l'angle entre la direction macroscopique principale de l'échantillon et la direction de polarisation de l'excitation utilisé pour la représentation des données expérimentales, avec l'angle γ utilisé dans le modèle.

La dépendance des distributions angulaires à la structure du muscle a été confirmée en broyant un échantillon. Les résultats obtenus typiquement sont illustrés par la figure 53, page 121, sur laquelle une moyenne des données brutes d'après la symétrie de l'échantillon n'a pas été réalisé. On peut voir que les distributions angulaires sont presque isotropes. Nous attribuons les variations visibles à des hétérogénéités locales de l'échantillon de muscle broyé présentes dans le champ de mesure. L'échantillon a donc perdu son "anisotropie angulaire", reliée à l'arrangement des fibres musculaires devenu aléatoire. Il convient toutefois de souligner que la valeur de l'anisotropie de fluorescence ne s'annule pas, à cause de l'anisotropie intrinsèque des molécules de tryptophane : la lumière polarisée excite préférentiellement les dipôles dont les moments de transition en absorption sont parallèles à la direction de la polarisation de la lumière, qui émettent eux même selon la direction des moments de transition en émission. On notera cependant que l'anisotropie de fluorescence mesurée ici ne correspond bien sûr pas directement à la valeur de l'anisotropie intrinsèque fondamentale du tryptophane, en raison de la présence entre autres des phénomènes de diffusion de la lumière ayant lieu au sein de l'échantillon et qui modifient la polarisation de celle-ci.

L'analyse des résultats présentés dans ce chapitre permet ainsi de conclure que les distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence dépendent principalement de l'orientation préférentielle des fluorophores,

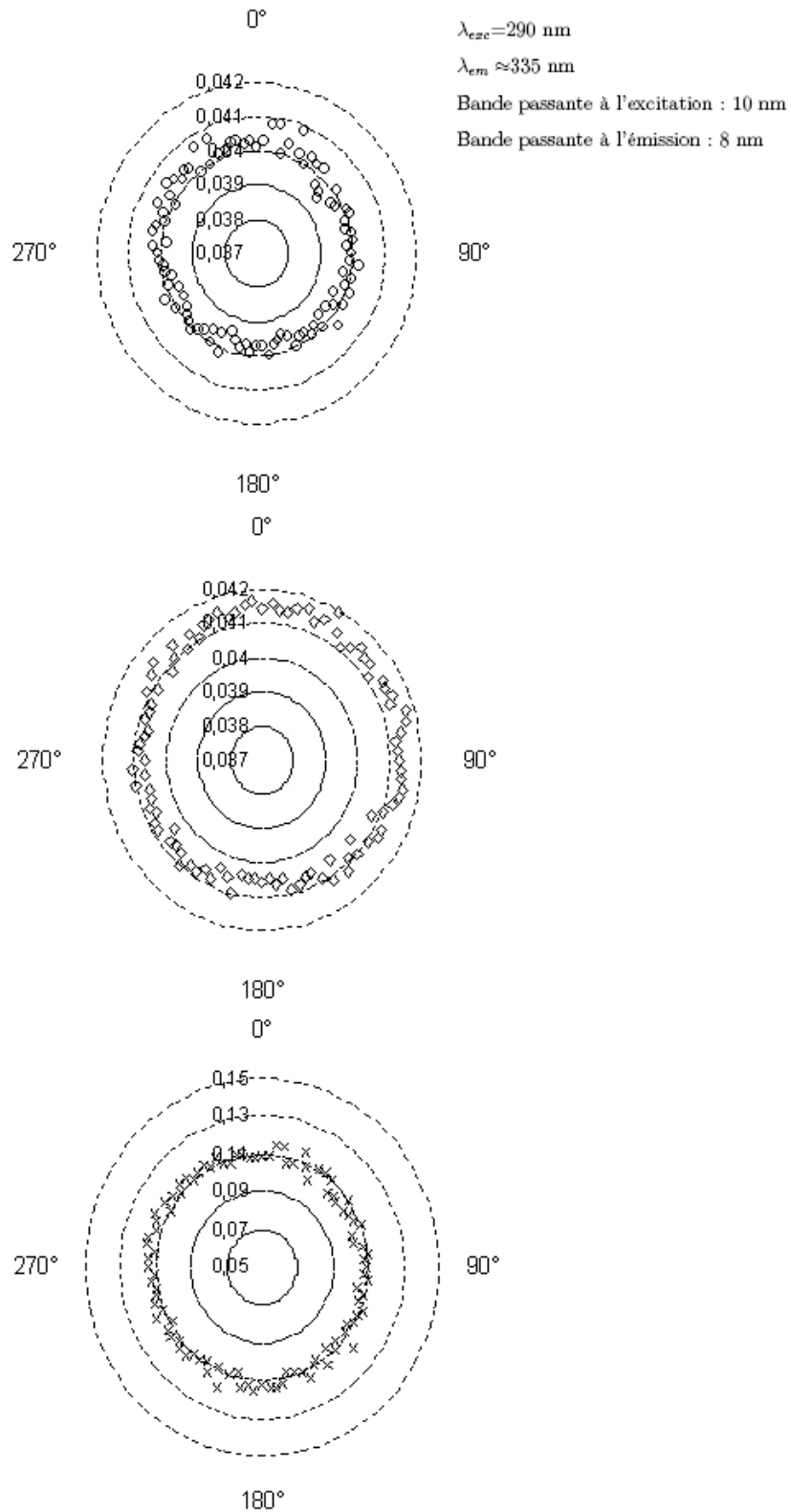


FIG. 53 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} (\circ) et I_{VH} (\diamond) et de l'anisotropie de fluorescence (\times) obtenues pour un échantillon issu de muscle broyé.

conférant une anisotropie de "structure" et de l'anisotropie de fluorescence intrinsèque du tryptophane. La présence de procédés de dépolariation n'est pas problématique pour l'interprétation que nous souhaitons faire des données expérimentales, étant donné que nous ne souhaitons pas quantifier la valeur de l'anisotropie de fluorescence intrinsèque du tryptophane, mais que nous souhaitons seulement étudier l'arrangement structural des fibres musculaires visible grâce aux mesures résolues angulairement.

II.2.2 Ajustement du modèle avec les données expérimentales

II.2.2.1 Choix du modèle le plus adéquat

Les équations 34 et 35, présentées dans le chapitre précédent, constituent le modèle le plus complet que nous ayons mis au point pour modéliser l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires. L'ajustement de ce modèle aux données expérimentales permet d'obtenir les valeurs des six paramètres C_1 et C_2 , σ_1 et σ_2 , β et μ , porteurs d'une information sur la structure de l'échantillon. Malheureusement, l'ajustement entre le modèle et les données expérimentales ne donne pas une solution unique, mais des solutions multiples : le nombre de degré de liberté est ici trop grand. En effet, les équations 34 et 35 ajustent par exemple très bien les données présentées sur la figure 52, page 119 avec les paramètres suivants :

$$\begin{aligned} & (\sigma_1=3,6^\circ ; \sigma_2=14,1^\circ ; C_1=0,197 ; C_2=0,200 ; \mu=0,9523 ; \beta=0^\circ) \\ \text{ou } & (\sigma_1=12,4^\circ ; \sigma_2=23,0^\circ ; C_1=0,194 ; C_2=0,207 ; \mu=0,9215 ; \beta=0^\circ) \\ \text{ou } & (\sigma_1=10,0^\circ ; \sigma_2=5,0^\circ ; C_1=0,204 ; C_2=0,192 ; \mu=0,9559 ; \beta=0^\circ) \\ & \text{etc.} \end{aligned}$$

Pour utiliser le modèle sans ambiguïté, outre le fait de réaliser d'autres mesures, par exemple avec des échantillons orientés aléatoirement comme le proposent Nobbs et al. ([82]), il est nécessaire de réduire le nombre de degré de liberté et donc de paramètres ajustables. La solution que nous avons retenue est de ne pas intégrer au modèle les paramètres σ_1 et σ_2 et d'utiliser les équations simplifiées 32 et 33. En conséquence, les paramètres C_1 et C_2 représentent les concentrations des fluorophores présents "globalement" autour des directions longitudinales et transversales aux fibres musculaires. La réduction du nombre de paramètres variables de six à quatre permet d'obtenir l'unicité

des valeurs numériques résolues. Ainsi, les équations 32 et 33 ajustent correctement les données présentées sur la figure 52 avec les valeurs uniques des paramètres suivantes :

$$(C_1=0,2014; C_2=0,1943; \mu=0,9255; \beta=0^\circ)$$

Il convient de remarquer que l'angle β est, d'après les résultats expérimentaux, proche de zéro. Nous considérerons donc par la suite la valeur de ce paramètre comme constante et égale à zéro. Les équations dont nous ajusterons finalement la valeur des paramètres aux données expérimentales sont :

$$I_{VV}(\gamma) \propto C_1^2 (\cos^2 \gamma \cos^2 \gamma + \mu \sin^2 \gamma \cos^2 \gamma) + C_2^2 (\sin^2 \gamma \sin^2 \gamma + \mu \cos^2 \gamma \sin^2 \gamma) \quad (36)$$

$$I_{VH}(\gamma) \propto C_1^2 (\cos^2 \gamma \sin^2 \gamma + \mu \sin^2 \gamma \sin^2 \gamma) + C_2^2 (\sin^2 \gamma \cos^2 \gamma + \mu \cos^2 \gamma \cos^2 \gamma) \quad (37)$$

II.2.2.2 Méthode d'ajustement

L'ajustement des équations 36 et 37 aux données expérimentales est effectué par la méthode des moindres carrés. Cette méthode consiste à chercher les valeurs des paramètres C_1 , C_2 et μ qui rendent minimale la somme quadratique pondérée des distances entre les points expérimentaux et la courbe d'ajustement. Cette somme pondérée est souvent appelée χ^2 . Dans le cas de nos expériences on peut définir :

$$\chi_{I_{VV}}^2(C_1, C_2, \mu) = \sum_{i=1}^{i=N} \frac{1}{N} \left(I_{VV}(\gamma_i) - C_1^2 (\cos^2 \gamma_i \cos^2 \gamma_i + \mu \sin^2 \gamma_i \cos^2 \gamma_i) - C_2^2 (\sin^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i + \mu \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i) \right)^2 \quad (38)$$

où N est le nombre de points et avec pour les γ_i : $\gamma_1=0^\circ$, $\gamma_2=3,6^\circ$... $\gamma_{N=26}=90^\circ$.

La minimisation de $\chi_{I_{VV}}^2$ peut-être réalisée par deux méthodes :

- Méthode 1 : la méthode de Newton-Raphson, qui permet d'obtenir après plusieurs itérations une valeur approchée d'un zéro à localiser, en se basant sur l'utilisation de la tangente en un point de la courbe de la fonction considérée. Concrètement, cette méthode est utilisée à l'aide du solveur Excel qui recherche et affiche directement les valeurs des paramètres C_1 , C_2 et μ .
- Méthode 2 : le calcul analytique des paramètres C_1 , C_2 et μ , dont le détail est présenté dans l'annexe F.

Ces deux méthodes de résolution permettent en pratique d'obtenir des valeurs des paramètres C_1 , C_2 et μ identiques. L'intérêt de la méthode 2 est que, comme nous le verrons

dans le paragraphe II.2.3.2, elle permet d'estimer l'erreur commise sur les valeurs des paramètres C_1 , C_2 et μ , en fonction de l'incertitude associée aux mesures d'intensité de fluorescence. Toutefois, pour des raisons pratiques, l'ajustement des données expérimentales par la méthode des moindres carrés est directement réalisé avec la méthode 1. Dans ce cas là, afin d'utiliser la totalité des données mesurées lors des expérimentations, c'est-à-dire les valeurs de I_{VV} et I_{VH} , nous avons choisi de minimiser $\chi_{I_{VV}}^2 + \chi_{I_{VH}}^2$ avec :

$$\chi_{I_{VH}}^2(C_1, C_2, \mu) = k \sum_{i=1}^{i=N} \frac{1}{N} \left(I_{VH}(\gamma_i) - C_1^2 (\cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i + \mu \sin^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i) - C_2^2 (\sin^2 \gamma_i \cos^2 \gamma_i + \mu \cos^2 \gamma_i \cos^2 \gamma_i) \right)^2 \quad (39)$$

où k est un facteur instrumental.

Il convient de noter que la minimisation de $\chi_{I_{VV}}^2 + \chi_{I_{VH}}^2$ n'a pas été réalisée analytiquement car elle demande des calculs beaucoup trop fastidieux.

II.2.3 Evaluation de la répétabilité des résultats de mesure

La figure 54, page 125 compare les résultats obtenus pour les deux répétitions de mesure réalisées sur différents échantillons. On peut voir que les courbes d'un même échantillon sont quasi-superposées. En revanche, on constate que les résultats diffèrent selon les échantillons, mettant en évidence la variabilité entre les échantillons.

II.2.3.1 Calcul de l'incertitude statistique sur la mesure des intensités de fluorescence

Méthode de calcul générale En théorie, des mesures de la même grandeur faites dans des conditions expérimentales identiques (même mode opératoire, même observateur, même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions, même lieu, répétition sur une courte durée de temps) devraient donner des résultats identiques. En pratique, les résultats obtenus sont voisins mais différents. La dispersion des résultats est d'origine aléatoire, liée par exemple à la grandeur à mesurer et à l'environnement qui fluctuent de manière imprévisible. On introduit ainsi la "répétabilité" des résultats d'un mesurage, qui permet une approche statistique de l'erreur. Elle se définit comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande (dans notre cas l'intensité

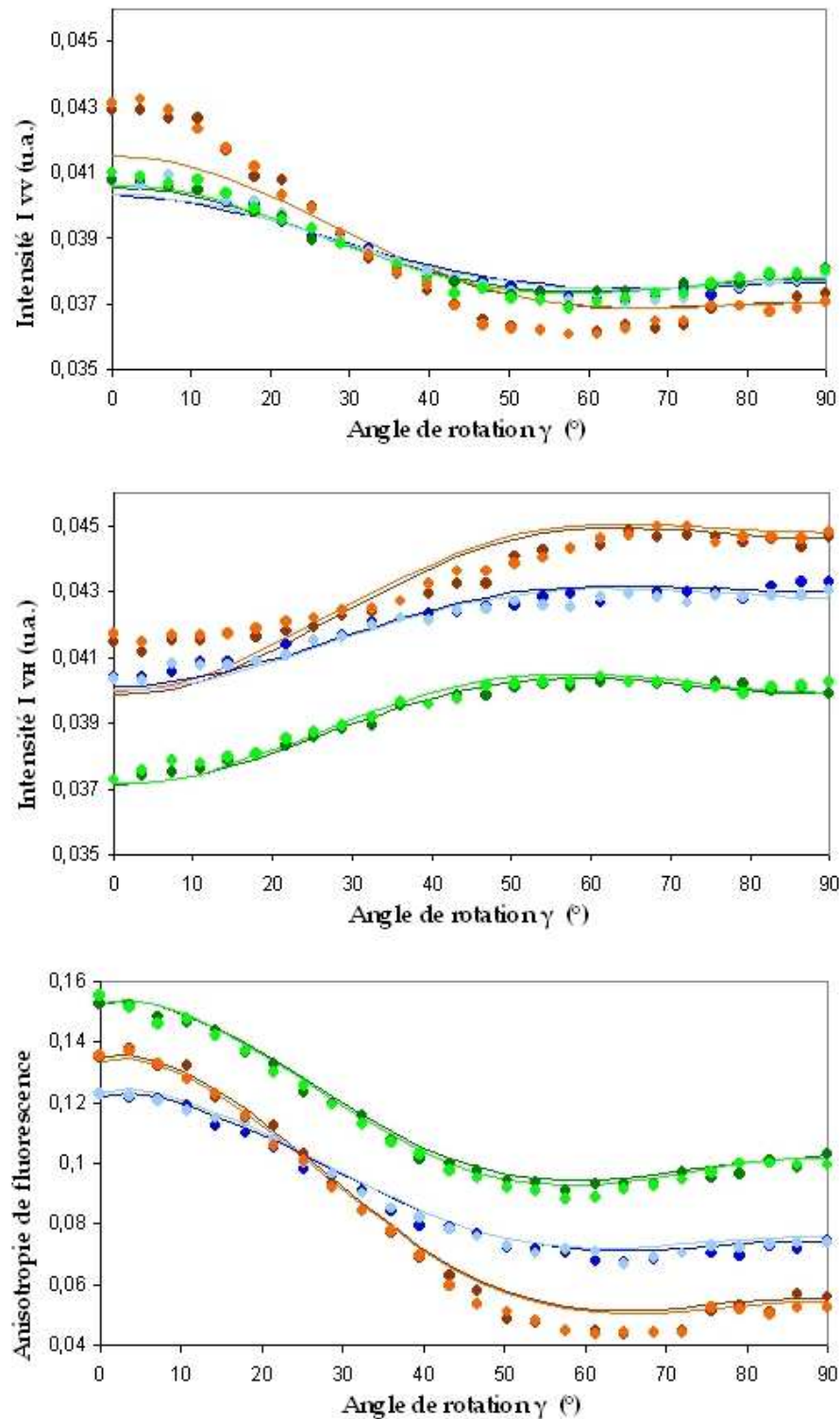


FIG. 54 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour trois échantillons : échantillon 1, répétitions 1 (●) et 2 (●) ; échantillon 2, répétitions 1 (●) et 2 (●) et échantillon 3, répétitions 1 (●) et 2 (●). Les courbes issues des ajustements aux données expérimentales de I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) sont représentées par les traits colorés correspondants.

de fluorescence) effectués dans des conditions de mesure identiques. Concrètement, la répétabilité des résultats de mesure est évaluée en estimant l'incertitude statistique des résultats. L'incertitude statistique est généralement calculée en estimant l'écart-type s sur une série de n mesures, pour lesquelles les conditions de répétabilité sont satisfaites :

$$s(x) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (40)$$

où x_i représente la i -ième mesure de la grandeur x et \bar{x} est la moyenne arithmétique des n mesures effectuées. L'incertitude statistique sur la valeur moyenne \bar{x} est donc finalement estimée par $s(\bar{x}) = s(x)/\sqrt{n}$.

Méthode de calcul adaptée Dans le cas des expérimentations menées dans ce chapitre, la grandeur mesurée est l'intensité de fluorescence, dans des conditions de polariseur et analyseur parallèles et croisés. Nous formulons l'hypothèse que l'incertitude statistique sur la mesure de I_{VV} n'est pas significativement différente de l'incertitude statistique sur la mesure de I_{VH} . Ainsi, nous ne considérons que l'incertitude statistique "globale" sur la mesure de l'intensité de fluorescence I , incertitude que nous souhaitons évaluer. Nous supposons également que cette incertitude est la même, quel que soit l'angle de rotation γ de l'échantillon.

Cependant, comme expliqué dans le paragraphe II.1 de ce chapitre, les échantillons biologiques dont on mesure l'intensité de fluorescence ne nous permettent pas de répéter un nombre n de mesures suffisamment important, étant donné l'évolution temporelle des échantillons. Le protocole de mesure oblige ainsi $n=2$. En revanche, le nombre d'échantillons utilisés dans le protocole, ainsi que le fait que nous réalisons des mesures à 26 angles de rotation différents, correspondant à autant de comparaisons entre deux répétitions, nous permettent de disposer d'un grand nombre de groupes de mesures pour lesquels nous avons deux répétitions des résultats. L'équation générique 40 ne permettant pas de prendre en compte tous les groupes de mesures avec deux répétitions des résultats, nous avons plutôt choisi d'utiliser la norme NF ISO 5725-3¹. Cette norme considère en effet le cas d'études pour lesquelles sont présents t groupes de mesures (correspondant à t échantillons) avec n répliques de résultats d'essais. Elle définit un estimateur de l'écart-type

¹Application de la statistique. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 3 : mesures intermédiaires de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée (décembre 1994).

intermédiaire de fidélité qui dans le cas $n=2$ s'écrit :

$$s_l(I) = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (I_{j1} - I_{j2})^2} \quad (41)$$

La condition pour que l'équation 41 soit applicable est : $t(n-1) > 15$. Dans le cas de notre expérience, nous avons :

- $n=2$, puisque 2 répétitions de mesure par échantillon.
- $t=416$, si on suppose que chaque angle de rotation γ de l'échantillon correspond à un échantillon différent. On obtient $t = (8 \text{ échantillons}) \times (26 \text{ angles de mesures par échantillon}) \times (2 \text{ intensités mesurées } I_{VV} \text{ et } I_{VH} \text{ par échantillon}) = 416$.

La condition d'application de l'équation 41 est donc largement respectée et nous trouvons : $s_l(I) = 1,6 \times 10^{-4}$ u.a.. L'incertitude statistique $u(I)$ sur la mesure des intensités de fluorescence est donc :

$$u(I) = 1,6 \times 10^{-4} \text{ u.a.}$$

ce qui correspond à une incertitude relative inférieure à 1 %.

La formule générale de propagation des incertitudes permet de déduire l'incertitude statistique $u(r)$ sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence due à l'incertitude statistique $u(I)$ sur la mesure des intensités de fluorescence. En supposant qu'il n'y a pas d'incertitude sur la valeur de G , on a :

$$u(r) = \sqrt{\left(\frac{\partial r}{\partial I_{VV}}\right)^2 u^2(I) + \left(\frac{\partial r}{\partial I_{VH}}\right)^2 u^2(I)} \quad (42)$$

qui donne :

$$u(r) = u(I) \times 3G \frac{\sqrt{I_{VV}^2 + I_{VH}^2}}{(I_{VV} + 2GI_{VH})^2} \quad (43)$$

D'après les valeurs de I_{VV} et I_{VH} , on trouve par le calcul :

$$u(r) \approx 0,002$$

ce qui correspond à une incertitude relative de l'ordre de 2 %.

Les incertitudes relatives statistiques $u(I)$ et $u(r)$ sur les mesures, respectivement des intensités de fluorescence et de l'anisotropie de fluorescence sont en conclusion petites. Par

souci de clarté, ces barres d'erreurs ne seront donc pas systématiquement représentées sur les courbes de résultats présentées dans ce mémoire.

II.2.3.2 Calcul de l'incertitude sur les paramètres C_1 , C_2 et μ

Les paramètres C_1 , C_2 et μ sont issus de l'ajustement des équations 36 et 37 avec les données expérimentales. Le tableau 5 propose une comparaison des valeurs des paramètres obtenus pour les trois échantillons dont les résultats expérimentaux sont présentés sur la figure 54, page 125. On constate de façon générale que les ajustements aboutissent à des valeurs numériques concordantes entre les deux répétitions effectuées pour un même échantillon. On peut cependant remarquer que la variabilité relative du paramètre μ est plus grande que celle des paramètres C_1 et C_2 . Nous attribuons cela au fait que la précision du paramètre μ est relativement moins bonne que celle des paramètres C_1 et C_2 .

		C_1	C_2	μ
Echantillon 1	Répétition 1	0,2020	0,1947	0,9047
	Répétition 2	0,2025	0,1947	0,8942
Echantillon 2	Répétition 1	0,2019	0,1941	0,9210
	Répétition 2	0,2022	0,1940	0,9151
Echantillon 3	Répétition 1	0,2073	0,1928	0,8329
	Répétition 2	0,2075	0,1927	0,8314
Variabilité absolue moyenne		0,0003	0,0001	0,006
Variabilité relative moyenne (%)		0,2	0,03	0,7

TAB. 5 : Valeur des paramètres C_1 , C_2 et μ obtenus par l'ajustement des équations 36 et 37 avec les données expérimentales de trois échantillons.

Il est en effet possible d'associer à chaque paramètre C_1 , C_2 et μ une incertitude $u(C_1)$, $u(C_2)$ et $u(\mu)$ respectivement qui constitue une estimation de l'erreur commise sur la détermination du paramètre. Cette incertitude peut être évaluée en reprenant les expressions analytiques des différents paramètres (cf. annexe F). Connaissant l'incertitude statistique $u(I)$ sur la mesure des intensités de fluorescence, le calcul des propagations de cette incertitude sur les valeurs des incertitudes des différents paramètres (dont le

développement est également présenté dans l'annexe F) est réalisé et les applications numériques donnent les ordres de grandeur suivants :

$$u(C_1) \approx 0,0001 \text{ soit } 0,05\%$$

$$u(C_2) \approx 0,0001 \text{ soit } 0,05\%$$

$$u(\mu) \approx 0,011 \text{ soit } 1\%$$

Les valeurs de ces incertitudes statistiques expliquent donc bien les faibles écarts obtenus entre les deux répétitions réalisées pour chaque paramètre et présentées dans le tableau 5 et confirment que l'incertitude relative du paramètre μ est plus grande que celle des paramètres C_1 et C_2 .

II.3 Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter la mise en évidence expérimentale de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires. Il est clair que en théorie, l'anisotropie de fluorescence est influencée, non seulement par l'arrangement ordonné des fluorophores, mais également par les propriétés optiques des fibres musculaires, telle que la diffusion. A défaut de prendre en compte toutes ces propriétés, le modèle mis au point dans le chapitre 1 permet toutefois bien de réaliser l'ajustement aux données expérimentales et l'obtention des paramètres portant une information sur la structure de chaque échantillon.

Le nombre de paramètres de l'équation a été réduit pour assurer l'unicité des solutions. Les paramètres considérés pour la suite de l'étude seront donc finalement au nombre de trois : C_1 , C_2 et μ .

La répétition des mesures réalisées sur un même échantillon a permis de montrer que la répétabilité des résultats est très bonne puisque l'incertitude statistique sur les mesures de l'intensité est inférieure au pourcent. L'estimation de l'erreur commise sur la détermination des paramètres a été réalisée. Globalement, les valeurs des incertitudes obtenues n'étant jamais supérieures à quelques pourcents, ces barres d'erreurs ne seront volontairement pas systématiquement représentées sur les courbes de résultats, afin de ne pas nuire à leur clarté.

Chapitre III

Evolution de la structure des fibres musculaires avec la maturation

Les deux premiers chapitres de la partie "Résultats" ont permis de mettre en évidence de façons théorique et expérimentale les variations angulaires de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires, provenant de l'anisotropie de fluorescence intrinsèque du tryptophane et de l'alignement préférentiel de ce dernier le long des structures protéiques. Un modèle, constitué de trois paramètres (C_1 , C_2 et μ) caractéristiques de l'état des fibres musculaires et applicable aux données expérimentales, permet ainsi de caractériser la structure des échantillons.

Une application potentielle de cette démarche est d'étudier et de quantifier la structure des fibres musculaires et ses changements lors de la maturation de la viande. Le paragraphe III.2.1 de l'étude bibliographique (page 33) présente en effet l'importance de la maturation sur les qualités de la viande. L'évolution dans le temps des tissus musculaires pouvant être très variable, il existe donc un intérêt considérable à contrôler l'état d'avancement des modifications subies par un muscle en cours de maturation. La possibilité d'utiliser pour cela des méthodes potentiellement non destructives telles que les méthodes optiques présente un avantage en comparaison des méthodes connues actuellement basées sur la mesure destructive de la résistance mécanique des tissus [67].

III.1 Plan des expériences 1 et 2

Principes des deux expériences menées L'objectif des expérimentations menées était de mesurer macroscopiquement (avec le spectrofluorimètre) l'anisotropie de fluorescence d'un muscle au cours de sa phase de maturation, c'est à dire à différents temps *post mortem*. L'échantillonnage du muscle posait cependant quelques difficultés. En effet, comme le montre la figure 54 (page 125), les irrégularités de la structure du muscle induisent une variabilité importante entre les différents échantillons prélevés sur un même muscle. Afin de s'affranchir de cette variabilité inter-échantillons, inhérente à la structure du muscle, et de mettre en évidence des différences dues uniquement à l'état de maturation, deux solutions étaient possibles. Nous avons décidé de mettre en œuvre ces deux solutions au cours de deux expériences :

- Expérience 1 : les mesures à tous les temps *post mortem* ont été réalisées sur le même échantillon.
- Expérience 2 : à chaque temps *post mortem*, plusieurs échantillons sont prélevés et une moyenne des résultats des mesures est effectuée.

Les résultats de l'anisotropie de fluorescence ont été comparés à ceux obtenus grâce aux mesures de résistance à la compression qui constituent une grandeur de référence de l'état de maturation (cf. annexe G pour le principe de la mesure).

Préparation des échantillons et mesures au spectrofluorimètre Les échantillons de dimensions adaptées au porte-échantillon ont été découpés dans un muscle à des emplacements choisis aléatoirement et de telle façon que l'axe principal des fibres soit parallèle à la surface de l'échantillon.

Pour l'expérience 1 il s'agissait d'un muscle *Semi membranosus* (race blonde d'Aquitaine). Comme la partie mobile du porte-échantillon a été fabriquée en quatre exemplaires nous avons la possibilité de préparer quatre échantillons différents au premier jour et de les laisser en place dans ces porte-échantillons tout au long de l'expérience. En dehors des moments où un échantillon était positionné dans le spectrofluorimètre, il était conservé dans sa monture en chambre froide (5 ° C). Nous avons choisi de prélever trois des quatre échantillons dans la partie dite "rouge" du muscle (partie standard) et de prélever le dernier échantillon dans une autre zone qui est dite partie "blanche" du muscle, dont les

caractéristiques des fibres musculaires sont différentes de celles de la partie rouge. Les mesures ont été effectuées de 1 à 14 jours *post mortem*.

Pour l'expérience 2 il s'agissait d'un muscle *Triceps brachii caput longum*. Entre deux et six échantillons ont été prélevés à chaque temps de mesure, positionnés dans un des porte-échantillons et analysés. Dans le cas où l'on mesurait la fluorescence de six échantillons au même temps *post mortem*, la prise de mesure durait en fait une journée. Afin que le premier et le dernier échantillon puissent être considérés dans un état de maturation proche, tous les échantillons étaient conservés dans un bain de glace fondante avant d'être utilisés pour la mesure. Ce procédé permet de ralentir l'évolution des échantillons. Les mesures ont été effectuées de 1 à 21 jours *post mortem*.

III.2 Résultats

III.2.1 Analyse des résultats de l'expérience 1

III.2.1.1 Mesures mécaniques de référence

La figure 55 représente les résultats obtenus grâce aux tests de compression mécanique réalisés sur le muscle *Semi membranosus*. Chaque point a été obtenu d'après la moyenne des mesures de 5 à 14 échantillons de muscle. Les échantillons ont été prélevés uniquement dans la partie "rouge" du muscle.

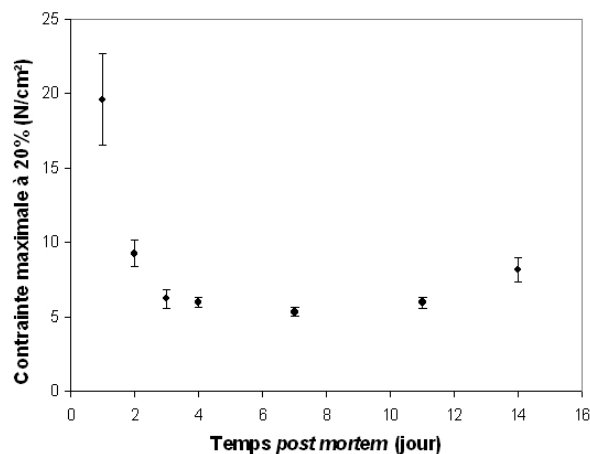


FIG. 55 : Evolution *post mortem* de la contrainte maximale à 20 % de compression du muscle *Semi membranosus*.

L'évolution de la contrainte maximale à 20% reflète les modifications qui ont lieu au sein de la structure des fibres musculaires en raison de la maturation et qui influencent le comportement rhéologique des tissus musculaires. Ainsi, les paramètres rhéologiques sont étroitement corrélés avec l'indice biochimique¹ indiquant l'état de la maturation des fibres musculaires. La diminution de la contrainte maximale à 20% s'explique par le fait que la structure des fibres musculaires est progressivement fragilisée par les altérations enzymatiques et physico-chimiques. Une caractéristique importante de cette courbe est que la contrainte maximale à 20% tend asymptotiquement vers un niveau, correspondant à la contrainte résiduelle, qui constitue une référence de la maturation optimale [67]. On peut donc conclure que le muscle utilisé ici est mûri au bout de 3 à 4 jours *post mortem*.

Il est important de faire une remarque concernant le protocole de mesure utilisé pour les mesures mécaniques. Les mesures réalisées au premier jour *post mortem*, présentées dans le tableau 6, nécessitent en effet une attention particulière.

Ech.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Mesure	18,5	12,7	12,8	4,7	5,6	20,6	29,0	12,2	5,5	31,6	5,3	6,7	5,6	6,8

TAB. 6 : Contrainte à 20% (N/cm^2) mesurée pour les 14 échantillons de muscle *Semi membranosus* au premier jour *post mortem*.

Au premier abord, on constate que les valeurs de la contrainte à 20% sont variables, mettant en évidence la variabilité de l'état des fibres musculaires en différents endroits du muscle. Puis, on peut remarquer plus particulièrement que les échantillons 4, 5, 9 et 11 à 14 affichent des valeurs relativement basses de la contrainte à 20%. Ce résultat ne doit cependant pas être interprété comme un état de maturation avancé de ces échantillons, mais plutôt que ces derniers ne sont pas encore dans la phase d'installation de la rigidité cadavérique (ou *rigor mortis*). En effet, au tout début de cette phase, c'est-à-dire juste après l'abattage, l'ATP contenu dans le muscle joue le rôle de relaxant : la contrainte à 20% est alors initialement basse. Puis, la diminution de la quantité d'ATP présent dans le muscle entraîne une augmentation de la contrainte à 20% qui atteint un maximum à

¹Basé sur l'activité ATPasique myofibrillaire

la *rigor mortis*. La contrainte à 20% diminue ensuite au cours de la phase de maturation, comme expliqué précédemment [67]. En conclusion, les résultats provenant des échantillons 4, 5, 9 et 11 à 14 doivent être exclus, et ne sont pas pris en compte sur la courbe présentée par la figure 55. Cela signifie aussi que les échantillons prélevés à 1 jour *post mortem* pour les mesures de fluorescence sont susceptibles d'être dans ce même état *ante rigor*.

III.2.1.2 Mesures de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence du muscle *Semi membranosus* a déjà été mise en évidence par la figure 52, page 119. L'ajustement des équations 36 et 37 aux données expérimentales des quatre échantillons aux différents temps *post mortem* permet d'obtenir les variations des paramètres C_1 , C_2 et μ , représentées sur la figure 56, page 136. Pour les trois échantillons prélevés sur la partie rouge du muscle on utilise la moyenne des paramètres obtenus. Par conséquent, les barres d'erreurs sur les courbes sont :

- l'écart-type statistique des paramètres, dans le cas des échantillons issus de la partie rouge du muscle ;
- l'incertitude sur les paramètres (déterminée dans le paragraphe II.2.3.2, page 128), dans le cas de l'échantillon issu de la partie blanche du muscle.

D'autre part, la figure 57, page 137 montre les variations de l'anisotropie de fluorescence maximale, c'est-à-dire l'anisotropie de fluorescence mesurée avec un angle de rotation de l'échantillon $\gamma=0^\circ$, avec le temps *post mortem*. Une légère diminution avec le temps peut être observée, en particulier si l'on considère que certaines mesures effectuées à un jour *post mortem* sont susceptibles d'être biaisées.

De manière générale, les variations avec le temps *post mortem* des différents paramètres ne montrent pas vraiment de modification significative. Les paramètres C_1 , C_2 et μ ne sont donc pas corrélés *a priori* avec l'état de maturation du muscle. Le protocole de mesure utilisé dans l'expérience 1, pour lequel les mesures aux différents temps sont réalisées sur les mêmes échantillons, ne semble pas adapté. Une des causes possible de cet échec est que les échantillons, qui sont prélevés du muscle un jour après l'abattage et conservés dans les porte-échantillons tout au long de l'expérience, ne subissent probablement pas la même évolution que le muscle lui-même, qui est conservé sous vide.

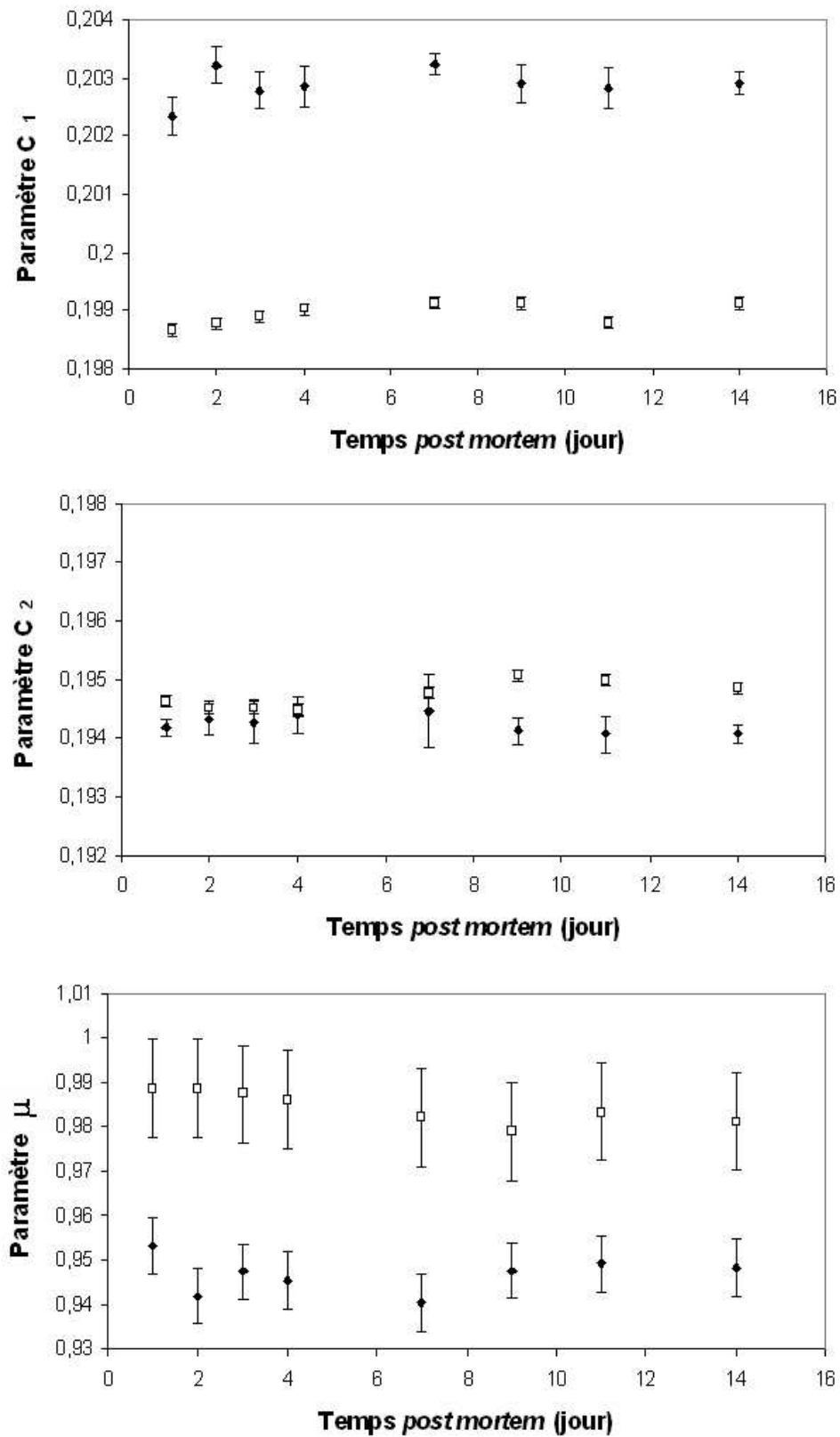


FIG. 56 : Evolution *post mortem* des différents paramètres d'ajustement C_1 , C_2 et μ des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) d'un muscle *Semi membranosus* : pour la partie rouge (♦) et pour la partie blanche (□) du muscle.

