

MICROSCOPIE VIBRATIONNELLE OPTIR: APPLICATION A LA CARACTERISATION DE LA GRAINE DE *BRASSICA JUNCEA*

WINCKLER Pascale^{1,2}, BONNOT Emma¹, LAVAUD Matéo^{1,2},
PERRIER-CORNET Jean-Marie^{1,2}, CHAMPION Dominique¹

¹: *UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Institut
Agro Dijon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 1,
Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

²: *Dimacell Imaging Facility, Institut Agro Dijon, Université
de Bourgogne Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000
Dijon, France.*

pascale.winckler@institut-agro.fr

OPTIR VIBRATIONAL MICROSCOPY APPLIED TO *BRASSICA JUNCEA* SEEDS CHARACTERISATION

ABSTRACT

Vibrational spectroscopy is the science of measuring which wavelengths of light are absorbed by a molecule. The absorption bands arise from quantized changes in the energy of mutual atomic vibrations within the molecule. These vibrational modes absorb in the near and far infrared (IR) range (from 2 μm to 1000 μm) and can be used as molecular signatures. Two phenomena are usually exploited for vibrational imaging: infrared absorption and Raman scattering. These are non-destructive, label-free methods that can be used to identify the molecular composition of a sample. The frequency of vibrations can therefore be characteristic of a particular chemical bond. Vibrational spectroscopy is a widely used characterization method in the life sciences. OPTIR (Optical PhotoThermal InfraRed spectroscopy) is a new vibrational spectroscopy technique which uses a pulsed and tunable medium-IR quantum cascade laser (QCL) to induce photothermal effects at the surface of a sample when the wavelength is corresponding to a vibrational mode energy (i.e. when the laser energy is absorbed). This photothermal effect is measured using a visible probe laser focused on the sample. This technology enables IR spectroscopy and IR chemical imaging, with spatial resolution independent of IR wavelength.

KEY WORDS

Infrared, Microscopy, Mustard seed, OPTIR, Vibrational spectroscopy.

RESUME

La spectroscopie vibrationnelle utilise le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent avec des niveaux d'énergie discrets appelés modes de vibrations. Ces modes de vibrations absorbent dans le domaine du proche et lointain infrarouge (IR) (de 2 μm à 1000 μm) et peuvent être utilisés comme des signatures moléculaires. Deux phénomènes sont usuellement exploités pour l'imagerie vibrationnelle, l'absorption infrarouge et la diffusion Raman. Ce sont des méthodes non destructives et sans marquage qui permettent l'identification de la composition moléculaire d'un échantillon. Les fréquences des modes de vibrations peuvent être considérées comme liées à la force de la liaison et aux masses atomiques d'une liaison particulière, d'un ensemble de liaisons au sein d'une molécule ou d'un groupe fonctionnel. Les fréquences d'un spectre de vibration d'un matériau donné sont donc caractéristiques de chacune des liaisons des constituants de ce matériau. La spectroscopie vibrationnelle est une méthode de caractérisation largement utilisée en sciences du vivant. La technique OPTIR (Optical PhotoThermal InfraRed spectroscopy) est une nouvelle technique de spectroscopie vibrationnelle utilisant un laser à cascade quantique (QCL) moyen-IR pulsé et accordable, qui induit des effets photothermiques à la surface d'un échantillon lorsque la longueur d'onde IR correspond à l'énergie d'un mode de vibration (i.e. quand l'énergie du laser est absorbée). Cet effet photothermique est mesuré à l'aide d'un laser de sonde, de longueur d'onde dans le visible, focalisé à la surface de l'échantillon. Cette technologie permet des mesures de spectroscopie IR classique ainsi que la réalisation d'images chimiques d'absorption IR, avec une résolution spatiale indépendante de la longueur d'onde IR, submicronique, identique à celle de l'imagerie photonique classique. L'OPTIR offre une mesure d'absorption IR de qualité, sans contact avec la surface. L'objectif de cet article est de présenter cette technique d'imagerie novatrice ainsi qu'une application à la caractérisation de la graine de *Brassica juncea*.

MOTS CLÉS

Graine de moutarde, Infrarouge, Microscopie, OPTIR, Spectroscopie vibrationnelle.

INTRODUCTION

L'objectif de cet article est de présenter la microspectroscopie OPTIR (Optical Photothermal Infrared spectroscopy), technique innovante émergente qui est amenée à se développer de plus en plus dans l'étude des tissus, avec un exemple appliqué à la graine de moutarde. Les principes des spectroscopies vibrationnelles (IR et Raman), dont l'OPTIR fait partie, sont également présentés.