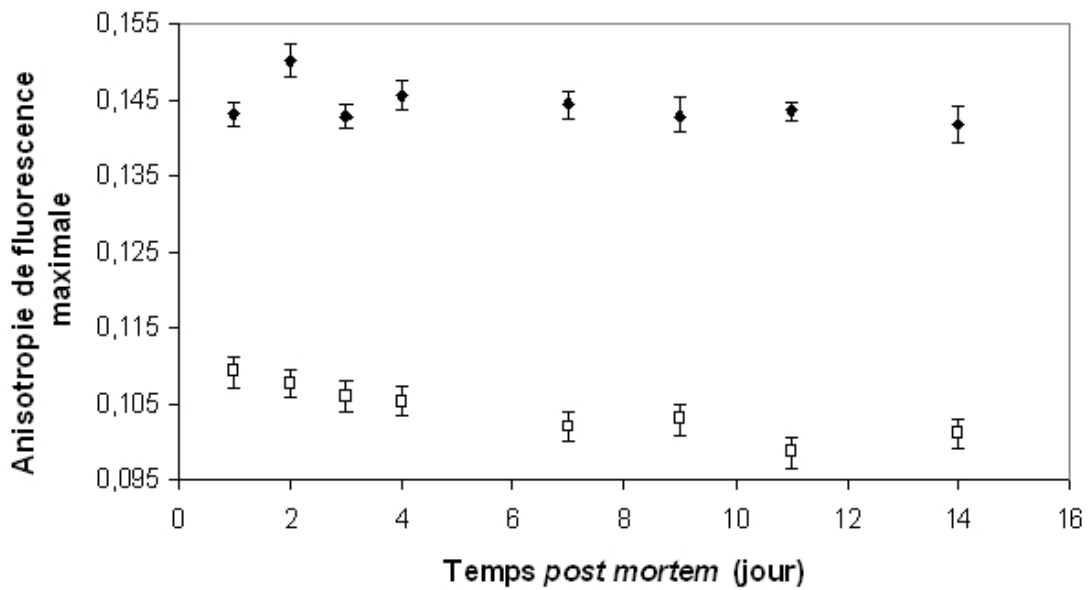


FIG. 57 : Evolution *post mortem* de l'anisotropie de fluorescence maximale d'un muscle *Semi membranosus* pour la partie rouge (◆) et pour la partie blanche (□) du muscle.

Si les mesures en fonction du temps *post mortem* ne permettent pas de caractériser l'état de déstructuration du muscle, les résultats permettent en revanche de distinguer les fibres blanches des fibres rouges. Ce phénomène est également visible si l'on examine les valeurs maximales de l'anisotropie de fluorescence (cf. figure 57) qui sont largement inférieures pour les fibres blanches que pour les fibres rouges. Ces différences trouvent certainement leur origine dans le fait que les fibres rouges et les fibres blanches ont des propriétés très différentes : apparence visuelle et caractéristiques physiologiques et biochimiques. Le tableau 7 compare certaines de ces caractéristiques.

Classification	Fibres rouges	Fibres blanches
Couleur	Rouge	Blanche
Teneur en myoglobine	Forte	Faible
Largeur de la strie Z	Large	Fine
Section	Petite	Grande
Teneur en glycogène	Faible	Forte

TAB. 7 : Caractéristiques principales des divers types de fibres musculaires (d'après [123]).

A ce niveau, il est utile de rappeler que les caractéristiques de la fluorescence du tryptophane dépendent fortement de son environnement proche. Par conséquent, le spectre d'absorption du tryptophane, mettant en œuvre deux transitions 1L_a et 1L_b dont les niveaux d'énergie varient en fonction des interactions du tryptophane avec son environnement, est très sensible aux conditions de mesure. Il est donc possible de formuler l'hypothèse que l'environnement physico-chimique du tryptophane diffère selon le type de fibres musculaires, induisant alors des modifications de son spectre d'absorption et de son spectre d'excitation de polarisation. Ces modifications se répercutent logiquement sur le modèle d'ajustement des données que nous utilisons au niveau du paramètre μ , qui indique les variations relatives de ces deux transitions d'absorption.

De plus, l'hypothèse d'un environnement différent du tryptophane dans les fibres rouges et les fibres blanches est renforcée par l'examen de son spectre d'émission. Comme le montre la figure 58, un léger décalage en longueur d'onde est visible si l'on compare les spectres d'émission de fluorescence normalisés des deux types de fibres. Ces spectres ont été obtenus en moyennant les spectres acquis pour tous les échantillons utilisés dans cette expérience et à tous les temps *post mortem*. Les barres d'erreurs, correspondant aux écart-types obtenus, ne sont pas représentées car ceux-ci ne sont que de 0,4% en moyenne. La différence observée entre les spectres est donc supérieure, mais la significativité de cette différence reste discutable. Lakowicz ([62]) explique que les variations du

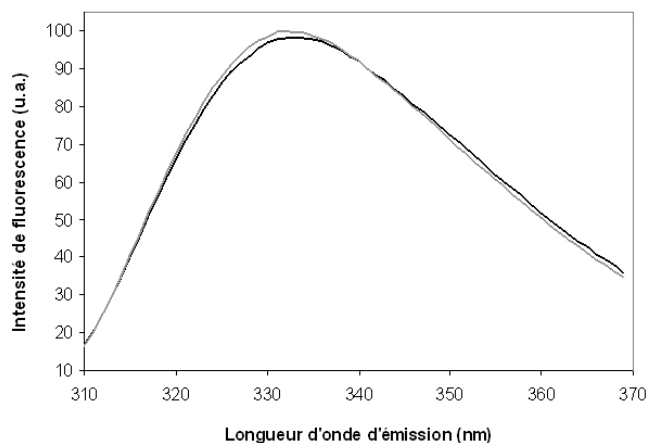


FIG. 58 : Comparaison des spectres d'émission de fluorescence moyens d'un muscle *Semi membranous* pour la partie rouge (—) et pour la partie blanche (—) du muscle.

spectre d'émission du tryptophane sont dues à l'environnement moyen de ce dernier. La différence obtenue entre les spectres d'émission de fluorescence des échantillons de fibres rouges et de fibres blanches est donc une confirmation que l'environnement moyen du tryptophane n'est pas identique dans les deux cas.

Il est également possible de proposer une explication des différences observées pour le paramètre C_1 (et C_2 dans une moindre mesure) en s'appuyant sur le tableau 7. La section des fibres rouges étant plus faible que celle des fibres blanches, on peut penser que l'alignement des fluorophores supportés par les structures protéiques longitudinales à l'axe des fibres est meilleur, ce qui impliquerait une augmentation du paramètre C_1 .

Enfin, les écarts observés sur l'anisotropie de fluorescence maximale (cf. figure 57) s'expliquent logiquement par les variations des paramètres d'ajustement du modèle. En effet, pour un angle de rotation de l'échantillon $\gamma=0^\circ$, la simplification des équations 36 et 37 donne $I_{VV}(\gamma = 0^\circ) \propto C_1^2$ et $I_{VH}(\gamma = 0^\circ) \propto \mu C_2^2$, d'où :

$$r(\gamma = 0^\circ) = \frac{\frac{C_1^2}{k\mu C_2^2} - 1}{\frac{C_1^2}{k\mu C_2^2} + 2} \quad (44)$$

où k est un facteur de proportionnalité instrumental.

Ainsi, l'anisotropie de fluorescence r augmente lorsque le rapport $C_1^2/\mu C_2^2$ augmente. Une valeur plus élevée du paramètre C_1 et moins élevée du paramètre μ , comme c'est le cas pour les fibres rouges, se traduit donc bien par une valeur de l'anisotropie de fluorescence à $\gamma=0^\circ$ plus élevée.

Par ailleurs, un autre élément qui peut être abordé pour expliquer les différences de l'anisotropie de fluorescence, et qui n'est pas pris en compte dans le modèle d'ajustement, est la différence des propriétés de diffusion des deux types de fibres. Le glycogène est en effet un diffuseur de la lumière. Présent en plus grande quantité dans les fibres blanches ([66]), on peut penser qu'il augmente la diffusion des photons, entraînant des dépolarisations supplémentaires qui se traduisent par une diminution de l'anisotropie.

III.2.2 Analyse des résultats de l'expérience 2

III.2.2.1 Mesures mécaniques de référence

La figure 59 représente les résultats obtenus grâce aux tests de compression mécanique réalisés sur le muscle *Triceps brachii caput longum*. Chaque point a été obtenu d'après la moyenne des mesures de 16 à 21 échantillons de muscle.

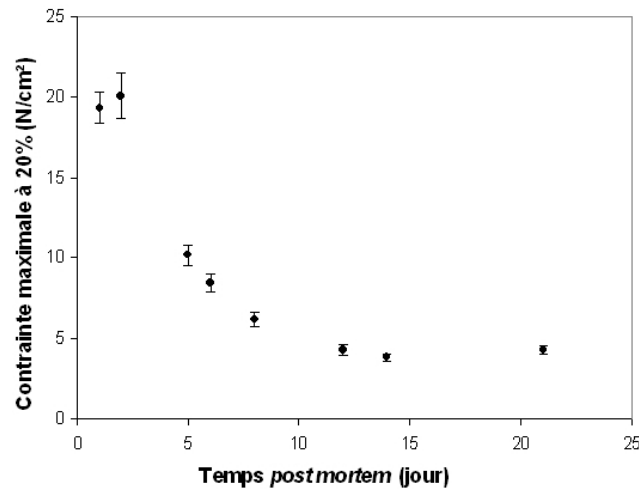


FIG. 59 : Evolution *post mortem* de la contrainte maximale à 20 % de compression d'un muscle *Triceps brachii caput longum*.

L'analyse de ce type de courbe a déjà été expliquée dans le paragraphe III.2.1.1, page 133. On peut conclure que le muscle de l'expérience 2 est mûr au bout d'une douzaine de jours *post mortem*.

III.2.2.2 Mesures de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence du muscle *Triceps brachii caput longum* est mise en évidence par la figure 60, page 141, où sont représentées les variations angulaires des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence.

Les données expérimentales des 2 à 6 échantillons prélevés sur le muscle aux différents temps *post mortem* sont ajustées avec les équations 36 et 37 afin d'obtenir les variations des paramètres C_1 , C_2 et μ avec le temps *post mortem*. Les résultats obtenus sont montrés

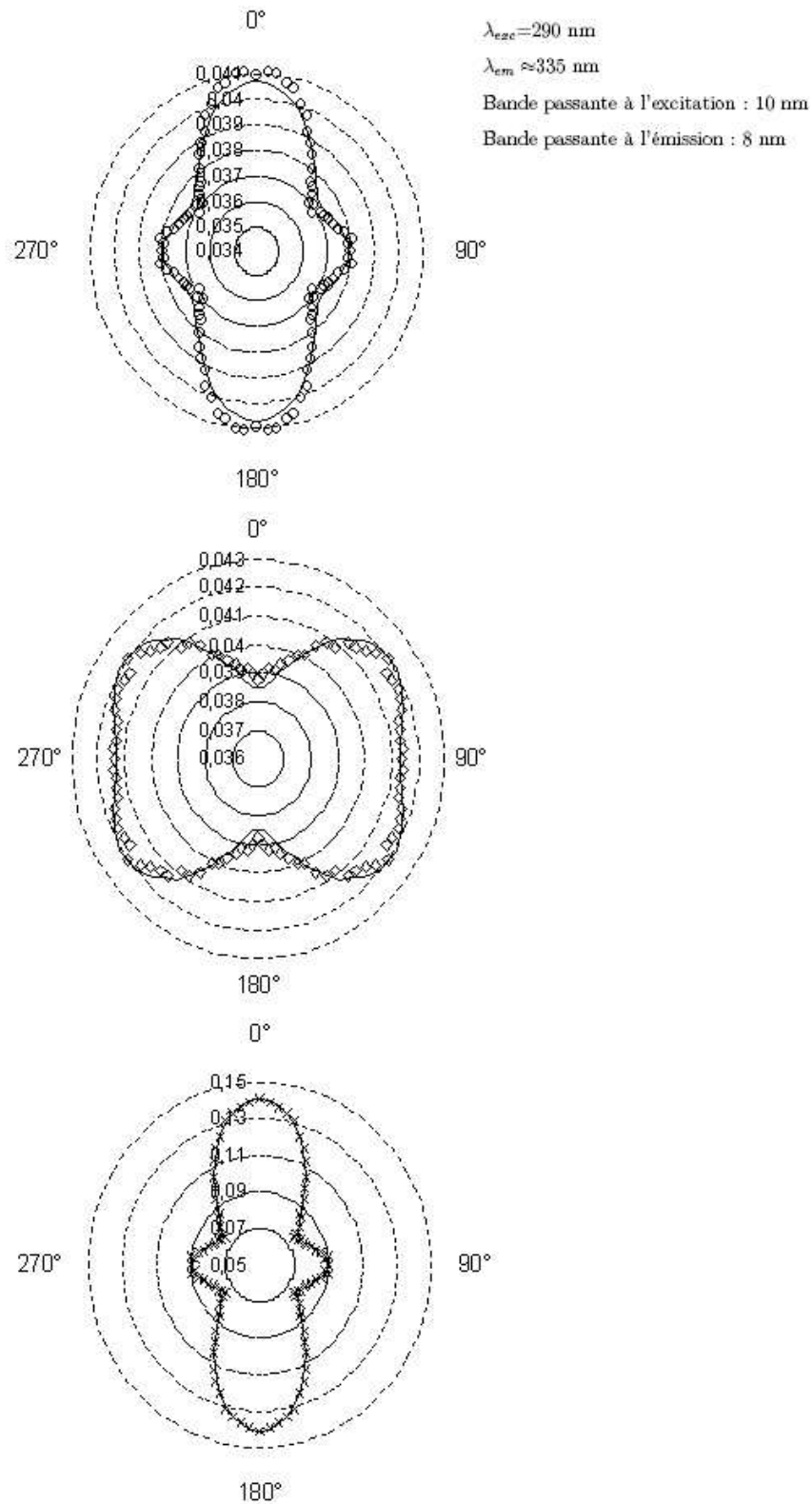


FIG. 60 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} (\circ) et I_{VH} (\diamond) et de l'anisotropie de fluorescence (\times) obtenues pour un échantillon issu de muscle *Triceps brachii caput longum*. Les courbes issues des ajustements des données expérimentales de I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) sont représentées par les traits pleins.

sur la figure 61, page 143. Les variations des paramètres C_1 et μ montrent cette fois des modifications en fonction du temps *post mortem* : on constate une différence significative entre les valeurs de ces deux paramètres avant 6 jours *post mortem* et après 8 jours *post mortem*. Les paramètres C_1 et μ sont donc corrélés avec l'état de maturation du muscle. En revanche, le paramètre C_2 ne subit pas de changement significatif.

Les variations du paramètre μ peuvent être interprétées de la même manière que pour l'expérience 1. La maturation de la viande consiste en une dégradation des protéines de structure des myofibrille, résultant d'un ensemble de processus de natures physico-chimique et enzymatique. Une hypothèse est donc que ces processus impliquent des modifications significatives de l'environnement du tryptophane, modifiant son spectre d'excitation de polarisation. L'augmentation du paramètre μ signifierait que la transition 1L_a est plus sollicitée, et respectivement la transition 1L_b est moins sollicitée. D'après Lakowicz ([62]), cette première transition est très sensible à la polarité de l'environnement du tryptophane, tandis que la deuxième ne l'est pas. Ainsi, l'augmentation du paramètre μ corrélée avec l'état de maturation du muscle pourrait par exemple traduire une augmentation de la polarité du liquide sarcoplasmique.

Les variations du paramètre C_1 peuvent être interprétées en proposant que la dénaturation des protéines de structure des myofibrilles entraînent une diminution du degré d'alignement des fluorophores. Les dégradations subies par les protéines peuvent en effet augmenter la mobilité des structures et du tryptophane qui y est rattaché. Le désalignement de ces éléments serait cohérent avec une diminution du paramètre C_1 qui est proportionnel à la quantité de fluorophores alignés autour de l'axe longitudinal aux fibres musculaires. On peut noter de plus que la valeur du paramètre C_1 au premier jour *post mortem* est susceptible d'être biaisée par le fait que le muscle est peut être localement encore dans la phase *ante rigor* (cf. figure 59).

D'après les résultats du paramètre C_2 , les modifications de structures induites par la maturation ne semblent pas en revanche porter atteinte de manière significative à l'alignement des fluorophores alignés transversalement aux fibres musculaires.

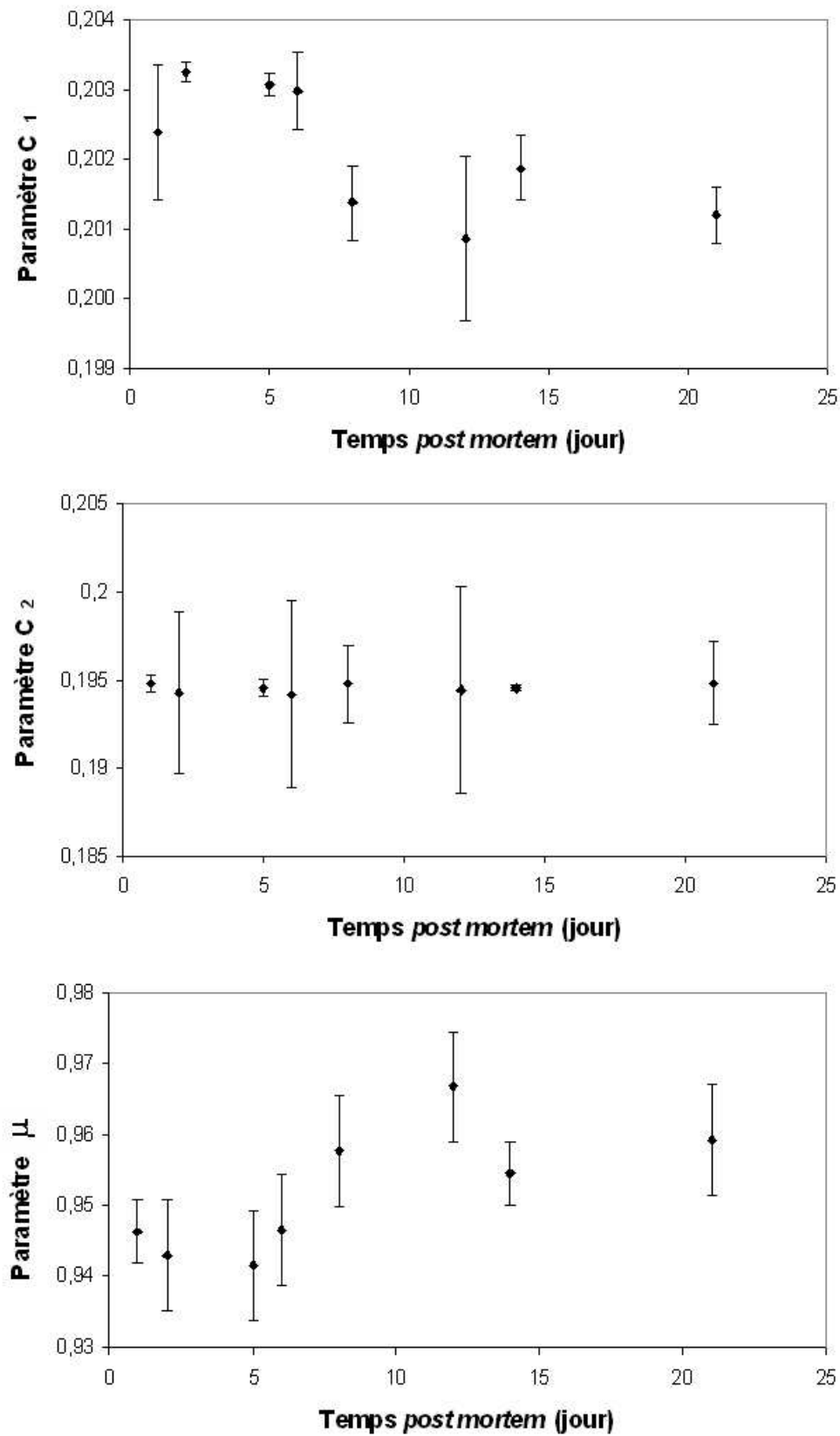


FIG. 61 : Evolution *post mortem* des différents paramètres d'ajustement C_1 , C_2 et μ des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) d'un muscle *Triceps brachii caput longum*.

Les variations de l'anisotropie de fluorescence maximale ($\gamma=0^\circ$) décrivent également un saut ayant lieu entre le quatrième et le septième jour *post mortem*, comme montré sur la figure 62. D'après l'équation 44, page 139, la diminution de l'anisotropie maximale mesurée est liée à la diminution du paramètre C_1 et à l'augmentation du paramètre μ . Cette diminution de l'anisotropie des fibres musculaires est cohérente avec leur dégradation qui détériore l'alignement des structures à l'échelle des myofibrilles.

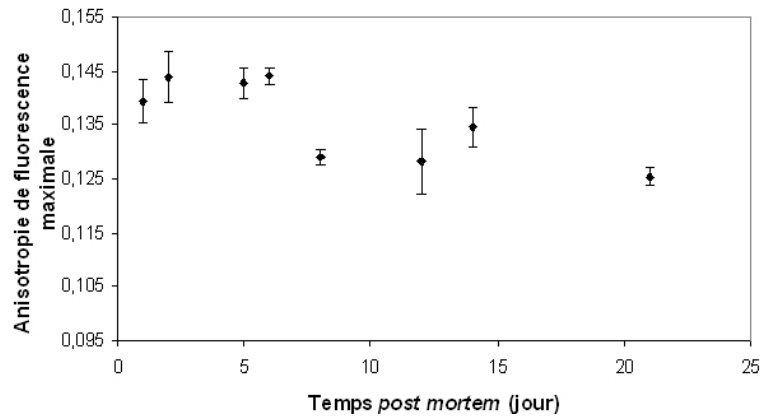


FIG. 62 : Evolution *post mortem* de l'anisotropie de fluorescence maximale d'un muscle *Triceps brachii caput longum*.

III.3 Conclusion

Le protocole de mesure utilisé dans l'expérience 2 est plus adapté que celui de l'expérience 1 puisqu'il permet d'obtenir des résultats plus sensibles à l'état de maturation du muscle. La variabilité du muscle induisant des écarts-types parfois importants entre les résultats obtenus pour un temps *post mortem* donné, il conviendrait de reproduire les mesures sur un plus grand nombre d'échantillons.

Les paramètres C_1 et μ du modèle d'ajustement aux données expérimentales semblent corrélés avec le degré de maturation de la viande. Ils varient de façon cohérente avec la dénaturation des protéines de structure des myofibrilles et les modifications probables de l'environnement du tryptophane résultant des processus de natures physico-chimique et enzymatique subies dans le temps par le muscle. La mesure de l'anisotropie de fluorescence est donc sensible à des modifications de la structure du muscle à l'échelle des myofibrilles.

Chapitre IV

Modifications de la structure des fibres musculaires en fonction de la longueur des sarcomères

Investiguer la longueur des sarcomères présente un intérêt pour détecter le phénomène de contraction à froid du muscle, présenté dans le paragraphe III.2.2 de l'étude bibliographique (page 34). Des méthodes optiques ont déjà été proposées pour répondre à cette problématique, telles que l'imagerie microscopique ([85]) et la mesure de réflectance ([107]). L'objet du présent chapitre est ainsi d'appliquer la mesure de l'anisotropie de fluorescence résolue angulairement à cette problématique afin de savoir si cette méthode peut être potentiellement utilisée pour étudier les modifications de la structure des fibres musculaires en fonction de la longueur des sarcomères.

IV.1 Plan de l'expérience

Principe L'objectif des expérimentations menées était de mesurer macroscopiquement (avec le spectrofluorimètre) l'anisotropie de fluorescence d'un muscle en fonction du degré de contraction et d'étirement de ses fibres. La contraction et l'étirement des sarcomères ont été obtenus en appliquant différents types de traitement au muscle durant la phase d'installation de la *rigor mortis*. La longueur des sarcomères a été ensuite établie par observation microscopique de fibres musculaires isolées, qui constitue une méthode

de référence. L'échantillonnage du muscle a été réalisé d'après les conclusions du chapitre précédent : afin de s'affranchir de la variabilité inter-échantillons due à la structure du muscle irrégulière, et de ne mettre en évidence que des différences dues à la longueur des sarcomères, la mesure a été reproduite sur un maximum d'échantillons, au même temps *post mortem*.

Préparation initiale des échantillons Afin de disposer d'un maximum d'échantillons pour les mesures de l'anisotropie de fluorescence, deux muscles *Sternomandibularis* (race Charolaise) ont été utilisés dans cette expérience. Une à deux heures seulement après l'abattage, les deux muscles ont été échantillonnés chacun en trois parties, subissant respectivement trois types de traitements :

- Pour la partie "normale", c'est-à-dire à l'état de repos, des conditions de refroidissement optimales du muscle ont été appliquées : après conditionnement sous vide, elle a été immergée dans un bain d'eau à 15 ° C, lui-même placé dans la chambre froide à 5 ° C. Le rapport de la masse d'eau par rapport à la masse de muscle a été calculé de façon à ce que le muscle atteigne 5 ° C en douze heures. Ce refroidissement lent a évité tout phénomène de contraction à froid des sarcomères et a permis d'obtenir des échantillons standards.
- Pour la partie "contractée", des conditions de refroidissement rapides du muscle ont été appliquées : après conditionnement sous vide, elle a été immergée dans un bain de glace, lui-même placé dans la chambre froide à 5 ° C. Ce refroidissement rapide a provoqué le phénomène de contraction à froid des sarcomères et a permis d'obtenir des échantillons contractés.
- Pour la partie "étirée", des conditions de refroidissement optimales du muscle ont été appliquées ainsi qu'un étirement mécanique à l'aide de mors : après conditionnement sous vide, le tout a été immergé dans un bain d'eau à 15 ° C, lui-même placé dans la chambre froide à 5 ° C. Ce refroidissement lent additionné d'une contrainte d'étirement a permis d'obtenir des échantillons étirés.

Après la *rigor mortis*, la partie étirée a été libérée des mors et reconditionnée normalement sous vide et toutes les parties de muscles ont été stockées dans la chambre froide à 5 ° C.

Mesures au spectrofluorimètre Après six jours *post mortem*, des échantillons de dimensions adaptées au porte-échantillon ont été découpés à des emplacements choisis aléatoirement dans les différentes parties de muscle et de telle façon que l'axe principal des fibres soit parallèle à la surface de l'échantillon. Au total, 15 à 16 échantillons de chaque type ont été analysés.

Préparation intermédiaire des échantillons Environ la moitié des échantillons utilisés pour les mesures au spectrofluorimètre a été réutilisée pour les mesures microscopiques de référence. Dans ce but, des fibres musculaires issues de chacun des échantillons sélectionnés au hasard ont été isolées à l'aide d'une pince. Les fibres ont ensuite été placées entre lame et lamelle avec un peu d'eau distillée.

Mesures microscopiques Ces préparations ont ensuite été observées avec le microscope Nikon Eclipse 50i. La longueur moyenne des sarcomères a été évaluée pour chaque fibre en réalisant une moyenne des mesures réalisées sur les images acquises en plusieurs endroits de la fibre. Finalement, une moyenne des résultats obtenus sur toutes les fibres musculaires analysées a été réalisée en fonction du type d'échantillon (contracté, normal ou étiré) sur lequel ont été prélevées les fibres.

IV.2 Résultats

IV.2.1 Analyse des résultats obtenus en microscopie

La figure 63, page 148 montre des exemples d'images obtenues pour des fibres issues d'échantillons de muscle contracté, normal et étiré. On distingue clairement sur ces images les sarcomères qui donnent leur apparence striée aux fibres musculaires. Un autre indice du degré d'étirement ou de contraction des fibres est leur diamètre : à volume constant, plus la fibre est étirée, respectivement contractée, plus son diamètre est diminué, respectivement augmenté.

Il est nécessaire de noter que la mesure de la longueur des sarcomères a été réalisée plus difficilement sur les échantillons de muscle contractés. En effet, pour une fibre dont

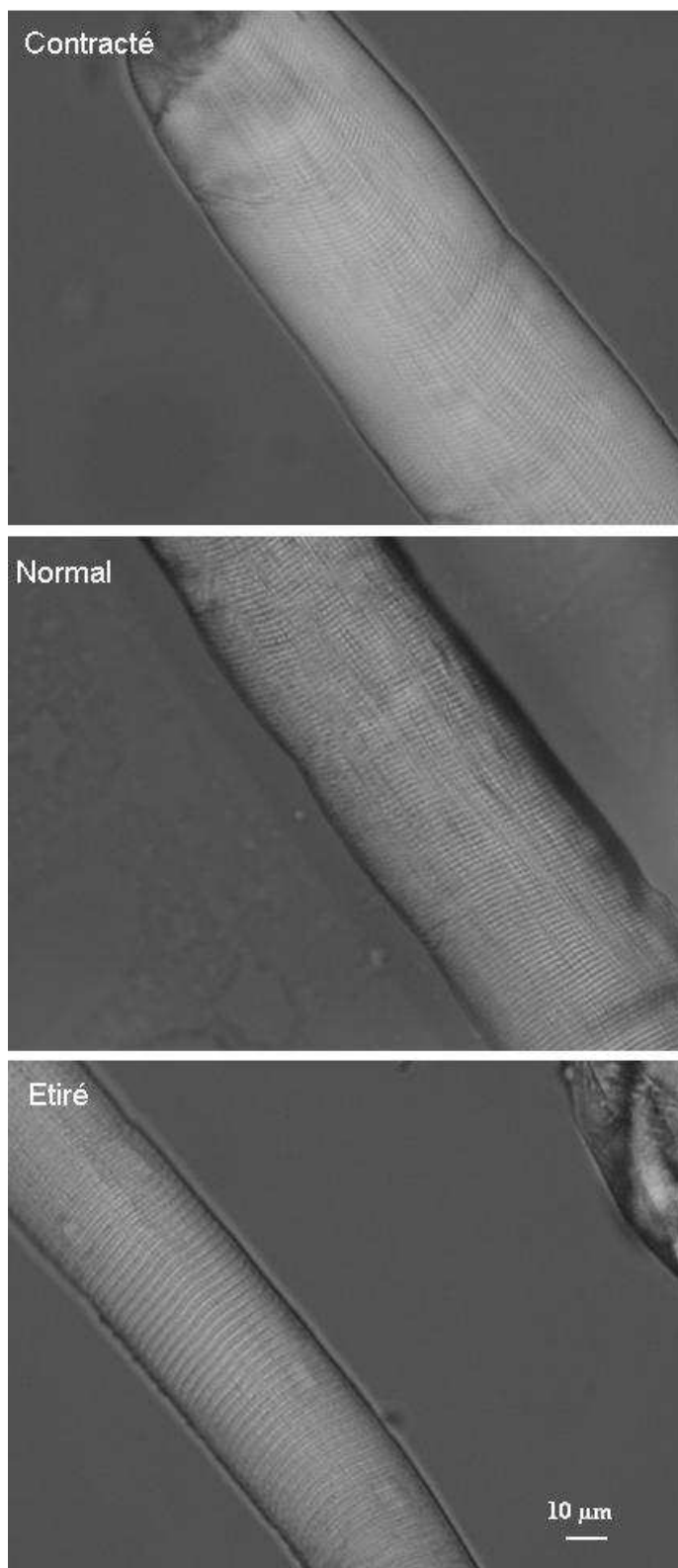


FIG. 63 : Exemples d'images microscopiques obtenues en transmission avec l'objectif $\times 40$ pour des fibres musculaires dont l'état est contracté, normal et étiré.

le degré de contraction est important, les striations n'étaient pas visibles avec un objectif $\times 40$, la mesure a donc dû être réalisée avec l'objectif $\times 100$ du microscope Nikon Eclipse 50i.

Par ailleurs, si les sarcomères de la fibre contractée de la figure 63 sont bien visibles sur cet exemple réalisé avec un objectif $\times 40$, c'est parce que cette fibre, bien que venant d'un échantillon de muscle contracté, ne présentait pas une contraction très importante. Nous nous retrouvons ici de nouveau face au problème de la variabilité inter-échantillons : les fibres musculaires provenant d'un même échantillon présentent une certaine variabilité dans la longueur de leurs sarcomères. C'est pour cela que pour un même échantillon de muscle, plusieurs fibres ont été extraites et analysées.

Finalement, l'étude statistique de toutes les mesures effectuées en microscopie donne les résultats présentés dans le tableau 8.

Classification	Longueur des sarcomères
Etat contracté	$1,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$
Etat normal	$2,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$
Etat étiré	$3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$

TAB. 8 : Longueurs moyennes des sarcomères des parties contractée, normale et étirée des deux muscles *Sternomandibularis*.

Les données du tableau 8 montrent ainsi que les fibres musculaires se sont contractées de 24% par rapport à leur longueur standard et ont été étirées de 62%. Ces pourcentages sont en accord avec la contraction et l'étirement observés à l'échelle des différentes parties de muscle. Prenant en compte les longueurs des différentes parties avant et après traitement, les ordres de grandeur des degrés de contraction et d'étirement étaient en effet respectivement de 30% et 55% environ.

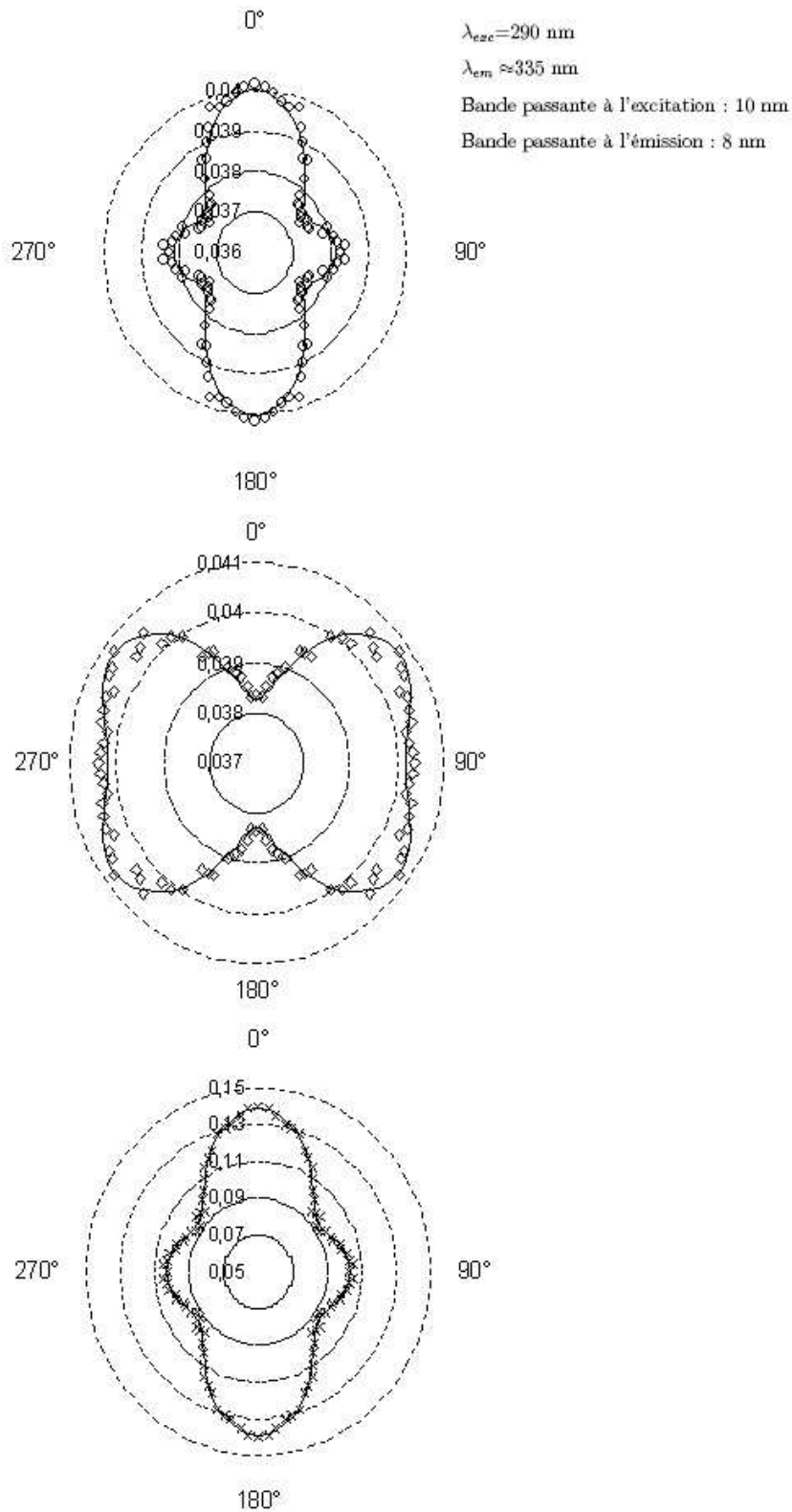


FIG. 64 : Distributions angulaires des intensités de fluorescence normalisées I_{VV} (\circ) et I_{VH} (\diamond) et de l'anisotropie de fluorescence (\times) obtenues pour un échantillon issu de muscle *Sternomandibularis*. Les courbes issues des ajustements des données expérimentales de I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) sont représentées par les traits pleins.

IV.2.2 Analyse des résultats obtenus au spectrofluorimètre

L'anisotropie de fluorescence du muscle *Sternomandibularis* est mise en évidence par la figure 64, page 150, où sont représentées les variations angulaires des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} et de l'anisotropie de fluorescence.

Au total pour les deux muscles *Sternomandibularis*, 16 échantillons ont été utilisés pour l'étude des parties contractées et normales, et 15 échantillons pour les parties étirées. Les données expérimentales obtenues sont ajustées avec les équations 36 et 37 afin d'obtenir les variations des paramètres C_1 , C_2 et μ en fonction de la longueur des sarcomères. Les résultats obtenus pour les paramètres C_1 et C_2 sont montrés sur la figure 65, page 152. Les tests de comparaison de moyenne effectués sur les résultats de ces deux paramètres ont permis de mettre en évidence la significativité ou non des différences obtenues pour les trois groupes.