La spectroscopie vibrationnelle

La spectroscopie vibrationnelle est une technique d'analyse chimique basée sur l'interaction lumière-matière au niveau des vibrations moléculaires. Elle permet de caractériser les liaisons chimiques qui composent l'échantillon, car celles-ci présentent des bandes vibrationnelles spécifiques. La Figure 1 illustre les niveaux d'énergie au niveau moléculaire. Ces niveaux d'énergie se composent de niveaux électroniques, chacun composé de sous-niveaux vibrationnels. Les niveaux d'énergie électronique sont dus à la distribution des électrons d'une molécule. La transition entre niveaux électroniques correspond à l'absorption de photons dans le visible ou dans l'UV. Le retour vers le niveau électronique fondamental peut alors éventuellement se faire par émission de fluorescence. La spectroscopie vibrationnelle se focalise quant à elle sur les sous-niveaux vibrationnels de l'état électronique fondamental, qui sont dus à des mouvements des atomes les uns par rapport aux autres.

La transition entre niveaux vibrationnels implique une énergie plus faible que pour les niveaux électroniques, et peut se faire par absorption de photons dans l'infrarouge ou bien par perte d'énergie de photons visibles par diffusion inélastique (diffusion Raman). Une grandeur couramment utilisée en spectroscopie vibrationnelle est le nombre d'onde, dont l'unité est le cm^{-1} .