Les variations du paramètre C_1 montrent que la contraction des sarcomères induit une diminution significative du nombre moyen de fluorophores alignés longitudinalement à l'axe des fibres musculaires. Cependant, on ne note pas de différence entre les échantillons normaux et étirés. Les variations du paramètre C_2 expriment au contraire une diminution significative du nombre moyen de fluorophores alignés transversalement à l'axe des fibres musculaires lorsque la longueur des sarcomères est augmentée. Par conséquent, le rapport de ces deux paramètres croît avec la longueur des sarcomères.

L'interprétation de ces résultats peut être effectuée en accord avec la publication de Swatland ([107]). De façon générale, l'étirement des fibres musculaires améliore l'alignement des structures myofibrillaires. Les structures des parties étirées ont donc un alignement plus ordonné que les parties normales. A l'inverse, la contraction des fibres musculaires nuit à l'alignement des structures myofibrillaires.

Or, un meilleur alignement des structures protéiques, et des fluorophores qui y sont rattachés, contribue à augmenter l'anisotropie de structure de l'échantillon. De la même manière, le désalignement des structures protéiques diminue l'anisotropie de structure de l'échantillon, le rapprochant alors de l'isotropie, qui se traduirait par une quantité

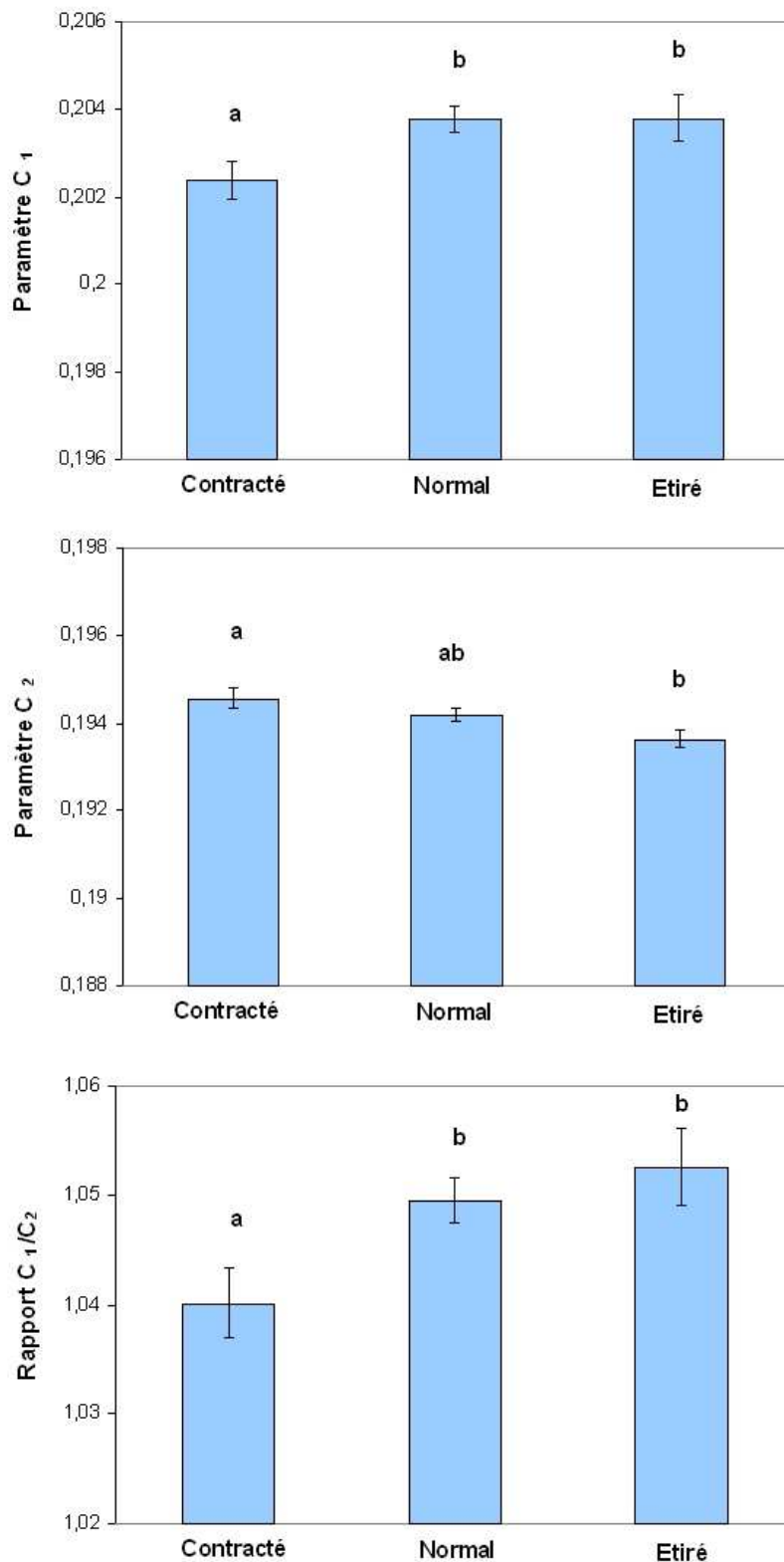


FIG. 65 : Modification des différents paramètres d'ajustement C_1 et C_2 des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} avec les équations 36 et 37 (page 123) du muscle *Sternomandibularis* en fonction du degré de contraction du muscle. Les lettres *a* et *b* représentent les groupes obtenus grâce aux tests de significativité.

semblable de fluorophores alignés dans toutes les directions. Cette notion d'isotropie est visible sur le graphe montrant les variations du rapport C_1/C_2 qui se rapproche de l'unité pour les échantillons contractés.

Il convient de remarquer que l'interprétation des résultats se fait uniquement en terme d'anisotropie de fluorescence de structure et que l'anisotropie de fluorescence intrinsèque du tryptophane n'a pas été abordée étant donné que la modification de la longueur des sarcomères n'induit pas *a priori* de variations de l'environnement physico-chimique. C'est pour cette raison que les résultats du paramètre μ , qui ne montrent pas de variations avec la longueur des sarcomères, n'ont pas été représentés et n'ont pas de motif à être discutés.

Avant de conclure, on peut noter que les variations des paramètres C_1 et C_2 en fonction de la longueur des sarcomères, et donc de l'anisotropie de structure des échantillons sont également visibles sur les distributions angulaires moyennes de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour chaque groupe (cf. figure 66).

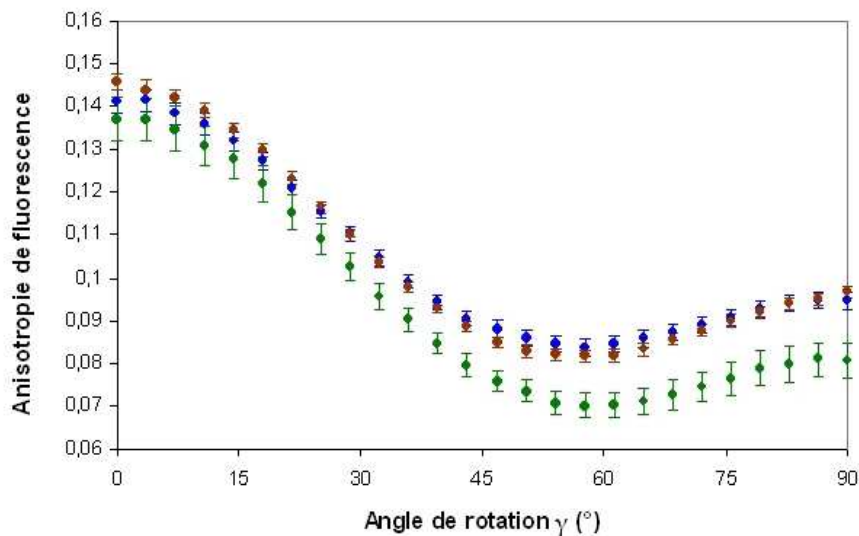


FIG. 66 : Distributions angulaires moyennes de l'anisotropie de fluorescence pour les échantillons de muscle *Sternomandibularis* contractés (●), normaux (●) et étirés (●).

La diminution de l'anisotropie de fluorescence pour les échantillons étirés s'explique logiquement par les variations des paramètres C_1 et C_2 d'ajustement du modèle. Considérons par exemple l'angle de rotation de l'échantillon $\gamma=90^\circ$, la simplification des équations

36 et 37 donne $I_{VV}(\gamma = 90^\circ) \propto C_2^2$ et $I_{VH}(\gamma = 90^\circ) \propto \mu C_1^2$, d'où :

$$r(\gamma = 90^\circ) = \frac{\frac{C_2^2}{k\mu C_1^2} - 1}{\frac{C_2^2}{k\mu C_1^2} + 2} \quad (45)$$

où k est un facteur de proportionnalité instrumental.

Ainsi, l'anisotropie de fluorescence à $\gamma=90^\circ$ diminue lorsque le rapport $C_2^2/\mu C_1^2$ diminue. Une valeur plus élevée du paramètre C_1 et moins élevée du paramètre C_2 , comme c'est le cas pour les échantillons étirés, se traduit donc bien par une valeur de l'anisotropie de fluorescence à $\gamma=90^\circ$ moins élevée.

Les tests de comparaison de moyenne indiquent que la distribution angulaire moyenne de l'anisotropie de fluorescence des parties étirées est significativement différente des distributions angulaires moyennes de l'anisotropie de fluorescence des parties contractées et normales pour les angles de rotation allant de $\gamma=28,8^\circ$ à $\gamma=90^\circ$. Ce dernier résultat confirme qu'il est donc nécessaire de considérer les différentes directions d'un échantillon afin d'obtenir un maximum d'informations sur sa structure.

IV.3 Conclusion

Cette expérience met en évidence que l'anisotropie de fluorescence est une méthode de mesure sensible au degré d'alignement des structures des fibres musculaires et donc une méthode optique potentiellement applicable pour étudier la longueur des sarcomères. Les paramètres C_1 et C_2 du modèle d'ajustement aux données expérimentales varient de façon cohérente avec l'organisation des structures des myofibrilles.

Chapitre V

Quantification du degré de déstructuration des fibres musculaires avec le broyage

Les chapitres de résultats précédents ont permis de mettre en évidence l'anisotropie de fluorescence de structure des fibres musculaires. La problématique développée ici est de savoir si la mesure de l'anisotropie de fluorescence résolue angulairement peut être un outil pour étudier le degré de déstructuration mécanique des tissus musculaires. La distribution angulaire de l'anisotropie de fluorescence présentant quatre lobes principaux dans le cas des tissus de fibres musculaires structurées intactes, l'objectif de cette étude est de déterminer si la forme de cette distribution tend peu à peu vers l'isotropie (cercle) en fonction de la quantité de déstructuration.

V.1 Intérêt de l'expérience

La problématique à laquelle cherche à répondre l'expérience développée dans ce chapitre présente un intérêt dans le domaine des produits obtenus en utilisant des procédés de traitement mécanique de la viande. En effet, "viande récupérée mécaniquement" ou "viande séparée mécaniquement" sont des termes génériques pour décrire la viande résiduelle qui a été récupérée ou séparée par forces de pression ou de cisaillement des os

desquels la viande a déjà été enlevée. Le produit résultant de ce procédé a l'apparence d'une viande finement hachée. Elle est utilisée dans un grand nombre de produits soit en tant qu'agent de liaison, soit comme source peu onéreuse de viande.

Compte tenu de la diversité des produits traités et de la variabilité des traitements appliqués, les viandes séparées mécaniquement peuvent avoir des compositions très variables. Afin de contrôler ces produits, la plupart des pays imposent des régulations strictes concernant leur utilisation, comme par exemple la directive européenne 2001/101/CE ¹. Ces directives demandent que lorsqu'un aliment, ou un de ces ingrédients, a subi un tel procédé, une mention apparaisse sur l'étiquette pour informer le consommateur : la viande séparée mécaniquement ne peut donc pas être qualifiée de "viande" tout court.

De nos jours, le développement des technologies utilisées permet d'obtenir des produits dont la composition et la qualité se rapprochent de celles des viandes séparées manuellement. Henckel et al. ([47]) expliquent par exemple qu'il est désormais dans l'intérêt des consommateurs et de l'industrie de contrôler plutôt les caractéristiques des produits, que la méthode qui a été utilisée pour les traiter. Pour ce faire, un premier indicateur est la composition biochimique du produit. On mesure ainsi les teneurs en calcium, protéines, lipides, etc. Un second indicateur proposé aujourd'hui est constitué par le degré de dégradation des structures des tissus musculaires. En effet, les procédés mécaniques utilisés entraînent une disparition des fibres musculaires ou des modifications de leur structure.

L'évaluation de l'intégrité des composants des tissus musculaires, dont les fibres musculaires et les tissus conjonctifs, permettrait donc de contrôler la qualité des viandes séparées, ou encore de vérifier le respect des normes telles que la directive 2001/101/CE. L'histologie et l'analyse d'image permettent de réaliser une telle évaluation. [47], [23], [20] et [117]. Toutefois, ce type de méthodologie est fastidieux à mettre en œuvre et il serait donc intéressant de mettre au point des techniques plus aisées et plus rapides.

¹La directive 2001/101/CE de la Commission du 26 novembre 2001 modifie la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil relative au rapprochement des législations des États membres concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires ainsi que la publicité faite à leur égard.

V.2 Plan de l'expérience

Principe Plusieurs types de broyats de muscles bovins *Triceps brachii Caput Longum* ont été préparés et leur anisotropie de fluorescence a été mesurée avec le spectrofluorimètre. Des coupes histologiques colorées ont ensuite été réalisées à partir des échantillons utilisés et ont été observées en microscopie en tant que méthode de référence.

Préparation initiale des échantillons A partir de viande issue de muscles *Triceps brachii Caput Longum* bovins, quatre broyats se caractérisant par des préparations différentes ont été réalisés. Dans tous les cas, 20% d'eau a été additionnée à la viande :

- Pour les préparations du type E_1 : une première émulsion a été réalisée en broyant la viande avec un cutter à hacher² pendant 5 minutes.
- Pour les préparations du type E_2 : une deuxième émulsion a été réalisée en broyant la viande avec un cutter à hacher pendant 10 minutes.
- Pour les préparations du type G_8 : en passant la viande intègre à travers une machine à hacher³ avec une grille 8 mm, et après malaxage manuel, un broyat a été obtenu.
- Pour les préparations du type $G_{1,5}$: en passant la viande intègre à travers une machine à hacher avec une grille 1,5 mm, et après malaxage manuel un autre broyat a été obtenu.

Ensuite, chacune des préparations a été aliquotée sept fois, ce qui a conduit à un nombre total de 28 échantillons.

Mesures au spectrofluorimètre Les échantillons ont été placés dans un ordre aléatoire dans le porte-échantillon du spectrofluorimètre. Un soin particulier a été pris lors du remplissage du porte-échantillon avec les pâtes obtenues afin d'éviter la présence d'hétérogénéités dans le champ de mesure et de bulles d'air à la surface du quartz.

²Dans un cutter à hacher, utilisé principalement dans la fabrication des charcuteries échaudées et à chair cuite, les couteaux sont en rotation rapide autour de l'axe central de la cuve.

³Dans une machine à hacher, plutôt utilisée dans la fabrication des saucisses crues, la viande est conduite par une spirale d'alimentation tranchante en rotation autour d'un axe, puis elle traverse un disque perforé.

Préparation intermédiaire des échantillons Immédiatement après la mesure macroscopique, chaque échantillon a été démoulé avec soin du porte-échantillon et sa face d'intérêt a été placée à plat sur un support. Une congélation ultra-rapide a été réalisée comme représenté par la figure 67. La procédure a mis en œuvre de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide et se trouvant à l'équilibre entre les phases liquide et solide. La plongée de l'échantillon dans la phase liquide a provoqué une décongélation partielle de la phase solide, maintenant une température homogène (-160°C) et évitant la formation d'une couche gazeuse isolante. Ce type de congélation évite la formation de cristaux de glace très néfastes pour la conservation des structures et surtout pour leur observation microscopique et présente l'avantage, par rapport à une fixation chimique comme l'incubation dans un bain de formol, de ne pas introduire de produit chimique.

Une fois la congélation effectuée, chaque échantillon a subi une découpe avec un microtome réfrigéré (Microm HM 560). Après une première phase de découpe légère de la face d'intérêt de l'échantillon jusqu'à obtention d'une surface plane et homogène, une coupe de $10\ \mu\text{m}$ a été réalisée et déposée par adsorption sur une lame de verre.

Une coloration a été ensuite réalisée après déshydratation par séchage à l'air libre et à température ambiante. La coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (dite HES) permet de distinguer les différents éléments qui constituent le muscle. Elle fait apparaître les noyaux des cellules en violet bleuté (colorés par l'hématoxyline), le cytoplasme des cellules en rose (coloré par l'éosine) et le tissu conjonctif en orangé (coloré par le safran). Les coupes ont finalement été protégées à l'aide d'une résine synthétique afin d'assurer leur conservation.

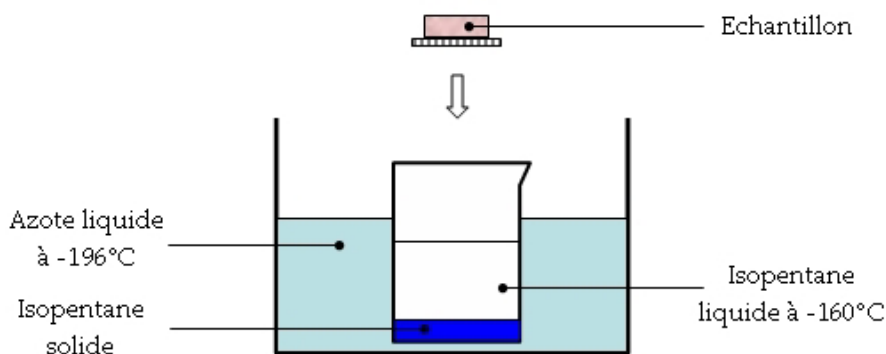


FIG. 67 : Congélation ultra-rapide des échantillons dans un bain d'isopentane refroidi par l'azote liquide.

Mesures microscopiques Les coupes ont été observées au microscope Nikon Eclipse 50i avec l'objectif $\times 10$ en mode de transmission et sans les polariseurs. Des images ont été acquises en réalisant un balayage de chaque coupe comme le représente la figure 68. Les images ont ensuite été analysées en utilisant un programme écrit sous Matlab (cf. annexe H) : les différents objets présents sur chaque image ont été labélisés, puis un seuillage (basé sur le niveau de gris, la taille et la forme des objets) a été réalisé afin de mettre en évidence les fibres musculaires visibles dans le plan de la coupe. Ce traitement a permis ainsi d'obtenir des données quantitatives concernant l'état des fibres musculaires, à savoir leur quantité et leur surface moyenne. Etant donné le nombre de coupes dont nous disposions (4 types de broyats \times 7 échantillons par type de broyat) et le temps d'acquisition et de traitement des images, seulement trois coupes par type de broyat, choisies au hasard, ont été utilisées pour l'étude microscopique.

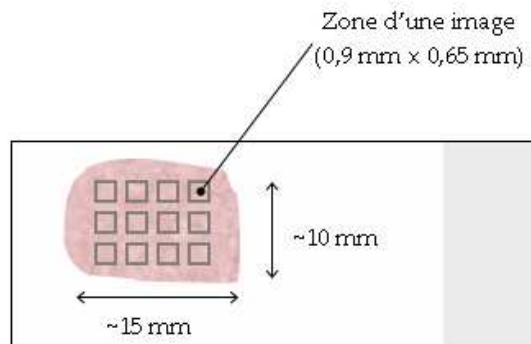


FIG. 68 : Acquisition de douze images par balayage de la coupe (le schéma ne respecte pas l'échelle réelle).

V.3 Résultats

V.3.1 Analyse des résultats obtenus en microscopie

La figure 69, page 160 montre un exemple d'image typiquement obtenue pour chaque type de broyat. Les images traitées mettent clairement en évidence les fibres musculaires partiellement intactes et visibles dans le plan des coupes.

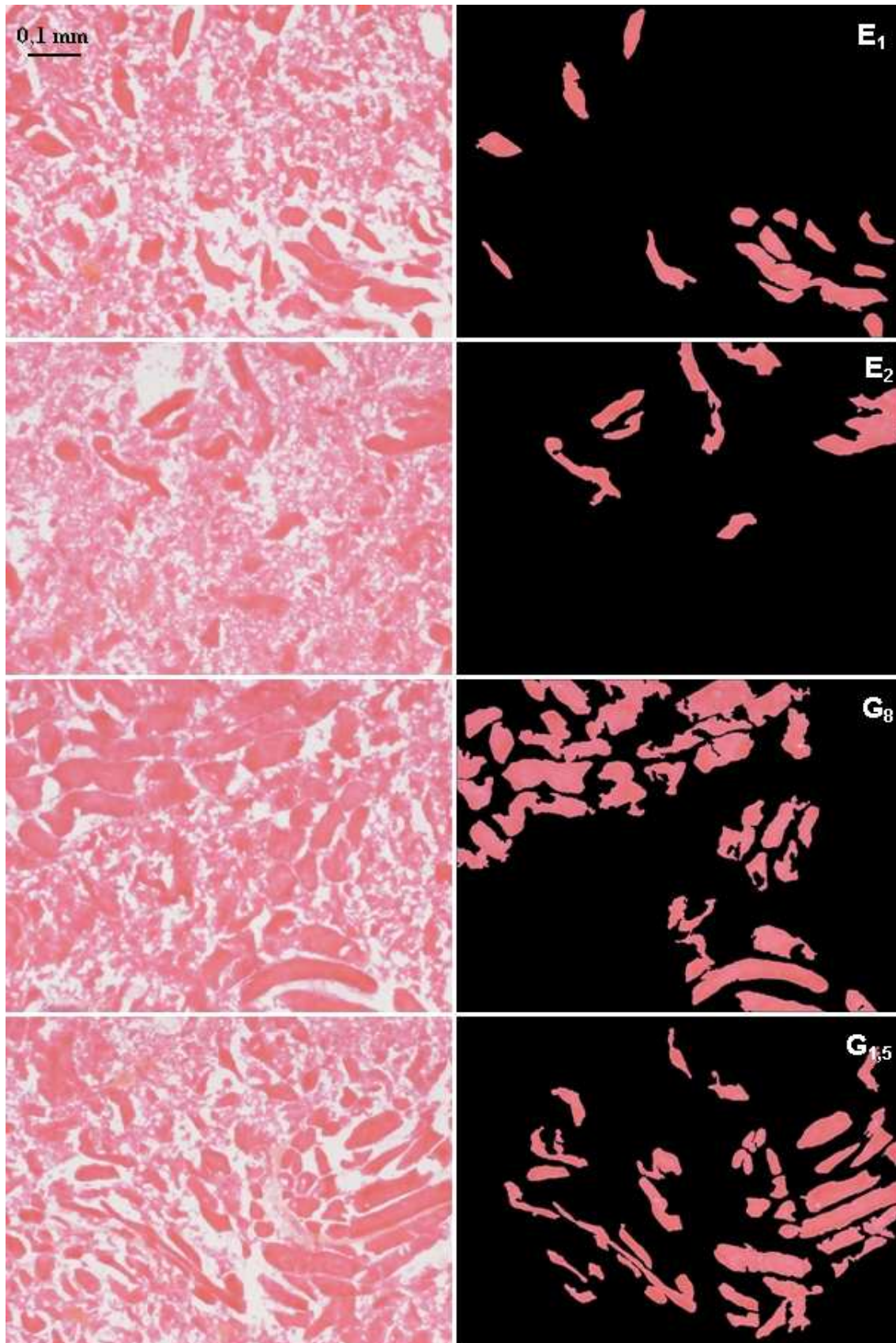


FIG. 69 : Exemple d'image microscopique brute (à gauche) et traitée (à droite) pour chaque type de broyat (dimensions 0,9 mm × 0,65 mm).

L'analyse des images a permis de quantifier la surface totale des fibres musculaires présentes en moyenne sur une coupe de chaque type de broyat. Ces résultats sont présentés sur la figure 70. Le tableau 9 indique les tailles de ces fibres.

Type de broyat	E_1	E_2	G_8	$G_{1,5}$
Nombre de fibres	369	259	284	280
Taille moyenne (μm^2)	6859	5283	12457	9555
Taille minimale (μm^2)	607	613	616	601
Taille maximale (μm^2)	230670	125333	354044	51128

TAB. 9 : Taille des fibres musculaires intactes détectées sur les coupes pour chaque type de broyat.

La figure 70 et le tableau 9 sont tous deux complémentaires et en accord. Ils montrent pour les émulsions que plus le temps de hachage au cutter est long, plus les fibres sont déstructurées : les fibres intactes sont moins nombreuses et de plus petites dimensions. En ce qui concerne les broyats obtenus à la machine à hacher, plus la grille utilisée est fine, plus les fibres intactes sont de taille réduite. De manière générale, on peut conclure que les images microscopiques montrent que quel que soit le procédé, le matériau est déstructuré. On ne peut donc plus parler d'alignement préférentiel des fibres musculaires.

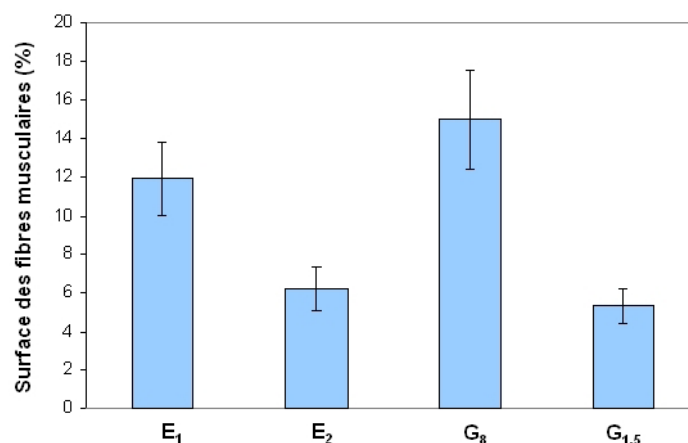


FIG. 70 : Surface totale moyenne des fibres musculaires intactes détectées sur les coupes pour chaque type de broyat, calculée d'après la moyenne des surfaces des fibres visibles sur les images et exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de l'image.

Les échantillons utilisés pour notre analyse microscopique ont été envoyés pour analyse à la société HISTALIM spécialiste de l'histologie alimentaire. Cette technique permet de détecter chaque composant non soluble dans l'eau ou les graisses d'un produit, qu'il soit d'origine animale ou d'origine végétale. Les résultats obtenus par HISTALIM sont présentés dans l'annexe I. Les analyses réalisées n'ont pas permis de confirmer les conclusions des résultats obtenus par nos analyses. Plusieurs causes sont responsables de cet échec :

- Les dimensions de nos échantillons étaient nettement inférieures à celles habituellement analysées par cette société ;
- Les structures ont été dégradées par la décongélation puis la recongélation effectuées afin de subir une fixation correspondant au protocole suivi par cette société.

Par conséquent, nous avons choisi de ne pas prendre en compte les résultats obtenus par la société HISTALIM dans notre analyse.

V.3.2 Analyse des résultats obtenus macroscopiquement

La figure 71, représente sous forme polaire les distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence, obtenues en moyennant les résultats des sept échantillons réalisés pour chaque type de broyat. Les écarts-types ne sont pas représentés par souci de clarté.

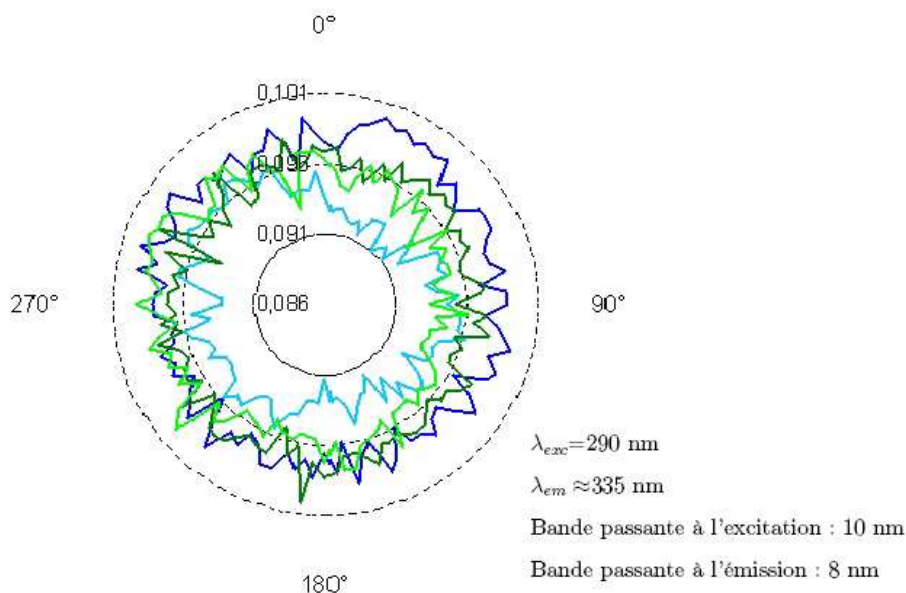


FIG. 71 : Distribution angulaire moyennes de l'anisotropie de fluorescence pour chaque type de broyat : E_1 (—), E_2 (—), G_8 (—) et $G_{1,5}$ (—).

Ces distributions angulaires ne montrent plus les quatres lobes présents dans le cas d'échantillons structurés. En effet, l'angle de rotation entre l'échantillon et la direction de la polarisation excitatrice n'a ici plus vraiment de sens, étant donnée l'organisation aléatoire des fibres présentes dans les échantillons, organisation confirmée par la microscopie. Cependant, les graphes ne sont pas parfaitement isotropes du fait d'inhomogénéités et de petites bulles d'air éventuellement présentes dans le champ de mesure. En outre, il apparaît que la courbe correspondant au broyat de type E_2 se détache des autres avec une anisotropie de fluorescence globalement plus faible, tandis que la courbe correspondant au broyat de type E_1 montre une anisotropie de fluorescence légèrement supérieure.

L'interprétation des résultats est facilitée par le calcul de l'anisotropie de fluorescence moyenne obtenue pour chaque type de broyat. Il est en effet possible de s'affranchir de l'angle de rotation étant donné que les échantillons n'ont plus de direction privilégiée. Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 72.

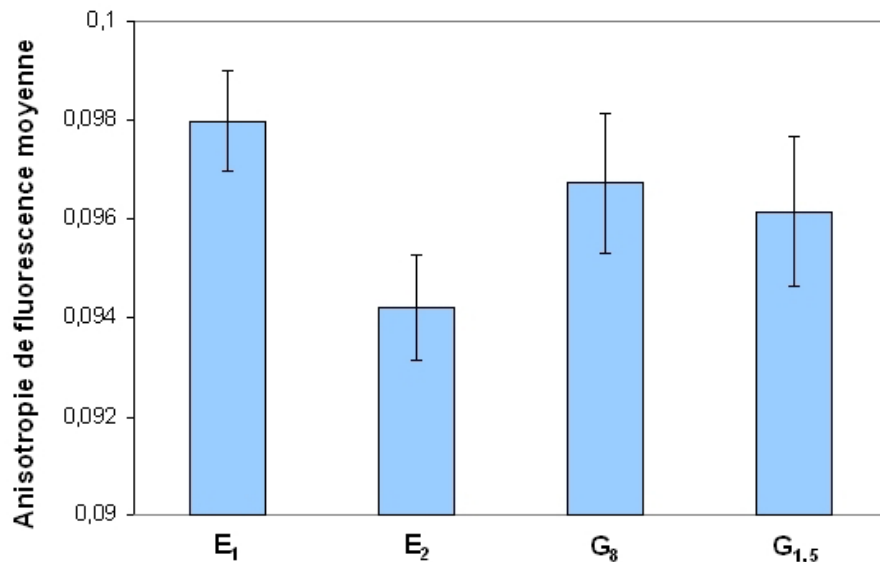


FIG. 72 : Anisotropie de fluorescence moyenne pour chaque type de broyat.

Les résultats présentés sur la figure 72 ne permettent pas de discriminer entre eux les broyats réalisés au hachoir à grille (G_8 et $G_{1,5}$). En revanche, les courbes concernant les deux types d'émulsions (E_1 et E_2) diffèrent de manière significative.

L'interprétation que nous faisons de ces résultats est que l'anisotropie de fluorescence mesurée dans le cas de broyats dépend uniquement de l'anisotropie de fluorescence intrinsèque du tryptophane (et non plus également de l'orientation des fluorophores). Or, nombreuses sont les références bibliographiques qui indiquent que le tryptophane est un acide aminé dont la fluorescence est très sensible à son environnement local. En particulier, on peut considérer ici la possibilité de transferts d'énergie non radiatifs, ayant lieu entre les différents acides aminés des protéines. Un tel type de transfert se produit car les spectres d'absorption et d'émission de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane se superposent. Ainsi, les milieux visqueux et concentrés, pour lesquels la distance entre les molécules est diminuée, tendent à favoriser ce type de transfert. L'intérêt d'aborder ici la question du transfert d'énergie non radiatif est qu'un de ces effets est une diminution de l'anisotropie de fluorescence. Lakowicz ([62]) montre ainsi à titre d'exemple que la polarisation de la fluorescence du tryptophane est diminuée lorsque celui-ci forme un di-peptide. Il précise cependant que la relation entre l'importance de la dépolarisation induite et la quantité des transferts d'énergie non radiatifs qui en sont la cause est difficile à établir. Dans le cas d'une protéine, elle dépend en effet de sa conformation et de l'orientation relative des molécules mises en jeu dans le transfert.

Une hypothèse pour expliquer les résultats obtenus pourrait donc être que les procédés permettant d'aboutir au broyat de type E_2 impliquent une modification significative de l'environnement proche du tryptophane allant dans le sens d'une augmentation des transferts d'énergie (et donc d'une dépolarisation de la fluorescence) pour un procédé de broyage plus long. Cette hypothèse serait cohérente avec le fait que la déstructuration plus importante des structures avec le temps de broyage pourrait être la cause d'une plus grande modification de la structure tridimensionnelle des protéines. Une conséquence de cette hypothèse est que nous devons conclure que les procédés permettant d'aboutir aux broyats de type G_8 et $G_{1,5}$ ne modifient pas de façon assez importante le milieu dans lequel se trouve le tryptophane pour pouvoir détecter des modifications importantes de son anisotropie de fluorescence. Ceci est cohérent avec le fait que le procédé ayant permis de réaliser les broyats de type G_8 et $G_{1,5}$, consistant à broyer la viande à l'aide de grilles dont les trous ont des diamètres de plusieurs millimètres, ne permet pas de modifier la structure des fibres à l'échelle moléculaire. La confirmation de cette hypothèse ne pourrait être

effectuée qu'en réalisant des expérimentations supplémentaires. Le spectre d'excitation de la polarisation du tryptophane étant modifié par les transferts d'énergie non radiatifs, un plan d'expérience tel que celui de Moens et al. ([76]) pourrait être appliqué dans lequel la polarisation du tryptophane est comparée en utilisant différentes longueurs d'onde d'excitation.

Un autre phénomène qui peut être abordé pour expliquer ces résultats est la diffusion de la lumière. Une hypothèse supplémentaire pourrait donc être que les propriétés de diffusion de la lumière des émulsions E_1 et E_2 sont significativement différentes. Une diffusion de la lumière plus importante dans l'émulsion E_2 expliquerait également une diminution de l'anisotropie de fluorescence, à cause des phénomènes de dépolarisation plus nombreux. Les propriétés de diffusion d'un milieu dépendent par exemple de l'indice de réfraction [44], de la taille [41] et de la concentration [79] des molécules diffusantes. La modifications des propriétés de diffusion entre l'émulsion E_1 et l'émulsion E_2 serait cohérente avec des changements de ces caractéristiques en raison de la déstructuration plus importante avec le temps de broyage.

V.4 Conclusion

La mesure de l'anisotropie de fluorescence de divers types de broyats semble montrer des différences selon le degré de déstructuration des fibres musculaires seulement dans le cas d'émulsions. Même si les variations obtenues ne sont que de l'ordre de quelques pourcents, elles sont significatives et cohérentes avec les modifications potentielles de l'environnement local du tryptophane et/ou des propriétés de diffusion des échantillons.

Ces hypothèses laissent donc à penser que la mesure de l'anisotropie de fluorescence pourrait être une méthode utilisable pour mesurer le degré de déstructuration de viandes traitées mécaniquement. Cependant, de nouvelles expérimentations devraient être réalisées afin d'améliorer le protocole de mesure, d'obtenir une meilleure sensibilité (par exemple en réduisant le "bruit" des mesures dû à la qualité du contact entre les échantillons et le porte-échantillon) et de confirmer les hypothèses d'interprétation proposées.

Chapitre VI

Quantification du degré de déstructuration du tissu conjonctif avec le chauffage

Les chapitres de résultats précédents ont permis de mettre en évidence l'anisotropie de fluorescence de structure et intrinsèque des fibres musculaires ainsi que l'intérêt de cette mesure pour le suivi *post mortem* de la viande.

Ce dernier chapitre de résultats traite du même type de problématique mais en s'attachant non plus à la structure des fibres musculaires, mais à celle du tissu conjonctif. Comme expliqué dans le paragraphe III.2.3 de l'étude bibliographique (page 34), cet aspect présente en effet également un intérêt pour la compréhension et le contrôle des propriétés mécaniques de la viande. En particulier, le chauffage de la viande induisant la dénaturation du collagène, la quantification du degré de déstructuration du tissu conjonctif avec ce procédé est un paramètre important dans l'étude des propriétés mécaniques de la viande.

VI.1 Plan des expériences 1 et 2

Principes des deux expériences menées L'objectif des expérimentations menées était de mettre en évidence à l'échelle macroscopique (avec le spectrofluorimètre) et à

l'échelle de la fibre (avec le microscope de fluorescence) l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif, et d'étudier les modifications qui interviennent lors du chauffage. Pour ce faire, deux expériences ont été menées :

- Expérience 1 : des échantillons de tissu conjonctif ont été chauffés pendant 20 minutes à quatre températures différentes : 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C. L'anisotropie de fluorescence des échantillons chauffés a été comparée à celle mesurée en moyenne sur les échantillons à l'état intact.
- Expérience 2 : des échantillons de tissu conjonctif ont été chauffés à deux températures différentes : 60 ° C et 70 ° C. L'anisotropie de fluorescence a été mesurée à différents temps de chauffage de ces échantillons afin de réaliser une cinétique au cours du chauffage.

Préparation initiale des échantillons et mesures au spectrofluorimètre Les échantillons de dimensions adaptées au porte-échantillon ont été découpés dans une trame de tissu conjonctif à des emplacements choisis aléatoirement et de telle façon que l'axe principal des fibres de collagène soit parallèle à la surface de l'échantillon.