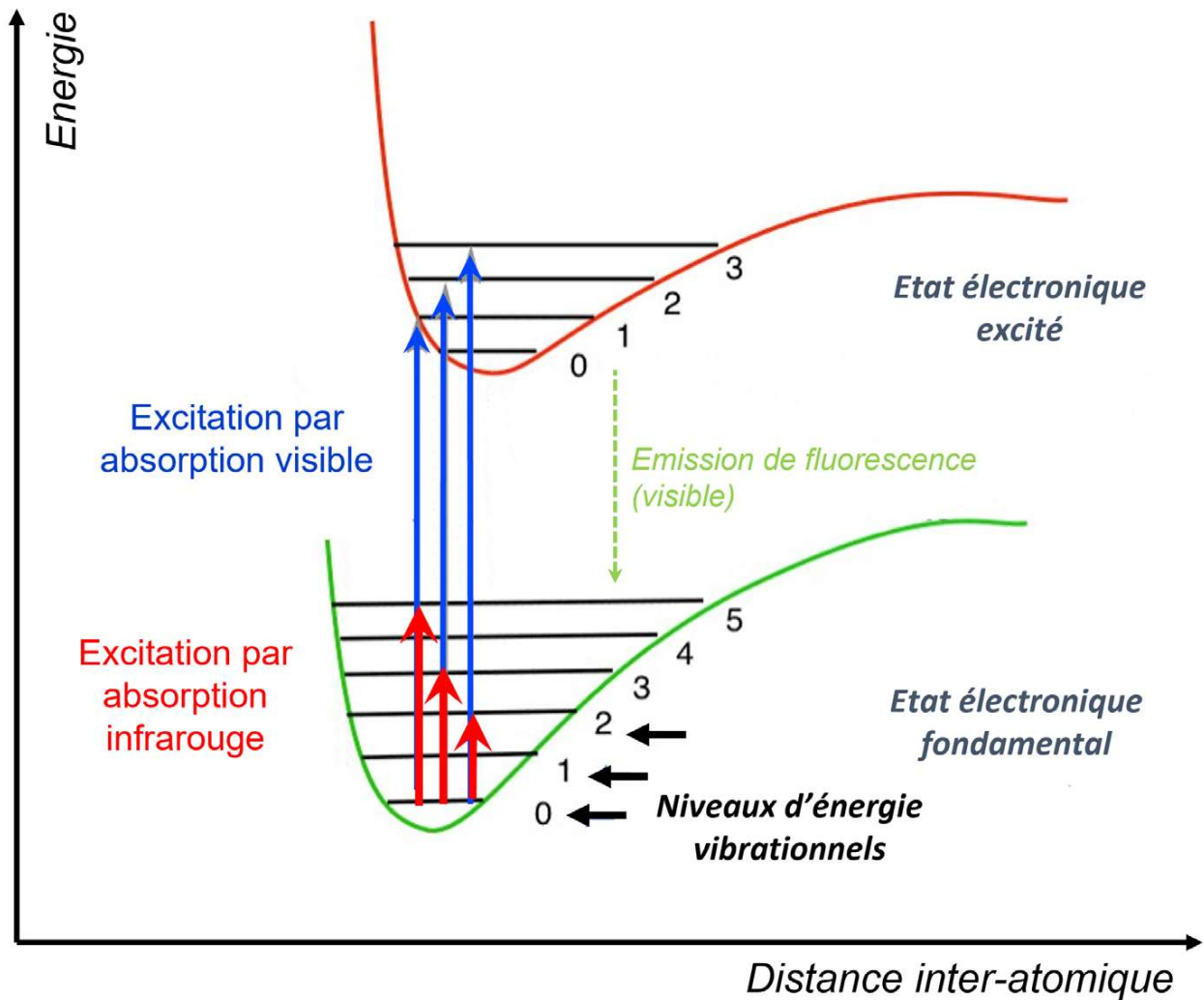


Figure 1 : Transitions énergétiques entre états électroniques (absorption dans le visible ou dans l'UV) ou vibrationnels (absorption dans l'infrarouge) pour une molécule.

Il s'agit de l'inverse de la longueur d'onde. La conversion entre la longueur d'onde en micromètre et le nombre d'onde en cm^{-1} est donnée par l'équation (E.1).

$$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{10^4}{\lambda(\mu\text{m})} \quad (\text{E.1})$$

Dans le cas présent, la gamme de travail utilisée correspond au moyen infrarouge, soit de 400 à 4000 cm^{-1} . Il existe généralement plusieurs modes de vibrations possibles pour une même molécule. La molécule d'eau, composée seulement de deux liaisons chimiques, offre trois modes de vibrations

(élongations - étirements / vibration angulaire). La vibration symétrique des liaisons OH survient pour une énergie équivalente à un nombre d'onde de 3652 cm^{-1} , la vibration asymétrique de cette même liaison, survient pour un nombre d'onde de 3756 cm^{-1} . Pour cette même molécule, il peut se produire également une déformation des angles de liaisons (1640 cm^{-1}). La spectroscopie vibrationnelle repose sur la détection des modes de vibrations moléculaires possibles. La molécule d'eau reste une molécule composée seulement de deux liaisons chimiques : dans le cas d'échantillons biologiques, nous observons une multitude de molécules complexes, avec divers groupements chimiques. Dans ce type d'échantillon il y a un grand nombre de modes de vibrations possibles et le spectre d'absorption IR résultant est alors la somme de ces bandes, qui se chevauchent du fait d'énergies proches. Ce que nous pouvons alors détecter, grâce à la spectroscopie vibrationnelle, ce sont les changements impactant une grande quantité d'un type donné de liaisons chimiques. Le Groupe Français de Spectroscopie Vibrationnelle (GFSV) a édité récemment un ouvrage collectif regroupant les notions théoriques et les applications du domaine [1].

La technique OPTIR

L'OPTIR (Optical Photothermal Infrared spectroscopy) est une technique innovante de microspectroscopie dans l'infrarouge moyen qui permet de réaliser une imagerie infrarouge à limite de diffraction usuelle de la microscopie visible [2] [3]. Il s'agit d'une technique pompe-sonde qui utilise une source IR pulsée pour exciter l'échantillon, généralement un laser à cascade quantique fonctionnant dans l'infrarouge moyen, et un laser sonde à une longueur d'onde visible, typiquement 532 nm , pour détecter la réponse photothermique de l'échantillon. Son principe est illustré **Figure 2**.

Les deux lasers sont focalisés à leurs limites de diffraction respectives au même endroit par un objectif de microscope. La réponse de l'échantillon est alors un changement de réflectance dû à une combinaison de dilatation thermique et de changement d'indice de réfraction au niveau du point de focalisation du laser infrarouge, lorsque celui-ci est absorbé.

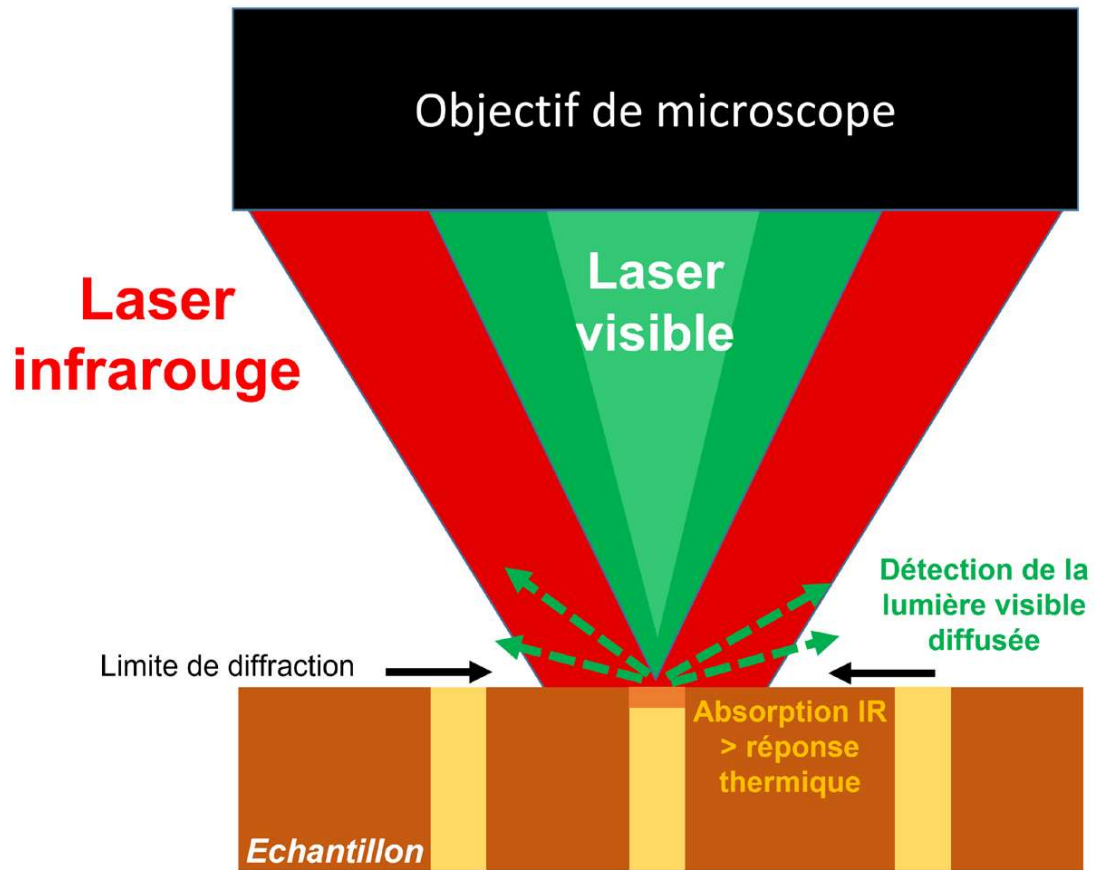


Figure 2 : Principe de la mesure OPTIR. Le laser de lecture, de longueur d'onde dans le visible, peut être environ 20 fois plus focalisé que le faisceau infrarouge. Il permet ainsi de sonder la réponse photothermique locale de l'échantillon avec une résolution sub-micrométrique.

Les résolutions latérale et axiale de la mesure sont données par les équations E.2 et E.3 respectivement (critère de Rayleigh). Elles sont déterminées par la longueur d'onde λ du laser de sonde ainsi que par l'ouverture numérique (ON) de l'objectif utilisé.

$$\text{résolution latérale} = \frac{0,61 * \lambda}{ON} \quad (E.2)$$

$$\text{résolution axiale} = \frac{2 * n * \lambda}{ON^2} \quad (E.3)$$

Par exemple, une résolution latérale d'environ 420 nm est obtenue avec un laser vert fonctionnant à 532 nm et focalisé *via* un objectif d'ouverture numérique 0,78. A titre comparatif, un faisceau infrarouge à 10 μm (1000 cm^{-1}), focalisé à travers le même objectif donnerait une résolution latérale d'environ 7,8 μm . La

résolution axiale obtenue dans ce cas est quant à elle d'environ 1,75 μm . Par ailleurs, une mesure Raman peut facilement être réalisée au même endroit et au même moment que la mesure OPTIR du fait de la présence du laser de sonde (il faut alors que l'instrument soit équipé en sus d'un spectromètre).

Application à la caractérisation de la graine de *B. juncea*

La microspectroscopie OPTIR a trouvé des applications en chimie [4] [5], dans la caractérisation des nanomatériaux [6], dans le patrimoine culturel [7], dans l'histologie [8] [9] et dans la biologie des neurones et des maladies neurodégénératives [10] [11]. Cette technique peut être intéressante pour étudier les tissus et en particulier pour caractériser des sous-structures trop petites pour être entièrement résolues par la microspectroscopie FTIR conventionnelle (μFTIR). Il est proposé ici de présenter brièvement une application à l'analyse de la composition de la graine de moutarde, *B. juncea*.