Pour l'expérience 1 deux trames d'épimysium ont été prélevées sur le muscle *Longissimus dorsi*, provenant de deux animaux (race Salers) âgés respectivement de 6 mois et de 9 ans. Sur chaque trame, 8 échantillons au total ont été prélevés. L'anisotropie de fluorescence des échantillons intacts a été mesurée. Puis les échantillons ont été chauffés 20 minutes, 4 échantillons étant utilisés au total pour chaque température étudiée (50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C). L'anisotropie de fluorescence des échantillons chauffés a été mesurée.

Pour l'expérience 2 une trame d'épimysium a été prélevée sur un animal (race Salers) âgé de 6 mois, et sur laquelle ont été prélevés 4 échantillons. L'anisotropie de fluorescence de ces échantillons a été mesurée à l'état initial et à différents temps de chauffage cumulés. Au total, 2 échantillons ont été utilisés pour chaque température d'étude (60 ° C et 70 ° C).

Le chauffage des échantillons a été réalisé par immersion dans un bain d'eau dont la température est régulée grâce à un bain marie, comme décrit par la figure 73, page 169. Directement après leur sortie du bain, les échantillons ont été refroidis pendant une trentaine de minutes dans un bain d'eau à température ambiante avant d'être placés dans le porte-échantillon.

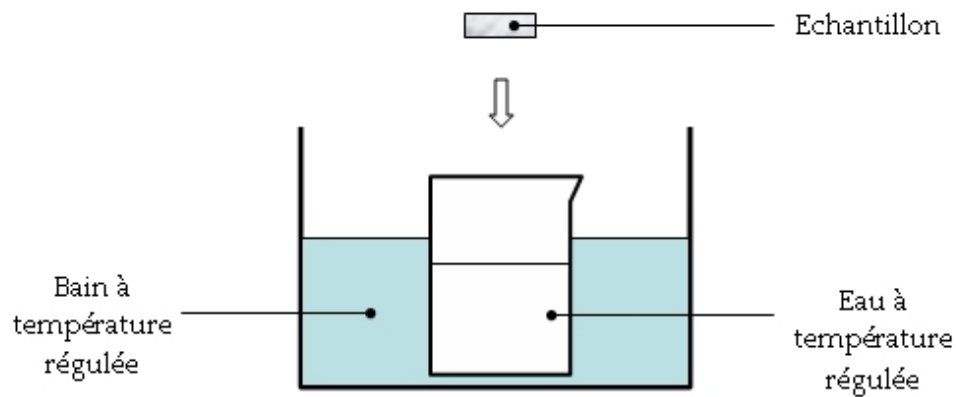


FIG. 73 : Chauffage des échantillons dans un bain d'eau à température régulée par un bain marie.

Un soin particulier a été pris lors de la mise en place des échantillons (intacts et chauffés) dans le porte-échantillon pour assurer un bon contact entre les échantillons et le quartz, afin d'éviter la présence de bulles d'air dans le champ de mesure.

Préparation intermédiaire des échantillons et mesures microscopiques Les mesures microscopiques ont été réalisées à la suite des mesures au spectrofluorimètre. De manière générale, des fibres de collagène ont été isolées à l'aide d'une pince et placées entre lame et lamelle avec un peu d'eau distillée et observées avec le microscope de fluorescence polarisant Nikon Eclipse 50i. Les fibres à l'état intact ont été prélevées directement sur les trames d'épimysium disponibles pour les expériences 1 et 2, tandis que les fibres à l'état destructuré ont été prélevées sur les échantillons chauffés utilisés pour les mesures au spectrofluorimètre. L'anisotropie de fluorescence de chaque fibre a été mesurée d'après le protocole de mesure décrit dans le paragraphe II.3 de la partie décrivant les dispositifs expérimentaux (page 98).

Que ce soit pour les mesures au spectrofluorimètre ou pour les mesures microscopiques, une moyenne des résultats obtenus sur des échantillons ayant subi des traitements identiques a été réalisée.

VI.2 Résultats

Dans les chapitres de résultats concernant les fibres musculaires, les résultats de mesures présentés étaient constitués des distributions angulaires des intensités de fluorescence I_{VV} et I_{VH} mesurées et de l'anisotropie de fluorescence calculée. Dans le présent chapitre, nous présentons et analysons directement les distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence, en raison du fait que nous ne disposons pas de modèle équivalent à celui des fibres musculaires (équations 36 et 37 page 123) à ajuster aux données expérimentales des intensités de fluorescence. Il n'est en effet pas possible de définir un tel modèle car les fluorophores impliqués dans la fluorescence du collagène au couple ($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) ne sont pas clairement identifiés, comme nous l'avons expliqué dans l'étude bibliographique (cf. paragraphe III.3 page 35), et que nous ne disposons pas d'informations sur les transitions électroniques de ces fluorophores aussi complètes que pour le tryptophane.

VI.2.1 Mise en évidence de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif et méthode d'analyse des résultats

L'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif intact est mise en évidence sur la figure 74 (page 171) où sont représentées les variations angulaires de l'anisotropie de fluorescence obtenues pour deux échantillons avant chauffage. Comme pour les fibres musculaires, il est constaté que l'anisotropie de fluorescence dépend de la direction considérée par rapport à l'échantillon. On remarque également que l'amplitude de ces distributions diffère selon les échantillons, révélant à nouveau la forte variabilité structurale inter-échantillons.

L'anisotropie de fluorescence est aussi visible à l'échelle de la fibre grâce aux données microscopiques (figure 75 page 171), qui montrent également des variations liées à l'angle entre l'axe de la fibre et la direction de la polarisation excitatrice.

Ces deux figures montrent également les distributions angulaires obtenues pour des échantillons au moins partiellement déstructurés, en raison du procédé de chauffage qui leur a été appliqué. Il est constaté d'une part que l'amplitude des distributions angulaires

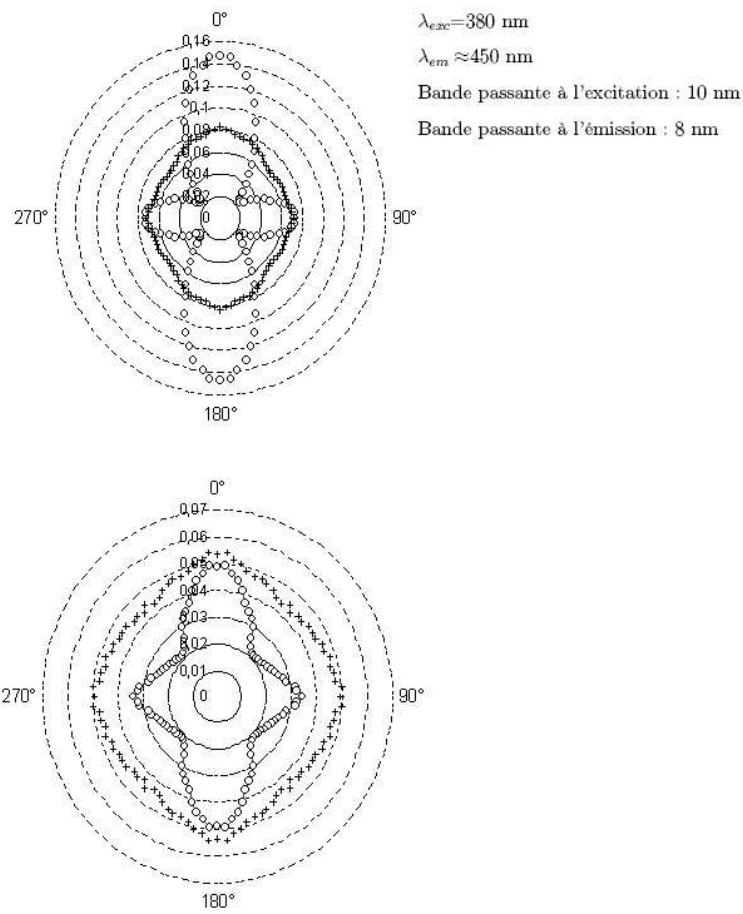


FIG. 74 : Deux exemples de distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au spectrofluorimètre avant (○) et après (+) chauffage à 80 ° C.

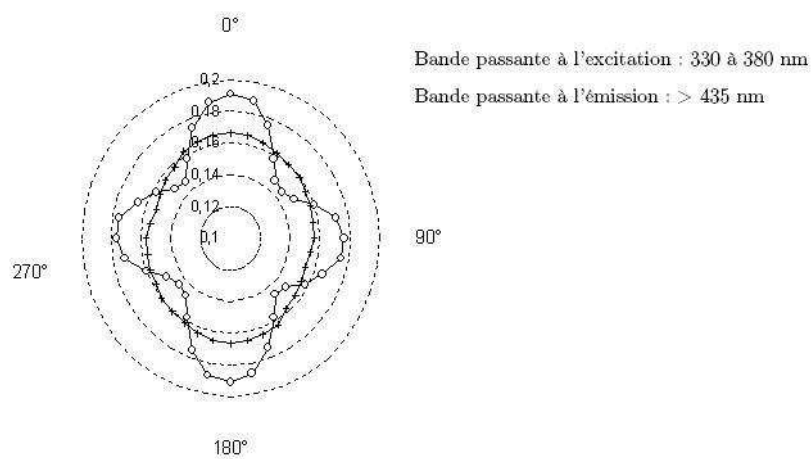


FIG. 75 : Exemples de distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de fibres isolées de tissu conjonctif obtenues au microscope avant (○) et après (+) 20 minutes de chauffage à 80 ° C.

est plus faible et d'autre part que les "lobes" traduisant les variations angulaires sont moins marqués que pour l'échantillon intact.

Afin de quantifier les modifications des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence dues au chauffage, dans les expériences 1 et 2, nous avons choisi d'étudier deux grandeurs :

- La première est l'anisotropie de fluorescence maximale des échantillons, c'est-à-dire l'anisotropie de fluorescence lorsque l'axe de l'échantillon est parallèle à la direction de la polarisation excitatrice. Cette grandeur caractérise l'amplitude des distributions.
- La deuxième est la circularité des distributions, qui permet de quantifier la présence de "lobes" sur les distributions, traduisant en fait l'anisotropie dite de structure des échantillons. Nous définissons la circularité d'une distribution comme le rapport :

$$\text{Circularité} = \frac{A_1}{A_0} \quad (46)$$

où A_1 est l'aire sous la distribution et A_0 est l'aire du cercle circonscrit à la distribution, en accord avec la figure 76. Le critère de circularité ainsi défini varie entre 0 et 1, sachant que plus la circularité est proche de l'unité, plus la distribution de l'anisotropie de fluorescence tend vers une forme circulaire, c'est-à-dire isotrope. A l'inverse, plus la circularité est proche de zéro, plus la distribution de l'anisotropie de fluorescence tend vers une forme avec des "lobes".

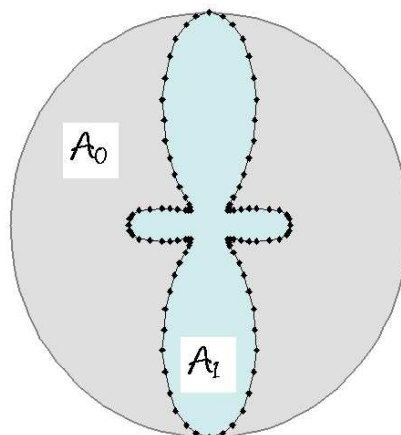


FIG. 76 : Représentation des aires A_0 et A_1 utilisées pour le calcul de la circularité.

VI.2.2 Analyse des résultats de l'expérience 1

VI.2.2.1 Mesures au spectrofluorimètre

La figure 77 présente les valeurs de la circularité des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence obtenues en moyenne après 20 minutes de chauffage à différentes températures.

D'une part, en comparant entre elles les valeurs de la circularité correspondant aux différentes températures de chauffage, il est constaté que plus la température de chauffage augmente, plus la circularité se rapproche de 1. Ces variations sont cohérentes avec une perte de l'anisotropie de structure plus importante à température de chauffage élevée : à durée de chauffage identique, le chauffage à 80 ° C déstructure plus le tissu conjonctif que le chauffage à 50 ° C. Toutefois, 20 minutes de chauffage à 80 ° C ne suffisent pas pour déstructurer totalement les échantillons car la valeur finale de la circularité est largement inférieure à 1. Cette conclusion est cohérente avec celle de Purslow ([87]) qui affirme que l'arrangement en treillis des tissus conjonctifs périnysiaux subsiste après 1 heure de chauff-

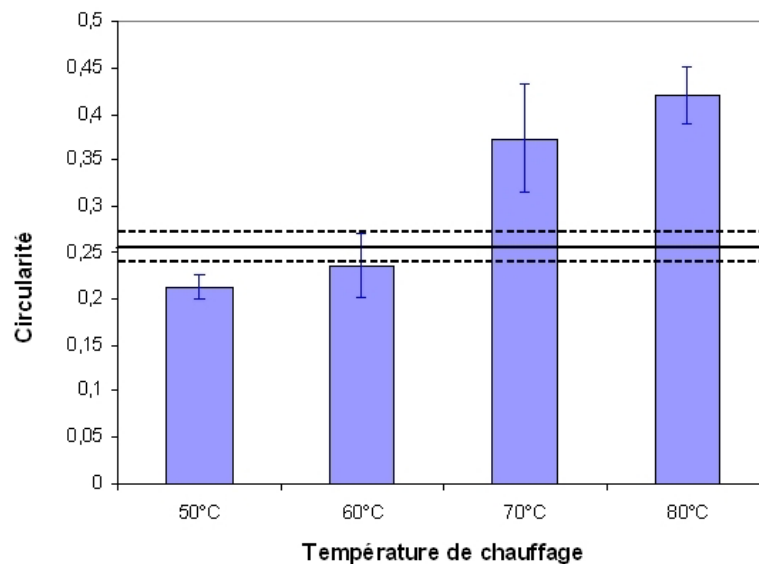


FIG. 77 : Circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C. Le bandeau horizontal représente la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif intact.

fage à 80 ° C.

D'autre part, en comparant les valeurs de la circularité correspondant aux différentes températures de chauffage à la valeur de la circularité obtenue en moyenne sur les échantillons intacts, il est constaté que pour 50 ° C et 60 ° C, la circularité moyenne des échantillons chauffés est inférieure à la circularité moyenne des échantillons intacts. Ce résultat est au premier abord contraire aux variations attendues, puisque le chauffage ne peut *a priori* qu'induire une déstructuration des échantillons, et donc une perte de leur anisotropie de structure. Cependant, cette augmentation de l'anisotropie de structure pour des températures de chauffage relativement peu élevées peut être expliquée par les observations de Lewis et Purslow ([68]). Ces auteurs remarquent en effet d'après leurs observations microscopiques du tissu conjonctif que les fibres de collagène avant chauffage sont ondulées. Ils poursuivent en indiquant que le raccourcissement des fibres de collagène, induit par le chauffage, tend à faire disparaître cette ondulation. Ainsi, pour une durée de chauffage de 1 heure, les ondulations du tissu conjonctif ne disparaissent complètement que pour des températures supérieures ou égales à 70 ° C.

Finalement, l'analyse faite par Lewis et Purslow peut être utilisée pour formuler une hypothèse quant aux résultats obtenus en optique. Le procédé de chauffage des tissus conjonctifs induit en parallèle deux phénomènes qui ont des effets opposés : la dénaturation des molécules de collagène et la perte de l'ondulation des fibres de collagène. Du point de vue optique, la dénaturation des molécules de collagène se traduit par une diminution de l'anisotropie de structure tandis que la perte de l'ondulation des fibres de collagène entraîne au contraire une augmentation de l'anisotropie de structure, en raison du meilleur alignement des fibres, et donc des fluorophores. D'après nos résultats expérimentaux, pour des température de chauffage de 50 ° C et 60 ° C, l'augmentation de l'anisotropie de structure entre les échantillons intacts et chauffés (se traduisant par une diminution de la circularité) s'explique par la perte de l'ondulation des fibres qui dans ces conditions de chauffe est un effet prépondérant comparé à la dénaturation du collagène. Pour des température de chauffage de 70 ° C et 80 ° C, l'ondulation des fibres ayant disparu, la diminution de l'anisotropie de structure est liée uniquement à la dénaturation du collagène.

La figure 78 représente les valeurs de l'anisotropie de fluorescence maximale mesurée en moyenne après 20 minutes de chauffage à différentes températures.

Les variations de l'anisotropie de fluorescence maximale obtenues entre les états intacts et chauffés pour les différentes températures de chauffage sont au premier abord peu évidentes à expliquer. L'anisotropie de fluorescence maximale est en effet en moyenne du même ordre de grandeur pour les échantillons intacts et les échantillons chauffés à 70 ° C et 80 ° C, tandis que sa valeur est plus faible pour les échantillons chauffés à 50 ° C et 60 ° C. Les résultats de l'expérience 2 aident à comprendre en partie les résultats exposés sur cette figure.

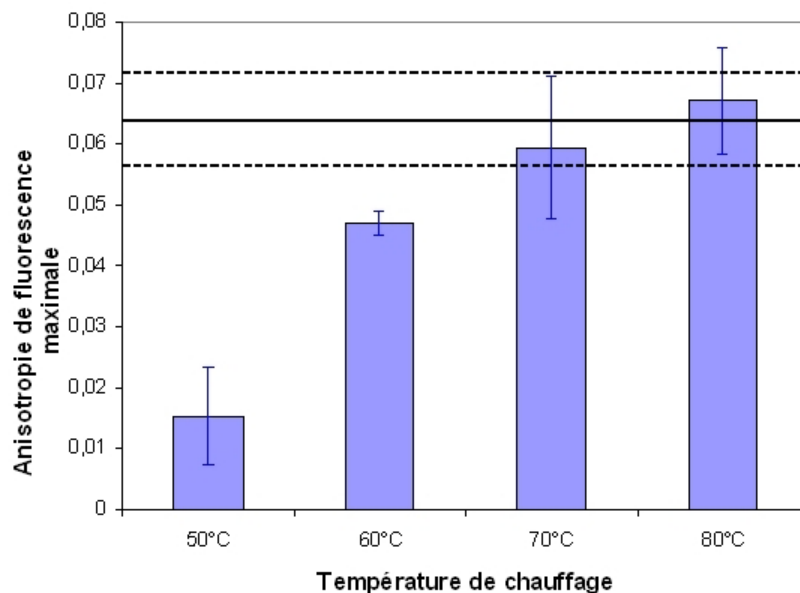


FIG. 78 : Anisotropie de fluorescence maximale moyenne du tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50 ° C, 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C. Le bandeau horizontal représente l'anisotropie de fluorescence maximale moyenne du tissu conjonctif intact.

VI.2.2.2 Mesures au microscope

Les résultats concernant les valeurs maximales de l'anisotropie de fluorescence mesurée microscopiquement ne sont pas présentés car ils ne montrent pas de variations significatives.

La figure 79 présente les valeurs de la circularité des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence obtenues en moyenne après 20 minutes de chauffage à différentes températures.

A l'échelle microscopique, le chauffage tend de façon générale à augmenter la circularité des distributions de l'anisotropie de fluorescence, indiquant une diminution de l'anisotropie de structure des fibres isolées. Ce résultat est semblable à celui obtenu au spectrofluorimètre. On n'observe toutefois pas l'effet de la perte d'ondulation comme avec le spectrofluorimètre, puisque les circularités des fibres chauffées sont dans tous les cas supérieures à la circularité moyenne des fibres isolées intactes. Cette constatation est cohérente étant donné que les ondulations des fibres de collagène ont lieu à un ordre de grandeur de $20 \mu\text{m}$ ([68]), tandis que les observations microscopiques se font à une échelle inférieure.

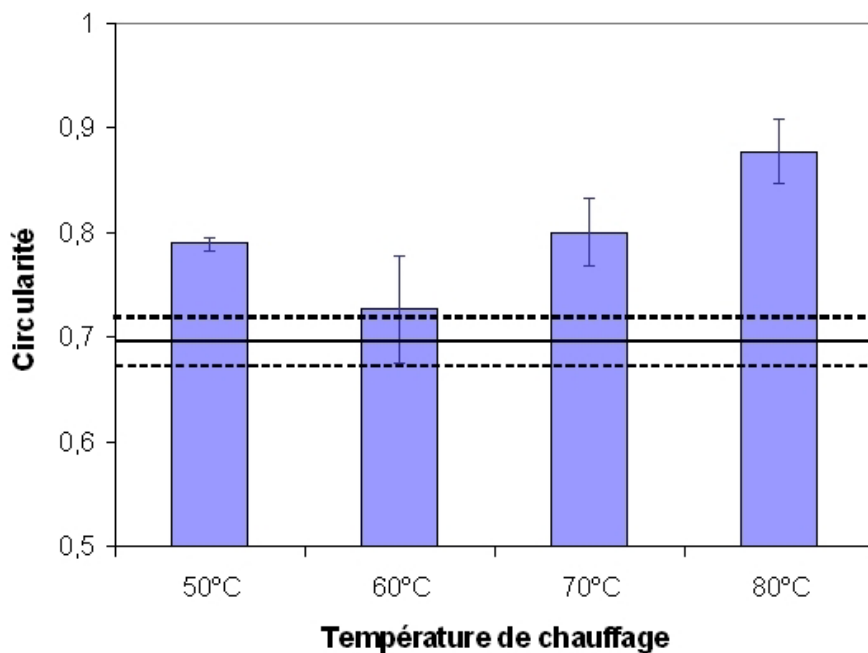


FIG. 79 : Circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de fibres isolées de tissu conjonctif obtenue après 20 minutes de chauffage à 50°C , 60°C , 70°C et 80°C . Le bandeau horizontal représente la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de fibres isolées de tissu conjonctif intact.

VI.2.3 Analyse des résultats de l'expérience 2

VI.2.3.1 Mesures au spectrofluorimètre

La figure 80, page 178 présente les distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence de deux échantillons de tissu conjonctif pour différents temps de chauffage cumulés, à 60 ° C pour le premier échantillon et 70 ° C pour le second.

L'évolution des distributions au cours du chauffage montre deux effets :

- d'une part, la disparition progressive des "lobes" des distributions, qui se quantifie grâce au calcul de la circularité, dont le résultat est présenté sur les figures 81 et 82, page 179.
- d'autre part, la variation de l'amplitude des distributions, mise en évidence par les valeurs maximales de l'anisotropie de fluorescence représentées sur la figure 83, page 180.

Il convient de noter que sur les figures 81, 82 et 83, les traits reliant les points des graphes n'ont pas de signification physique, mais sont représentés afin de faciliter la lecture. De plus, il est nécessaire de préciser que la courbe de variations de la circularité mesurée avec le spectrofluorimètre pour une température de chauffage de 60 ° C (cf. figure 81) est issue des résultats obtenus à partir d'un seul échantillon, contrairement à la courbe de variations semblable pour une température de chauffage de 70 ° C (cf. figure 82) où les résultats obtenus à partir de deux échantillons ont été pris en compte. Nous avons en effet choisi d'exclure les valeurs de la circularité provenant d'un des deux échantillons utilisé pour l'étude à 60 ° C car les variations de la circularité de cet échantillon, qui sont d'une amplitude relativement faible, masquent les variations de la circularité obtenues avec l'autre échantillon, nuisant alors à la lecture des courbes.

Les figures 81 et 82, montrant les variations de la circularité des distributions de l'anisotropie de fluorescence pour différentes durées de chauffage, confirment les résultats et conclusions de l'expérience 1 : plus les échantillons sont déstructurés en raison du chauffage, plus la circularité des distributions tend vers 1, traduisant une diminution de l'anisotropie de structure. En revanche, le suivi du chauffage à 60 ° C montre la diminution

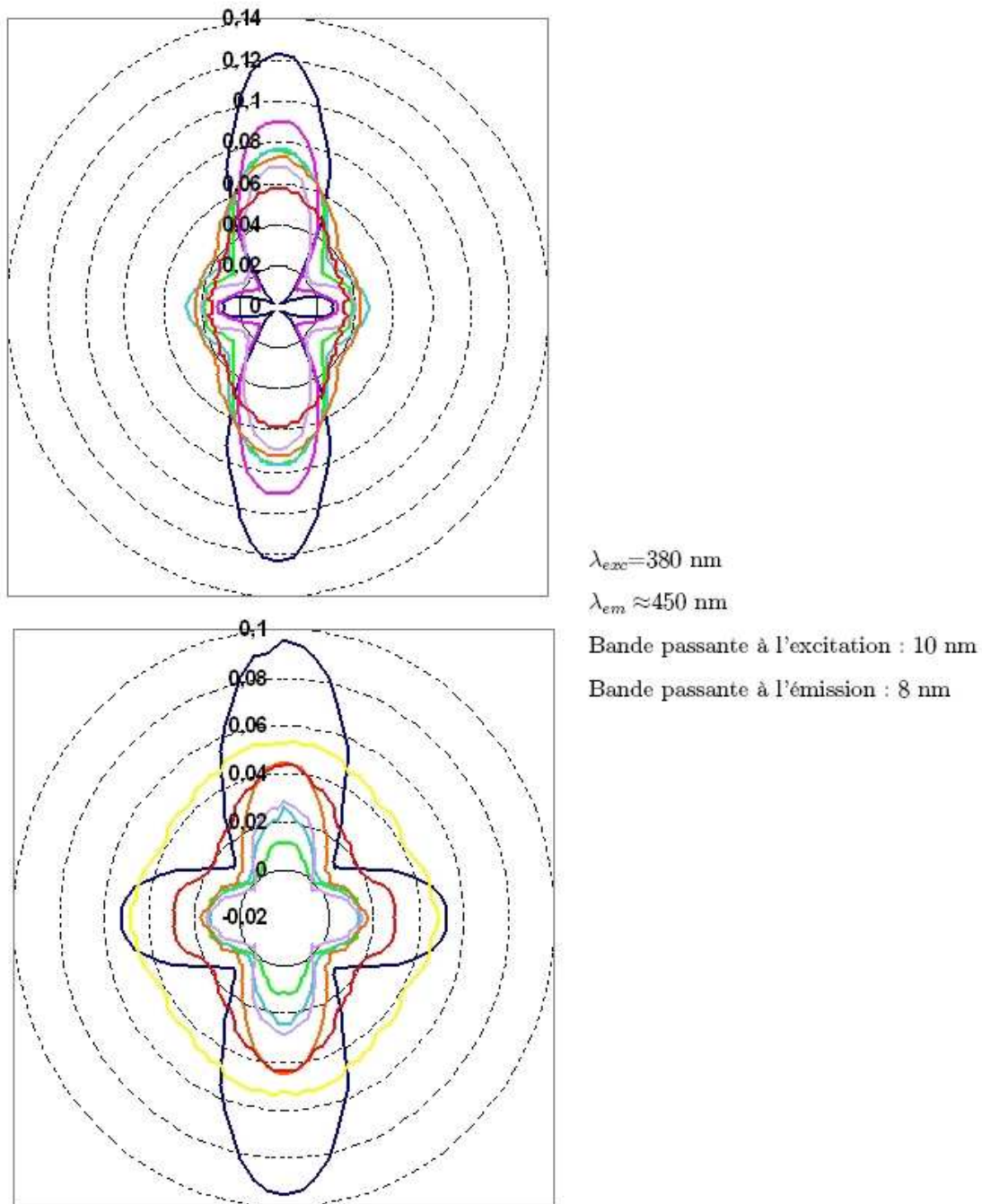


FIG. 80 : Exemples d'évolution des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 70 ° C (graphe du haut) et 60 ° C (graphe du bas). Les prises de mesure ont été effectuées à différents temps : initial (—), 2 minutes (—), 4 minutes (—), 7 minutes (—), 10 minutes (—), 20 minutes (—), 40 minutes (—) et 60 minutes (—).

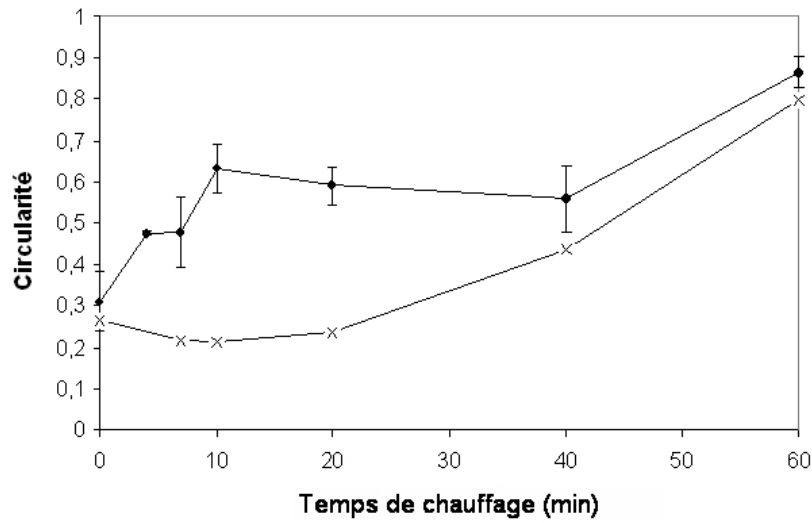


FIG. 81 : Evolution de la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 60 °C avec le spectrofluorimètre (×) et avec le microscope (●).

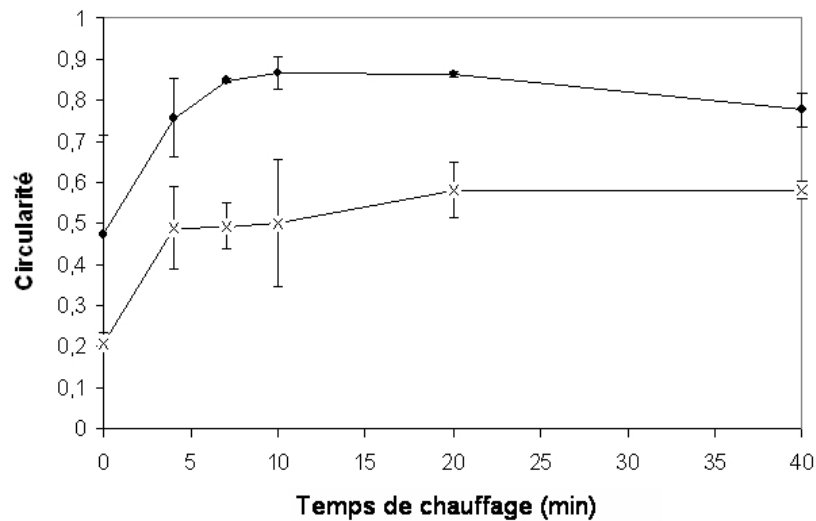


FIG. 82 : Evolution de la circularité moyenne des distributions angulaires de l'anisotropie de fluorescence du tissu conjonctif obtenues au cours du chauffage à 70 °C avec le spectrofluorimètre (×) et avec le microscope (●).

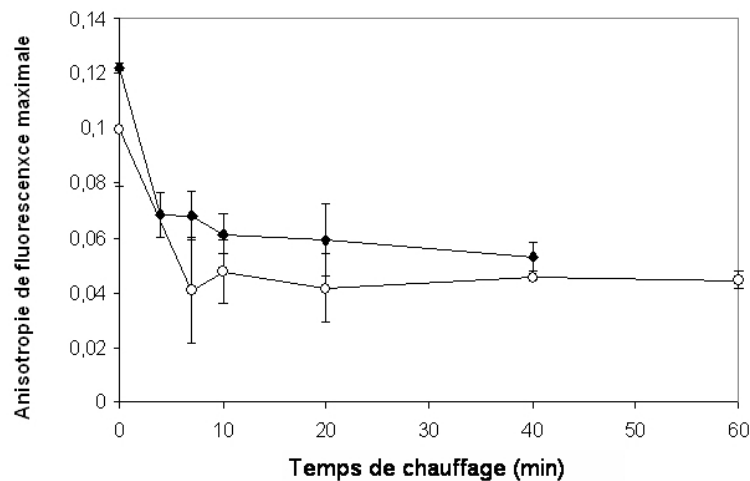


FIG. 83 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence maximale moyenne du tissu conjonctif obtenue au cours du chauffage à 60 °C (○) et à 70 °C (◆).

de la circularité qui a lieu dans un premier temps, correspondant à la perte de l'ondulation des tissus. A 70 °C, ce phénomène n'est pas visible sur la courbe car la dénaturation due au chauffage se fait plus rapidement : dès le premier point de mesure (à 4 minutes), l'effet destructurant du chauffage supplante la disparition de l'ondulation.

La figure 83 montre une décroissance de l'anisotropie de fluorescence maximale en fonction du temps de chauffage. Comparativement, on ne distingue pas de différence entre les vitesses de décroissance à 70 °C et à 60 °C pour les temps de mesure choisis. La valeur finale de l'anisotropie de fluorescence maximale semble être à même quelle que soit la température de chauffage. L'interprétation des modifications de la valeur de l'anisotropie de fluorescence, indépendamment des modifications ayant lieu angulairement, nécessite une discussion concernant l'anisotropie de fluorescence "intrinsèque" des fluorophores. La dénaturation thermique subie par les fibres de collagène modifie en effet sans doute l'environnement physico-chimique des fluorophores concernés au couple de fluorescence étudié. On peut parler plus précisément de l'augmentation de la quantité d'eau présente dans le milieu ainsi que des variations des distances entre les différents acides aminés, qui sont susceptibles de faire varier l'anisotropie de fluorescence des fluorophores. Cette hypothèse pourrait être en partie soutenue par la figure 84, page 181 qui semble montrer que les spectres d'émission des échantillons intacts et chauffés sont différents.

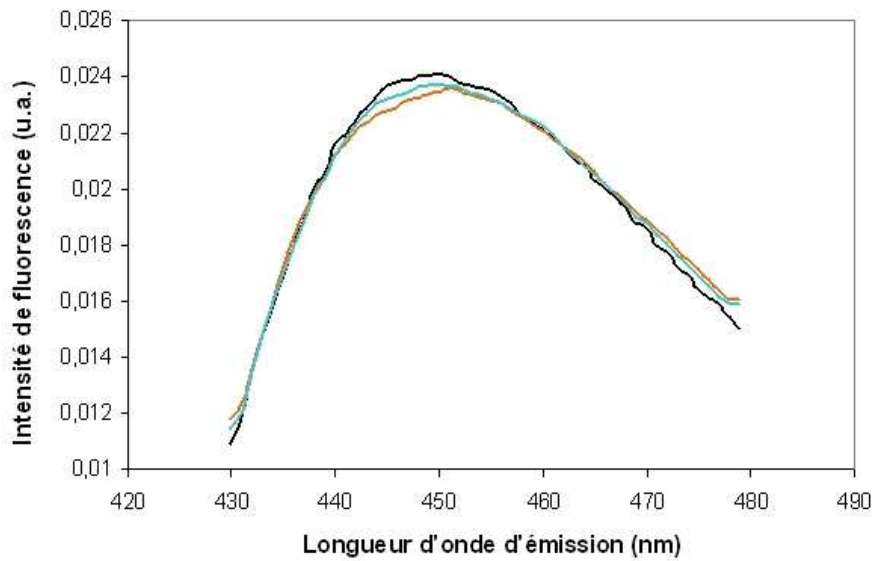


FIG. 84 : Comparaison des spectres d'émission de fluorescence moyens du tissu conjonctif intact (—), chauffé 60 minutes à 60 ° C (—) et chauffé 40 minutes à 70 ° C (—).

Un autre élément d'explication de la diminution de l'anisotropie de fluorescence maximale avec le temps de chauffage est certainement la modification des propriétés optiques du tissu conjonctif dans leur ensemble. Le changement des propriétés optiques des échantillons avant et après chauffage est évident par observation à l'oeil nu. Il est fort probable que la diffusion des photons dans les échantillons augmente au fur et à mesure de la dénaturation, entraînant des dépolarisations supplémentaires qui se traduisent par une diminution de l'anisotropie.

Par ailleurs, les résultats de la figure 83 montrent que l'anisotropie de fluorescence maximale des échantillons chauffés semble tendre vers une valeur limite de l'ordre de 0,05, quelle que soit la valeur initiale de l'anisotropie de fluorescence. Cette dernière remarque permet de discuter les résultats obtenus au cours de l'expérience 1 et présentés sur la figure 78. On peut noter en effet que la valeur de l'anisotropie de fluorescence maximale obtenue en moyenne pour les échantillons intacts de cette expérience, n'est guère plus élevée que la valeur limite de 0,05. Ceci pourrait donc justifier le fait que les résultats entre les échantillons intacts et chauffés à 60 ° C, 70 ° C et 80 ° C diffèrent peu de l'état initial. Nous n'expliquons en revanche pas vraiment les valeurs relativement faibles de l'anisotropie de fluorescence maximale obtenue pour les échantillons chauffés à 50 ° C.

VI.2.3.2 Mesures au microscope

Les valeurs de la circularité moyennes déduites des mesures microscopiques sont présentées sur les figures 81 et 82, en comparaison avec les valeurs obtenues avec le spectrofluorimètre. Les variations obtenues à l'échelle des fibres sont semblables, confirmant les conclusions concernant les modifications de l'anisotropie de structure. De même, il est constaté également que le phénomène de disparition de l'ondulation des fibres n'est pas visible d'après les mesures microscopiques du fait de l'échelle d'observation.

VI.3 Conclusion

Ce dernier chapitre permet de présenter la mise en évidence expérimentale de l'anisotropie de fluorescence des fibres de collagène visible à deux échelles (macroscopique et microscopique) ainsi que les modifications de cette anisotropie dues au chauffage.

Les mesures réalisées à l'échelle macroscopique révèlent clairement, à travers le calcul de la circularité des distributions, les modifications structurales des échantillons en raison du chauffage, en accord avec la littérature qui détaille la présence de deux effets : la perte de l'ondulation et la dénaturation des fibres de collagène. La dénaturation des fibres est également visible sur les mesures réalisées à l'échelle microscopique. Les valeurs maximales de l'anisotropie de fluorescence tendent à montrer des variations directement liées aux modifications de l'environnement physico-chimique ou/et des propriétés optiques des fibres de collagène.

La comparaison des résultats obtenus sur des échantillons d'animaux d'âge très différents (cf. expérience 1) ne permettent pas de mettre en évidence un effet significatif de l'âge sur l'anisotropie de fluorescence du collagène. Ce résultat est cohérent avec le fait que le couple de fluorescence utilisé est différent de celui de la pyridinoline, seule molécule qui subit des modifications avec l'âge. De plus, étant donné la variabilité inter-échantillons, un plan d'expérience plus adapté pour étudier les éventuelles différences dues à l'âge nécessiterait l'analyse d'un nombre d'échantillons plus élevé par animal.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail était de mettre en place une méthode de mesure de l'anisotropie de fluorescence appliquée aux tissus musculaires animaux et permettant d'évaluer leur organisation structurale et les modifications de cette structure liées aux procédés de transformation *post mortem*. En effet, la structure des produits animaux est à l'origine de leurs propriétés sensorielles et technologiques. A ce titre, c'est une grandeur pertinente pour le contrôle de la qualité, contrôle nécessaire pour répondre aux attentes à la fois des consommateurs et des industriels des filières concernées.