MATÉRIELS ET METHODES

Le microscope utilisé est un microscope mIRage LS (Photothermal, Californie). La source infrarouge est un laser MIRcat-QT (Daylight) qui repose sur la technologie des lasers à cascade quantique. Il s'agit d'un laser pulsé infrarouge moyen, accordable avec une précision au cm^{-1} . La gamme spectrale est couverte par quatre puces laser. Ces puces émettent respectivement dans les gammes 3000–2700 cm^{-1} , 1850–1465 cm^{-1} , 1465–1190 cm^{-1} et 1190–924 cm^{-1} . Ce laser est focalisé au travers d'un objectif Cassegrain 40x (Pike Technologies, USA). Le laser de lecture utilisé est un laser à 532 nm (puissance en sortie d'objectif x40 lors des mesures : 120 μW). Il est focalisé sur l'échantillon *via* le même objectif Cassegrain (mesures en co-propagation). Avant chaque série d'acquisitions, un spectre OPTIR est enregistré sur une lame de calibration interne au microscope (mylar aluminisé) afin de pouvoir normaliser les variations de puissance du laser IR mIRcat en fonction de la longueur d'onde IR émise. La correction sur les spectres qui seront acquis ultérieurement consiste

en une division des spectres mesurés sur les échantillons par le spectre de calibration. Une mesure typique de spectre est effectuée en moins d'une dizaine de secondes (moyennage 3, vitesse de balayage $1000\text{ cm}^{-1}/\text{s}$).

Les images de microscopie de surface ont été réalisées sur un microscope numérique 3D, VHX 7000 (Keyence, Bois-Colombes, France), pour des graines intactes ou sectionnées au microtome à -20 °C . Les graines de *Brassica juncea* ont été gracieusement fournies par l'Association des Producteurs de Graines de Moutarde de Bourgogne (APGMB). Elles sont issues d'une seule variété (référence confidentielle) et d'un même lieu de récolte lors de la campagne 2020.

RÉSULTATS

La **Figure 3A** montre une image en microscopie à réflexion d'une section de graine de *B. juncea*. La graine se compose d'un cœur relativement riche en lipides (de 29 à 40% du poids sec) et d'une enveloppe la protégeant. Plusieurs mesures OPTIR ont été réalisées (une quinzaine par condition), soit au cœur de la graine, soit sur son enveloppe. Les spectres moyens correspondants sont représentés sur la **Figure 3B**. Le spectre correspondant au cœur de la graine est représenté en jaune, avec des pics caractéristiques des lipides (2927 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} , 1747 cm^{-1}), des protéines (bande autour de 1647 cm^{-1}), et des polysaccharides (bande autour de 1073 cm^{-1}). Le spectre correspondant à l'enveloppe de la graine est représenté en rouge, avec une bande autour de 2927 cm^{-1} ainsi que 1747 cm^{-1} caractéristiques de la présence de lipides, des protéines (bande autour de 1647 cm^{-1}), et deux domaines spectraux correspondants à des polysaccharides ($1330\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ et $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$).

La **Figure 4A** montre une image en microscopie à réflexion de l'enveloppe de la graine de *B. juncea*. Cette enveloppe présente une surface structurée, avec des alvéoles entourées d'une paroi d'épaisseur moyenne de $10\text{ }\mu\text{m}$. Plusieurs mesures OPTIR ont été réalisées (une quinzaine par condition), en différents points du centre des alvéoles et de la paroi les entourant. Les spectres moyens obtenus sont représentés sur la **Figure 3B**. Le spectre correspondant au cœur des alvéoles est représenté en vert, celui correspondant aux parois

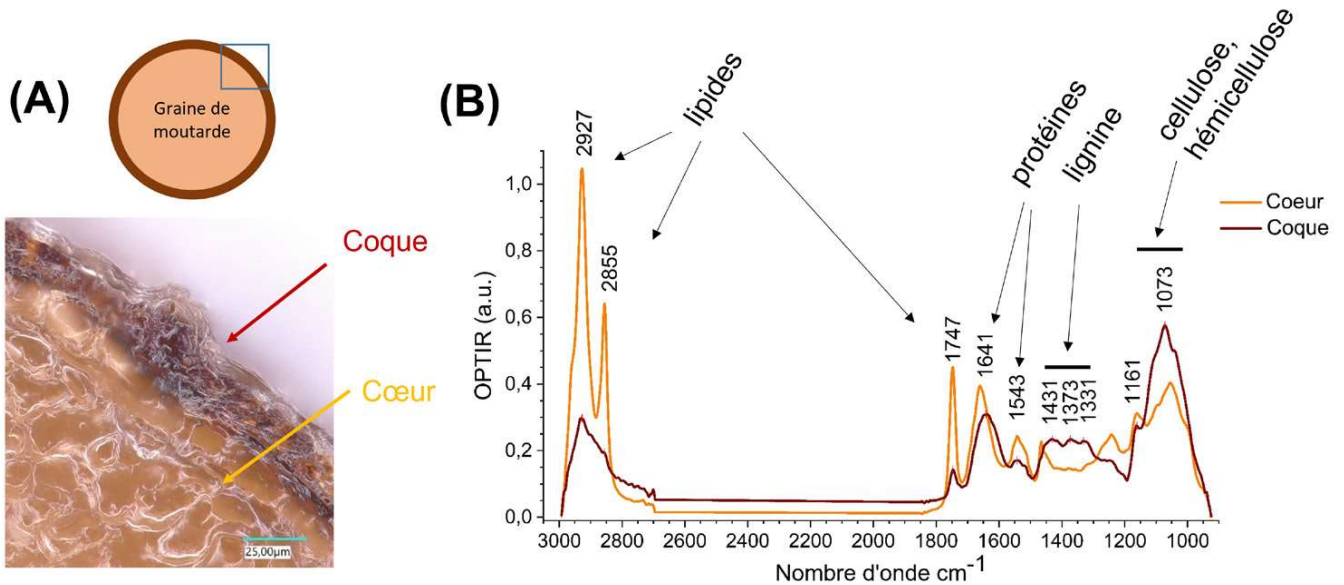


Figure 3 : (A) Image en microscopie à réflexion d'une section de graine de moutarde. (B) Spectres OPTIR moyens obtenus respectivement par mesures sur le cœur de la graine (en jaune) et sur l'enveloppe (en rouge).

est représenté en rouge. L'allure globale de ces spectres est similaire : on y retrouve des pics caractéristiques des lipides (2927 cm⁻¹, 2855 cm⁻¹, 1747 cm⁻¹), des protéines (domaines spectraux autour de 1647 cm⁻¹ et 1543 cm⁻¹), et deux domaines spectraux correspondant à des polysaccharides (1330–1430 cm⁻¹ et 1000–1200 cm⁻¹).

DISCUSSION

Microspectroscopie OPTIR : de la structure à la caractérisation chimique

Si l'imagerie classique, qu'elle soit photonique ou électronique, apporte une information sur les distributions de tailles et de formes, la spectroscopie vibrationnelle permet quant à elle d'apporter une information de composition chimique. Dès lors, l'intérêt de sa mise en œuvre en microscopie permet de faire le lien entre la composition chimique locale de l'échantillon et sa structure, amenant une meilleure compréhension du lien propriété/structure. Les résultats illustrés **Figure 3** montrent bien que l'on peut identifier la composition huileuse du cœur de la graine, avec la présence de bandes spectrales caractéristiques de la présence de lipides. En comparaison, le spectre OPTIR

obtenu sur l'enveloppe de la graine présente des bandes caractéristiques de l'absorption des lipides beaucoup plus faibles, probablement dues à une contamination lors du tranchage de la graine, et une plus forte présence de bandes d'absorption des polysaccharides, qui sont les composants majeurs de l'enveloppe, avec une première bande pouvant être attribuée à la lignine (1431-1331 cm^{-1}) et une seconde bande (autour de 1073 cm^{-1}), pouvant être plutôt attribuée à la cellulose et l'hémicellulose [12] [13]. La lignine semble absente du cœur de la graine qui semble toutefois contenir des traces de cellulose/hémicellulose.

La microscopie OPTIR réalisée sur la structure alvéolaire de l'enveloppe de la graine, dont les résultats sont illustrés **Figure 4**, nous permet de distinguer les variations de composition au sein de cette structure. Les parois semblent ainsi plus riches en cellulose et en hémicellulose qu'en lignine, comparativement au cœur des alvéoles. Le centre des alvéoles semblerait également proportionnellement plus riche en protéines.