Afin d'atteindre cet objectif, il a d'abord été nécessaire de prendre du temps pour l'adaptation du spectrofluorimètre conventionnel dont dispose le laboratoire pour travailler en lumière polarisée sur des échantillons biologiques. De nouveaux éléments techniques ont ainsi été ajoutés au spectrofluorimètre : polariseurs, porte-échantillon de fluorescence frontale rotatif adapté au type d'échantillons étudiés et système de régulation en température. La résolution des difficultés instrumentales liées à ces modifications a permis d'assurer la maîtrise de la chaîne de mesure mise en œuvre. Les phénomènes de lumière parasite et de biais instrumental liés aux conditions de mesure ont été maîtrisés aboutissant finalement à la mise au point de protocoles de mesure fiables et conformes à l'application souhaitée.

L'étude théorique menée en considérant la structure et les propriétés du tryptophane, principal fluorophore des fibres musculaires, et en prenant en compte son organisation au sein des fibres musculaires a permis de proposer un modèle des variations de l'anisotropie de fluorescence des fibres musculaires en fonction de la direction de mesure considérée par rapport à la direction des fibres des échantillons. Le modèle mis en place se veut volontairement simple, et donc plus facilement transposable à l'étude d'autres systèmes. Les modalités retenues permettent ainsi de prendre en compte deux dimensions relatives au terme "anisotropie de fluorescence" : d'une part l'anisotropie de fluorescence "intrinsèque" des fluorophores, en raison de leurs propriétés spécifiques d'absorption et d'émission et d'autre part l'anisotropie de fluorescence que nous avons qualifiée "de structure", visible grâce aux mesures résolues angulairement et provenant de l'arrangement des fluorophores au sein de la matrice des tissus musculaires. C'est pourquoi le modèle théorique développé

est paramétré par des grandeurs caractérisant d'une part les propriétés de fluorescence des fluorophores (le paramètre μ) et d'autre part l'orientation des fluorophores autour des axes principaux définissant le système (les paramètres C_1 et C_2).

L'étude expérimentale a dans un premier temps permis de vérifier avec succès ce modèle. L'ajustement de celui-ci aux données expérimentales a ainsi permis d'extraire des valeurs des paramètres caractéristiques de l'évolution de la structure des fibres musculaires avec les procédés de transformation *post mortem*.

Les différents plans d'expérience mettant en œuvre les effets de la maturation, de la contraction au froid, du broyage et du chauffage ont de façon générale permis de montrer que les valeurs de l'anisotropie de fluorescence sont corrélées dans la plupart des cas avec l'état de structure des tissus musculaires. L'analyse des données expérimentales a ainsi permis d'extraire des informations concernant la structure des échantillons, quantifiées par les paramètres du modèle théorique dans le cas des fibres musculaires. Il convient de souligner que les variations obtenues sont dans la plupart des cas relativement faibles. Toutefois, la prise en compte de la variabilité inter-échantillons, inhérente à la structure du muscle, permet de dégager des variations significatives.

De ce fait, la diminution significative de l'anisotropie de fluorescence pour les viandes contractées laisse présager la possibilité de détection de façon non destructive de ce défaut technologique. De la même manière, la diminution très importante de l'anisotropie de fluorescence des tissus conjonctifs au cours du chauffage traduit des modifications moléculaires du collagène qui interviennent parallèlement aux modifications mécaniques. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour établir le lien entre les modifications optiques et les modifications mécaniques dans l'objectif d'une évaluation non destructive de la tendreté.

Les études théoriques et expérimentales menées au cours de ces trois années ont constitué une première approche de la mesure de l'anisotropie de fluorescence appliquée aux aliments. Elles ont permis de soulever les difficultés liées à la mise en place de ce type

de mesure et à l'interprétation des données. Certaines ont été résolues. Bien entendu, comme il a été dit à plusieurs reprises, ce travail nécessite d'être complété afin de prendre en compte l'influence des autres propriétés optiques, en particulier de la diffusion de la lumière, dans les mesures de l'anisotropie de fluorescence. Comme il a été mentionné brièvement dans la partie "Dispositifs Expérimentaux", des essais ont d'ores et déjà été réalisés sur ce sujet. Les mesures effectuées dans la même configuration de mesure qu'en fluorescence frontale, mais en choisissant des longueurs d'onde d'excitation et d'observation égales, ont montré qu'il y a bien une anisotropie de diffusion de la lumière. Cependant, ce type de mesures n'a pas été poursuivi et les premiers résultats n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des données issues de cette thèse car l'acquisition des données n'a pas été réalisée dans des conditions de mesure indiscutables, à savoir :

- A $\lambda_{exc} = \lambda_{em}$, de la lumière parasite provenant de la réflexion spéculaire du faisceau d'excitation sur la lame de quartz du porte-échantillon est renvoyée vers le détecteur, augmentant artificiellement la valeur de l'anisotropie de la lumière détectée.
- L'anisotropie de diffusion semble être sensible à l'épaisseur des échantillons dans la gamme variant de 1 à 5 mm.

En conclusion, il est clair qu'une étude de l'anisotropie de diffusion de la lumière est indispensable pour compléter l'interprétation des résultats concernant l'anisotropie de fluorescence des tissus musculaires. Etant donné les difficultés soulevées une nouvelle fois sur le plan expérimental par ce type de mesure, une approche théorique de ce problème serait dans un premier temps plus adéquate. La modélisation des propriétés optiques des tissus musculaires semble être une étape indispensable pour la suite de ce travail de recherche. Dans ce but, les travaux menés en ce moment par Lyes Lakhali ([60]), qui visent à déterminer les paramètres optiques de milieux turbides et à modéliser leurs propriétés de fluorescence, devraient être considérés.

De façon plus générale, les résultats obtenus ouvrent des perspectives théoriques et pratiques dans le domaine de la fluorescence des aliments afin d'une part, de compléter les connaissances visant à identifier et à comprendre les modifications structurales liées aux procédés de transformation des aliments et d'autre part, d'ouvrir la voie à des applications de contrôle non destructif de la qualité des aliments.

Enfin, ce travail peut également être considéré au delà de la filière viande et de son application aux tissus musculaires. Comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, la problématique de l'étude des propriétés optiques d'échantillons structurés est très générique et concerne également d'autres domaines que celui des produits carnés. Le département Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA) de l'INRA a en effet pour champs thématiques l'étude des structures et propriétés des produits d'origines agricole et forestière et des processus de transformation. Ces thèmes de recherches s'appliquent aux produits carnés, mais également à des produits d'autres filières, telles que le bois, les polymères d'origines végétales et les fruits, dans lesquelles ce travail pourrait être utile. A plus large échelle que celle des produits issus de l'agriculture, le domaine du biomédical également développe et met en œuvre des méthodes basées sur la connaissance des propriétés optiques des tissus biologiques. La mesure de l'anisotropie de fluorescence est également susceptible d'être appliquée dans le cadre de ces techniques à but diagnostique.

Valorisation des compétences

Le nouveau chapitre de la thèse

Depuis plusieurs années, le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche s'attache à rendre les thèses plus professionnalisantes, en vue de permettre aux doctorants ne pouvant pas ou ne voulant pas continuer dans le domaine de la recherche de mieux valoriser leurs travaux vis-à-vis d'un employeur extérieur au monde de la recherche publique française. Il a ainsi été mis en place un exercice appelé "Valorisation des compétences, un Nouveau Chapitre de la Thèse" qui consiste à demander à des étudiants en thèse d'inclure dans leur mémoire un chapitre présentant leurs travaux en tant que projet de recherche. Cette expérience, dont le maître d'œuvre est l'Association Bernard Gregory, est maintenant menée pour la septième année consécutive.

Il convient de noter que cet exercice n'a aucun caractère académique et n'entre en compte ni dans l'évaluation de la thèse, ni dans l'obtention du diplôme. C'est un véritable inventaire et une mise en valeur des compétences qui ont été nécessaires au bon déroulement de la thèse. Il inclut une analyse critique du déroulement de la thèse, dans une optique de projet, une identification et une mise en valeur des acquis professionnels et compétences développées pendant la thèse illustrés par des exemples puisés dans sa préparation.

J'ai eu l'opportunité de participer à la campagne 2007 du "Nouveau Chapitre de la Thèse" et de rédiger en juin 2007 le rapport qui suit. Ce travail a été encadré par Maria Bachmann.

1 Cadre général et enjeux de la thèse

1.1 Présentation succincte

La **qualité des produits alimentaires** est un enjeu socio économique. Parmi les industries agro-alimentaires (premier secteur industriel français), le secteur viande occupe une part prépondérante. Cependant, les technologies utilisées dans cette filière restent encore très traditionnelles, voire empiriques.

La **viande bovine** plus particulièrement, dont la qualité est toujours difficilement maîtrisable, reste cependant une viande onéreuse par rapport aux viandes blanches comme le porc et la volaille. Le faible rapport qualité / prix, ainsi que la mauvaise image nutritionnelle de cette viande, sont en partie responsables de la chute de près de 20% en 25 ans de la consommation en viande bovine des français. Cette lourde tendance à la baisse semble cependant être freinée depuis quelques années grâce aux efforts développés par la filière pour regagner la confiance des consommateurs dont les principales attentes en terme de qualité sont des garanties de la qualité sanitaire, sensorielle (tendreté et flaveur essentiellement) et nutritionnelle, mais aussi l'authenticité.

La variabilité non maîtrisée de la qualité sensorielle de la viande bovine est donc une préoccupation majeure de la filière viande et fait l'objet de nombreuses recherches, sachant qu'il est généralement admis que cette variabilité est expliquée à environ 20% par les facteurs d'élevage et à 80% par les phases d'abattage et de transformation du muscle en viande. Dans ce cadre, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) conduit des recherches sur la maîtrise des caractéristiques qualitatives qui déterminent les qualités organoleptiques (tendreté, flaveur¹, etc.) des viandes. [75], [48]

Ma thèse s'inscrit dans le contexte de ces recherches avec pour sujet l'étude de l'**anisotropie**² des propriétés physiques des tissus biologiques structurés, tels que les **fibres musculaires** et le **collagène**. La connaissance des propriétés physiques des tissus présente en effet un intérêt pour mieux comprendre leur organisation structurale et en mesurer

¹La flaveur est l'ensemble des sensations perçues lors du flairage ou de la mise en bouche de l'aliment

²L'anisotropie (contraire de l'isotropie) est la propriété d'être dépendant de la direction

les évolutions dues aux transformations post mortem comme la cuisson et la maturation. Cela permettrait de tracer des pistes en vue de l'élaboration de capteurs non destructifs de la qualité de la viande.

1.2 La thèse dans son contexte

J'ai réalisé cette thèse au sein du centre INRA de Clermont-Ferrand Theix, 3ème centre INRA par sa taille, dans l'Unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA). Comme l'indique son nom, cette Unité a pour projet scientifique l'étude de la qualité des produits animaux par une approche intégrative de la caractérisation de la matière première et des procédés de transformation. Au début de ma thèse, l'Unité QuaPA est composée de 5 équipes et de 60 agents permanents répartis en 40 chercheurs, 15 techniciens et 5 agents administratifs (cf. figure 85, page 194). Elle est impliquée dans le pôle de compétitivité "Viandes et produits carnés".

J'ai été plus particulièrement accueillie par l'Equipe "Biophysique" qui s'intéresse aux produits et à leur évolution par différentes mesures physiques : mécaniques, électriques et électromagnétiques.

Mon projet de thèse était donc bien intégré au projet global de l'équipe puisqu'il comprenait une partie des méthodes électromagnétiques développées pour caractériser les produits. A son commencement, les compétences scientifiques et techniques de l'équipe Biophysique, qui était alors constituée de 2 chercheurs, 2 ingénieurs de recherche, 1 assistant ingénieur et 2 personnels techniques, ont été mises à disposition pour encadrer ce projet. Lors de ma première année de thèse, une restructuration a modifié quelque peu les données puisque un chercheur et un ingénieur de recherche ont quitté l'équipe alors qu'un assistant ingénieur l'intégrait. L'équipe biophysique a finalement été supprimée lors de ma troisième année de thèse. Il faut noter que cette dernière restructuration n'a pas beaucoup modifié la disponibilité des personnes participant à l'encadrement de ma thèse.

Excepté le fait que ma thèse s'intégrait à 2 des 3 programmes transversaux³ de l'Unité, les projets "Structure" et "Authentification", elle n'était initialement liée à aucun réseau scientifique dans le domaine. En effet, la spectroscopie de fluorescence en lumière polarisée était alors une méthode tout à fait nouvelle dans l'Unité. Les travaux à l'origine de ce sujet de thèse portaient sur la spectroscopie de fluorescence non polarisée et plus particulièrement sur l'imagerie de fluorescence des tissus musculaires. Dans ce cadre, des collaborations existaient avec un laboratoire de l'ENITA de Clermont Ferrand.

³Ces projets scientifiques fédérateurs permettent de regrouper les compétences dans des études nécessitant une approche pluridisciplinaire

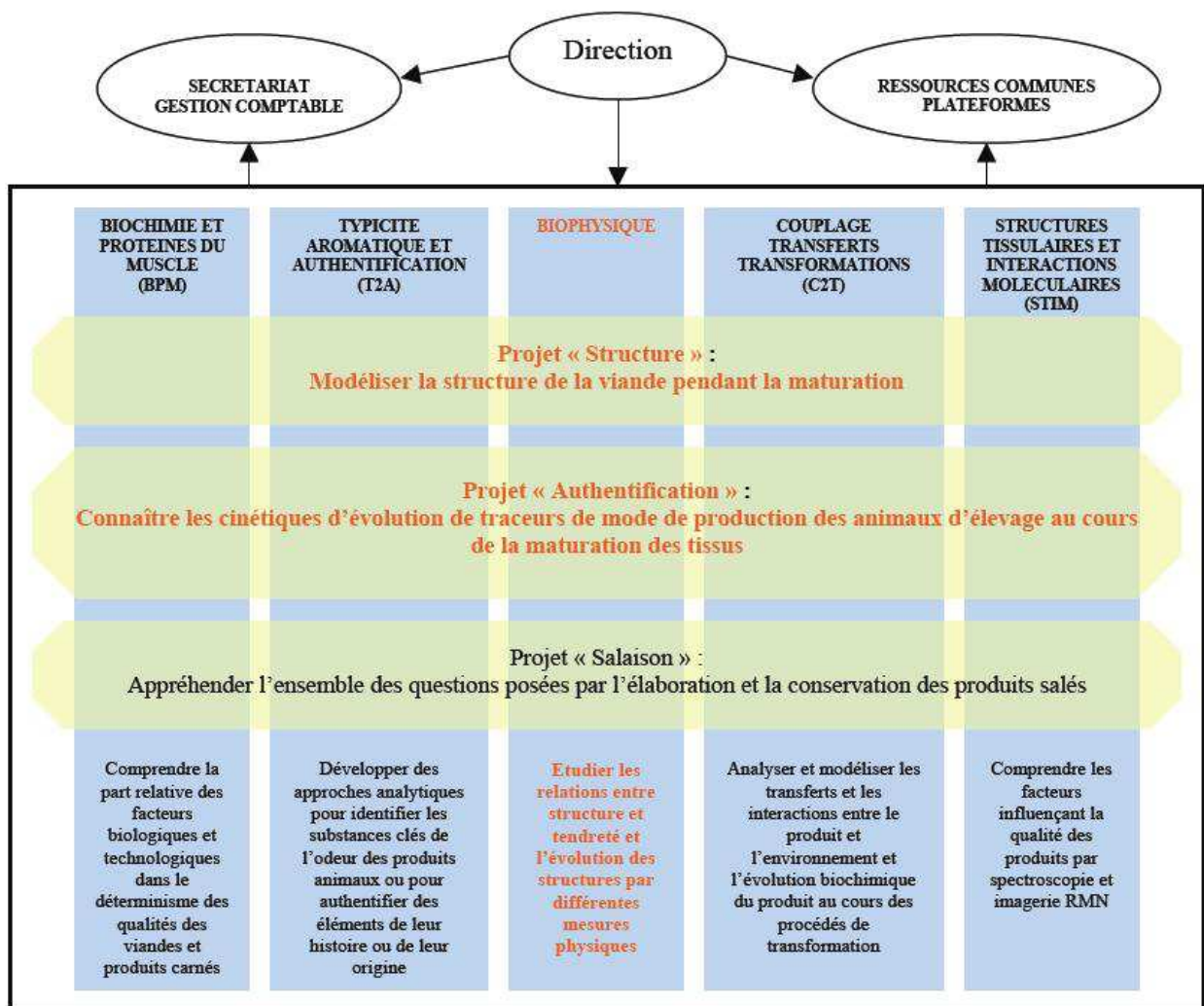


FIG. 85 : Organigramme de l'Unité QuaPA avec en orange les composantes dans lesquelles le projet de thèse intervenait.

1.3 Moi dans ce contexte

C'est au cours de mon stage de technicien, pour l'obtention du DUT, que j'ai eu mon premier contact avec le monde de la recherche, puisqu'il s'effectuait, un peu par hasard, dans un laboratoire de recherche de la faculté de pharmacie. A l'époque, cette expérience m'a permis de côtoyer des chercheurs et des thésards, et de les voir évoluer dans leur quotidien.

Mais ce n'est que lors de mon cursus d'ingénieur que j'ai commencé à m'interroger sur la possibilité d'intégrer moi-même ce milieu et de faire une thèse. En effet, par l'intermédiaire d'un stage et d'un mini-projet faisant partie de ma formation, j'ai eu de nouveau la possibilité de fréquenter des laboratoires universitaires. Cela m'a permis de prendre réellement conscience des principales missions des métiers de la recherche que sont la production scientifique, la valorisation des résultats et la diffusion de l'information scientifique et d'éveiller mon intérêt pour la formation par la recherche. C'est ainsi que j'ai décidé de m'inscrire en double cursus lors de ma dernière année de formation d'ingénieur, pour suivre en même temps une formation de DEA. Ce diplôme a été pour moi l'opportunité également de me spécialiser dans un domaine particulier qu'était la **physique des rayonnements**.

Mon stage de fin de 2ème cycle s'est effectué au sein d'un laboratoire de l'INSA de Lyon et c'est naturellement que j'ai décidé de rechercher une thèse afin d'une part de confirmer mon orientation vers le domaine des rayonnements et d'autre part de me préparer à des métiers de la recherche et du développement ou à une carrière universitaire dans la mesure du possible. Le laboratoire m'ayant accueillie pour mon stage de DEA n'ayant pas reçu de bourse qu'il pouvait me destiner, il m'a aidée à rentrer en contact avec l'équipe Biophysique de l'INRA qui disposait alors d'une bourse de thèse. Le sujet proposé s'éloignait un peu de la thématique des rayonnements ionisants vers laquelle je souhaitais au départ me diriger, mais correspondait tout de même à ma spécialisation de DEA. De plus, la perspective d'intégrer un grand institut de recherche national tel que l'INRA et de découvrir un environnement de recherche différent de celui de la recherche universitaire et que j'avais seul connu jusqu'ici me paru des plus intéressants. Enfin, l'idée

de me confronter au **domaine de l'agroalimentaire** qui m'était peu connu jusqu'alors, me sembla être forcément intéressante dans la mesure où elle me permettrait de m'ouvrir à d'autres domaines scientifiques.

2 Déroulement, gestion et coût du projet

2.1 Préparation et cadrage du projet

La préparation et le cadrage du projet de thèse ont été effectués avant mon arrivée par les scientifiques constituant l'équipe Biophysique. Un des aspects du projet était donc d'élargir la gamme des recherches effectuées dans le domaine des propriétés électromagnétiques des produits animaux en ajoutant le domaine des rayonnements du visible et du proche UV comme la fluorescence, au domaine des hyperfréquences déjà étudié ([16] and [37]). Pour ce faire, l'équipe disposait d'un spectrofluorimètre, instrument récemment récupéré et qu'il était nécessaire d'adapter aux mesures que le projet nécessitait.

Un des facteurs de risque du projet était que son domaine avait été peu exploré jusqu'ici et qu'il était ainsi difficile d'en évaluer les difficultés et l'aboutissement. Mais ce fait constituait également le facteur de succès du projet puisque ce travail, même si il n'aurait pas forcément le temps d'aboutir au développement d'outils industrialisables de la mesure de la qualité de la viande, il générerait forcément des connaissances et compétences originales et constituerait donc un apport scientifique certain. Un autre facteur de succès également était bien sûr la compétence des agents de l'équipe et leur expérience dans le domaine agroalimentaire.

2.2 Conduite du projet

2.2.1 Principales étapes

Le sujet de ma thèse vise à mettre en évidence et étudier l'anisotropie optique des tissus biologiques. Au départ, outre les phases de bibliographie et de rédaction, les principales étapes prévues pour répondre à cette question étaient :

- mettre au point une méthodologie de mesure de l'anisotropie optique ;
- réaliser des expérimentations pour mettre en évidence l'anisotropie de fluorescence des tissus ;
- réaliser d'autres expérimentations pour mettre en évidence l'évolution de l'anisotropie des tissus avec les procédés de transformation.

Le programme de départ de la thèse était donc assez cerné, mais pas trop précis quand même, laissant des libertés dans le choix et l'ordre des expériences à mettre en œuvre.

Dès le début de la thèse, un suivi régulier par mes **encadrants** directs a eu lieu sous forme de réunions afin de décider de façon collégiale des expérimentations à mettre en œuvre, de la gestion et commande des échantillons et de l'analyse des résultats. La fréquence de ces réunions pouvait varier selon les besoins, de 1 à 2 fois par mois en moyenne. Un **comité de thèse**⁴ a également été réuni tous les 6 mois environ afin de faire le point sur l'état d'avancement de la thèse et décider des pistes scientifiques à suivre. Ces réunions de comité de thèse furent très utiles car leur préparation nécessitait de prendre du recul par rapport aux travaux effectués. Elles permirent de faire le point régulièrement et de recueillir l'avis de personnes extérieures sur la validité et l'intérêt des résultats présentés, et les directions à suivre.

2.2.2 Gestion des relations avec les partenaires scientifiques

Au commencement de la thèse, l'équipe Biophysique n'appartenait à aucun réseau scientifique dans le domaine concerné, c'est-à-dire de façon spécifique la fluorescence en lumière polarisée. Cependant, en particulier par l'intermédiaire des membres du comité de thèse, de nouveaux liens se sont créés au cours de la thèse avec des réseaux de scientifiques. Nous avons ainsi eu l'opportunité de participer à des « Ateliers de fluorescence », organisés à l'origine par l'Institut Supérieur d'Agriculture de Beauvais (ISAB) et au cours desquels nous avons pu entrer en contact avec des personnes travaillant sur cette

⁴Comité scientifique constitué du directeur de thèse, de chercheurs internes et externes au projet de recherche et d'un professeur de l'Ecole Doctorale

thématique. Ces ateliers consistaient en des réunions de travail où chacun présentait ses travaux et les problématiques rencontrées, et une discussion de groupe s'en suivait.

A cours de ma première année de thèse, j'ai participé à une formation internationale proposée par la "Fluorescence foundation" à Gênes en Italie. Durant 4 jours, j'ai suivi les enseignements très riches des spécialistes mondiaux de la fluorescence qui furent des plus intéressants bien sur. La discussion avec tous les partenaires scientifiques de cette formation fut très ouverte et j'eus ainsi l'opportunité de leur parler de mon projet de thèse et de recevoir leurs conseils avisés en terme d'instrumentation et de références bibliographiques.

J'ai également participé à deux congrès internationaux qui m'ont permis à la fois de m'enrichir des travaux des équipes du monde entier travaillant sur des domaines proches du mien et de me faire connaître par la présentation de posters relatifs à mon sujet de thèse.

L'occasion s'est également présentée de mettre en commun certaines analyses avec la société Histalim (start up de Montpellier spécialisée dans la mesure de la structure des produits alimentaires par des méthodes histologiques) afin de comparer les résultats que nous obtenions sur les mêmes échantillons.

2.2.3 Difficultés rencontrées et solutions apportées

Outre la gestion du temps concernant les tâches à effectuer (bibliographie, formations de l'école doctorale, réunions internes, participation à des séminaires et congrès, expérimentations à réaliser et résultats à analyser et enfin rédaction) présentée par la figure 86 (page 201), les principales difficultés rencontrées furent d'ordre scientifique.

La première partie du projet (mise au point de la méthode de mesure) a demandé de gros efforts du point de vue de l'instrumentation, que l'on n'avait pas forcément anticipé. Quelques exemples de difficultés rencontrées :

- L'instrument initial n'était pas adapté à la mesure polarimétrique que l'on souhaitait

faire et on se heurta donc à des problèmes lors de son adaptation en terme de matériel, de temps et d'argent.

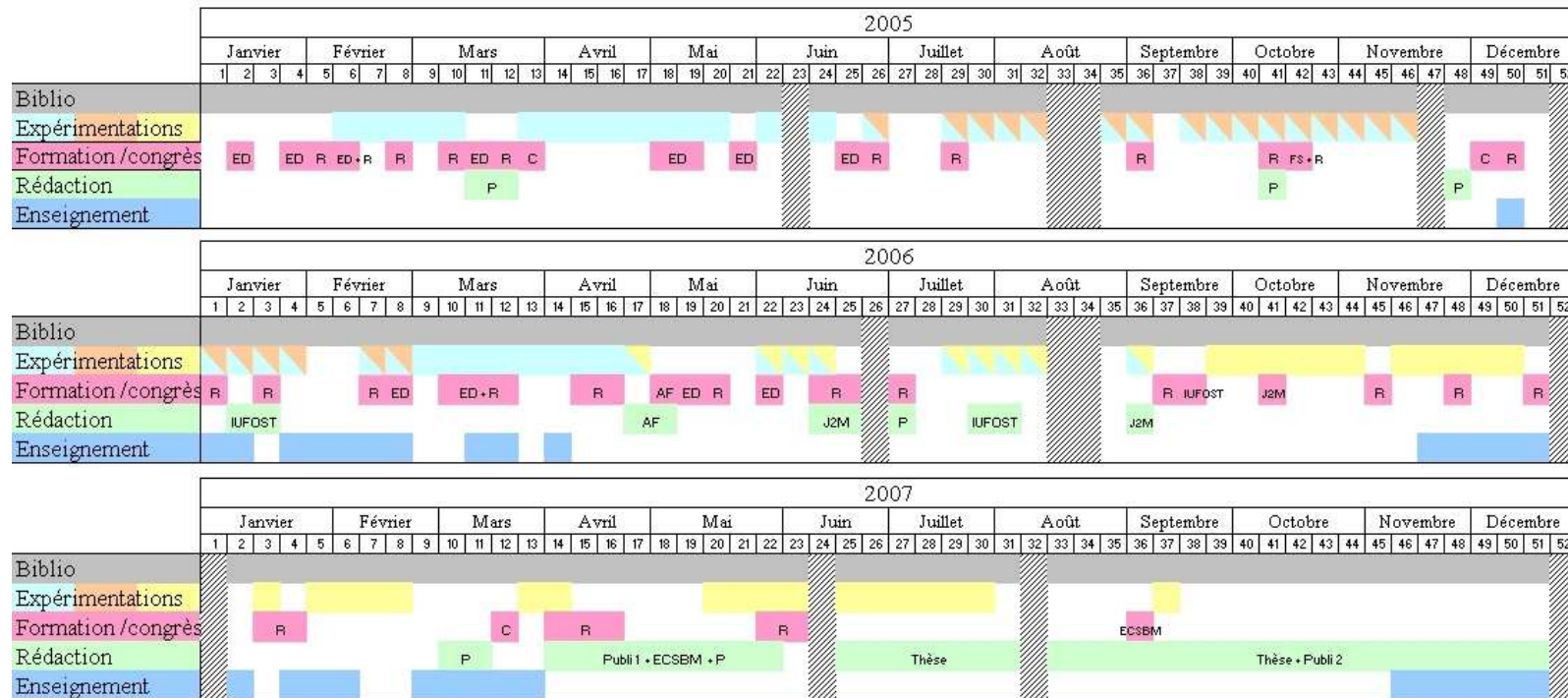
- Il n'y avait presque aucune référence bibliographique ayant décrit de mesure semblable à celle que l'on cherchait à mettre au point. Plus particulièrement, aucune référence dans le domaine de la viande et quelques références seulement dans d'autres domaines mais difficilement exploitables car vieilles ou/et peu détaillées.
- Le fait est qu'aucun échantillon biologique n'est semblable et qu'un même échantillon évolue au cours du temps. Ceci représente une véritable difficulté pour mettre au point une méthode de mesure physique car il est nécessaire d'en connaître la répétabilité et d'évaluer ainsi l'incertitude sur les résultats obtenus.

Les principales solutions apportées à ces difficultés furent la patience et la rigueur ! Nous avons en effet passé plusieurs mois de plus que ce que nous avions prévu au départ sur la mise au point de la méthode de mesure. Nous avons passé du temps sur chacun des éléments de la chaîne de mesure afin de les maîtriser et d'être sûrs de la fiabilité des résultats de mesure. La participation au cours sur « Les principes des techniques de fluorescence » dispensé à Gênes m'a également été d'une grande utilité. Les scientifiques reconnus du domaine ont en effet présenté aux participants les éléments indispensables à savoir pour réaliser des mesures fiables, ils nous ont également individuellement aiguillé vers certaines références bibliographiques et nous ont donné des conseils grâce à leur expérience. Enfin, pour palier au problème de la variabilité des échantillons, nous avons dû réaliser un plus grand nombre de mesures que si nous avions eu la possibilité d'avoir des échantillons témoins, ou de référence. Dans cette phase de développement méthodologique, ma formation d'ingénieur ainsi que mon expérience de l'instrumentation et de la mesure en général acquise lors de mes stages en laboratoire m'ont beaucoup aidée.

Lors des deux parties suivantes du projet (expérimentations), les difficultés rencontrées furent plutôt liées au fait que les résultats obtenus n'ont pas toujours été ceux attendus. Après avoir mis en évidence l'anisotropie des tissus biologiques comme souhaité, nous avons cherché à mettre en évidence l'évolution de cette anisotropie avec les procédés de transformation. Les très faibles variations de cette anisotropie ainsi que la grande variabi-

lité entre les échantillons ont rendu cette mise en évidence très difficile. Ainsi, nous avons réalisé un grand nombre de plans d'expérience différents pour pouvoir tester ce qui marchait bien et moins bien. Au final, nous avons donc pu évaluer la sensibilité de la méthode de mesure mise au point pour mettre en évidence différentes transformations des tissus biologiques.

La faible sensibilité de notre méthode pour le suivi de certains procédés de transformation (la maturation de la viande bovine par exemple) ne doit pas masquer le caractère générique de ce qui a été mis au point. L'une des difficultés de la rédaction du rapport de thèse a été de montrer les applications potentielles à cette technique, au-delà du domaine de l'agroalimentaire.



LEGENDES :

- | | |
|---------------------------------------|--|
| Expérimentations de la thèse : | Formation / Congrès et Rédaction : |
| = étape 1 | ED = Module de l'école doctorale |
| = étape 2 | R = Réunion INRA |
| = étape 3 | C = Réunion de Comité de thèse |
| | FS = Fête de la science |
| | IUFOST = International Congress of Food Science and Technology |
| | AF = Atelier de Fluorescence |
| | J2M = Journées de la Mesure et de la Métrologie |
| | P = Préparation Réunion |

FIG. 86 : Récapitulatif de la gestion des tâches au cours de la thèse (les phases de traitement des résultats et d'analyse des données ne sont pas représentées).

2.3 Evaluation et prise en charge du coût du projet

Le financement de ma thèse a été réalisé grâce à une bourse INRA/région en ce qui concerne mon salaire, ainsi que par une ANS (Action Nouvelle Soutenue) du département Cépia (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture) de l'INRA pour ce qui relève des autres frais (hors salaires et coûts d'infrastructure qui sont pris en charge par l'INRA). Une liste détaillée des dépenses sur 3 ans est présentée dans le tableau 10.

Type			Total (€)
<i>Humain</i>			
	Temps (mois)	Salaire brut mensuel + 20% charges sociales (€)	
Doctorant	36	1710	61560
Ingénieur de recherche	7	2665	18655
Assistant ingénieur / technicien	5	2076	10380
Stagiaire	2	555	1110
<i>Matériel</i>			
Achat matériel scientifique			3130
Achat matériel informatique			1270
<i>Coût approximatif d'infrastructure</i>			
	Temps (mois)	Coût annuel (€)	
Electricité	3	350	1050
Chauffage	3	550	1650
Téléphone	3	50	150
Photocopies	3	70	210
<i>Communication orale</i>			
Conférences			1090
Formations			1000
Comités de thèse			630
<i>Communication écrite</i>			
Achat livres			200
Achat publications			150
Total			102235

TAB. 10 : Evaluation du coût du projet

Ainsi, les dépenses liées au projet ont été principalement liées au financement humain, les dépenses matérielles ne représentant qu'un peu plus de 7%, et les dépenses en relation avec la communication scientifique 3% environ. Il faut toutefois noter que les dépenses liées aux salaires des personnes impliquées dans l'encadrement de la thèse sont difficiles à évaluer dans la mesure où les travaux menés lors de la thèse correspondent à leurs domaines d'étude et font donc finalement partie à part entière de leur mission.

3 Identification des diverses compétences mises en œuvre

Ces trois années de thèse ont constitué une expérience professionnelle importante et m'ont permis d'acquérir des compétences scientifiques et techniques, mais également transversales et aussi d'ordre personnel.

3.1 Compétences scientifiques et techniques

La thèse m'a d'abord donné une opportunité d'acquérir de nouvelles connaissances en physique et plus particulièrement dans le **domaine des rayonnements électromagnétiques**, qui était celui de mon choix de spécialisation en DEA. J'ai ainsi pu développer une certaine expertise scientifique dans le domaine de ma thèse qui était la **spectroscopie de fluorescence**, à la fois concernant la théorie physique notamment grâce à la bibliographie, mais également la mise en œuvre expérimentale. En effet, à travers la mise au point d'un protocole de mesure adapté aux besoins de ma thèse, j'ai pu aborder les difficultés liées à l'adaptation d'un instrument et à la maîtrise d'une chaîne de mesures et de ses grandeurs d'influence. Ce dernier point a donc constitué une part majeure de ma thèse, m'ayant permis d'acquérir un savoir-faire important en **instrumentation**.

Si je reviens sur les connaissances scientifiques acquises durant la thèse, il est évident que je ne dois pas seulement considérer la spectroscopie de fluorescence, qui était l'outil indispensable que j'ai utilisé tout au long de ces 3 années, mais également toutes les sciences plus ou moins connexes à ce sujet. J'ai en effet bénéficié d'une **ouverture de mon domaine de compétences initial**, qui était la physique, vers d'autres thématiques. La plupart des publications sur lesquelles je me suis appuyée portent sur des domaines très divers : agroalimentaire bien sûr, mais également biologie du muscle, et méthodes de mesure développées dans le domaine du biomédical et des polymères par exemple.

3.2 Compétences transversales

Les compétences transversales que j'ai pu acquérir durant ma thèse sont nombreuses et diverses :

- La thèse constitue avant tout une expérience de **conduite de projet** et de **résolution de problèmes**. Elle m'a permis de mettre en application la formation que j'avais reçue dans ce domaine durant mon cursus d'ingénieur à travers les exercices quotidiens de planification des tâches, de gestion du temps et des problèmes. De manière plus générale, on pourrait dire que la thèse permet donc d'acquérir des **compétences organisationnelles** à travers la gestion en parallèle de tâches scientifiques sur la paillasse (expérimentations) et derrière son bureau (traitement des résultats, rédaction d'articles, etc.), mais aussi administratives (réunions par exemple) et sociales.
- La **communication** au sens large du terme a également été un apport majeur de la thèse. Elle englobe :
 - La communication scientifique pratiquée à travers les communications orales et écrites faites autour des résultats de la thèse en anglais ou français, dans des congrès internationaux et des séminaires ou réunions INRA, mais également à travers des événements tels que la « Fête de la science », visant à expliquer aux plus jeunes les métiers scientifiques, ainsi que par la composante d'enseignement que j'ai effectuée sur laquelle je reviendrai plus loin.
 - La communication technique avec les fournisseurs, à travers les achats de matériel et demandes de devis.
 - La communication dans le domaine du social de par le rôle que j'ai pu tenir en tant que membre de l'association des non titulaires du centre qui vise à intégrer les nouveaux arrivants, organiser des rencontres entre les non-titulaires et diffuser des informations scientifiques telles que des offres d'emploi, des salons, etc. Également en tant que représentante des non-titulaires au conseil de gestion de l'unité.
- La plupart des éléments que je viens d'aborder dans le domaine de la communication

sont étroitement liés avec la notion d'**animation de réunion** qui est un exercice que j'ai effectué à plusieurs reprises, soit directement par rapport à ma thèse, soit dans les domaines du social cités ci-dessus. En effet, au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de mener des réunions de discussion concernant les travaux de ma thèse. En tant que représentante des non-titulaires au conseil de gestion de l'Unité, j'ai également organisé des réunions d'information et de prise de décision collective.

- Ma mission de vacataire à l'IUT Mesures Physiques de l'Université d'Auvergne ainsi que le module d'enseignement que j'ai suivi par l'intermédiaire de l'Ecole Doctorale, m'ont également permis d'acquérir des **méthodes d'enseignement**. De part mon poste à l'IUT, j'ai eu l'occasion d'encadrer des travaux pratiques dans différentes matières (optique et thermodynamique), de corriger les copies des étudiants et d'effectuer le contrôle de leurs connaissances en fin de session. Ce poste m'a également permis de m'intégrer dans une équipe éducative et d'échanger avec d'autres enseignants sur le contenu des travaux pratiques ou sur l'évaluation des progrès des étudiants au cours des réunions de fin d'année. Grâce au module "enseignement" de l'Ecole Doctorale j'ai pu mettre en œuvre les conseils avisés lors de la partie théorique de la formation au cours de deux séances de travaux dirigés en première année d'école d'ingénieur.
- J'ai également complété mes compétences en terme de **veille scientifique** à travers la composante omniprésente de bibliographie de la thèse.
- De part les communications scientifiques écrites et orales, les lectures effectuées pour la bibliographie et le module de formation interne en **anglais** suivi durant toute la durée de ma thèse, j'ai amélioré mes capacités en anglais oral et écrit, essentiellement dans les domaines scientifiques et techniques.
- La mise en place au sein de l'INRA de la **démarche qualité** au cours de ma thèse m'a permis de mettre en application les connaissances que j'avais acquises dans ce domaine au cours de mon cursus universitaire en participant par exemple à l'écriture

de protocoles de mesure et en utilisant quotidiennement des cahiers de laboratoire.

- Les méthodes de **travail en équipe** sont également un aspect quotidien inhérent à tout projet de recherche.
- La part de rédaction au cours de la thèse est importante, que ce soit des documents scientifiques, des documents techniques ou des documents organisationnels par exemple. Ainsi, j'ai amélioré au cours de ces trois années mes **capacités rédactionnelles**.

3.3 Compétences personnelles

Ces trois années m'ont également permis de mettre en œuvre, développer et enrichir mes qualités personnelles. J'ai toujours eu un goût pour la communication et le relationnel et participer à un projet de recherche commun m'a donné l'occasion de révéler ma capacité à travailler en équipe. L'adaptabilité, l'esprit d'organisation, le sens pratique et l'autonomie sont des qualités qui me paraissent nécessaires dans le monde du travail et la thèse a été également un bon exercice pour les tester et les déployer au quotidien. De la même façon, j'ai pu étendre mes capacités de synthèse et d'analyse, par exemple lors des phases de bibliographie et de rédaction d'articles. Deux autres qualités indispensables sont la curiosité intellectuelle et la créativité et cette expérience m'aura permis de les stimuler et les cultiver. Enfin, un dernier point et non le moindre, la thèse est une formidable mise à l'épreuve...de la patience !

Ainsi, ces trois années de thèse m'auront permis de valider certaines compétences acquises au cours de mon cursus scolaires, et d'en développer de nouvelles, utiles pour mon avenir professionnel.

4 Résultats, impact de la thèse et retombées notamment en termes de pistes professionnelles identifiées

4.1 Résultats et impact de la thèse

Mon projet de thèse était situé très en amont d'une recherche sur l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques (aucune thèse sur le sujet avant). En ce sens, il était difficile d'aboutir au bout de 3 ans à un brevet ou une méthode de Contrôle Non Destructif directement applicable dans l'industrie. En revanche, les résultats techniques de la thèse ont permis d'aboutir à une méthode de mesure fiable et applicable, non seulement aux tissus biologiques du domaine des produits carnés, mais éventuellement envisageable pour d'autres produits structurés, comme des tissus biologiques humains, ou d'autres produits agroalimentaires ou industriels au sens large (les polymères par exemple). La thèse a également généré des connaissances scientifiques concernant l'évaluation de la structure des fibres musculaires et des fibres de collagène au sein de la matrice viande transmises dans des communications orales (J2M 2006, Atelier de fluorescence), communications affichées (IUFOST 2006, ECSBM 2007) et publications écrites.

Il me semble donc que cette thèse aura eu un impact positif pour l'Unité de Recherche QuaPA puisqu'elle aura permis de générer des connaissances scientifiques, d'aboutir à une nouvelle méthode de mesure et de communiquer sur les travaux menés. De plus, elle aura permis aux scientifiques de l'équipe de s'intégrer à des réseaux du domaine et de développer donc des liens avec de nouveaux partenaires.

Des perspectives de recherche pourraient bien sûr être envisagées afin d'enrichir les résultats obtenus. Cependant, étant donné les re-structurations internes à l'Unité QuaPA ayant eu lieu au cours de ma thèse, ces nouvelles pistes de recherche ne seront probablement pas exploitées.

4.2 Pistes professionnelles précises identifiées

Ces trois ans de thèse m'ont permis de confirmer mon intérêt pour les métiers relatifs à la recherche que ce soit dans le domaine du public ou du privé. Ils m'ont également permis de découvrir un goût pour l'enseignement. Ainsi, j'ai aujourd'hui 2 axes principaux de recherche d'emploi :

- Mon premier choix serait de devenir maître de conférence afin d'allier au quotidien les missions de réaliser des travaux de recherche et transmettre des connaissances scientifiques.
- Mon deuxième choix serait de m'orienter vers une carrière d'ingénieur en recherche et développement afin de mettre en œuvre les connaissances, les capacités de gestion de projet et de résolution de problème et le degré de technicité que j'ai pu acquérir.

Quelle que soit la piste que j'aurais l'opportunité d'emprunter, mon projet serait de continuer dans le domaine de la physique des rayonnements et de leur interaction avec la matière, qui me passionne. Ainsi, travailler dans le domaine de la biophysique des radiations et de l'imagerie médicale me plairait beaucoup, en mettant par exemple au point des instruments de diagnostic ou de thérapie. Un autre domaine connexe à la physique des rayonnements est bien sûr le domaine du nucléaire. Ainsi, intégrer un grand groupe tel que Areva ou le CEA m'attirerait également.

5 Conclusion personnelle

Plus qu'un projet de recherche réalisé en tant qu'étudiant, la thèse constitue à mon sens réellement une première expérience dans le monde du travail que je ne regrette pas d'avoir vécue. En effet, la responsabilisation induite par la prise en main d'un sujet du début à la fin est un tremplin vers l'acquisition de la maturité professionnelle, clôturant le chapitre de la vie étudiante ! La thèse m'a permis d'acquérir je pense un certain recul, à la fois scientifique et humain, utile, voire indispensable, pour appréhender les tâches qui pourront m'être confiées dans mon avenir professionnel. Il me semble que cette expérience constitue un apport certain non seulement de compétences scientifiques et techniques, mais aussi de capacité d'adaptation, de faculté d'intégration et d'expérience tout court.

Références bibliographiques

-
- [1] I. ALLAIS, E. DUFOUR, A. PIERRE, C. VIAUD, V. CHEVALLEREAU, C. CURT et N. PERROT : Monitoring the texture of meat emulsions by front-face fluorescence spectroscopy. *Science des aliments*, 23:128–131, 2003.
- [2] I. ALLAIS, C. VIAUD, A. PIERRE et E. DUFOUR : A rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of the texture of meat emulsions and frankfurters. *Meat Science*, 67:219–229, 2004.
- [3] C.M. ANDERSEN et J.P. WOLD : Fluorescence of muscle and connective tissue from cod and salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:470–476, 2003.
- [4] J.F. ARONSON et M.F. MORALES : Polarization of tryptophan fluorescence in muscle. *Biochemistry*, 8(11):4517–4522, 1969.
- [5] D. AXELROD : Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophysical Journal*, 26:557–576, 1979.
- [6] D. AXELROD : Fluorescence polarization microscopy. In volume 30 *Methods in CELL BIOLOGY*, éditeur : *Lansing Taylor, D. and Wang, Y.L.*, pages 333–352. Academic Press Inc., 1989.
- [7] C. E. BIGELOW : *Biological applications of confocal fluorescence polarization microscopy*. Thèse de doctorat, University of Rochester, New York, 2005.
- [8] T. BINZONI, C. COURVOISIER, R. GIUST, G. TRIBILLON, T. GHARBI, J.C. HEBDEN, T.S. LEUNG, J. ROUX et D.T. DELPY : Anisotropic photon migration in human skeletal muscle. *Physics in Medicine and Biology*, 51:N79–N90, 2006.
- [9] S.M. BLACKMAN, C.E. COBB, A.H. BETH et D.W. PISTON : The orientation of eosin-5-maleimide on human erythrocyte band 3 measured by fluorescence polarization microscopy. *Biophysical Journal*, 71:194–208, 1996.
- [10] J. BOREJDO, A. SHEPARD, D. DUMKA, I AKOPOVA, J. TALENT, A. MALKA et T.P. BURGHARDT : Changes in orientation of actin during contraction of muscle. *Biophysical Journal*, 86:2308–2317, 2004.
- [11] J. BRONDUM, L. MUNCK, P. HENCKEL, A. KARLSSON, E. TORNBERG et S.B. ENGELSEN : Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55:177–185, 2000.

- [12] A.J. BUR, S.C. ROTH et C.L. THOMAS : Fluorescence anisotropy sensor and its application to polymer processing and characterization. *Review of Scientific Instruments*, 71(3):1516–1523, 2000.
- [13] J. CHRISTENSEN : *Autofluorescence of intact food - an exploratory multi-way study*. Thèse de doctorat, Royal Veterinary and Agricultural University of Denmark, 2005.
- [14] J. CHRISTENSEN, L. NORGAARD, R. BRO et S.B. ENGELSEN : Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical Reviews*, 106:1979–1994, 2006.
- [15] B. CLAUSS et D.R. SALEM : Characterization of the non-crystalline phase of oriented poly(ethylene terephthalate) by chain-intrinsic fluorescence. *Polymer*, 33(15):3193–3202, 1992.
- [16] S. CLERJON et J.L. DAMEZ : Microwave sensing for meat and fish structure evaluation. *Measurement Science and Technology*, 18:1038–1045, 2007.
- [17] C.G.B. COLE et J.J. ROBERTS : The fluorescence of gelatin and its implications. *The Imaging Science Journal*, 45:145–149, 1997.
- [18] B. CORRY, D. JAYATILAKA, B. MARTINAC et P. RIGBY : Determination of the orientational distribution and orientation factor for transfert between membrane-bound fluorophores using a confocal microscope. *Biophysical Journal*, 91:1032–1045, 2006.
- [19] J.C. CRONEY, D.M. JAMESON et R.P. LEARMONTH : Fluorescence spectroscopy in biochemistry : teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29:60–65, 2001.
- [20] A.R. CROSLAND, R.L. PATTERSON, R.C. HIGMAN, C.A. STEWART et K.D. HARGIN : Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - i : chemical composition. *Meat Science*, 40:289–302, 1995.
- [21] R.E. DALE, S.C. HOPKINS, U.A. Van der HEIDE, T. MARSZALEK, M. IRVING et Y.E. GOLDMAN : Model-independent analysis of the orientation of fluorescent probes with restricted mobility in muscle fibers. *Biophysical Journal*, 76:1606–1618, 1999.
- [22] T. DAMERAU et M. HENNECKE : Determination of orientational order parameters

- of uniaxial films with a commercial 90°-angle fluorescence spectrometer. *Journal of Chemical Physics*, 103(14):6232–6240, 1995.
- [23] L. DAY et H. BROWN : Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis. *Meat Science*, 57:31–37, 2001.
- [24] Z. DEYL, I. MIKSIK et J. ZICHA : Multicomponent analysis by off-line combination of synchronous fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis of collagen glycation adducts. *Journal of Chromatography A*, 869:161–171, 1999.
- [25] C.G. DOS REMEDIOS, R.G.C. MILLIKAN et M.F. MORALES : Polarization of tryptophan fluorescence from single striates muscle fibers. a molecular probe for contractile state. *The Journal of General Physiology*, 59:103–120, 1972.
- [26] E. DRANSFIELD : Intramuscular composition and texture of beef muscles. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28:833–842, 1977.
- [27] E. DUFOUR, M.F. DEVAUX, P. FORTIER et S. HERBERT : Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy - relationship with texture. *International Dairy Journal*, 11:465–473, 2001.
- [28] E. DUFOUR et J.P. FRENCIA : Les spectres de fluorescence frontale, une empreinte digitale de la viande. *Viandes et Produits Carnés*, 22:9–14, 2001.
- [29] E. DUFOUR, J.P. FRENCIA et E. KANE : Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International*, 36:415–423, 2003.
- [30] E. DUFOUR et A. RIAUBLANC : potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. i. front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait*, 77:657–670, 1997.
- [31] B. EGELANDSDAL, G. DINGSTAD, G. TOGERSEN, F. LUNDBY et O. LANGSRUD : Autofluorescence quantifies collagen in sausage batters with large variation in myoglobin content. *Meat Science*, 69:35–46, 2005.
- [32] B. EGELANDSDAL, K. KVAAL et T. ISAKSSON : Autofluorescence spectra as related to tensile properties for perimysium from bovine masseter. *Journal of Food Science*, 61:342–347, 1996.

- [33] B. EGELANDSDAL, J.P. WOLD, A. SPONNICH, S. NEEGARD et K.I. HILDRUM : On attempts to measure the tenderness of *Longissimus Dorsi* muscles using fluorescence emission spectra. *Meat Science*, 60:187–202, 2002.
- [34] J. EISINGER et G. FLORES : Front-face fluorometry of liquid samples. *Analytical Biochemistry*, 94:15–21, 1979.
- [35] D. EYRE, M.A. PAZ et P.M. GALLOP : Cross-linking in collagen and elastin. *Annual Review of Biochemistry*, 53:717–748, 1984.
- [36] J.B. Faisant de CHAMPCHESNEL, J.F. TASSIN, L. MONNERIE, P. SERGOT et G. LORENTZ : Amorphous phase orientation in biaxially drawn poly(ethylene terephthalate) films. *Polymer*, 38(16):4165–4173, 1997.
- [37] D. FELBACQ, S. CLERJON, J.L. DAMEZ et F. ZOLLA : Modeling microwave electromagnetic field absorption in muscle tissues. *The European Physical Journal - Applied Physics*, 19(1):25–27, 2002.
- [38] Y.C. FUNG : *Biomechanics, Mechanical properties of living tissues*. Springer-Verlag, 1981.
- [39] C. GENOT, F. TONETTI, T. MONTENAY-GARESTIER et R. DRAPRON : Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-protein interactions of visco-elastic food products. 1- designing of front-face adaptator and validity of front-face fluorescence measurements. *Science des aliments*, 12:199–212, 1992.
- [40] C. GENOT, F. TONETTI, T. MONTENAY-GARESTIER et R. DRAPRON : Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-protein interactions of visco-elastic food products. 2- application to wheat gluten. *Science des aliments*, 12:687–704, 1992.
- [41] N. GHOSH, S.K. MAJUMBER et P.K. GUPTA : Fluorescence depolarization in a scattering medium : effect of size parameter of a scatterer. *Physical Review E*, 65:026608, 2002.
- [42] N. GHOSH, S.K. MAJUMDER et P.K. GUPTA : Polarized fluorescence spectroscopy of human tissues. *Optics Letters*, 27(22):2007–2009, 2002.
- [43] N. GHOSH, S.K. MAJUMDER, H.S. PATEL et P.K. GUPTA : Depth-resolved fluores-

- cence measurement in a layered turbid medium by polarized fluorescence spectroscopy. *Optics Letters*, 30(2):1–3, 2005.
- [44] N. GHOSH, A. PRADHAN, P.K. GUPTA, S. GUPTA, V. JAISWAL et R.P. SINGH : Depolarization of light in a multiply scattering medium : effect of the refractive index of a scatterer. *Physical Review E*, 70:066607, 2004.
- [45] D.A. HARRIS et C.L. BASHFORD : *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry : a practical approach*. IRL Press, 1987.
- [46] J. HEINO, S. ARRIDGE, J. SIKORA et E. SOMERSALO : Anisotropic effects of highly scattering media. *Physical Review E*, 68:031908, 2003.
- [47] P. HENCKEL, M. VYBERG, S. THODE et S. HERMANSEN : Assessing the quality of mechanically and manually recovered chicken meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37:593–601, 2004.
- [48] J.F. HOCQUETTE, I. CASSAR-MALEK, A. LISTRAT, C. JURIE, R. JAILLER et B. PICARD : Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande i. vers une meilleure connaissance de la biologie musculaire. *Cahiers de l'Agriculture*, 14(3):283–289, 2005.
- [49] D.M. JAMESON : Basic fluorescence principles. In *3rd Annual Principles of Fluorescence Techniques Course*. Fluorescence Foundation, 2005.
- [50] D.M. JAMESON et J.C. CRONEY : Fluorescence polarization : past, present and future. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6:167–176, 2003.
- [51] D.M. JAMESON, J.C. CRONEY et P.D.J MOENS : Fluorescence : basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods in enzymology*, 360:1–43, 2003.
- [52] H.F. JANG : Measurement of fibril angle in wood fibres with polarization confocal microscopy. *Journal of Pulp and Paper Science*, 24(7):224–230, 1998.
- [53] S.A. JENSEN, L. MUNCK, P. SIGSGAARD et H. HUSS : *Method for quality control of products from fish, cattle, swine and poultry*, 1986.
- [54] R. KAROUI, G. MAZEROLLES et E. DUFOUR : Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. *International Dairy Journal*, 13:607–620, 2003.

- [55] A. KIENLE, C. WETZEL, A. BASSI, D. COMELLI, P. TARONI et A. PIFFERI : Determination of the optical properties of anisotropic biological medi using isotropic diffusion model. *Journal of Biomedical Optics*, 12(1):014026, 1996.
- [56] O. KOSTYUK, H. BIRCH, V. MUDERA et R.A. BROWN : Structural changes in loaded equine tendons can be monitored by a novel spectroscopic technique. *The Journal of Physiology*, 554(3):791–801, 2003.
- [57] O. KOSTYUK et R.A. BROWN : Novel spectroscopic technique for in situ monitoring of collagen fibril alignment in gels. *Biophysical Journal*, 87:648–655, 2004.
- [58] A.S. LADOKHIN : Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. In Encyclopedia of analytical CHEMISTRY, éditeur : Meyers, R.A., pages 5762–5779. Wiley & Sons Ltd, 2000.
- [59] N.G. LAING et K.J. NOWAK : When contractile proteins go bad : the sarcomere and skeletal muscle disease. *BioEssays*, 27:809–822, 2005.
- [60] L. LAKHAL : Nouvelle approche pour l'élimination des effets de matrice, l'identification et la séparation des sources de fluorescence par le modèle parafac/candecomp. In 3ème atelier de fluorescence appliquée aux aliments. ENITA Clermont, 2007.
- [61] J.R. LAKOWICZ : *Topics in fluorescence spectroscopy*. Plenum press, 1991.
- [62] J.R. LAKOWICZ : *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer academic / Plenum publishers, 1999.
- [63] P. LAPERSONNE, J.F. TASSIN, P. SERGOT, L. MONNERIE et G. LE BOURVELLEC : Fluorescence polarization characterization of biaxial orientation. *Polymer*, 30:1558–1564, 1989.
- [64] D.J.R. LAURENCE : A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence. *The Biochemical Journal*, 51(2):168–180, 1952.
- [65] R.A. LAWRIE : *Meat Science, Fourth Edition*. Pergamon Press, 1985.
- [66] L. LEFAUCHEUR, P. BUCHE, P. ECOLAN et M. LEMOING : Classification of pig myofibres and assessment of post-mortem glycogen depletion according to fibre type by computerized image analysis. *Meat Science*, 32(3):267–278, 1992.

- [67] J. LEPETIT, P. SALÉ et A. OUALI : Post-mortem evolution of rheological properties of the myofibrillar structure. *Meat Science*, 16:161–174, 1986.
- [68] G.J. LEWIS et P.P. PURSLOW : The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26:255–269, 1989.
- [69] J.W. LICHTMAN et J.A. CONCHELLO : Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12):910–919, 2005.
- [70] S.J. LIN, W. LO, H.Y. TAN, J.Y. CHAN, W.L. CHEN, S.H. WANG, Y. SUN et W.S. LIN : Prediction of heat-induced collagen shrinkage by use of second harmonic generation microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(3):034020, 2006.
- [71] A. LISTRAT, C. LETHIAS, J.F. HOCQUETTE, G. RENAND, F. MÉNISSIER, Y. GEAY et B. PICARD : Age-related changes and location of type i, iii, xii and xiv collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *The Histochemical Journal*, 32:349–356, 2000.
- [72] A.G. MARANGONI : Steady-state fluorescence polarization spectroscopy as a tool to determine microviscosity and structural order in food systems. *Food Research International*, 25:67–80, 1992.
- [73] G. MARQUEZ, L.V. WANG, S. LIN, J.A. SCHWARTZ et S.L. THOMSEN : Anisotropy in the absorption and scattering spectra of chicken breast tissue. *Applied Optics*, 37(4):798–804, 1998.
- [74] H. MARTENS, E. STABURSVIK et M. MARTENS : Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *Journal of Texture Studies*, 13:291–309, 1982.
- [75] L. MAUNIER-SIFRE : *Organisation spatiale du tissu conjonctif intramusculaire : relation avec la texture de la viande bovine*. Thèse de doctorat, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal, 2005.
- [76] P.D.J. MOENS, M.K. HELMS et D.M. JAMESON : Detection of tryptophan to tryptophan energy transfert in proteins. *The Protein Journal*, 23(1):79–83, 2004.
- [77] S.K. MOHANTY, N. GHOSH, S.K. MAJUMDER et P.K. GUPTA : Depolarization of autofluorescence from malignant and normal human breast tissues. *Applied optics*, 40(7):1147–1154, 2001.

- [78] J.K.S. MOLLER, G. PAROLARI, L. GABBA, J. CHRISTENSEN et L.H. SKIBSTED : Monitoring chemical changes of dry-cured parma ham during processing by surface autofluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1224–1230, 2003.
- [79] S.P. MORGAN, M.P. KHONG et M.G. SOMEKH : Effects of polarization state and scatterer concentration on optical imaging through scattering media. *Applied Optics*, 36(7):1560–1565, 1997.
- [80] J.C. MYERS, D. LI, A. BAGERIS, V. ABRAHAM, A.S. DION et P.S. AMENTA : Biochemical and immunohistochemical characterization of human type xix defines a novel class of basement membrane zone collagens. *American Journal of Pathology*, 151(6):1729–1740, 1997.
- [81] S. NICKEL, M. HERMANN, M. ESSENPREIS, T.J. FARRELL, U. KRAMER et M.S. PATTERSON : Anisotropy of light propagation in human skin. *Physics in Medicine and Biology*, 45:2873–2886, 2000.
- [82] J.H. NOBBS, D.I. BOWER, I.M. WARD et D. PATTERSON : A study of the orientations of fluorescent molecules incorporated in uniaxially oriented poly(ethylene terephthalate) tapes. *Polymer*, 15:287–300, 1974.
- [83] C.A. PARKER : *Photoluminescence of solutions with applications to photochemistry and analytical chemistry*. Elsevier, 1968.
- [84] F. PERRIN : Polarisation de la lumière de fluorescence. vie moyenne des molécules dans l'état excité. *Le Journal de Physique et le Radium*, 7:390–401, 1926.
- [85] F. PEYRIN, D. CORMIER et J. LEPETIT : Méthode de mesure de la longueur des sarcomères de la viande par acquisition d'image et transformée de fourier. *Journées de la mesure et de la Métrologie INRA*, 2006.
- [86] G.H. POLLACK : *Muscle & Molecules*. Ebner & Sons publishers, 1990.
- [87] P.P. PURSLOW : *Advances in Meat Research. Volume 4 Collagen as a Food*. Van Nostrand Reinold Company, 1985.
- [88] R. RICHARDS-KORTUM et E. SEVICK-MURACA : Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47:555–606, 1996.

- [89] R.W.D. ROWE : Elastin in bovine *Semitendinosus* and *Longissimus dorsi* muscles. *Meat Science*, 17:293–312, 1986.
- [90] W.R. SANBORN, C.C. HEUCK, R.E. AOUD et W.B. STORCH : *Fluorescence microscopy for disease diagnosis and environmental monitoring*. World Health Organization Regional Publications, 2005.
- [91] V. SANKARAN, J.T. WALSH et D.J. MAITLAND : Comparative study of polarized light propagation in biologic tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 7(3):300–306, 2002.
- [92] T. SAYD, M. MORZEL, C. CHAMBON, M. FRANCK, P. FIGWER, C. LARZUL, P. LE ROY, G. MONIN, P. CHÉREL et E. LAVILLE : Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig *semimembranosus* muscle : implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:2732–2737, 2006.
- [93] M. SEDIGHI-GILANI, H. SUNDERLAND et P. NAVI : Microfibril angle non-uniformities within normal and compression wood tracheids. *Wood Science and Technology*, 39:419–430, 2005.
- [94] Y.P. SINICHKIN, D.A. ZIMNYAKOV, D.A. YAKOVLEV, I.A. OVCHINNIKOVA, A.V. SPIVAK et O.V. USHAKOVA : The effect of the optical anisotropy of scattering media on the polarization state of scattered light. *Optics and Spectroscopy*, 101(5):802–810, 2006.
- [95] M.P. SIRET : Analyse du réseau conjonctif de muscles de bovins : relations avec le comportement rhéologique de la viande. Rapport de Stage INRA de Clermont-Fd /Theix - UTC, 1990.
- [96] P.O. SKJERVOLD, R.G. TAYLOR, J.P. WOLD, P. BERGE, S. ABOUELKARAM, J. CULLIOLI et E. DUFOUR : Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue, and myofibers im meat. *Food Chemistry and Toxicology*, 68:1161–1168, 2003.
- [97] J.M. SQUIRE et P.J. VIBERT : *Fibrous proteine structure*. Academic Press, 1987.
- [98] G.N. STAMATAS, R.B. ESTANISLAO, M. SUERO, Z.S. RIVERA, J. LI, A. KHAIAT et N. KOLLIAS : Facial skin fluorescence as a marker of the skin's response to chronic

- environmental insults and its dependance on age. *British Journal of Dermatology*, 154:125–132, 2006.
- [99] H. STEINHART, A. BOSSELMANN et C. MOLLER : Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42:1943–1947, 1994.
- [100] Y. SUN, W.L. CHEN, S.J. LIN, S.H. JEE, Y.F. CHEN, L.C. LIN, P.T.C. SO et C.Y. DONG : Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second harmonic generation imaging. *Biophysical Journal*, 91:2620–2625, 2006.
- [101] A. SVIRIDOV, V. CHERNOMORDIK, M. HASSAN, A. RUSSO, A. EIDSATH, P. SMITH et A.H. GANDJBAKHCHÉ : Intensity profiles of linearly polarized light backscattered from skin and tissue-like phantoms. *Journal of Biomedical Optics*, 10(1):014012, 2005.
- [102] H.J. SWATLAND : *Structure and development of meat animals*. Prentice-Hall, 1984.
- [103] H.J. SWATLAND : Fiber-optic reflectance and autofluorescence of bovine elastin and differences between intramuscular and extramuscular tendon. *Journal of Animal Science*, 64:1038–1043, 1987.
- [104] H.J. SWATLAND : Measurement of the gristle content in beef by macroscopic ultra-violet fluorometry. *Journal of Animal Science*, 65:158–164, 1987.
- [105] H.J. SWATLAND : Correlations of mature beef palatability with optical probing of raw meat. *Food Research International*, 28:403–416, 1995.
- [106] H.J. SWATLAND : *Post-mortem* changes in pork using parallel needles for both light scattering and low-frequency electrical properties. *Food Research International*, 30(3/4):293–298, 1997.
- [107] H.J. SWATLAND : Near-infrared birefringence and transmittance of pork in relation to pH, sarcomere length, cold-shortening, and causes of paleness. *Food Research International*, 28(2):153–159, 1997.
- [108] H.J. SWATLAND : Relationship between the back-scatter of polarised light and the fiber-optic detection of connective tissue fluorescence in beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75:45–49, 1997.

- [109] H.J. SWATLAND : Connective and adipose tissue detection by simultaneous fluorescence and reflectance measurements with an on-line probe. *Food Research International*, 33:749–757, 2000.
- [110] H.J. SWATLAND : Growth and structure of meat animals. Site internet <http://www.aps.uoguelph.ca/swatland/gasman.html>, Consulté en juillet 2007.
- [111] H.J. SWATLAND et S. BARBUT : Optical prediction of processing characteristics of turkey meat uv fluorescence and nir birefringence. *Food Research International*, 28:227–232, 1995.
- [112] H.J. SWATLAND, J.C. BROOKS et M.F. MILLER : Possibilities of predicting taste and tenderness of broiled beef steaks using an optical-electromechanical probe. *Meat Science*, 50:1–12, 1998.
- [113] H.J. SWATLAND, E. GULLETT, T. HORE et S. BUTTENHAM : Uv fiber-optic probe measurements of connective tissue in beef correlated with taste panel scores for chewiness. *Food Research International*, 28:23–30, 1995.
- [114] H.J. SWATLAND, N.T. MADSEN et T. NIELSEN : Fluorometry of connective tissue in beef, relative to direction of measurement. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, pages 536–541, 1996.
- [115] H.J. SWATLAND, B. UTTARO, N. BUDDIGER et J. MOHR : Spectrophotometry of polarised light transmitted through and reflected from slices of turkey breast meat in relation to ph and fluid losses. *Food Research International*, 34:117–121, 2001.
- [116] F.W.J. TEALE : Fluorescence depolarization by light-scattering in turbid solutions. *Photochemistry and Photobiology*, 10:363–374, 1969.
- [117] B. TREMLOVA, P. SARHA, M. POSPIECH, H. BUCHTOVA et Z. RANDULOVA : Histological analysis of different kind of mechanically recovered meat. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 57(5/6):85–91, 2006.
- [118] B. VALEUR : *Molecular fluorescence, principles and applications*. Wiley-VCH, 2002.
- [119] B. VALEUR : *Invitation à la fluorescence moléculaire*. Editions De Boeck Université, 2004.
- [120] B. VALEUR et G. WEBER : Resolution of the fluorescence excitation spectrum of

- indole into the 1L_a and 1L_b excitation bands. *Photochemistry and Photobiology*, 25:441–444, 1977.
- [121] U.A. Van der HEIDE, B. ORBONS, H.C. GERRITSEN et Y.K. LEVINE : The orientation of transition moments of dye molecules used in fluorescence studies of muscle systems. *European Biophysics Journal*, 21:263–272, 1992.
- [122] S. VENTADOUR : *Identification des substrats musculaires du protéasome 26S*. Thèse de doctorat, Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université d'Auvergne, 2006.
- [123] P. VIGNERON, F. BACOU, J. NOUGUES et L. LEFAUCHEUR : Croissance et développement des fibres musculaires, facteurs de variation. *Viandes et Produits Carnés*, 1983.
- [124] G. WEBER : Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. theory and experimental method. *The Biochemical Journal*, 51(2):145–155, 1952.
- [125] G. WEBER : Polarization of the fluorescence of macromolecules. 2. fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *The Biochemical Journal*, 51(2):155–167, 1952.
- [126] G. WEBER : Rotational brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions. *Advances in Protein Chemistry*, 8:415–459, 1953.
- [127] G. WEBER : Photoelectric method for the measurement of the polarization of the fluorescence of solutions. *Journal of the Optical Society of America*, 46(11):962–970, 1956.
- [128] R.M. WILLIAMS, W.R. ZIPFEL et W.W. WEBB : Interpreting second-harmonic generation images of collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 88:1377–1386, 2005.
- [129] J.P. WOLD : *Rapid quality assessment of meat and fish by using near-infrared spectroscopy, autofluorescence spectroscopy and image analysis*. Thèse de doctorat, Agricultural University of Norway, 2000.
- [130] J.P. WOLD, F. LUNDBY et B. EGELANDSDAL : Quantification of connective tissue (hydroxyproline) in ground beef by autofluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64:377–383, 1999.

- [131] J.P. WOLD et M. MIELNIK : Nondestructive assessment of lipid oxidation in minced poultry meat by autofluorescence spectroscopy. *Food Chemistry and Toxicology*, 65:87–95, 2000.
- [132] J.P. WOLD, M. MIELNIK, M.K. PETTERSEN et P. BAARDSETH : Rapid assessment of rancidity in complex meat products by front face fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry and Toxicology*, 67:2397–2404, 2002.
- [133] Y. YAN et G. MARRIOTT : Fluorescence resonance energy transfer imaging microscopy and fluorescence polarization imaging microscopy. *Methods in Enzymology*, 360:561–580, 2003.
- [134] G. YAO, K.S. LIU et F. HSIEH : A new method for characterizing fiber formation in meat analogs during high-moisture extrusion. *Journal of Food Science E*, 69(7):303–307, 2004.
- [135] T. YASUI, Y. TOHNO et T. ARAKI : Characterization of collagen orientation in human dermis by two dimensional second-harmonic-generation polarimetry. *Journal of Biomedical Optics*, 9(2):259–264, 2004.
- [136] T. YASUI, Y. TOHNO et T. ARAKI : Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Applied Optics*, 43(14):2861–2867, 2004.

Liste des communications

Publications

C. LUC, S. CLERJON, F. PEYRIN et J. LEPETIT : Polarized front-face fluorescence for muscle structure evaluation. Soumis à *Measurement Science and Technology*, 2007.

C. LUC, S. CLERJON, F. PEYRIN, J. LEPETIT et J. CULIOLI : Monitoring *post mortem* sarcomere length changes in muscle using front-face fluorescence polarization. Prévu pour soumission à *Meat Science*, 2007.

Communications dans des congrès internationaux

C. LUC, S. CLERJON, F. PEYRIN et J. LEPETIT : Changes in Fluorescence Anisotropy of Muscle Tissues with Processing. *13th World Congress of Food Science and Technology (IUFOST)*, septembre 2006. Poster.

C. LUC, S. CLERJON, J. LEPETIT et F. PEYRIN : Fluorescence Anisotropy Measurement Applied to Muscle Structure Characterization. *XIIth European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, septembre 2007. Poster.

Communications dans des workshops

C. LUC et S. CLERJON : Anisotropie de réflectance et de fluorescence de la viande : Application au suivi de maturation. *Workshop Atelier de Fluorescence* organisé par l'Institut Supérieur d'Agriculture de Beauvais (ISAB), mai 2006. Exposé oral.

C. LUC, S. CLERJON et F. PEYRIN : Méthode de mesure de l'anisotropie de fluorescence des tissus animaux structurés : Application à la viande. *Journées de la Mesure et de la Métrologie INRA (J2M)*, octobre 2006. Exposé oral.

C. LUC, S. CLERJON, F. PEYRIN, J. LEPETIT et J. CULIOLI : Anisotropie de fluorescence appliquée au suivi de la dénaturation du tissu conjonctif avec le chauffage. *Workshop Atelier de Fluorescence* organisé par l'Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles (ENITA) de Clermont-Fd, octobre 2007. Exposé oral.

Annexes

Annexe A

Pourquoi l'intensité totale de fluorescence est égale à $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$?

Considérons un ensemble de i fluorophores. Puisqu'il n'existe aucune relation de phase entre les lumières émises par ces différentes molécules, la fluorescence totale peut être considérée comme résultant de trois sources de lumières indépendantes émettant selon les trois axes des coordonnées Ox , Oy et Oz , l'échantillon fluorescent étant placé en O ([118]). Si on note I_x , I_y et I_z les intensités de fluorescence respectives de ces trois sources, l'intensité totale est :

$$I_{totale} = I_x + I_y + I_z \quad (47)$$

Les valeurs des composantes de l'intensité de fluorescence dépendent entre autres de la polarisation de la lumière incidente. Quand la lumière incidente est polarisée verticalement, l'axe vertical Oz est un axe de symétrie de l'émission de fluorescence, d'après le principe de Curie, ce qui entraîne $I_x = I_y$. De plus, si on note I_{\parallel} et I_{\perp} , les composantes de l'intensité de fluorescence qui sont respectivement parallèle et perpendiculaire au vecteur champ électrique du faisceau incident, alors on a $I_z = I_{\parallel}$ et $I_x = I_y = I_{\perp}$ ([118]). L'équation 47 s'écrit alors :

$$I_{totale} = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (48)$$

Annexe B

Cas des moments de transition d'absorption et d'émission non parallèles

L'équation 9, page 22 de l'étude bibliographique donne l'expression de l'anisotropie de fluorescence fondamentale quand les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles. Considérons le cas où l'angle β entre les moments de transition d'absorption et d'émission n'est pas nul. Si on note θ_A et θ_E respectivement les orientations des moments de transition d'absorption et d'émission de la molécule par rapport à l'axe Oz du système, on peut alors ré-écrire l'équation 9 :

$$r_0 = \frac{3\langle \cos^2 \theta_E \rangle - 1}{2} \quad (49)$$

Or, d'après les formules classiques de trigonométrie sphérique, $\cos \theta_E$ peut s'écrire :

$$\cos \theta_E = \cos \theta_A \cos \beta + \cos \Theta \sin \theta_A \sin \beta \quad (50)$$

où Θ représente l'angle entre les plans (Oz, M_A) et (Oz, M_E) comme représenté sur la figure suivante ([118]).

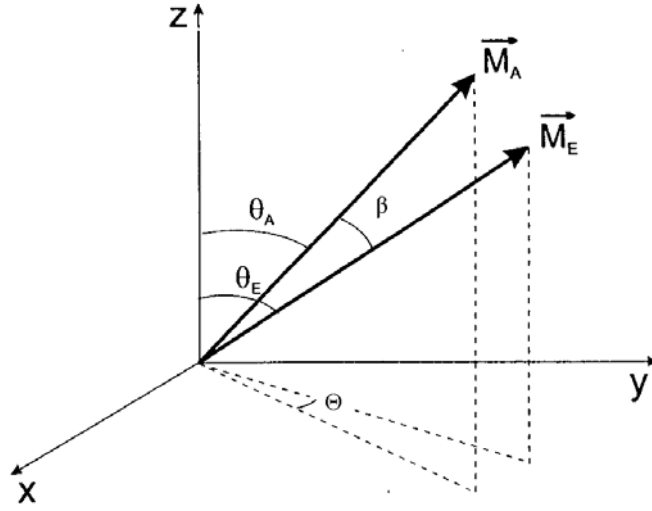


FIG. B. 1 : Définition de l'angle Θ (d'après [118])

Prenant en compte que toutes les valeurs de Θ sont équiprobables ($\langle \cos \Theta \rangle = 0$, $\langle \cos^2 \Theta \rangle = 1/2$), on obtient ([118]) :

$$\begin{aligned}
 \langle \cos^2 \theta_E \rangle &= \langle \cos^2 \theta_A \rangle \langle \cos^2 \beta \rangle + \frac{1}{2} \langle \sin^2 \theta_A \rangle \langle \sin^2 \beta \rangle \\
 &= \langle \cos^2 \theta_A \rangle \langle \cos^2 \beta \rangle + \frac{1}{2} (1 - \langle \cos^2 \theta_A \rangle) (1 - \langle \cos^2 \beta \rangle) \\
 &= \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_A \rangle \langle \cos^2 \beta \rangle - \frac{1}{2} \langle \cos^2 \theta_A \rangle - \frac{1}{2} \langle \cos^2 \beta \rangle + \frac{1}{2}
 \end{aligned} \tag{51}$$

D'où

$$r_0 = \frac{3 \langle \cos^2 \theta_E \rangle - 1}{2} = \frac{3 \langle \cos^2 \theta_A \rangle - 1}{2} \times \frac{3 \langle \cos^2 \beta \rangle - 1}{2} \tag{52}$$

Sachant que $\langle \cos^2 \theta_A \rangle = 3/5$ puisque par hypothèse l'orientation est aléatoire, on a finalement ([118]) :


$$r_0 = \frac{2}{5} \frac{3 \langle \cos^2 \beta \rangle - 1}{2} \tag{53}$$

Annexe C

Modes opératoires de mesure avec le spectrofluorimètre

Trois modes opératoires de mesure avec le spectrofluorimètre ont été écrits d'après le référentiel qualité de l'INRA :

- Le mode opératoire référencé MO-BIOP-MET-4 indique comment utiliser le logiciel commandant le spectrofluorimètre SLM 8000C afin d'acquérir des données et de les transférer.
- Le mode opératoire référencé MO-BIOP-MET-5 indique comment vérifier, et si besoin corriger, le calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C.
- Le mode opératoire référencé MO-BIOP-MET-3 indique comment effectuer, à l'aide du spectrofluorimètre SLM 8000C, une mesure d'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique structuré pour différents angles entre l'axe principal du tissu et la direction de la polarisation.