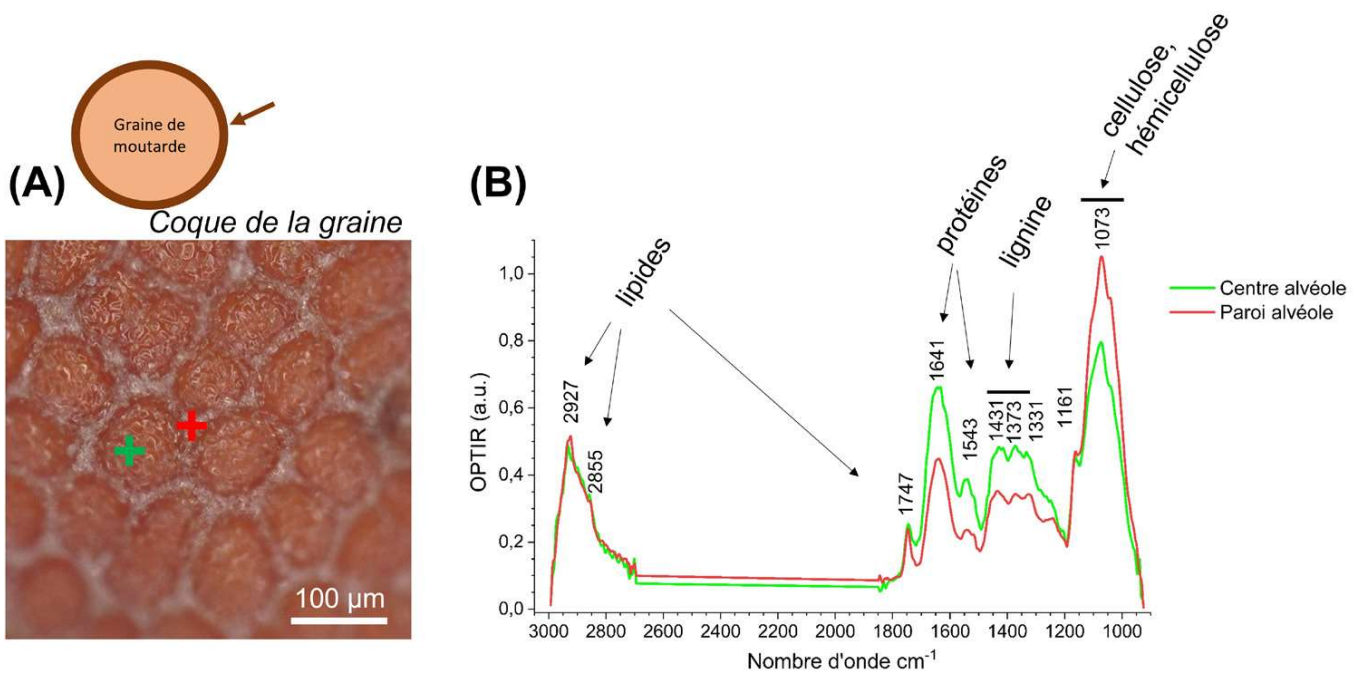


Figure 4 : (A) Image en microscopie à réflexion de la structure en alvéoles de l'enveloppe de graine de moutarde. (B) Spectres OPTIR moyens obtenus respectivement par mesures sur le cœur des alvéoles (en vert) et sur la paroi de ces alvéoles (en rouge).

CONCLUSION

La spectroscopie vibrationnelle est une méthode de caractérisation largement utilisée en sciences du vivant. La technique OPTIR (Optical PhotoThermal IR spectroscopy) est une nouvelle technique de microscopie utilisant un laser moyen-IR pulsé et accordable, qui induit des effets photothermiques à la surface d'un échantillon lorsque la longueur d'onde induit une transition vibrationnelle. Cette technologie permet une spectroscopie IR avec une résolution spatiale submicronique indépendante de la longueur d'onde IR, submicronique, identique à celle de l'imagerie Raman dans le visible, et ce, même sur des échantillons autofluorescents (ce que ne permet pas l'imagerie Raman). L'eau ayant peu de réponse photothermique, la technique est applicable sur les échantillons hydratés. L'OPTIR offre ainsi une mesure d'absorption IR de qualité, sans contact avec la surface, tout à fait adaptée aux applications histologiques et applicable en imagerie par balayage de l'échantillon à un nombre d'onde donné (durée d'acquisition d'une image 512x512 à partir de quelques minutes, selon le paramétrage choisi). Une attention particulière sera cependant portée au fait que les protocoles de préparation d'échantillon (paraffine, glutaraldéhyde) peuvent avoir un fort impact sur les mesures OPTIR comme sur toute mesure de spectroscopie vibrationnelle (IR ou Raman).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SIMON, G. Spectroscopies Vibrationnelles: Théorie, Aspects Pratiques et Applications., 2020. DOI:10.17184/eac.9782813002556
2. FURSTENBERG, R., KENDZIORA, C.A., PAPANTONAKIS, M.R., NGUYEN, V. & MCGILL, R.A. Chemical imaging using infrared photothermal microspectroscopy. In *Next-Generation Spectroscopic Technologies V*, **8374**, edited by: SPIE, 2012: 293–302.