 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 1/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

Sommaire

	Page
1	1
2	2
3	2
4	2
5	2
6	2
7	2
8	2
9	3
9.1	4
9.2	5
9.2.1	5
9.2.2	6
9.2.3	7
9.3	8
9.4	8

1 Objet et domaine d'application

Ce document indique comment utiliser le logiciel commandant le spectrofluorimètre SLM 8000C afin d'acquérir des données et de les récupérer.

Liste de diffusion des copies	équipe BIOP		
Nombre de copies	1		
Date de diffusion des copies	04/10/07	Date de retrait des copies	
L'original est intégré au système documentaire Qualité et conservé par l'animateur Qualité. Avant d'utiliser ce document, vérifiez qu'il s'agit bien de la dernière version.			
	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Claire Luc	Sylvie Clerjon	Frédéric Peyrin
Fonction :			Animateur Qualité
Visa :			

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 2/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

2 Documents de référence

Documents de référence :

- Rapport intitulé « Spectrofluorimètre SLM 8000C : Fonctionnement, macros pour le spectrofluorimètre », Stéphanie Chauvet, mai 2004.
- Classeur bleu de documentation du spectrofluorimètre.

Documents associés :

- E-BIOP-DOC-CAT-9 : Cahier de laboratoire du spectrofluorimètre.

3 Niveau de confidentialité

Aucun	Restreinte à l'unité	Restreinte à l'équipe
-------	----------------------	-----------------------

4 Prévention

Néant.

5 Principe de la méthode

Utilisation de différents menus du logiciel dans le but d'acquérir et de transférer des données.

6 Matériels nécessaires

- Spectrofluorimètre ;
- Disquette

7 Réactifs

Néant.

8 Contraintes de la méthode

Néant.

 Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 3/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9 Contenu du Mode Opératoire

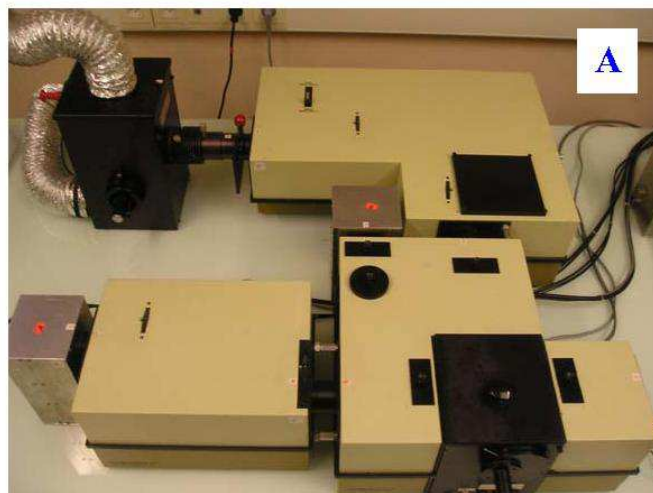


Figure 1 : Vue globale du spectrofluorimètre SLM 8000C
Photo A : Module optique avec chambre de mesure, monochromateurs et détecteurs
Photo B : Lampe au Xénon et son alimentation
Photo C : Modules de commande et Pc

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 4/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.1 Mise en route du spectrofluorimètre

Mettre en route la climatisation de la pièce ($T=18^{\circ}\text{C}$).

Allumer la lampe au Xenon : basculer l'interrupteur pour la mise en route du ventilateur, vérifier la mise en route de la ventilation puis allumer la lampe en appuyant sur le bouton poussoir quelques secondes (il peut y avoir plusieurs « clacs » avant l'allumage)

Allumer le PC et les deux modules de commande du spectrofluorimètre. Taper sous DOS la commande 8000 puis ENTER pour lancer le programme de commande. Lancer les 2 procédures d'initialisation en appuyant sur <SPACE>. Le menu présenté par la Figure 2 s'affiche.



Figure 2 : Ecran du menu principal¹

Laisser préchauffer la lampe environ 30 minutes.

¹ Dans tous les menus, pour valider taper sur ENTER et pour revenir à la page précédente taper sur ECHAP.

	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 5/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.2 Acquisition de données avec le spectrofluorimètre

A partir de l'écran de menu principal (Figure 2), aller dans le menu DATA ACQUISITION MENU.

9.2.1 Réglages de l'instrument avant une acquisition

Aller dans EMISSION WAVELENGTH ACQUISITION. L'écran de réglage (cf. Figure 3) apparaît.

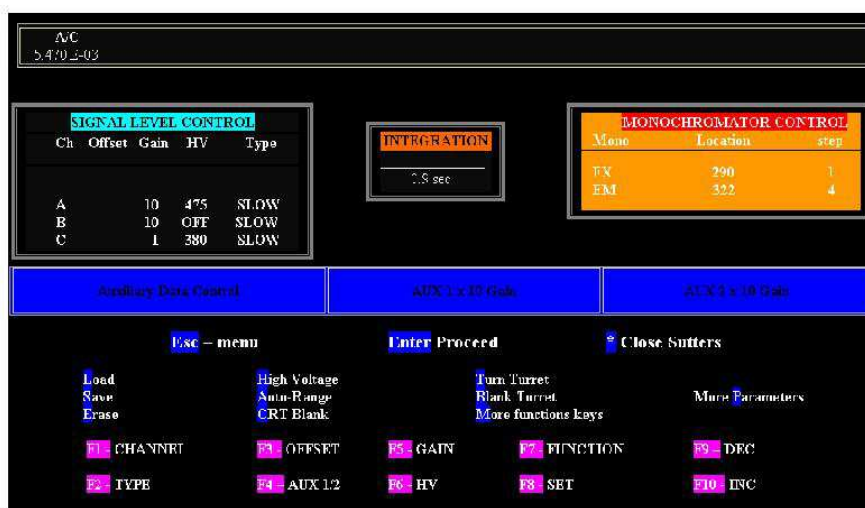


Figure 3 : Ecran de contrôle pour le réglage de l'instrument

Différents paramètres peuvent être réglés :

- Les fonctions mesurées durant l'acquisition : A est le canal de mesure de l'émission, C est le canal de référence. Appuyer sur **F7** pour FUNCTION puis saisir les fonctions souhaitées : par exemple taper **A/C** et **ENTER** puis **A** et **ENTER** et valider avec **ENTER**.
- L'alimentation des détecteurs (A et C) :
 - La haute tension HV : taper **F6** pour HV puis **F8** pour SET et la valeur souhaitée ;
 - Le gain G : appuyer sur **F5** pour GAIN plusieurs fois pour choisir 1, 10 ou 100 ;
 - Appuyer sur **F1** pour CHANNEL pour changer de détecteur.
- La longueur d'onde des 2 monochromateurs : en tapant **M** pour MORE FUNCTION KEYS². On a alors accès à la fenêtre nommée MONOCHROMATOR CONTROL. Pour le monochromateur d'excitation / d'émission, taper respectivement **F1** pour EXC. LOC.³ / **F2** pour EM. LOC.⁴ puis **F8** pour SET et la valeur souhaitée.

² pour avoir de nouveau accès aux premiers paramètres, taper à nouveau sur **M**

³ EXC. LOC. = Excitation location

⁴ EM. LOC. = Emission location

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 6/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

On peut avoir accès à d'autres paramètres en tapant **P** pour MORE PARAMETERS : un nouvel écran s'affiche alors (pour revenir à l'écran précédent taper à nouveau sur **P**).

- La position des polariseurs : pour le polariseur d'excitation / d'émission, taper respectivement **F1** pour EXC. P.⁵ / **F2** pour EM. LFT. P.⁶ puis **F8** pour SET et la valeur souhaitée. La valeur de 0° correspond à la position verticale de l'axe des polariseurs et 90° à la position horizontale
- L'ouverture des shutters : pour éventuellement laisser ouvert seul le shutter de l'émission (canal A), si les shutters sont fermés taper « * » pour les ouvrir, puis taper **F5** pour sélectionner le shutter de l'émission, puis + et *.
- L'angle azimutal de l'échantillon : taper **F3**⁷ puis **F8** pour SET et la valeur souhaitée. **Attention, l'angle réglé ici est relatif et un déplacement de 0,1° correspond à une rotation réelle du porte échantillon de 0,9°.**

9.2.2 Acquisition manuelle d'un spectre de fluorescence

Après avoir réglé l'instrument, définir les paramètres de l'acquisition grâce à l'écran présenté sur la Figure 4.

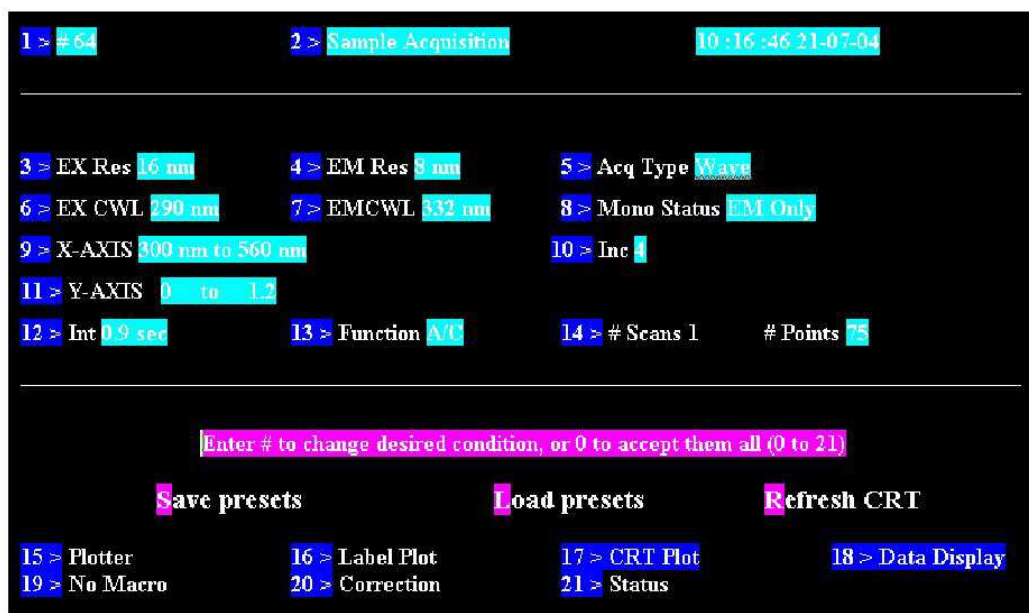


Figure 4 : Ecran de contrôle pour le réglage des paramètres d'acquisition d'un spectre d'émission

⁵ EXC. P. = Excitation polariser

⁶ EM. LFT. P. = Emission left polariser

⁷ La fonction F3 correspondait initialement à EM. RT. P. (Excitation right polariser), mais a été modifiée et permet maintenant la commande du moteur du porte échantillon rotatif.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 7/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

Plusieurs types d'acquisition sont possibles. Pour choisir le type d'acquisition, taper **5** puis **ENTER** et :

- pour un spectre d'excitation, taper **1** pour EX SCAN puis **ENTER**,
- pour un spectre d'émission, taper **2** pour EM SCAN puis **ENTER**,
- pour un spectre en balayage synchrone, taper **7** pour SYNCHRONOUS SCAN puis **ENTER**.

Régler ensuite les différents paramètres d'acquisition du spectre :

- La longueur d'onde d'excitation ou d'émission en tapant respectivement **6** ou **7** puis **ENTER** puis la longueur d'onde souhaitée.
- L'intervalle de balayage en longueur d'onde pour l'excitation, l'émission ou les deux en tapant **9** puis **ENTER** puis les longueurs d'onde minimale et maximale souhaitées.
- Le pas du balayage en longueur d'onde en tapant **10** puis **ENTER** puis le pas souhaité.
- L'échelle de l'axe des ordonnées (intensité) en tapant **11** puis **ENTER**. Si l'échelle n'est pas connue, entrer deux fois la valeur de **0** pour demander un Prescan.

Avant de lancer l'acquisition, relever le numéro du fichier de données qui va être associé au spectre en haut à gauche de l'écran (paramètre 1>). Pour modifier ce numéro de fichier, taper **1** puis **ENTER** puis le numéro souhaité (entrer **0** comme numéro pour rechercher automatiquement le prochain fichier vide).

Remarque : si il y a plusieurs fonctions mesurées durant l'acquisition (par exemple A/C et A), deux fichiers de données seront créés

Lancer l'acquisition du spectre tapant **ENTER**.

Une fois l'acquisition terminée, pour relever la longueur d'onde maximale du pic : taper **Z** pour ZOOM puis **ENTER**, déplacer le curseur sur le spectre et taper **P** pour PIC pour obtenir la longueur d'onde correspondante.

9.2.3 Acquisition automatique de données en utilisant une macro

Après avoir réglé l'instrument, revenir au sommaire du menu DATA ACQUISITION MENU en tapant sur **ECHAP**. Choisir le menu MACRO-COMMAND DRIVEN ACQUISITION.

Entrer le nom de la macro d'acquisition souhaitée puis **ENTER**.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-4 Version 1 du 21/06/06 page 8/8
	Utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.3 Transfert des données acquises avec le spectrofluorimètre

A partir de l'écran de menu principal (Figure 2), aller dans le menu UTILITIES MENU.

Choisir TRANSFER DATA TO NEW LOCATION pour transférer les fichiers de mesure sur la disquette (à insérer !).


Répondre aux questions posées :

- « Enter path to desired files » : taper **A** : pour désigner la disquette,
- « Enter extension to desired files » : taper **TXT** pour le format texte,
- « Do you want to read from DOS text files (Y/N) ? » : taper **N**,
- « Do you want to write X-axis values to the DOS text files (Y/N) ? » : taper **Y**,
- « Enter first/last record to convert » : entrer les numéros du 1er et dernier fichier de données à transférer,
- « Press <space> to continue » : valider en appuyant sur la barre espace.

Attendre que le transfert se fasse et retirer la disquette.

9.4 Arrêt du spectrofluorimètre et rangement

Pour éteindre le spectrofluorimètre, aller dans EXIT PROGRAM, éteindre ensuite les deux modules de commande, puis le PC et enfin la lampe.
Eteindre la climatisation.

 Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 1/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	


Sommaire

	Page
1	Objet et domaine d'application 2
2	Documents de référence 2
3	Niveau de confidentialité 2
4	Prévention..... 2
5	Principe de la méthode 2
6	Matériels nécessaires..... 2
7	Réactifs..... 2
8	Contraintes de la méthode..... 2
9	Contenu du Mode Opératoire..... 3
9.1	Début et fin du calibrage 5
9.1.1	Mise en route du spectrofluorimètre 5
9.1.2	Arrêt du spectrofluorimètre et prise en compte des nouveaux coefficients de calibration..... 5
9.2	Calibrage du monochromateur d'émission 6
9.2.1	Installation de l'échantillon et de la lampe Xcite..... 6
9.2.2	Réglage de l'instrument 6
9.2.3	Acquisition et lecture du spectre d'émission de la lampe de référence..... 6
9.2.4	Retrait de la lampe Xcite..... 6
9.3	Calibrage du monochromateur d'excitation..... 7
9.3.1	Réglage de l'instrument 7
9.3.2	Acquisition et lecture du spectre d'émission de la lampe de référence..... 7
9.4	Modification du coefficient de calibration d'un monochromateur : 8
9.4.1	Cas du monochromateur d'émission 8
9.4.2	Cas du monochromateur d'excitation 8

Liste de diffusion des copies	équipe BIOP		
Nombre de copies			
Date de diffusion des copies		Date de retrait des copies	

L'original est intégré au système documentaire Qualité et conservé par l'animateur Qualité.
 Avant d'utiliser ce document, vérifiez qu'il s'agit bien de la dernière version.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Claire Luc	Sylvie Clerjon	Frédéric Peyrin
Fonction :			Animateur Qualité
Visa :			

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 2/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

1 Objet et domaine d'application

Ce document indique comment vérifier, et si besoin corriger, le calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C.

2 Documents de référence

Document de référence :

- Classeur bleu de documentation du spectrofluorimètre.
- Fiche « Conditions d'acquisition des spectres de calibrage des monochromateurs ».
- Fiche « Suivi du calibrage des monochromateurs ».

Documents associés :

- E-BIOP-DOC-CAT-9 : Cahier de laboratoire du spectrofluorimètre.
- MO-BIOP-MET4 : Mode Opérateur d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000 C.

3 Niveau de confidentialité

Aucun	Restreinte à l'unité	Restreinte à l'équipe
-------	----------------------	-----------------------

4 Prévention

La source de lumière Xcite émet un rayonnement intense pouvant provoquer des lésions graves de yeux et de la peau. Il faut donc réaliser les branchements de la fibre optique de la lampe avant la mise sous tension et :

- ne jamais regarder dans l'axe du faisceau,
- porter des lunettes anti-UV,
- porter de gants anti-UV.

S'assurer de la présence du matériel de prévention avant de commencer toute manipulation

5 Principe de la méthode

Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre par rapport à une référence absolue émettant le spectre de raies du mercure (lampe Xcite).

6 Matériels nécessaires


- Spectrofluorimètre,
- Lampe Xcite 120,
- Cuve en quartz,
- Porte cuve,
- Matériels de prévention (cf. § 4).

7 Réactifs

Solution de glycogène à 500 ppm (Glycogen from rabbit liver, type III, Sigma Aldrich) ou de silice colloïdale (Ludox, Sigma Aldrich).

8 Contraintes de la méthode

Prendre des précautions pour l'utilisation de la lampe Xcite : la laisser allumée au moins 15 minutes et après extinction, attendre 30 minutes avant de la rallumer.

 Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 3/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9 Contenu du Mode Opératoire

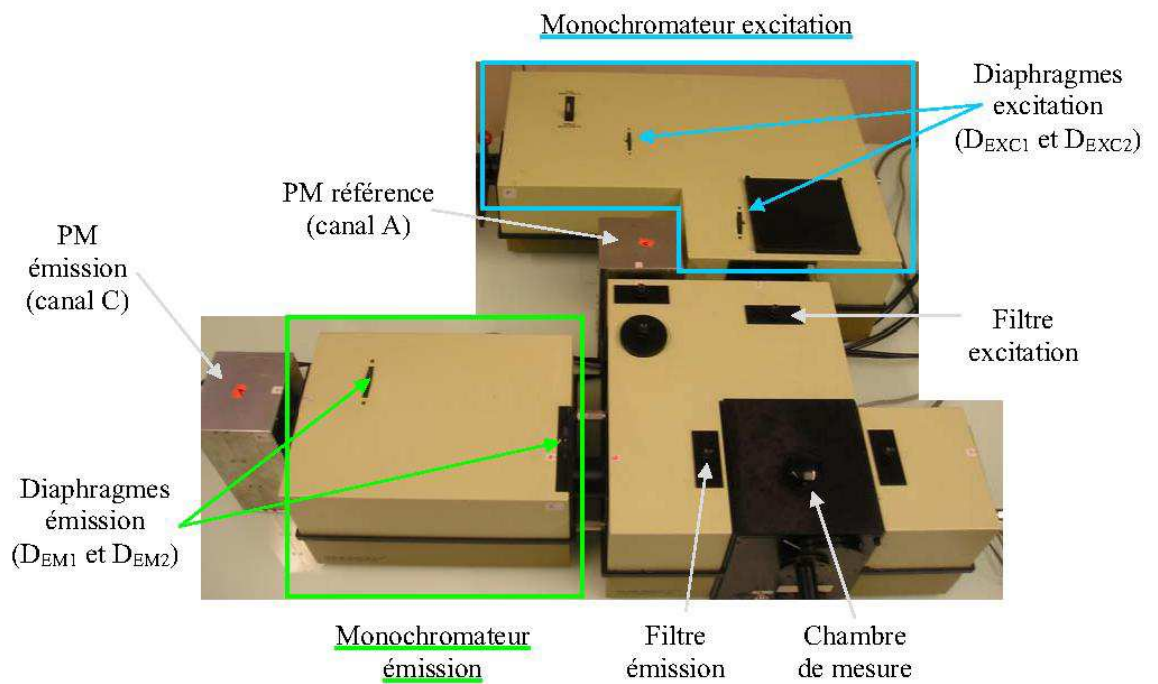

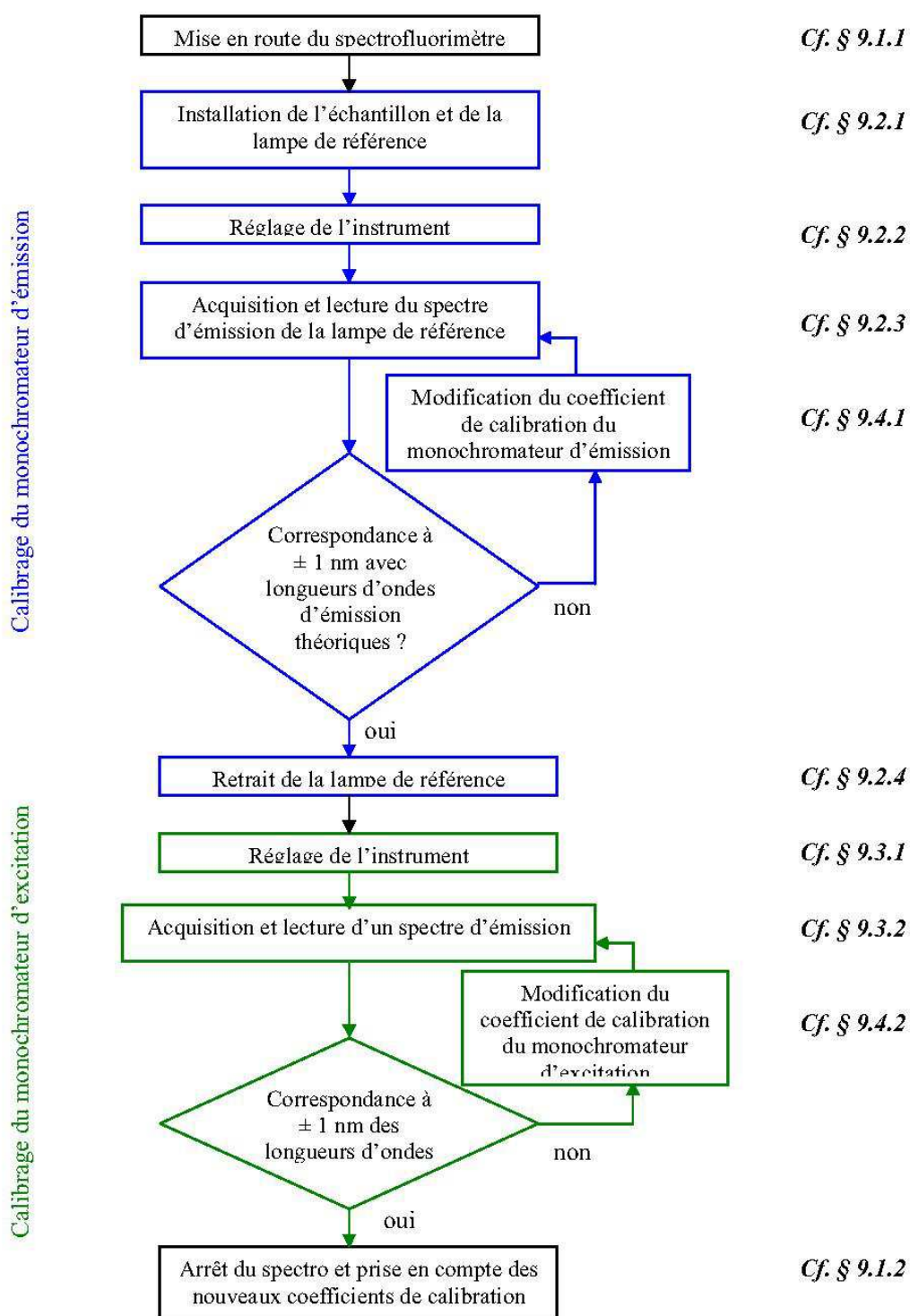



Figure 1 : Identification des différents composants du module optique et des monochromateurs

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 4/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	



 Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 5/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.1 Début et fin du calibrage

9.1.1 Mise en route du spectrofluorimètre


Pour mettre en route le spectrofluorimètre suivre les instructions du §9.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4).

9.1.2 Arrêt du spectrofluorimètre et prise en compte des nouveaux coefficients de calibration

Eteindre le spectrofluorimètre selon les instructions du §9.4 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP-MET4).

Remplir la fiche de « suivi du calibrage des monochromateurs ».

Ranger le matériel et les réactifs utilisés, nettoyer la cuve.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 6/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.2 Calibrage du monochromateur d'émission

9.2.1 Installation de l'échantillon et de la lampe Xcite

Insérer le porte-cuve dans la chambre de mesure de façon à ce qu'il soit bien aligné avec l'axe de l'excitation et l'axe de l'émission. Placer la cuve en quartz à l'intérieur, remplie par une solution de glycogène ou de silice colloïdale.

Tout en respectant les précautions indiquées §4 : insérer soigneusement la fibre optique de la lampe de référence Xcite dans la porte de la chambre de mesure prévue à cet effet. Une fois l'installation effectuée, fermer le couvercle de la chambre de mesure, ouvrir le shutter de la porte de la chambre de mesure et allumer la lampe de référence Xcite.

9.2.2 Réglage de l'instrument


Régler l'instrument avec les valeurs indiquées sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de calibrage des monochromateurs » (affichée au mur) à l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4)

9.2.3 Acquisition et lecture du spectre d'émission de la lampe de référence

Avec l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4) : régler les paramètres d'acquisition du spectre avec les valeurs indiquées sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de calibrage des monochromateurs » (affichée au mur) et acquérir ensuite le spectre d'émission de la lampe de référence. Une fois l'acquisition terminée, relever les longueurs d'onde des pics obtenus expérimentalement.

9.2.4 Retrait de la lampe Xcite

Eteindre la lampe de référence Xcite, fermer le shutter de la porte de la chambre de mesure et retirer soigneusement la fibre optique.

 Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 7/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.3 Calibrage du monochromateur d'excitation

9.3.1 Réglage de l'instrument


Régler l'instrument avec les valeurs indiquées sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de calibrage des monochromateurs » (affichée au mur) à l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4)

9.3.2 Acquisition et lecture du spectre d'émission de la lampe de référence

Avec l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4) : régler les paramètres d'acquisition du spectre avec les valeurs indiquées sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de calibrage des monochromateurs » (affichée au mur) et acquérir ensuite le spectre d'émission. Une fois l'acquisition terminée, relever les longueurs d'onde du pic obtenu expérimentalement.

Les longueurs d'ondes théoriques des raies d'émission du mercure sont :

- 404,7 nm
- 435,8 nm
- 546,1 nm

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-5 Version 1 du 21/06/06 page 8/8
	Calibrage des monochromateurs du spectrofluorimètre SLM 8000C	

9.4 Modification du coefficient de calibration d'un monochromateur :

9.4.1 Cas du monochromateur d'émission

Pour choisir la nouvelle valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'émission, noté PC_{em} (pour Point de Calibration de l'émission):

- Calculer la différence moyenne entre les longueurs d'ondes des pics trouvés expérimentalement et les longueurs d'ondes théoriques d'émission de la lampe :

$$\Delta_{moy} = (\lambda_{em}^{exp} - \lambda_{em}^{th})_{moy}$$

- En déduire approximativement la nouvelle valeur du coefficient de calibration :

$$(PC_{em})_{nouveau} \approx (PC_{em})_{ancien} - \Delta$$

Modifier ensuite la valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'émission dans le logiciel de commande du spectrofluorimètre :

- Aller dans UTILITIES MENU à partir de l'écran du menu principal, puis dans DIRECT COMMAND CONTROL OF 8000C, puis dans ENTER COMMAND.
- Taper alors EMKIL pour effacer l'ancien coefficient, EMCAL pour calibrer le nouveau coefficient et enfin EMLDxxx.yy pour charger la nouvelle valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'émission à xxx.yy.

9.4.2 Cas du monochromateur d'excitation

Pour choisir la nouvelle valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'excitation, noté PC_{exc} (pour Point de Calibration de l'excitation):

- Calculer la différence moyenne entre la longueur d'onde du pic réfléchi trouvé sur le spectre d'émission et la longueur d'onde théorique choisie à l'excitation :


$$\Delta = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$$

- En déduire approximativement la nouvelle valeur du coefficient de calibration :

$$(PC_{exc})_{nouveau} \approx (PC_{exc})_{ancien} - \Delta$$

Modifier ensuite la valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'excitation dans le logiciel de commande du spectrofluorimètre :


- Aller dans UTILITIES MENU à partir de l'écran du menu principal, puis dans DIRECT COMMAND CONTROL OF 8000C, puis dans ENTER COMMAND.
- Taper alors EXKIL pour effacer l'ancien coefficient, EXCAL pour calibrer le nouveau coefficient et enfin EXLDxxx.yy pour charger la nouvelle valeur du coefficient de calibration du monochromateur d'excitation à xxx.yy.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 1/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

Sommaire

	Page
1 Objet et domaine d'application	2
2 Documents de référence	2
3 Niveau de confidentialité	2
4 Prévention.....	2
5 Principe de la méthode	2
6 Matériels nécessaires.....	2
7 Réactifs.....	2
8 Contraintes de la méthode	2
9 Contenu du Mode Opératoire.....	3
9.1 Mise en route du spectrofluorimètre	3
9.2 Préparation et mise en place de l'échantillon.....	4
9.3 Vérification de la longueur d'onde d'émission de fluorescence de l'échantillon	5
9.3.1 Réglages de l'instrument.....	5
9.3.2 Acquisition du spectre d'émission de fluorescence	5
9.4 Mesure de l'anisotropie de fluorescence de l'échantillon en faisant varier l'angle azimutal de l'échantillon sur 360°.....	5
9.5 Transfert et traitement des données.....	6
9.6 Arrêt du spectrofluorimètre et rangement	6

Liste de diffusion des copies	équipe BIOP		
Nombre de copies			
Date de diffusion des copies		Date de retrait des copies	
L'original est intégré au système documentaire Qualité et conservé par l'animateur Qualité. Avant d'utiliser ce document, vérifiez qu'il s'agit bien de la dernière version.			
	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Claire Luc	Sylvie Clerjon	Frédéric Peyrin
Fonction :			Animateur Qualité
Visa :			

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 2/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

1 Objet et domaine d'application

Ce document indique comment effectuer, à l'aide du spectrofluorimètre SLM 8000C, une mesure d'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique structuré pour différents angles entre l'axe principal du tissu et la polarisation.

2 Documents de référence

Document de référence :

- Classeur bleu de documentation du spectrofluorimètre.
- Fiche « Conditions d'acquisition des spectres de fluorescence ».

Documents associés :

- E-BIOP-DOC-CAT-9 : Cahier de laboratoire du spectrofluorimètre.
- MO-BIOP-MET4: Mode Opérateur d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000 C.

3 Niveau de confidentialité

Aucun	Restreinte à l'unité	Restreinte à l'équipe
-------	----------------------	-----------------------

4 Prévention

- Ne jamais regarder dans l'axe du faisceau.

5 Principe de la méthode

On détermine l'anisotropie de fluorescence d'un échantillon en éclairant celui-ci avec une lumière polarisée verticalement et en mesurant l'intensité de fluorescence des composantes verticale $I_{//}$ et horizontale I_{\perp} . L'anisotropie de fluorescence est caractérisée par la différence

entre ces deux composantes, rapportée à l'intensité totale de fluorescence : $r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$

6 Matériels nécessaires


- Spectrofluorimètre,
- Porte échantillon rotatif,
- Filtres optiques,
- Matériel de régulation de la température : Lauda et climatisation,
- Couteau et emporte-pièce,
- Disquette.

7 Réactifs

Néant.

8 Contraintes de la méthode

Prévoir un délai d'environ 1h15 pour exécuter ce mode opératoire.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 3/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

9 Contenu du Mode Opératoire

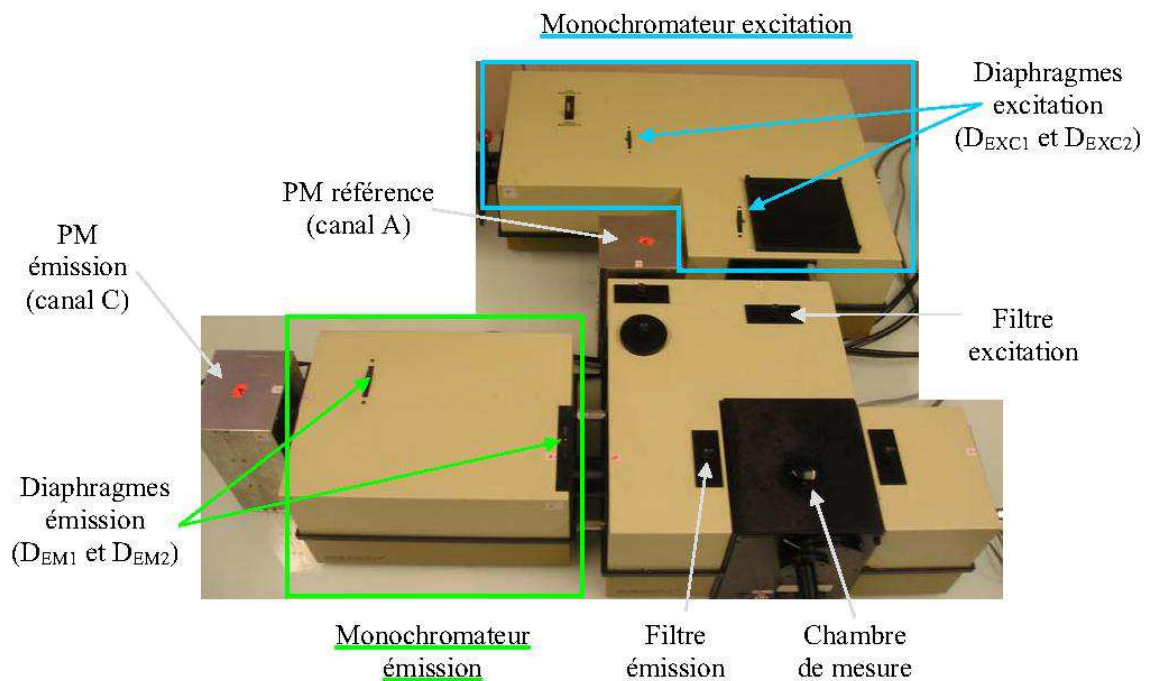



Figure 1 : Identification des différents composants du module optique et des monochromateurs

9.1 Mise en route du spectrofluorimètre

Cf. § 9.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre SLM 8000C. Mettre en route le Lauda, s'assurer qu'il n'y a pas de fuite dans le compartiment de mesure, et régler la température de refroidissement à 0°C.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 4/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

9.2 Préparation et mise en place de l'échantillon

Découper l'échantillon :

- Avec un couteau, couper une tranche de 3 à 4 mm d'épaisseur dans le plan parallèle aux fibres.
- Avec un emporte-pièce de 1 pouce de diamètre, couper un disque d'échantillon si possible dans une zone régulière et homogène.



Figure 2 : Pièces nécessaires à la mise en place de l'échantillon et dispositions

- A** : partie mobile du porte échantillon rotatif
B : partie statique du porte échantillon installée dans la chambre de mesure
C : porte de fermeture du compartiment de mesure avec tuyaux de circulation d'eau


Figure 2, photo A : Placer l'échantillon dans la partie mobile du porte échantillon rotatif en repérant si possible l'axe principal de l'échantillon (« placer cet axe en face des trous des vis »). Replacer et visser le couvercle avec la fenêtre en quartz. Placer l'ensemble dans la chambre froide à 5°C pendant 15 à 20 minutes.

Figure 2, photo B : Fixer la partie mobile du porte échantillon sur la partie statique orientant approximativement l'axe des fibres de l'échantillon verticalement (repérée grâce à la position des vis). La partie statique du porte échantillon doit être placée sur son socle dans le compartiment de mesure du spectrofluorimètre en butée et avec un angle de positionnement à 55° (graduations indiquées sur le socle). Le moteur doit être branché, ainsi que les tuyaux de circulation d'eau et la porte de fermeture du compartiment de mesure vissée (Figure 2, photo C).

Fermer avec le couvercle.

Enregistrer l'échantillon selon la procédure de gestion des échantillons.

Attendre environ 10 minutes que la température de l'échantillon se stabilise. Pendant ce temps, effectuer les réglages présentés dans la partie suivante.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 5/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

9.3 Vérification de la longueur d'onde d'émission de fluorescence de l'échantillon

9.3.1 Réglages de l'instrument

Régler l'instrument comme indiqué sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de fluorescence » (affichée au mur) à l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4)

9.3.2 Acquisition du spectre d'émission de fluorescence

Penser à relever le numéro des 2 fichiers de données qui vont être acquis.


Avec l'aide du §9.2.1 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre (ref : MO-BIOP- MET4) : régler les paramètres d'acquisition du spectre avec les valeurs indiquées sur la fiche « Conditions d'acquisition des spectres de fluorescence » (affichée au mur) et acquérir ensuite le spectre d'émission de l'échantillon.

Une fois l'acquisition terminée, relever la longueur d'onde maximale du pic et positionner, sur l'écran de réglage de l'instrument, le monochromateur d'émission à cette longueur d'onde.

9.4 Mesure de l'anisotropie de fluorescence de l'échantillon en faisant varier l'angle azimutal de l'échantillon sur 360°

Exécuter la macro d'acquisition nommée « TOURNE » avec pour pas de l'angle azimutal 3,6° (Cf. § 9.2.3 de la mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre). La durée d'acquisition est de 25 minutes.

Penser à relever le numéro des 3 fichiers de données qui vont être acquis (numéros suivants celui du dernier spectre d'émission).

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode opératoire	MO-BIOP-MET-3 Version 1 du 24/09/07 page 6/6
	Mesure de l'anisotropie de fluorescence d'un tissu biologique	

9.5 Transfert et traitement des données

Copier les fichiers de données acquis sur une disquette (cf. § 9.3 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre 8000C).

Et les transférer dans le répertoire Data Matlab du « Pc de Claire ».

Démarrer ensuite l'application Matlab et appeler le programme de traitement des données en tapant « aniso ». A la question, « Quel est le numéro du fichier de données brutes: », taper le numéro du 1^{er} fichier (*#deb*) de données acquis en 9.4.

Le programme génère alors deux fichiers : *data#debto#fin.txt* regroupant les données brutes et *aniso#debto#fin.txt* regroupant les données traitées et la valeur de l'anisotropie.

Démarrer finalement l'application Microsoft Excel et appeler les deux macros de mise en forme des données traitées en cliquant sur les boutons :

- ☺ : puis sélectionner le fichier *data#debto#fin.txt*. La macro génère alors un fichier dont le nom est par défaut *data#debto#fin.xls*.
- ☹ : puis sélectionner le fichier *aniso#debto#fin.txt*. La macro génère alors un fichier dont le nom est par défaut *aniso#debto#fin.xls*.

Enregistrer les fichiers de données.

9.6 Arrêt du spectrofluorimètre et rangement

Procéder à l'arrêt de l'installation (Cf. § 9.4 du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre 8000C).

Arrêter la circulation d'eau et débrancher les tuyaux.

Désinstaller le porte échantillon et retirer l'échantillon.

Mettre l'échantillon dans un sachet sous-vide : le conserver dans la chambre froide si besoin, après l'avoir numéroté ou sinon le jeter dans le bac prévu à cet effet dans la chambre froide.

Nettoyer le porte échantillon et le quartz avec de l'eau et un morceau de papier jetable.

Annexe D

Conditions d'acquisition du spectrofluorimètre

Les conditions d'acquisition du spectrofluorimètre sont réglées à l'aide du mode opératoire d'utilisation du logiciel du spectrofluorimètre donné dans l'annexe C.

Les entrées sont les suivantes :

Type d'échantillon	Fibres musculaires	Tissus conjonctifs
Réglage des diaphragmes		
<i>EX1</i>		16
<i>EX2</i>		8
<i>EM1</i>		4
<i>EM2</i>		4
Filtres optiques		
<i>Excitation</i>	03FIM022	03FIU014
<i>Emission</i>	59458	59482
Réglages de l'instrument		
<i>Fonctions mesurées</i>	A/C et A	
<i>HVA</i>	Ajuster pour avoir $10^4 < A < 10^5$	
<i>Gain A</i>	10	
<i>HVC</i>	250 V	
<i>Gain C</i>	1	
<i>Location EX</i>	290 nm	380 nm
<i>Location EM</i>	335 nm	450 nm
<i>Step EX</i>	1 nm	
<i>Step EM</i>	1 nm	
<i>Integration</i>	0,9 s	
<i>EXC. P.</i>	0 °	
<i>EM. LFT. P.</i>	0 °	
<i>EM. RIGHT. P.</i>	0 °	
Conditions du spectre		
<i>Type</i>	Emission	
<i>EXC CWL</i>	290 nm	380 nm
<i>X-AXIS</i>	320 nm à 370 nm	430 nm à 480 nm
<i>INC</i>	1 nm	
<i>Y-AXIS</i>	Prescan	

Annexe E

Mode opératoire de mesure avec le microscope

Un mode opératoire de mesure avec le microscope a été écrit d'après le référentiel qualité de l'INRA. Il s'agit du mode opératoire référencé MO-BIOP-MET-6 qui indique comment mesurer, à l'échelle microscopique, l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques.

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode Opérateur	MO-BIOP-MET-6 Version 1 du 10/09/2007 page 1/5
	Mesure au microscope NIKON de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques	

Sommaire

	Page
1 Objet et domaine d'application	1
2 Niveau de confidentialité	1
3 Documents de référence et documents associés.....	1
3.1 Documents de référence	1
3.2 Documents associés.....	1
4 Prévention.....	2
4.1 Risques	2
4.2 Précautions	2
5 Principe de la méthode	2
6 Matériels nécessaires.....	2
7 Réactifs.....	2
8 Contraintes de la méthode	2
9 Contenu du Mode Opérateur.....	3
9.1.....	3
9.1.1.....	5

1 Objet et domaine d'application

Mesure à l'échelle microscopique de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques.
 Application à la caractérisation des fibres biologiques (ex. collagène)

2 Niveau de confidentialité

Aucun	Restreinte à l'unité	Restreinte à l'équipe
--------------	-----------------------------	------------------------------

3 Documents de référence et documents associés

3.1 Documents de référence

- Documentation NIKON pour le microscope Eclipse 50i POL

3.2 Documents associés

-

Liste de diffusion des copies	équipe BIOP		
Nombre de copies	1		
Date de diffusion des copies		Date de retrait des copies	

L'original est intégré au système documentaire Qualité et conservé par l'animateur Qualité.
 Avant d'utiliser ce document, vérifiez qu'il s'agit bien de la dernière version.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Claire Luc	Sylvie Clerjon	Frédéric Peyrin
Fonction :	Frédéric Peyrin		Animateur Qualité
Visa :			

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode Opérateur	MO-BIOP-MET-6 Version 1 du 10/09/2007 page 2/5
	Mesure au microscope NIKON de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques	

4 Prévention

4.1 Risques

- Source lumineuse intense dans la bande UV : lampe X-Cite120

4.2 Précautions

- Port de lunette anti-UV en cas d'utilisation de la lampe X-Cite120

5 Principe de la méthode

Des fibres biologiques sont placées entre lames et lamelles pour observation microscopique de leurs propriétés d'anisotropie de fluorescence. Pour cela, on mesure l'intensité de fluorescence entre polariseur et analyseur, parallèles puis croisés afin de calculer l'anisotropie. Cette opération est effectuée pour plusieurs positions angulaires de l'échantillon.

6 Matériels nécessaires

- Microscope (Cube UV-2B, ...)
- Source Xcite
- Caméra DXM1200C
- Logiciel ACT-1C
- Logiciel Matlab + scripts [à préciser]

7 Réactifs

- néant

8 Contraintes de la méthode

Néant

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode Opérateur	MO-BIOP-MET-6 Version 1 du 10/09/2007 page 3/5
	Mesure au microscope NIKON de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques	

9 Contenu du Mode Opérateur

9.1 Réglage du microscope

- Mettre sous tension les sources lumineuses
 - Réflexion visible
 - Réflexion X-cite 120 pour la fluo dans l'UV
- Faire tous les réglages avec la source Halogène en lumière visible (Par précaution, ne pas utiliser X-Cite pour les réglages)
- Ouvrir le shutter : position O (Open)
- Ouvrir le logiciel Nikon ACT-1C
- Vérifier que le plateau tournant n'a pas été dérégulé : le centre de rotation du plateau doit se trouver approximativement au centre de l'image observée. **NE JAMAIS TOUCHER LA MOLETTE DIRECTEMENT DEVANT L'OPERATEUR**
- Rappel : en fluorescence, toutes les mesures sont effectuées en réflexion.
- Vérifier l'alignement du couple polariseur/analyseur :
 - Positionner l'analyseur à 90°
 - Choisir l'un des deux polariseurs en fonction de l'application :
 - (UV+VIS) : 350-410nm (ex. excitation du collagène)
 - (VIS) : visible
 - Positionner ce polariseur jusqu'à trouver l'extinction :
 - (UV+VIS) : le fond de la scène observée est de couleur bleue foncée
 - (VIS) : le fond de la scène observée est noir
 - Positionner l'analyseur à 0° pour la mesure en parallèle (I_{vv})
 - Positionner l'analyseur à 90° pour la mesure en perpendiculaire (I_{vh})
 - Reporter I_{vv} ou I_{vh} dans le nom des fichiers

9.2 Préparation de l'échantillon

- Extraire et isoler des fibres du matériel d'intérêt
- Les positionner entre lame et lamelle avec une goutte d'eau distillée
- Essuyer le surplus d'eau
- Positionner la préparation sous l'objectif
- Choisir la zone d'intérêt qui servira à l'acquisition des images

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode Opérateur	MO-BIOP-MET-6 Version 1 du 10/09/2007 page 4/5
	Mesure au microscope NIKON de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques	

9.3 Acquisition des données

- Vérifier que la zone d'intérêt est bien centrée sur le point de rotation du plateau. Ce point est légèrement décalé par rapport au centre de l'image et légèrement différent d'un objectif à l'autre.
- Positionner le plateau rotatif sur la graduation 10° pour faire correspondre l'incrément des noms de fichiers avec la position angulaire du plateau au cours de l'expérimentation (ex : Fichier_1 = position 10°).
- Placer l'analyseur en position 0° (Ivv)
- Logiciel ACT-1C : régler les paramètres liés à l'acquisition. Voir les valeurs par défaut pour les onglets :
 - Photo
 - mode quick-3
 - sensitivity normal
 - format tiff
 - Save
 - Répertoire de sauvegarde
 - Nom des fichiers image : définir prefix, incrément automatique : body
 - Live : Néant (ne pas modifier)
 - Timer
 - Enable timer : OK pour choisir le mode rafale automatique
 - Choisir « interval time » en fonction des contraintes de la manip comme le temps de manipulation, le temps d'exposition (voir « options »), le temps de sauvegarde des fichiers sur le disque dur.
 - Total shots : 19 pour balayer 180° de 10 à 190° par pas de 10°
 - Options
 - Color : choisir COLOR (voir 9.4 traitement des données)
 - Enhancement OK
 - Live OK
 - Enable cooling OK
- Fermer le shutter : position C (Closed)
- Choisir la bonne source lumineuse en fonction de l'application :
 - Rester avec la source halogène pour le visible
 - Choisir la source X-cite120 pour exciter dans l'UV (mettre les lunettes)
- Choisir le cube fluo en fonction de l'application (ex. UV-2B pour le collagène)
- Ouvrir le shutter (position O) et attendre au moins 2 minutes pour laisser décroître la fluorescence du collagène pour passer d'une décroissance exponentielle à une décroissance quasi linéaire (voir traitement des données)
- Logiciel ACT-1C : régler le temps d'exposition (garder le même pour Ivv et Ivh et pour toutes les positions angulaires du plateau) :
 - Réglage automatique avec le bouton AE (auto exposure)
 - Ajustement avec le curseur ou le combo (noir/vert)
- Lorsque tous les réglages sont effectués prendre la série d'images en appuyant sur le bouton « Start ». Ensuite, agir en fonction des messages à l'écran :
 - « Capturing » : ne jamais bouger le plateau pendant cette phase d'acquisition
 - « Clocking » : tourner le plateau de 10° entre chaque acquisition jusqu'à 190°

 INRA Clermont Theix UR 370 QuaPA	Mode Opérateur	MO-BIOP-MET-6 Version 1 du 10/09/2007 page 5/5
	Mesure au microscope NIKON de l'anisotropie de fluorescence des tissus biologiques	

9.4 Traitement des données

- Renommer les 19 fichiers : remplacer les références chronologiques (date, heures) par le bon index de 1 à 19 suivant l'ordre chronologique qui est aussi l'ordre angulaire croissant. Exemple :
 - bidon001!070911145622 => bidon001
 - bidon001!070911145627 => bidon002
- Exécuter imdiff_fluopolar.m dans Matlab :
 - Charger le masque circulaire prédéfini ne gardant qu'une région d'intérêt (ROI) centrale.
 - Charger les 19 images à traiter
 - Masquer ces images pour ne garder que la zone circulaire centrée sur l'axe de rotation du plateau
 - Convertir les images RGB en images en niveaux de gris
 - Calculer le niveau de gris moyen dans la ROI (correspond à l'intensité lumineuse moyenne de fluorescence) pour toutes les images
 - Sauvegarder le résultat (angle de rotation du plateau, niveau de gris moyen) dans un fichier du même nom, mais avec une extension *.txt.
- Reprendre les données dans Excel pour calculer l'anisotropie et la circularité de la représentation angulaire de l'anisotropie. Ce paramètre rend compte de la déstructuration via l'étude de la forme de cette représentation. La circularité est égale à la surface sur le périmètre au carré de la représentation angulaire de l'anisotropie.

Annexe F

Analyse des moindres carrés

L'équation 38 page 123 fait apparaître la somme quadratique des résidus comme un polynôme des paramètres C_1 , C_2 et μ . Cette somme $\chi^2(C_1, C_2, \mu)$ est minimale lorsque ses dérivées par rapport aux paramètres s'annulent :

$$\begin{cases} 0 = \frac{\partial(\chi^2)}{\partial C_1} \\ 0 = \frac{\partial(\chi^2)}{\partial C_2} \\ 0 = \frac{\partial(\chi^2)}{\partial \mu} \end{cases} \quad (54)$$

Pour simplifier les notations, on prend $I_{VV}(\gamma_i) = y_i$. La dérivation et le développement de 54 donne finalement :

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^4 \gamma_i + \mu \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i = C_1^2(\xi + \omega 2\mu + \epsilon \mu^2) + C_2^2(\epsilon + \omega 2\mu + \epsilon \mu^2) \\ \sum_{i=1}^{i=N} y_i \sin^4 \gamma_i + \mu \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i = C_1^2(\epsilon + \omega 2\mu + \epsilon \mu^2) + C_2^2(\xi + \omega 2\mu + \epsilon \mu^2) \\ \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i = (C_1^2 + C_2^2)(\mu\epsilon + \omega) \end{cases} \quad (55)$$

avec pour les γ_i : $\gamma_1=0^\circ$, $\gamma_2=3,6^\circ$... $\gamma_{N=26}=90^\circ$ et avec :

$$\xi = \sum_{i=1}^{i=N} \cos^8 \gamma_i = \sum_{i=1}^{i=N} \sin^8 \gamma_i \quad (56)$$

$$\epsilon = \sum_{i=1}^{i=N} \cos^4 \gamma_i \sin^4 \gamma_i \quad (57)$$

$$\omega = \sum_{i=1}^{i=N} \cos^6 \gamma_i \sin^2 \gamma_i = \sum_{i=1}^{i=N} \cos^2 \gamma_i \sin^6 \gamma_i \quad (58)$$

Les solutions de ce système de trois équations à trois inconnues sont :

$$\left\{ \begin{array}{l}
 C_1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=N} y_i \sin^4 \gamma_i - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^4 \gamma_i + \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1\right) \frac{\omega}{\epsilon} \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right)}} \\
 C_2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^4 \gamma_i - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \sum_{i=1}^{i=N} y_i \sin^4 \gamma_i + \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1\right) \frac{\omega}{\epsilon} \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right)}} \\
 \mu = \frac{\left[\left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon}\right)\right] \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\epsilon \left[\left(\frac{\epsilon^2 - \xi\epsilon}{\epsilon^2 - \omega^2}\right) \left(\sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^4 \gamma_i + \sum_{i=1}^{i=N} y_i \sin^4 \gamma_i\right) + 2 \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1\right) \frac{\omega}{\epsilon} \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i\right]} - \frac{\omega}{\epsilon}
 \end{array} \right. \quad (59)$$

Il est possible d'associer à chaque paramètre (C_1 , C_2 et μ) une incertitude ($u(C_1)$, $u(C_2)$ et $u(\mu)$) qui constitue une estimation de l'erreur commise sur la détermination du paramètre. Pour la calculer, on utilise la propagation des incertitudes qui donne :

$$\left\{ \begin{array}{l}
 u(C_1) = \sqrt{u(y)^2 \left(\frac{\partial C_1}{\partial y}\right)^2} \\
 u(C_2) = \sqrt{u(y)^2 \left(\frac{\partial C_2}{\partial y}\right)^2} \\
 u(\mu) = \sqrt{u(y)^2 \left(\frac{\partial \mu}{\partial y}\right)^2}
 \end{array} \right. \quad (60)$$

En calculant les dérivées partielles, on obtient finalement :

$$\left\{ \begin{array}{l}
u(C_1) = u(y) \times \frac{1}{2C_1} \times \left(\frac{\sum_{i=1}^{i=N} \sin^4 \gamma_i - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \sum_{i=1}^{i=N} \cos^4 \gamma_i + \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1 \right) \frac{\omega}{\epsilon} \sum_{i=1}^{i=N} \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right)} \right) \\
u(C_2) = u(y) \times \frac{1}{2C_2} \times \left(\frac{\sum_{i=1}^{i=N} \cos^4 \gamma_i - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \sum_{i=1}^{i=N} \sin^4 \gamma_i + \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1 \right) \frac{\omega}{\epsilon} \sum_{i=1}^{i=N} \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right)} \right) \\
u(\mu) = u(y) \times \left(\frac{\Gamma \sum_{i=1}^{i=N} \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i \times \sum_{i=1}^{i=N} y_i (\Lambda (\cos^4 \gamma_i + \sin^4 \gamma_i) + \Upsilon \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i) - \sum_{i=1}^{i=N} (\Lambda (\cos^4 \gamma_i + \sin^4 \gamma_i) + \Upsilon \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i) \times \Gamma \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i}{\left(\Lambda \sum_{i=1}^{i=N} y_i (\cos^4 \gamma_i + \sin^4 \gamma_i) + \Upsilon \sum_{i=1}^{i=N} y_i \cos^2 \gamma_i \sin^2 \gamma_i \right)^2} \right)
\end{array} \right. \quad (61)$$

avec

$$\Gamma = \left(\epsilon - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right) - \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \left(\xi - \frac{\omega^2}{\epsilon} \right) \quad (62)$$

$$\Lambda = \epsilon \left(\frac{\epsilon^2 - \xi\epsilon}{\epsilon^2 - \omega^2} \right) \quad (63)$$

$$\Upsilon = 2 \left(\frac{\xi\epsilon - \omega^2}{\epsilon^2 - \omega^2} - 1 \right) \omega \quad (64)$$

Annexe G

Principe de mesure de la contrainte à 20%

La mesure de la contrainte à 20% est réalisée grâce aux tests de compression mécanique effectués avec une machine INSTRON 5543.

L'échantillon découpé sous forme parallélépipédique est placé dans la cellule de compression, comme montré sur la figure ci-dessous. La partie mobile de l'instrument est déplacée verticalement à vitesse constante de façon à compresser l'échantillon. [67]

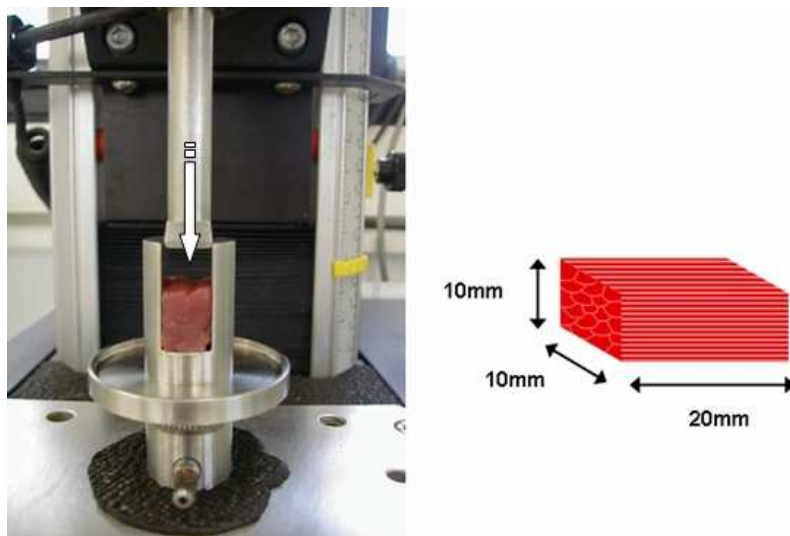


FIG. G. 1 : Principe d'un test de compression

La courbe qui représente la charge subie par le capteur en fonction de son déplacement permet de déterminer la valeur de la contrainte pour une compression de 20% de l'échantillon, comme montré sur la figure ci-dessous.

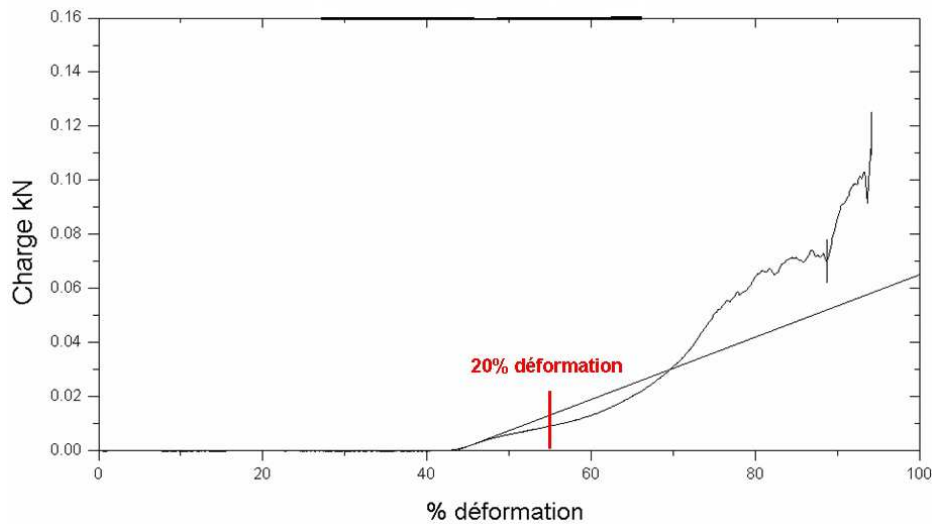


FIG. G. 2 : Exemple de courbe de compression d'un échantillon de fibres musculaires

La valeur de la contrainte à 20% est moyennée sur une dizaine de résultats d'essais environ.

Annexe H

Programme pour l'analyse des images des broyats

L'analyse des images est effectuée en utilisant le programme suivant écrit sous Matlab :

```
% Quantification de la destructuration d'échantillons de viande hachée
% Thèse Claire Luc
% Frédéric Peyrin
% Version
clear all
close all

% Parametres
% taille des objets retenus :
% taille_mini=5000;
% taille_maxi=50000;
% en fait on choisi 1/1000 de la surface de l'image

% Seuil de binarisation de l'image
seuil_sous_estim=.6;
seuil_sur_estim=.64;

%Nom = input('Identifiez-vous (vos initiales par exemple) : ','s');
Nom='FP';
```

```

% Nom des fichiers et répertoires
fichier_result=['Synthese_pointage_souris_' date '.txt'];
chemin='\\Zebulon\Commun\Images_microscope\Claire\broyats_3\coupes_HES\';
cheminMasque = [chemin 'Masque_2007-03-23'];
cheminsynthese= [chemin 'synthese'];

fid1 = fopen([cheminsynthese fichier_result],'wt');
fprintf(fid1,'Nom_fichier\t Surface souris\n');

fid2 = fopen([cheminsynthese 'Struct_pointage_souris_' date '.txt'],'wt');
fprintf(fid2,'Fichier\t Area\t MajorAxisLength\t MinorAxisLength\t...
... Eccentricity\t Orientation\t ConvexArea\t FilledArea\t...
... EulerNumber\t EquivDiameter\t Solidity\t Extent\t Perimeter\n');

% Chargement de toutes les images temp=dir([chemin '*.tif']);
names=char(temp.name);
[nfile, p]=size(names);

% Traitement des images
for i=1 :nfile
    I=imread([chemin names(i, :)]);

% Extraction du fond
BW ( :, :,2)= bwmorph(im2bw(I( :, :,2),.8),'close');%fond

% Extraction des fibres sur la base d'un seuil mini : sous-estimation
BWfibres_sous_estim= bwmorph(im2bw(I( :, :,3),seuil_sous_estim),'close'); % 'erode'
[M,N] =size(BWfibres_sous_estim);
BWfibres_sous_estim(1, :)=1;
BWfibres_sous_estim(M, :)=1;
BWfibres_sous_estim( :,1)=1;
BWfibres_sous_estim( :,N)=1;
I2mini=bwfill(not(BWfibres_sous_estim),'holes');

% Surface mini
[I3m,N3m]=bwlabel(I2mini);
s = regionprops(I3m( :, :,1), 'all');
[ns,ps]= size(s);
MajorAxisLengths =cat(1, s.MajorAxisLength);
MinorAxisLengths = cat(1, s.MinorAxisLength);

```

```

% Exclusion des petits objets (taille < 1/1000 de l'image)
for n=1 :N3m,
    [r,c]=find(I3m==n);
    si=size(r);
    if si<(M*N*.001)
        % if (or(si<(M*N*.001),MajorAxisLengths(n,1)/MinorAxisLengths(n,1)<2))
            for ii=1 :size(r),
                I3m(r(ii,1),c(ii,1))=0;
            end
        else
            Sm(n)=si(1,1);
        end
    end
end

I4m=im2bw(I3m);
BW (:, :,1)=I4m (:, :,1);
BW (:, :,2)=I4m (:, :,1);
BW (:, :,3)=I4m (:, :,1);
Imini= double(BW).*double(I)/255;

% Représentations graphiques
figure (1)

% Image initiale
subplot (2,2,1)
imagesc(I);

% Image seuillée
subplot (2,2,2)
imagesc(I4m);

% Image seuillée et labellisée
subplot (2,2,3)
imagesc(I3m);
Imf=I3m*0;

% Image de travail servant à pointer les objets à retenir
subplot (2,2,4)
imagesc(I);
Ifinal=double(I*0+1).*5;

```

```
% Pointage souris des fibres et création du filtre définitif
button=1;
handle=figure(1);
while button =3, % Test sur le bouton de la souris : si bouton droit, on sort de la boucle
    titre='Pointez à l'aide de la souris la zone à éliminer(clic droit pour terminer) :';
    [X,Y,button] = ginput(1);
    switch I3m(uint16(Y),uint16(X))
    case 0, % Test : fond de l'image?
        otherwise, % sinon on cherche les coordonnées de l'objet dans l'image
            [r,c,obj]=find(I3m==I3m(uint16(Y),uint16(X)));
            switch button
            case 1, % On retient cet objet comme fibre
                for ii=1 :size(r),
                    Ifinal(r(ii,1),c(ii,1))=3;
                    Imf(r(ii,1),c(ii,1))=1;
                end
            case 2, % Après avoir sélectionné cet objet comme fibre, on annule
                for ii=1 :size(r),
                    Ifinal(r(ii,1),c(ii,1))=5;
                    Imf(r(ii,1),c(ii,1))=0;
                end
            end
            subplot (2,2,4)
            If= double(Ifinal)./5.*double(I)/255;
            imagesc(If);
        end
    end
close(handle);

% Enregistrement des images traitées
% Image en surimpression
imwrite((If),[cheminMasque '\surintensité_souris_' names(i, :)],'tif','compression','none');

% image du masque
I4m=im2bw(Imf);
BW ( :, :,1)=I4m( :, :,1);
BW ( :, :,2)=I4m( :, :,1);
BW ( :, :,3)=I4m( :, :,1);
Igmo= double(BW).*double(I)/255;
imwrite((Igmo),[cheminMasque '\masque_souris_' names(i, :)],'tif','compression','none');
```

```

% Calcul et sauvegrade du % de surface fibre par rapport à la surface de l'image
Smini=bwarea(I4m)/(M*N)*100;
fprintf(fid1,'%s\t %f\n',names(i, :),Smini);

% statistiques STRUCT
% On répertorie les objets, leurs valeurs et on enregistre
s = regionprops(bwlabel(Imf), 'all');
[ns,ps]= size(s);

Areas = cat(1, s.Area);
Centroids=cat(1, s.Centroid);
%   BoundingBox
%   SubarrayIdx
MajorAxisLengths =cat(1, s.MajorAxisLength);
MinorAxisLengths = cat(1, s.MinorAxisLength);
Eccentricitys = cat(1, s.Eccentricity);
Orientations = cat(1, s.Orientation);
%   ConvexHull
%   ConvexImage
ConvexAreas = cat(1, s.ConvexArea);
%   Image
%   FilledImage
FilledAreas = cat(1, s.FilledArea);
EulerNumbers = cat(1, s.EulerNumber);
%   Extrema
EquivDiameters = cat(1, s.EquivDiameter);
Soliditys = cat(1, s.Solidity);
Extents = cat(1, s.Extent);
%   PixelIdxList
%   PixelList
Perimeters = cat(1, s.Perimeter);

for nn=1 :ns
    fprintf(fid2,'% s\t % f\t % f\t % f\t % f\t % f\t % f\t % f\t % f\t % f\t ...
        ...% f\t % f\t % f\n',names(i, :), Areas(nn,1), MajorAxisLengths(nn,1),...
        ...MinorAxisLengths(nn,1),Eccentricitys(nn,1),Orientations(nn,1),...
        ...ConvexAreas(nn,1), FilledAreas(nn,1),EulerNumbers(nn,1),...
        ...EquivDiameters(nn,1),Soliditys(nn,1),Extents(nn,1),Perimeters(nn,1));
end
i
end
ST = fclose(fid1);
ST = fclose(fid2);

```


Annexe I

Analyse des broyats par la société

HISTALIM

Les coupes histologiques utilisées lors de l'analyse microscopiques des broyats ont été également analysées par la société HISTALIM, qui a rédigé le rapport suivant :



Sylvie CLERJON
Centre INRA de Theix
QuaPA
63122 ST GENES CHAMPANELLE

Montpellier le 19 juin 2007,

Vous nous avez envoyé 12 échantillons notés de 1 à 12, avec, cependant, deux échantillons 5 (notés plus loin 5 et 5 bis et pas d'échantillon 11).

Nous avons décongelé ces échantillons pour pouvoir les fixer dans du formol 10% pendant 24h. Ensuite ils ont été déshydratés et inclus en paraffine, afin de réaliser des blocs suffisamment durs pour effectuer des coupes de 5 µm d'épaisseur, qui ont été colorées selon la méthode Calléja (norme NF V04-417).

Puis la totalité de la surface de ces lames colorées a été acquise numériquement à l'aide d'un microscope LEICA DM 4000B muni d'une platine motorisée (entre 10 et 20 champs par lame). Ces images ont enfin été traitées grâce à un algorithme développé par HISTALIM avec le logiciel VISILOG 6.4 (Noesis).

Cet algorithme permet de segmenter différents tissus (figure 1) comme :

- les tissus conjonctifs (tissu conjonctif intramusculaire, tendons, cartilages et os) en bleu clair
- les adipocytes en bleu foncé
- les fibres musculaires intactes en rouge
- les fibres musculaires déstructurées en vert
- l'espace extra-cellulaire (sortie d'eau des fibres intactes) en bleu ciel
- les lacunes (autres espaces) en orange.

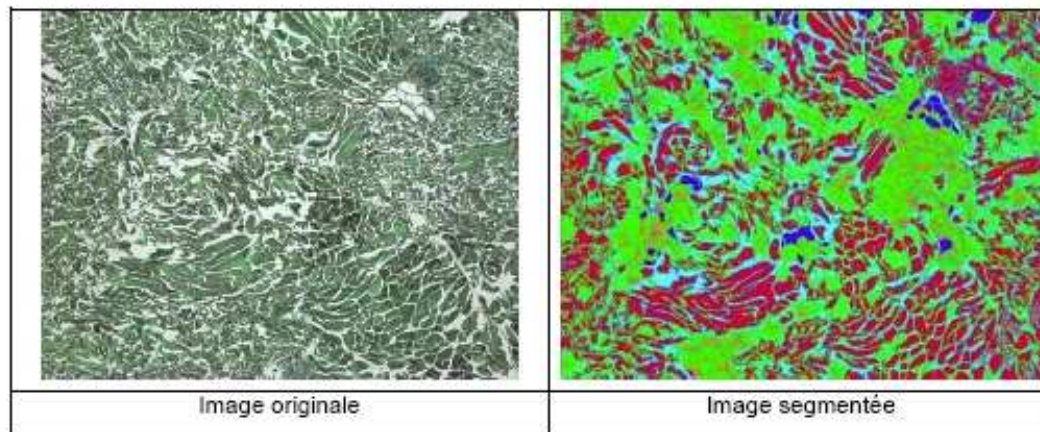


Figure 1 : exemple de segmentation

HISTALIM

Quelque soit le tissu segmenté, aucune différence significative n'a pu être observée (tableau 1). En effet visuellement, vos échantillons de viande hachée sont peu différents entre eux et peu différents des émulsions (figure 2).

Tableau 1 : pourcentage de surface de chaque lame occupée par le tissu conjonctif (*perimysium, tendon, cartilage, os*), les adipocytes, les fibres musculaires intactes, les fibres musculaires déstructurées, l'espace extracellulaire (autour des fibres intactes) et les lacunes (autres espaces).

Echantillon	Produit	Tissu conjonctif	Adipocytes	Fibres Intactes	Fibres Déstructurées	Espace extracellulaire	Lacunes
1	E1	6,5	2,6	29,4	39,4	14,2	7,9
2	G15	8,5	1,7	35,7	34,4	16,4	3,3
3	E2	6,7	2,4	31,8	41,5	12,4	5,1
4	G8	13,5	1,9	27,9	33,9	17,1	5,7
5	G8/E2	9,8	4,2	20,6	39,8	15,1	10,5
5bis	G8/E2	8,7	7,4	20,5	33,1	14,1	16,2
6	G15	6,5	2,7	27,7	37,0	18,0	8,0
7	E2	5,6	1,9	33,7	38,0	14,9	5,8
8	E1	6,2	1,3	37,8	37,2	13,6	3,9
9	E1	6,1	2,9	29,7	38,0	17,6	5,7
10	G15	10,1	5,1	10,7	44,0	10,3	19,9
12	G8	7,9	2,0	18,3	48,9	10,6	12,3

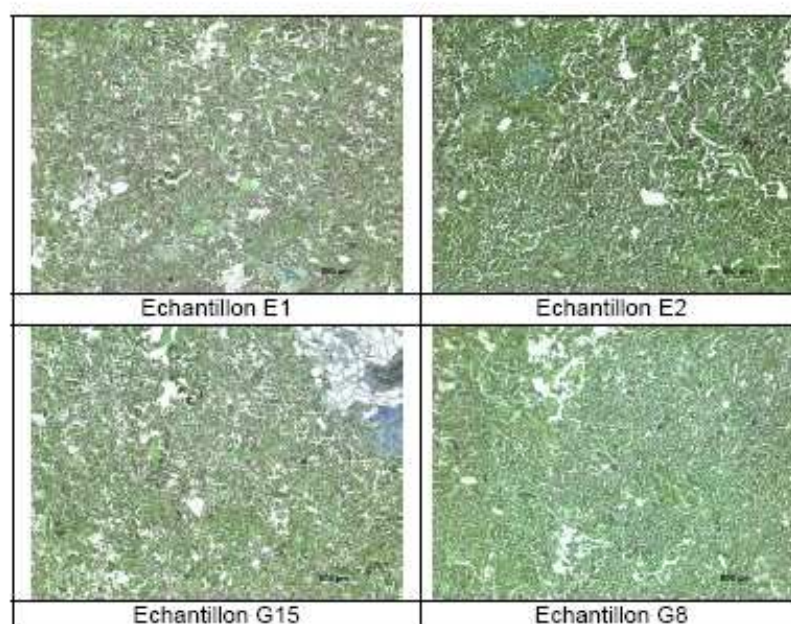


Figure 2 : coupes histologiques de vos échantillons colorées selon la méthode de Calléja.

L'absence de différence peut s'expliquer par plusieurs raisons.

Tout d'abord les étapes de congélation-décongélation, que les échantillons ont subies, les ont partiellement dégradées. En effet les fibres musculaires intactes sont rares, quelque soit le produit. Dans les exemples de viande de porc hachée avec des grilles 2 ou 6 mm (figure2) les fibres musculaires intactes restent majoritaires.



Sur les échantillons témoins, dont nous disposons au laboratoire, nous pouvons observer une différence entre des hachages grossiers (6 mm) et un hachage plus fin (2 mm). Plus la grille est fine, moins les fibres sont préservées et plus leur orientation varie souvent (figure 3).

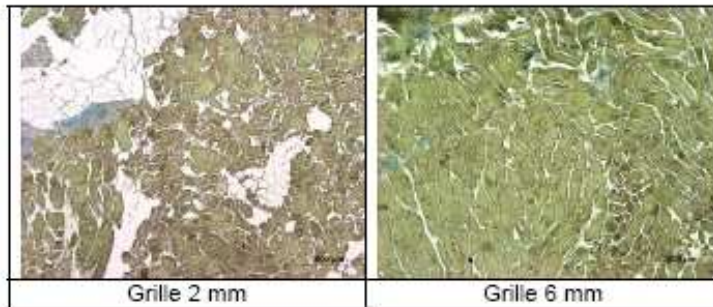


Figure 3 : coupes histologiques colorées selon la méthode de Calléja de viande de porc hachée avec des grilles de différents diamètres.

Par ailleurs notre analyse est habituellement réalisée sur 3 lames histologiques de 5 cm² de section et vos échantillons ne mesuraient au maximum 1 cm². De ce fait, les échantillons testés ne sont probablement pas suffisamment représentatifs pour mettre en évidence des différences.

En conclusion les résultats ne nous apparaissent pas significatifs. L'expérience serait, peut-être, à renouveler sur des échantillons plus gros fixés au formol et n'ayant pas subi de congélation à l'iso-pentane. En effet au cours d'une autre étude, nous avons pu mettre en évidence des différences nettes pour différentes grilles de hachage et ce pour différentes espèces animales.

RÉSUMÉ

Etude de la structure des tissus musculaires par polarimétrie de fluorescence

Les interactions de la lumière avec les tissus biologiques sont à l'origine de plus en plus de techniques de caractérisation. Parmi ces techniques, la mesure de la polarisation de la fluorescence offre la possibilité d'étudier l'organisation des tissus biologiques de façon sélective. L'objectif de ce travail était de mettre au point une méthode de mesure de l'anisotropie de fluorescence applicable à l'étude des tissus musculaires, afin de comprendre leur évolution structurale *post mortem* et de tracer des pistes en vue de l'élaboration de capteurs non destructifs de la qualité des aliments. Une revue bibliographique présente la notion d'anisotropie de fluorescence et introduit la structure et les propriétés optiques des tissus musculaires. Elle montre la diversité des études publiées concernant la caractérisation de l'anisotropie optique des matériaux structurés. La mise en œuvre des dispositifs expérimentaux pour répondre à la problématique posée est ensuite décrite. Un modèle mathématique basé sur la répartition géométrique et les propriétés du tryptophane, principal fluorophore des fibres musculaires, est proposé pour interpréter la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Il distingue les anisotropies de fluorescence "intrinsèque" et "de structure". Les différents plans d'expérience menés présentent le potentiel d'application de cette méthode pour la caractérisation des produits carnés : la dénaturation des protéines due à la maturation est mise en évidence par le paramètre physico-chimique du modèle, tandis que les modifications de la longueur des sarcomères sont reliées aux paramètres de structure du modèle. Le degré de déstructuration du tissu conjonctif avec le chauffage est également montré. Ces résultats ouvrent des perspectives d'application d'une méthode générique de contrôle non destructif de la structure des matériaux organisés.

MOTS CLÉS : FLUORESCENCE, TISSUS MUSCULAIRES, POLARISATION, ANISOTROPIE, MODÈLE

ABSTRACT

Muscle structure evaluation using fluorescence polarization

Light interactions with biological tissues have been exploited in an increasing number of techniques for characterization. Among these techniques, fluorescence polarization measurement offers a selective way for characterizing the organization of biological tissues. The aim of this work was to build a methodology for investigating the fluorescence polarization of muscle tissues in order to obtain information on their structural organization and its modifications caused by processing. A review presents the principle of fluorescence anisotropy and the structure and optical properties of muscle tissues. It highlights variety in published studies concerning optical characterization of structured materials. A detailed report on the experimental methodology is made. A theoretical model of fluorescence anisotropy is proposed. It is based on geometrical repartition and properties of tryptophan, which is the major fluorophore in muscle fibres, and makes the distinction between "intrinsic" and "structural" fluorescence anisotropies. Data from several experiments demonstrate how the method is able to show muscle structure modifications : protein denaturation induced by maturation displays changes in the values of the physico-chemical variable of the model, whereas sarcomere length is related to structural variables of the model. Structure modifications of connective tissue during heat treatment are also shown. Results show evidence of potential applications for this generic methodology proposed for non destructive assessment of organized materials.

KEY WORDS : FLUORESCENCE, MUSCLE TISSUES, POLARIZATION, ANISOTROPY, MODEL