3. ZHANG, D., LI, C., ZHANG, C., SLIPCHENKO, M.N., EAKINS, G. & CHENG, J.-X. Depth-resolved mid-infrared photothermal imaging of living cells and organisms with submicrometer spatial resolution. *Science Advances*, 2016, **82** (9) e1600521.
4. SARRA, A., BRUTTI, S., PALUMBO, O., CAPITANI, F., BORONDICS, F., APPETECCHI, G.B., CARBONI, N., ABDUL AHAD, S., GEANEY, H., RYAN, K. & PAOLONE, A. Solid-Electrolyte Interface Formation on Si Nanowires in Li-Ion Batteries: The Impact of Electrolyte Additives. *Batteries*, 2023, **9** (3) 148.
5. JUBB, A.M., REBECCA STOKES, M., MCALEER, R.J., HACKLEY, P.C., DILLON, E. & QU, J. Mapping ancient sedimentary organic matter molecular structure at nanoscales using optical photothermal infrared spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 2023, **177** 104569.
6. WANG, A.J., DILLON, E.P., MAHARJAN, S., LIAO, K.-S., MCELHENNY, B.P., TONG, T., CHEN, S., BAO, J. & CURRAN, S.A. Resolving Nanocomposite Interfaces via Simultaneous Submicrometer Optical-Photothermal Infrared-Raman Microspectroscopy. *Advanced Materials Interfaces*, 2021, **8** (5) 2001720.
7. MARCHETTI, A., BELTRAN, V., NUYTS, G., BORONDICS, F., DE MEYER, S., VAN BOS, M., JAROSZEWICZ, J., OTTEN, E., DEBULPAEP, M. & DE Wael, K. Novel optical photothermal infrared (O-PTIR) spectroscopy for the noninvasive characterization of heritage glass-metal objects. *Science Advances*, 2022, **8** (9) eabl6769.
8. BOUDERLIQUE, E., TANG, E., ZAWORSKI, J., COUDERT, A., BAZIN, D., BORONDICS, F., HAYMANN, J.-P., LEFTHERIOTIS, G., MARTIN, L., DAUDON, M. & LETAVERNIER, E. Vitamin D and Calcium Supplementation Accelerate Vascular Calcification in a Model of Pseudoxanthoma Elasticum. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23** (4) 2302.
9. PRATER, C., BAI, Y., KONINGS, S.C., MARTINSSON, I., SWAMINATHAN, V.S., NORDENFELT, P., GOURAS, G., BORONDICS, F. & KLEMENTIEVA, O. Fluorescently Guided Optical Photothermal Infrared Microspectroscopy for Protein-Specific Bioimaging at Subcellular Level. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, **66** (4) 2542–9.

10. KLEMENTIEVA, O., SANDT, C., MARTINSSON, I., KANSIZ, M., GOURAS, G.K. & BORONDICS, F. Super-Resolution Infrared Imaging of Polymorphic Amyloid Aggregates Directly in Neurons. *Advanced Science*, 2020, **7** (6) 1903004.
11. GUSTAVSSON, N., PAULUS, A., MARTINSSON, I., ENGDAHL, A., MEDJOUBI, K., KLEMENTIEV, K., SOMOGYI, A., DEIERBORG, T., BORONDICS, F., GOURAS, G.K. & KLEMENTIEVA, O. Correlative optical photothermal infrared and X-ray fluorescence for chemical imaging of trace elements and relevant molecular structures directly in neurons. *Light: Science & Applications*, 2021, **10** (1) 151.
12. PARK, S.-Y., KIM, J.-C., KIM, J.-H., YANG, S.-Y., KWON, O., YEO, H., CHO, K.-C. & CHOI, I.-G. Possibility of Wood Classification in Korean Softwood Species Using Near-infrared Spectroscopy Based on Their Chemical Compositions. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 2017, **45** (2) 202–12.
13. CHENG, S., HUANG, A., WANG, S. & ZHANG, Q. Effect of Different Heat Treatment Temperatures on the Chemical Composition and Structure of Chinese Fir Wood. *BioResources*, 2016, **11** (2) 4006–16.